

Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru

Bc. Zuzana Konečná

Diplomová práce
2009



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí
akademický rok: 2008/2009

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana KONEČNÁ**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Mikrobiologie biodegradace materiálu na bázi polyesteru**

Zásady pro vypracování:

1. Navrhnout a vyzkoušet metodiku pro práci s tímto materiálem.
2. Určit rychlost biodegradace v půdním prostředí.
3. Provéřit přítomnost a degradability nízkomolekulárních látek přítomných v materiálu.
4. Provést literární rešerši a zpracovat výsledky experimentů do formy DP.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Odborné publikace v databázových zdrojích na internetu

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

9. února 2009

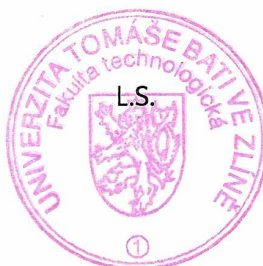
Termín odevzdání diplomové práce:

15. května 2009

Ve Zlíně dne 10. února 2009



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



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



ABSTRAKT

Cílem diplomové práce bylo zavést metodiku práce s novým materiálem Ecoflex. Byly připraveny jeho různé formy: fólie o tloušťce 100 μm , tenký povlak na perlitu a prášek. Tyto formy vzorku byly využity při testování biodegradability Ecoflexu, která byla sledována v prostředí půdy a vyzrálého kompostu. Biodegradabilita byla sledována analýzou plyných produktů metodou plynové chromatografie. Pro testování v půdním prostředí bylo využito 7 druhů zemědělských půd a vzorek ve formě fólií. Významná biodegradace Ecoflexu nebyla ani u jedné z půd zaznamenána. V kompostu byl Ecoflex testován ve formě fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku. Po asi 50 dnech bylo v kompostu dosaženo 2,4 % mineralizace vzorku ve formě fólií, 54 % mineralizace Ecoflexu ve formě tenkého povlaku na perlitu a 61 % u prášku. Tento významný rozdíl v biodegradabilitě různých forem Ecoflexu byl vysvětlen vyšším specifickým povrchem prášku a tenkého povlaku na perlitu ve srovnání s fóliemi.

Klíčová slova: Ecoflex, aromaticko-alifatický kopolyester, biodegradace, půda, kompost

ABSTRACT

The aim of the thesis was to set up a methodology of work with a new material called Ecoflex. Different forms of Ecoflex were prepared: 100 μm thick films, thin coating on the surface of perlite and powder. These forms of the sample were used for the testing of the biodegradability of Ecoflex, which was followed in soil and mature compost environments. The biodegradability was followed by analysis of gaseous products by gas chromatography. For testing in soil environment seven types of arable soils were used with the sample present in the form of film. Biodegradation of Ecoflex was on the limit of detection in all investigated soils. In the mature compost Ecoflex was tested in the form of film, thin coating on the surface of perlite and in the form of powder. After about 50 days of biodegradation

the levels of mineralization were 2,4 % for sample in the form of film, 54 % for Ecoflex in the form of thin coating on the surface of perlite and 61 % for powder. The significant differences in biodegradability of different forms of Ecoflex were explained by higher specific surfaces of powder and thin coating on the surface of perlite if compared with the film.

Keywords: Ecoflex, aromatic-aliphatic copolyester, biodegradation, soil, compost

Na tomto místě bych chtěla poděkovat doc.Mgr.Marku Koutnému, Ph.D. Za odborné vedení, cenné rady a všestrannou pomoc při vypracování diplomové práce. Dále patří mé poděkování celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření výborných pracovních podmínek. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat rodině, příteli a kamarádům za trpělivost a podporu při studiu.

Prohlašuji, že jsem na diplomové práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků, je-li to uvedeno na základě licenční smlouvy, budu uvedena jako spoluautorka.

Ve Zlíně

.....

Podpis diplomanta

OBSAH

ÚVOD	9
I LITERÁRNÍ REŠERŠE	11
1 BIODEGRADABILNÍ PLASTY	12
2 AROMATICKO-ALIFATICKÝ KOPOLYESTER - ECOFLEX	14
2.1 STRUKTURA MATERIÁLU ECOFLEX	14
2.2 VLASTNOSTI, ZPRACOVÁNÍ A POUŽITÍ MATERIÁLU ECOFLEX	15
2.2.1 Vlastnosti.....	15
2.2.2 Zpracování.....	15
2.2.3 Použití	16
2.3 SMĚSI ECOFLEXU SE ŠKROBEM	17
3 BIODEGRADACE POLYMERŮ	18
3.1 TESTOVÁNÍ BIODEGRADABILITY POLYMERŮ.....	18
3.1.1 Testování kompostovatelnosti a biodegradability kopolyesteru Ecoflex	19
4 BIODEGRADACE MATERIÁLU ECOFLEX	21
4.1 OVLIVNĚNÍ BIOLOGICKÉ DEGRADACE POLYMERŮ.....	22
4.1.1 Pohyblivost polymerních řetězců a krystalinita polymeru	22
4.1.2 Specifický povrch polymeru.....	23
4.1.3 Rozložení sekvencí alifatických a aromatických řetězců	24
4.1.4 Další faktory limitující degradaci polymerů.....	25
4.2 METODY TESTOVÁNÍ BIODEGRADACE MATERIÁLU ECOFLEX	25
4.2.1 Biodegradace v prostředí kompostu	25
4.2.2 Biodegradace v půdním prostředí.....	28
5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	30
II MATERIÁLY A METODIKA	31
6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA	32
6.1 CHEMIKÁLIE	32
6.2 ROZTOKY	33
6.3 ŽIVNÁ MÉDIA.....	36
7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY	39
8 METODIKA PROVEDENÝCH POKUSŮ	40
8.1 STERILIZACE.....	40
8.2 PŘÍPRAVA A CHARAKTERISTIKA VZORKU.....	40
8.2.1 Charakteristika vzorku	40
8.2.2 Příprava vzorku	41
8.3 CHARAKTERISTIKA SUBSTRÁTŮ.....	42
8.3.1 Půdní substrát	42
8.3.2 Substrát vyzrálého kompostu	46

8.4	POKUS O IZOLACI DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ NA MINERÁLNÍM AGARU.....	47
8.5	STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI VZORKU POMOCÍ SLEDOVÁNÍ PRODUKCE OXIDU UHLIČITÉHO	48
8.5.1	Příprava biodegradačního pokusu	48
8.5.2	Biodegradace v půdním prostředí.....	50
8.5.3	Biodegradace v prostředí vyzrálého kompostu	52
8.5.4	Analýza oxidu uhličitého plynovou chromatografií.....	54
8.5.5	Postup měření.....	54
8.5.6	Provzdušňování lahví (bioreaktorů).....	55
8.5.7	Zpracování naměřených dat	55
8.6	STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY POMOCÍ MĚŘENÍ OBSAHU ATP	57
8.6.1	Luminometrie – měření obsahu ATP	57
8.6.2	Nasazení pokusu.....	58
8.6.3	Postup měření celkového ATP	59
III	VÝSLEDKY A DISKUSE	60
9	CHARAKTERISTIKA VZORKU A SUBSTRÁTŮ.....	61
9.1	CHARAKTERISTIKA VZORKU	61
9.2	CHARAKTERISTIKA POUŽITÝCH PŮD A KOMPOSTŮ	64
10	POKUS O IZOLACI DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ NA MINERÁLNÍM AGARU	67
11	POSOUZENÍ BIODEGRADABILITY VZORKU ECOFLEX Z HLEDISKA PRODUKCE OXIDU UHLIČITÉHO.....	71
11.1	BIODEGRADACE VZORKU V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ	71
11.2	BIODEGRADACE VZORKU V PROSTŘEDÍ VYZRÁLÉHO KOMPOSTU	74
12	STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY POMOCÍ MĚŘENÍ OBSAHU ATP	80
	ZÁVĚR	82
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	84
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	87
	SEZNAM OBRÁZKŮ	88
	SEZNAM TABULEK.....	90

ÚVOD

Více než před půl stoletím začaly syntetické polymery nahrazovat přírodní materiály v téměř všech oblastech a nyní se staly nepostradatelnou částí našeho života.

Syntetické plasty jsou velmi používané v obalovém průmyslu, kde tvoří asi 30 % veškerého použití plastů. Nahrazují obalové materiály jako papír a jiné výrobky založené na celulóze, díky jejich lepším fyzikálním a chemickým vlastnostem odolným vůči environmentálním vlivům. Časem se odolnost a životnost plastů neustále zlepšovala. Dramatické zvyšování produkce plastů během posledního desetiletí v kombinaci s jejich stálostí však vedly ke zvyšujícím se problémům týkající se odpadového hospodářství.

Jedním z řešení ke zmírnění zátěže životního prostředí bylo navržení nových biodegradabilních polymerů použitelných v různých odvětvích. Ukázalo se, že hlavně polymery s heteroatomy v jejich hlavním řetězci jako polyestery, polyethery, polyamidy nebo polyuretany mohou být degradovány mikroorganismy. Od období rozvoje biodegradabilních plastů dominovaly hlavně materiály založené na polyesterech, např. mikrobiálně produkováný polyester poly(β -hydroxybutyrát) (PHB) nebo alifatické polyestery jako poly(ϵ -kapolakton). Staly se tak skupinou polymerů, které mohou být brány v úvahu jako náhrada běžných plastů, např. aromatických polyesterů s vysoce komerčním úspěchem jako je poly(etylen tereftalát (PET) a poly(butylen tereftalát) (PBT).

Alifatické polyestery se sice vyznačují snadnou biodegradabilitou, avšak jejich materiálové vlastnosti omezují jejich aplikaci v různých odvětvích. Nadějnější alternativu však představují alifaticko-aromatické kopolyestery, které byly uvedeny na trh pod obchodním názvem Ecoflex. Tyto kopolyestery překonávají nevýhody mnoha alifatických materiálů a spojují výhodné materiálové vlastnosti s biodegradabilitou. Degradace tohoto kopolyesteru byla zkoumána v prostředí kompostu pomocí termofilních mikroorganismů. Výsledky studií ukazují rapidní degradaci kopolyesteru. Nicméně otázkou stále zůstává, zda probíhá degradace kopolyesteru i za

mírných podmínek pomocí mikroorganismů, jiných než termofilních. A právě to je i předmětem zkoumání této diplomové práce.

I. LITERÁRNÍ REŠERŠE

1 BIODEGRADABILNÍ PLASTY

Biodegradabilní plasty - pod tímto pojmem jsou zahrnuty plasty, jejichž degradace je výsledkem působení mikroorganismů. Tyto plasty nemusí být vyrobeny z obnovitelných zdrojů, existují i biodegradabilní plasty vyrobené na bázi ropy. Také nemusí být nutně kompostovatelné. Do kompostovatelných plastů řadíme plasty degradovatelné biologickými procesy během podmínek kompostování na oxid uhličitý, vodu, anorganické složky a biomasu [1].

Biologicky rozložitelné plasty rozhodně nepředstavují hrozbu pro konvenční plasty. Jsou však významnou alternativou vhodnou zejména pro výrobu jednorázových výrobků, jako jsou sáčky na bioodpad, jednorázové nádoby (příbory, kelímky, tácky), obaly (např. potravinový průmysl: kelímky od jogurtu, láhve na vodu, sáčky na zeleninu apod.), některé lékařské pomůcky (např. jednorázové rukavice) a další. Využití biologicky rozložitelných plastů tak může přispět ke snížení obrovského množství plastových odpadů vznikajících právě z těchto jednorázových produktů [1].

V současné době se vyrábí řada polymerů, které splňují kritéria biodegradovatelnosti. K nejvýznamnějším patří:

- kyselina polyléččná (PLLA),
- poly- ϵ -kaprolakton (PKL),
- poly(oxyetylen) (POE),
- poly(vinylalkohol) (PVA),
- alifatické polyestery na bázi diolů a dikarboxylových kyselin (Bionolle),
- aromaticko-alifatické kopolyestery (Ecoflex) a
- poly(esteramidy) (BAK) [2].

Ve většině případů jsou však ceny těchto polymerů několikanásobně vyšší ve srovnání s konvenčními plasty, a to zásadně omezuje možnosti jejich technického využití [2].

Pokud mají tyto nové materiály najít uplatnění na trhu musí být splněny následující požadavky:

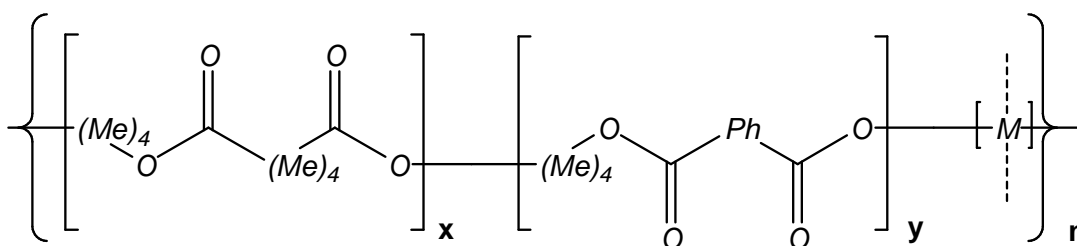
- standardní testovací metody (DIN 54900, CEN, ISO, ASTM)
- dobré vlastnosti srovnatelné s běžnými druhy plastů a snadnou zpracovatelnost plastů
- konkurenceschopné ceny a dobrou distribuční síť [3].

2 AROMATICKO-ALIFATICKÝ KOPOLYESTER - ECOFLEX

Společnost BASF začala v roce 1998 s komerční výrobou biodegradabilního kopolyesteru pod obchodní značkou Ecoflex založeném na syntetických surovinách (ropa) [3]. Tento produkt je certifikovaný podle německého standardu DIN 54900 vzhledem k jeho biologické degradaci a kompostovatelnosti [4].

2.1 Struktura materiálu Ecoflex

Ecoflex je aromaticko-alifatický kopolyester založený na kyselině tereftalové, kyselině adipové, 1,4-butandiolu a modulárních jednotkách (Obr.1). Ecoflex se připravuje transesterifikací poly(butyltereftalátu) (PBT), kyseliny adipové a 1,4-butandiolu [3].



Obr. 1: Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru

(*Me* = metyl, *Ph* = fenyl, *M* = modulární jednotky) [3].

Výrobní vlastnosti jsou upraveny tak, aby vyhovovaly požadavkům na biodegradabilní plasty, tedy kombinace zpracovatelnosti, užitečných vlastností a biodegradability. To je dosaženo vložení modulárních jednotek, na které jsou napojeny statisticky rozložené jednotky kopolyesteru složené z 1,4-butandiolu, kyseliny adipové a kyseliny tereftalové. Tento modulární systém umožňuje začlenění hydrofilních monomerů s větvením, což vede k prodloužení řetězce a tím i k narůstání molekulové hmotnosti (Obr.1) [3].

2.2 Vlastnosti, zpracování a použití materiálu Ecoflex

2.2.1 Vlastnosti

Aromaticko-alifatické kopolyestery spojují biodegradabilitu alifatických polyesterů s fyzikálními vlastnostmi a tepelnými vlastnostmi aromatických polyesterů [5].

V tabulce (Tab.1) jsou uvedeny mechanické vlastnosti Ecoflexu, které jsou srovnány s vlastnostmi nízkohustotního polyethylenu (LDPE). Fólie mají odolnost vůči mechanickému poškození, v čemž překonávají LDPE, jsou pružné, odolné proti vodě a změnám vlhkosti. Od LDPE se liší prodyšností fólií díky jejich mírné propustnosti vodním parám [3,6]

Důležitou vlastností kopolyesteru Ecoflex je však jeho kompostovatelnost a biodegradabilita.

Tab. 1: Základní materiálové vlastnosti materiálu Ecoflex (50 μm fólie) [3,6,7]

Vlastnost	Fyzikální jednotka	Ecoflex	LDPE
Hustota	g/cm^3	1,25 – 1,27	0,922 – 0,925
Teplota tání T_m	$^\circ\text{C}$	110 – 115	111
Teplota skelného přechodu T_g	$^\circ\text{C}$	- 30	-
Tvrdość (podle Shorea)	-	32	48
Průzračnost	%	82	89
Pevnost v tahu	N/mm^2	32/36	26/20
Mez pevnosti	N/mm^2	32/36	-
Propustnost kyslíku	$\text{cm}^3(1/\text{m}^2.\text{d}.\text{bar})$	1600	2900
Míra pronikání vodní páry	$\text{g}(1/\text{m}^2.\text{d})$	140	1,7

2.2.2 Zpracování

Ecoflex může být zpracováván způsoby používanými i pro LDPE a to např. vyfukováním fólií. V závislosti na dostupném vybavení pro zpracování

polymerů lze získat i velmi tenké fólie o tloušťce 10 μm . To pak vede k mnoha možnostem použití. Vyrábí se barevné fólie, provádí se úprava proti pronikání vodní páry, pro dobrou průhlednost fólií a další úpravy dle požadavků zákazníka. Problémové vlastnosti fólií např. propustnost vodním parám, mohou být upraveny použitím speciálních přísad [3].

2.2.3 Použití

Typickými aplikacemi materiálu Ecoflex jsou kompostovací pytle pro organický odpad, zemědělské fólie (mulčovací fólie), fólie pro domácnost, obalové materiály nebo laminace (např. papíru), produkty na bázi škrobu (např. tácky, misky, kelímky) pro průmysl rychlého občerstvení [3,6].

Kompostovací pytle pro organický odpad

Ecoflex splňuje požadavky na kompostovací pytle, což zahrnuje odolnost fólií proti vodě, dobu, po kterou zůstává stabilní vůči organickému odpadu, a také bezproblémové zpracování v kompostovacím zařízení [3,6].

Mulčovací fólie

Výhodou mulčovacích fólií vyrobených z biodegradabilních plastů jako je Ecoflex je ta, že fólie mohou být po sklizni zaorány spolu s rostlinnými zbytky do půdy, kde se fólie postupně zcela rozloží [3].

Laminované materiály

Laminace materiálů například papíru je používána, když je potřeba zvýšené odolnosti proti vlhkosti a tuku. Takovýto materiál nabízí další výhodu a to bezproblémovou likvidaci obalů (např. papírových obalů, kelímků na pití, obalů z rychlého občerstvení, krabic a různých nádob pro mražené výrobky) zašpiněných zbytky jídla - kompostováním [3,6].

Průhledné fólie pro potravinové obaly

Přidáním speciálních přísad a optimalizováním podmínek zpracování lze získat i průhledné fólie. Tyto fólie mohou být využity pro balení potravin např. masa, zeleniny a ovoce [3,6].

2.3 Směsi Ecoflexu se škrobem

Škrob patří mezi levné suroviny, které jsou dostupné ve velkém množství. Jeho nevýhodou však je, že nemůže být v přírodním stavu zpracován jako termoplastické materiály bez potřebných přísad. Kromě toho mají škrobové materiály poněkud omezený rozsah použití díky jejich vysoké absorpci vody. Pro získání zcela biodegradabilní a hydrofobní škrobové směsi lze škrob smíchat z hydrofobními biodegradabilními polymery např. s Ecoflexem. Ecoflex těmto směsím přináší odolnost proti vodě, která je vyžadována pro jejich další aplikace. Kromě toho, tyto materiály vykazují dobré mechanické vlastnosti jako je vysoká pevnost, propustnost kyslíku a vodním parám, jsou antistatické, příjemné na dotek, je možné na ně tisknout [3,6]. Dále směsi kopolyesteru se škrobem přináší snížení výrobních nákladů oproti výrobě samotného kopolyesteru [3].

3 BIODEGRADACE POLYMERŮ

Biodegradace je proces, kdy dochází k rozkladu organického substrátu pomocí mikroorganismů. Organické materiály mohou být rozloženy aerobně v přítomnosti kyslíku za vzniku oxidu uhličitého, vody a mikrobiální biomasy, nebo anaerobně bez přítomnosti kyslíku na oxid uhličitý, vodu, metan a biomasu [8].

Biodegradace polymerů je ovlivněna řadou faktorů, jako jsou vlastnosti polymeru (např. mobilita, krystalinita, molekulová hmotnost, typ funkčních skupin a substituentů, přidaná změkčovadla a jiná aditiva), typ mikroorganismů (např. mezofilní, termofilní) a podmínky prostředí (např. teplota, vlhkost, koncentrace kyslíku, přítomnost živin, hodnota pH) [8, 9].

Biodegradace probíhá tak, že nejprve musí dojít k narušení povrchu polymeru vlivem fyzikálně-mechanických faktorů. Následně je polymer převeden na jeho monomery a ty jsou pak mineralizovány. Většina polymerů je tak objemná, že nemůže projít buněčnou membránou dovnitř buněk. Extracelulární enzymy vyloučené mikroorganismy do prostředí rozkládají polymerní řetězec na menší fragmenty (oligomery, monomery) a ty pak mohou proniknout vnější bakteriální membránou do buněk, kde jsou využity mikrobiálními buňkami jako zdroj uhlíku a energie. Tento proces se nazývá depolymerizace. Následně dochází k mineralizaci látek až na konečné produkty např. CO_2 , H_2O popř. CH_4 [8].

3.1 Testování biodegradability polymerů

Existuje mnoho metod vhodných pro testování biodegradabilních polymerních materiálů. Některé z těchto metod jsou přijaty mezinárodními organizacemi jako jsou International Standard Organization (ISO) a American Society for Testing and Materials (ASTM). Standardy ISO jsou v podstatě shodné se standardy potvrzenými Evropskou komisí pro standardizaci (CEN) a Německou organizací pro standardy (DIN) [9].

3.1.1 Testování kompostovatelnosti a biodegradability kopolyesteru Ecoflex

Kompostovatelnost Ecoflexu je testována pomocí německého technického standardu DIN V 54900. Tento standard se skládá ze 3 částí uvedených v tabulce (Tab.2) [3]:

Tab. 2: DIN V 54900 – Zkoumání kompostovatelnosti polymerních materiálů [3].

Část	Popis
1	Chemický test (pro ověření obsahu např. těžkých kovů)
2	Vyhodnocení biodegradability polymerních materiálů pomocí laboratorních testů (měření uvolněného CO ₂ během degradace)
3	Testování kompostovatelnosti za reálných podmínek (stanovení kvality kompostu)

Na základě výsledků z testování pomocí DIN V 54900 je materiál certifikován a označen pomocí DIN CERTCO jako „kompostovatelný“. Další testování kromě výše zmíněných testů je zaměřené na prokázání kompletní biodegradace materiálů [3].

Existuje velké množství testů využívaných pro posouzení míry degradace polymerů. Mezi ně patří např. respirometrické metody, pomocí kterých se zjišťuje množství uvolněného oxidu uhličitého po vystavení polymeru houbám, bakteriím, aktivovanému kalu, kompostu nebo půdě. Některé testy používají sledování produktů reakce, úbytek hmotnosti polymeru nebo změny v jejich fyzikálních vlastnostech jako např. pevnosti v tahu (vlastnosti jako pevnost v tahu jsou velmi citlivé na změny molární hmotnosti polymerů, která je často indikátorem degradace) a měří se pomocí různých analytických metod: skenovací elektronová mikroskopie (SEM) - slouží pro sledování tepelných vlastností a morfologie před a během degradace, diferenciální skenovací kolorimetrie (DSC) slouží k určení bodu tání, teploty tání a teploty rozkladu. Dále se využívá infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), nukleární magnetická rezonance (NMR), rentgenová difrakční analýza (XRD), skenovací snímací mikroskopie (AFM) [8,10].

Dále mohou být posuzovány viditelné změny u polymerních materiálů následkem biodegradačního procesu. Sleduje se např. popraskání povrchu polymeru, jeho rozpad na menší části, tvorba děr, prasklin, barevné změny, tvorba biofilmů na povrchu. Tyto změny však nevysvětlují mechanismus biodegradace, ale jsou využity k signalizaci mikrobiálního napadání [8,9].

Je důležité mít kromě testovaných vzorků také kontrolní vzorky (tzv. blank), které slouží pro posouzení a odfiltrování procesů, které nemají vztah k biodegradaci vzorku.

4 BIODEGRADACE MATERIÁLU ECOFLEX

Polymery podléhající kontrolované biologické degradaci pomocí mikroorganismů se staly zajímavým přínosem poslední doby. Do této skupiny spadají i polyestery, které zde hrají důležitou roli díky snadné hydrolizovatelnosti esterových vazeb. Zatímco aromatické polyestery jako je např. poly(ethylenetereftalát) (PET) vynikají svými materiálovými vlastnostmi, jsou téměř rezistentní vůči mikrobiálnímu napadení, většina alifatických polyesterů jsou biologicky rozložitelné, ale mají horší vlastnosti důležité pro jejich aplikaci. Spojením těchto dvou polyesterů vznikne dobře biodegradovatelný materiál s výhodnými materiálovými vlastnostmi. Tento materiál se nazývá Ecoflex [5].

Testování biologické degradace aromaticko-alifatického kopolyesteru je prováděno za aerobních podmínek.

Pro zahájení degradace kopolyesteru Ecoflex je důležitá enzymaticky katalyzovaná hydrolýza esterových vazeb polymeru. Nejdříve se tedy enzym váže na polymerní substrát a pak katalyzuje hydrolytické rozštěpení. Kvůli nerozpustnosti ve vodě a velikosti polymerních molekul, mikroorganismy nejsou schopny navázat polymery přímo dovnitř svých buněk, kde probíhá většina biochemických procesů, ale nejdříve musí vyloučit extracelulární enzymy, které depolymerizují polymery vně buněk. Když je molární hmotnost polymerů dostatečně snížena, dojde k vytvoření ve vodě rozpustných meziproductů, které jsou lépe dostupné mikrobiálním buňkám a mohou pak být metabolizovány. Vyšší molekulová hmotnost polymerů vede k poklesu jejich rozpustnosti a díky tomu jsou hůře napadnutelné mikroorganismy. Výsledkem tohoto procesu jsou konečné produkty jako voda, oxid uhličitý, nová biomasa. Ve většině případů je prvním krokem degradačního procesu snížení molární hmotnosti, což je limitující faktor biodegradace plastů. Vzhledem k tomu že extracelulární enzymy jsou dost velké na to, aby mohly proniknout hlouběji do polymerního materiálu, působí jen na jejich povrchu a provádí jeho narušení [4,5,8,11].

4.1 Ovlivnění biologické degradace polymerů

Biodegradabilita polymerů je ovlivněna nejen chemickou strukturou polymerů, zejména přítomností funkčních skupin a rovnováhou mezi hydrofilitou a hydrofobitou, ale také strukturou jako je krystalinita, orientace, délka a rozložení sekvencí alifatických a aromatických řetězců a jiné vlastnosti (např. specifický povrch polymeru) [5].

Obecně, polyestery složené z alifatických monomerů jsou degradovány lipázami, zatímco většina aromatických polyesterů jsou biologicky inertní. V aromaticko-alifatických kopolyesterech se biodegradabilita snižuje s obsahem aromatických konstituentů. U kopolyesteru složeného z kyseliny adipové, tereftalové a 1,4-butandiolu, je jako limit pro biodegradabilitu uváděn obsah tereftalové kyseliny okolo 50-60% [11].

4.1.1 Pohyblivost polymerních řetězců a krystalinita polymeru

Z dřívějších poznatků [12] vyplývá, že řídicím faktorem biodegradace polyesterů je pohyblivost jejich řetězců. V zásadě enzymatická depolymerizace polyesterů a štěpení esterů s nízkou molární hmotností je řízeno různými faktory. Nezbytností dlouhých polymerních řetězců je proniknout do aktivního místa hydroláz, které se často nachází ve více či méně hluboké dutině. Proto mobilita polymerních řetězců hraje důležitou roli ovlivňující jejich degradabilitu. Protože mobilita souvisí s bodem tání materiálu, zdá se být nepravděpodobné, že mohou být přijatelnou rychlostí degradovány vysokotající polyestery jako PET. Přesto výsledky studií ukazují, že i aromatické polyestery s vysokým bodem tání mohou být degradovány a to pomocí hydrolázy z *T. fusca* [11].

Výsledky studie zaměřené na enzymatickou hydrolýzu polyesterů [12] dále ukazují, že délka alifatických sekvencí v kopolymeru nesouvisí s biodegradací rychlostí, ale že hlavním vlivem je, jak pevně jsou polymerní řetězce fixovány v krystalizační oblasti materiálu. To je charakterizováno bodem tání materiálu. Kopolyestery s delšími aromatickými sekvencemi mají za následek vyšší teplotu tání a tedy i nižší rychlost degradace. Pro

aromatické kopolyestery se významně zvyšuje citlivost k enzymatickému napadení, když bod tání v krystalizační oblasti není vyšší než 30 – 40°C [12].

Ve studii [13] bylo zaznamenáno, že krystalinita je parametrem, který silně ovlivňuje biologickou degradaci polyesterů. Bylo prokázáno, že amorfni části v semikrystalických polymerech jsou degradovány rychleji než krystalické polymerní části. Podle výsledků popsanych Martenem [12], souvisí enzymatická rychlost degradace polyesterů s rozdíly v teplotě tání polyesteru a teplotě degradačního procesu. Tento jev byl vysvětlen tím, že aktivní místo enzymů degradijící polyester (hlavně lipázy) je situováno uvnitř proteinu a proto musí být polymerní řetězec schopný dosáhnout tohoto katalytického centra. To vyžaduje určitou mobilitu polymerního řetězce. Zatímco v amorfni části polymeru (nad teplotou skelného přechodu T_g) jsou polymerní řetězce vysoce pohyblivé a v důsledku toho rapidně degradijí, polyesterové části v krystalické oblasti jsou vysoce fixovány a zde je degradační rychlost podstatně nižší. Mobilita polymerního řetězce je určena rozdílem mezi degradační teplotou a teplotou tání v krystalických strukturách. Zatímco degradační rychlost semikrystalických polyesterů se výrazně zvyšuje s vyšší teplotou během testu, rychlost hydrolýzy nanočástic je téměř nezávislá na testovací teplotě. Polyestery s částicemi v nanoměřítku se projevují amorfni strukturou a větší částice tvoří semikrystalickou strukturu [13].

4.1.2 Specifický povrch polymeru

V případě, že degradační rychlost závisí na specifickém povrchu polymeru, je možné tuto rychlost zvýšit a to zvýšením specifického povrchu použitím nanočástic polyesterů. První experimenty týkající se enzymatické degradace nanočástic polyesterů byly publikovány autorem Wu a spolupracovníky [14], kdy bylo dosaženo 1000krát vyšších hodnot rychlosti degradace nanočástic než u polymerních fólií. Podle studie [13] byla srovnávána degradace mezi polyesterovými fóliemi a nanočásticemi pomocí dvou typů enzymů (lipáza získaná z *Candida cylindracea* - CcL a lipáza z *Pseudomonas species* - PsL). Na rozdíl od fólií bylo úplné hydrolýzy

nanočástic polyesteru dosaženo pomocí enzymu CcL během několika minut a u fólií za několik hodin či dní [13,15].

Změny specifického povrchu lze dosáhnout změnou velikosti testovaného materiálu nebo použitím jeho různého množství. Zvýšení specifického povrchu změnou v počtu použitých fólií mělo za následek lineární zvyšování enzymatického rozštěpení esterů. Snížením rozměru nanočástic se degradační rychlost výrazně zvýšila [13].

4.1.3 Rozložení sekvencí alifatických a aromatických řetězců

Podle studie [16] je biodegradabilita aromatických částí kopolyesterů zejména závislá na počtu opakujících se jednotek. Proto nepravidelnost kopolyesterových řetězců a nepravidelné rozložení délky bloku uvnitř kopolymerů, jsou důležité pro porozumění biodegradačního chování alifatico-aromatických kopolyesterů. Složení délky řetězců a rozložení sekvencí kopolyesterů obsahujících polybutylen tereftalátové jednotky byly zkoumány pomocí NMR spektroskopie [16].

V této studii [16] byly syntetizovány čtyři biodegradabilní alifatico-aromatické náhodné kopolyestery pomocí polykondenzace s butylen tereftalátem (40-60 mol%). Biodegradabilní chování bylo sledováno za podmínek kompostování. Pomocí NMR analýzy bylo zjištěno, že po degradaci byla průměrná délka sekvencí alifatických řetězců snížena a aromatických zvýšena [16].

Práce [17] byla zaměřena na kopolyester obsahující 70 mol% PBT opakujících se jednotek poly(butylen 1,12-dodekandioát). Díky PBT jednotkám se významně zlepšily tepelné a mechanické vlastnosti. Vzorek nevykazoval stejnou biodegradabilitu typickou pro poly(alkylendikarboxyláty) a to díky sekvencím opakujících se jednotek PBT, které jsou příliš dlouhé na to, aby usnadnily proces biodegradace. I teplota tání je příliš vysoká na to, aby bylo získáno dostatečné mobility řetězců. Z tohoto důvodu, je nezbytné modulovat obsah ko-jednotek této skupiny kopolymerů obsahující alifatické a aromatické jednotky, aby bylo získáno více žádoucích vlastností a to fyzikálních vlastností a biodegradability [17].

4.1.4 Další faktory limitující degradaci polymerů

Dalším faktorem ovlivňujícím biodegradaci je její doba trvání. Složení, hmotnost a molekulová hmotnost polymeru se mění s dobou trvání biodegradace. Dochází k poklesu hmotnosti i molekulové hmotnosti polymeru. Alifatické složky se degradují mnohem rychleji než aromatické. To nastává díky tomu, že alifatické řetězce jsou snáze napadány a rozštěpeny pomocí enzymů [16].

Výsledky degradace mohou být ovlivněny také nehomogenitou prostředí reakce např. kompostu (příliš vlhká nebo suchá místa nebo přilnutí polymerních složek ke stěně reaktoru), představující možné vysvětlení existence zbytkových polymerů [3].

4.2 Metody testování biodegradace materiálu Ecoflex

4.2.1 Biodegradace v prostředí kompostu

V práci [18] byla prováděna degradace Ecoflexu v prostředí průmyslového kompostu, kompostu obsahujícím aktivovaný kal, v půdě a mořské vodě. Ukázalo se, že nejlepších výsledků degradace bylo dosaženo za kompostovacích podmínek [18]. Kompostování je tedy doporučováno jako nejvhodnější způsob využití biodegradabilních obalových materiálů a polymerů.

Současně s rozvojem nových biodegradabilních kopolyesterů se zvýšilo úsilí identifikovat mikroorganismy zodpovědné za degradaci těchto polymerů hlavně v prostředí kompostu, který je zdrojem termofilních mikroorganismů. A právě termofilní aktinomycéty jsou skupinou, které se aktivně podílí na degradaci aromaticko-alifatických kopolyesterů. Jako nejvíce účinným mikroorganismem v degradaci Ecoflexu byla shledána *Thermomonospora fusca* a extracelulární hydroláza (TfH) zodpovědná za rozštěpení polyesteru. Degradční charakteristika TfH se významně liší od běžných lipáz. Zatímco lipázy potřebují povrchovou aktivaci a jsou jen schopny rozštěpit esterové vazby na hydrofobním povrchu, TfH umí také hydrolyzovat rozpuštěné estery,

což je většinou úlohou esteráz. To znamená, že TfH jsou kombinací lipáz a esteráz [11].

Ve studii [19] byl pro degradační test použit polymerní film kopolyesteru Ecoflex, minerální médium a suspenze mikroorganismů kompostu (předem vyizolované aerobní degradační mikroorganismy). Inkubace byla prováděna se směsí mikroorganismů při různých teplotách. Nejlépe vyšly výsledky při teplotách vyšších než 40°C, což odpovídá termofilním mikroorganismům. Po 14 dnech inkubace došlo k úbytkům hmotnosti polymeru (po srovnání s nenačkovanými polymery). Bylo nalezeno 61 druhů termofilních mikroorganismů. Z 30 nalezených bakteriálních druhů bylo pouze 5 druhů schopno rozkládat polymer, z toho 2 druhy vykazovaly pouze slabou degradační aktivitu (váhový úbytek polymeru byl 0,06–0,15 mg/týden.cm²). Žádné z nalezených hub nebyly schopné rozkladu polymeru (váhový úbytek polymeru < 0,06 mg/týden.cm² = detekční limit). Co se týče termofilních aktinomycét, jen 4 z 29 nalezených druhů nevykazovaly významnou degradační aktivitu (váhový úbytek polymeru < 0,06 mg/týden.cm²). Dva druhy termofilních aktinomycét rozložily polymer během 7 dní až z 90 % (váhový úbytek > 2 mg/týden.cm²). Identifikací těchto aktinomycét bylo zjištěno, že patří do rodu *Thermomonospora*. Konkrétně pro další zkoumání degradace byla použita aktinomycéta *Thermomonospora fusca* (*T. fusca*). Po 7 dnech inkubace s bakterií *T. fusca* došlo k úplnému rozpadu polymeru. Bylo prokázáno, že rychlost degradace polymeru s aktinomycétou *T. fusca* (20,6 mg/týden.cm²) byla až desetkrát vyšší než s použitím adaptované směsi kultur z kompostu (2,3 mg/týden.cm²) [19].

Tento pokus byl zaměřen především na zjištění druhů mikroorganismů podílejících se na degradaci kopolyesteru a jejich izolaci. Dále zde byla zkoumána rychlost degradace použitím vybraného degradačního mikroorganismu (*T. fusca*) a směsných kultur termofilních bakterií.

Jiná práce [4] se zabývala degradací kopolyesteru Ecoflex s použitím konkrétního druhu mikroorganismu *T. fusca*, prokázaným, z dřívějších studií, degradací tohoto polymeru. Tato práce byla zaměřena na sledování produktů degradace. Degradační test s *T. fusca* byl prováděn při 55°C po dobu 21 dní

v kapalném syntetickém médiu přidáním kopolyesteru ve formě prášku. Byly sledovány degradační produkty a meziprodukty pomocí gelové permeační chromatografie (GPC) a plynové chromatografie (GC). Metodou GPC nebyly zpozorovány žádné zbytky polymeru ani hromadění aromatických oligomerů. Tvorba rozpustných meziproduktů byla analyzována metodou plynové chromatografie, kdy nebylo detekováno žádné významné množství rozpustných diolů a dvojsytných kyselin, ani aromatické a alifatické oligomery. Více než 99 % výchozího polymeru bylo depolymerizováno na monomery (1,4-butandiol, tereftalát a adipát). Bylo prokázáno, že delší aromatické sekvence kopolyesteru jsou enzymaticky rozštěpeny a nezůstávají ve formě nerozpustných nebo rozpustných zbytků polymeru. Krátké rozpustné oligomerní meziprodukty jsou však hydrolyzovány na monomery až za 3 týdny a metabolizovány jen když je přítomna směsná mikrobiální populace. Ukázalo se, že *T. fusca* snadno depolymerizuje Ecoflex, ale není schopna snadno metabolizovat vzniklé monomery a oligomery. To bylo vyřešeno přidáním směsné kultury mikroorganismů z kompostu po sedmidenní degradaci s *T. fusca* [4].

Dále byla zjišťována ekotoxicita produktů degradace pomocí ekotoxikologických testů s perloočkou *Daphnia magna* a s luminiscenční bakterií *Photobacterium phosphoreum*. Sledování toxicity meziproduktů rozpustných ve vodě je velmi důležité z toho důvodu, že tyto meziprodukty mohou snadno pronikat do podzemních vod, nebo mohou být absorbovány organismy. U obou testů depolymerizační produkty nevykazovaly žádné kriticky toxické chování [4,6].

Za podmínek řízeného kompostování byl prováděn i další test [3] použitím směsných kultur mikroorganismů obsažených v kompostu. Degradační rychlost uvedená v procentech teoretického oxidu uhličitého dosáhla po ukončení testu (124 dní) 95 %. Po ukončení testu byly z kompostu extrahovány zbytky polymeru a následně analyzovány pomocí GPC. Zbytky polymeru tvořily 2,3 % z počátečního množství polymeru (15 g). Nebyly zde detekovány žádné aromatické oligomerní meziprodukty. Dále byly tyto polymerní zbytky analyzovány pomocí NMR. Byl zde zaznamenán významný

nárůst obsahu aromatických kyselin, který značil pomalou degradaci aromatických složek [3].

V práci [20] byly testovány 3 biodegradabilní mulčovací fólie o různé tloušťce a barevnosti (bílé a černé): 25 μ m bílá fólie, 35 μ m bílá fólie a 35 μ m černá fólie. Byly testovány ve vyzrálém zahradnickém kompostu při 58°C. Bylo dosaženo viditelně rychlejší degradace bílé fólie oproti černé. Bílá fólie se začala rozpadat a tvořit praskliny během prvních dvou týdnů testování, zatímco černá fólie se rozkládala pomaleji asi kolem 8 týdnů. Byla testována i klasická mulčovací fólie z LDPE, která nevykazovala během testování žádnou viditelnou degradaci. Také byla měřena produkce CO₂, kdy za 120 dní inkubace bylo dosaženo u všech testovaných biodegradabilních fólií více než 60 % mineralizace a u pozitivní kontroly (kukuřičný škrob) bylo dosaženo více než 70 % [20].

4.2.2 Biodegradace v půdním prostředí

Většina studií je zaměřena na degradaci kopolyesteru pomocí termofilních mikroorganismů, které se vyznačují rychlou a kompletní degradací polymeru. Otázkou pak zůstává, jestli je Ecoflex rozložitelný mikroorganismy za jiných než termofilních podmínek [21].

Tím se zabývala práce [21], která zkoumala využití aerobních mezofilních bakterií k rozkladu kopolyesteru Ecoflex. Z půdy byly izolovány mezofilní mikroorganismy (bakterie, houby a kvasinky). Ecoflex byl použit ve formě tenkých filmů a naočkován suspenzí půdních mikroorganismů. Inkubace probíhala na Petriho miskách s minerálním agarem při 30°C po dobu 21 dnů. Dále byl proveden pokus v reakčních lahvích s polymerem ve formě granulí, opět naočkováným půdní suspenzí. Inkubace probíhala při 22°C po dobu 30 dnů. Byly sledovány viditelné změny degradovaných filmů a zaznamenávány jejich váhové úbytky. Jako nejlepším degradérem z 29 nalezených mikroorganismů byla shledána bakterie *Bacillus subtilis*, která vykazovala jak zjevné známky degradace filmu, tak i největší úbytek hmotnosti filmu (2 mg). Degradční meziprodukty byly sledovány pomocí GC a GC-MS, kdy byla v médiu po degradaci nalezena přítomnost adipové

kyseliny a menší množství tereftalové kyseliny. Vzorke, které vykazovaly známky degradace byly prozkoumány gelovou permeační chromatografií k zjištění molekulových hmotností zbytků degradace. Nebyly zde nalezeny žádné nízkomolekulární polymerní molekuly [21].

Výsledky pokusů prováděných s mezofilními bakteriemi ukazují, že Ecoflex může podléhat biodegradaci i za mírných podmínek, ale rychlost degradace je o mnoho pomalejší než u kompletní biodegradace pomocí *T. fusca*. Ve studii je uvedeno, že vyšší teplota (55°C) může být vysvětlením rozdílů v rychlosti biodegradace [21].

5 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo zavést metodiku práce s novým materiálem Ecoflex, především přípravy vzorku. Dále bylo cílem navrhnout a vyzkoušet metodiku sledování biodegradability Ecoflexu v půdě a kompostu.

Bude sledována biodegradabilita materiálu Ecoflex mikrobiálními společenstvy sady zemědělských půd a proveden pokus o izolaci případných degradérů a jejich charakterizaci.

Biodegradabilita vzorku bude studována také v prostředí vyzrálého kompostu, kdy budou použity vzorky Ecoflexu v různých formách s cílem ověřit vliv morfologie vzorku na rychlost biodegradace.

Míra biodegradace vzorku v půdě a kompostu bude sledována analýzou vyprodukovaného oxidu uhličitého metodou plynové chromatografie.

Dále bude vyzkoušena metoda sledování biodegradace Ecoflexu pomocí stanovení bakteriálního ATP.

II. MATERIÁLY A METODIKA

6 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A ŽIVNÁ MÉDIA

6.1 Chemikálie

CHCl_3	Chloroform (ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	Glycerin bezvodý (ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
$\text{C}_{64}\text{H}_{124}\text{O}_{26}$	Polysorbate 80 (Tween 80) (Alfa Aesar, Německo)
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Ethanol (Lachema a.s., Brno, ČR)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Chlorid vápenatý dihydrát (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Síran měďnatý pentahydrát (Lachema a.s., Brno, ČR)
H_3BO_3	Kyselina boritá (Lachema a.s., Brno, ČR)
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný (Lachema a.s., Brno, ČR)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Síran hořečnatý heptahydrát (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Síran manganatý monohydrát (Penta, Chrudim, ČR)
NH_4Cl	Chlorid amonný (Lachema a.s., Brno, ČR)
$(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Síran železnato-amonný hexahydrát (Lachema a.s., Brno, ČR)
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Molybdenan amonný tetrahydrát (Lachema a.s., Brno, ČR)
NaCl	Chlorid sodný (Penta, Chrudim, ČR)
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát (Lachema a.s., Brno, ČR)
$\text{Na}_4\text{O}_7\text{P}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	Difosforečnan sodný (Fluka Chemika, Švýcarsko)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Síran zinečnatý heptahydrát (ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
ATP Reagent HS	(BioThema, Švédsko)
ATP standard	(BioThema, Švédsko)
Diluent B	(BioThema, Švédsko)
Extraktant B/S	(BioThema, Švédsko)

Mikrokrystalická celulóza	(ing. Petr Lukeš, Uherský Brod, ČR)
Nosný plyn He o čistotě 4.6	(Linde Technoplyn a.s., Praha, ČR)
Směsný syntetický plyn 1 obsahující CH ₄ (4,07 obj.%), CO ₂ (0,815 obj.%) a N ₂ (95,115 obj.%)	(Linde Gas a.s., Praha, ČR)
Směsný syntetický plyn 2 obsahující CH ₄ (4,04 obj.%), CO ₂ (0,799 obj.%) a N ₂ (95,161 obj.%)	(Linde Gas a.s., Praha, ČR)
Vzduch stlačený	(Linde Technoplyn a.s., Praha, ČR)

6.2 Roztoky

Fyziologický roztok

Pro přípravu 200 ml fyziologického roztoku o koncentraci 8,5 g/l bylo do odměrné baňky o objemu 200 ml naváženo 1,7 g NaCl a rozpuštěno v malém množství destilované vody a poté doplněno destilovanou vodou po rysku. Roztok byl vysterilizován v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Roztok stopových prvků

Na přípravu 1000 ml roztoku stopových prvků bylo použito:

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

Navážená množství těchto látek byla rozpuštěna v 1000 ml destilované vody a důkladně promíchána.

Roztok A

Byl připraven rozpuštěním 9,0 g KH₂PO₄ v 1000 ml destilované vody.

Roztok B

Byl připraven rozpuštěním 24,0 g Na₂HPO₄.12H₂O v 1000 ml destilované vody.

Roztoky solí pro přípravu minerálního média

Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 10 g/l)	1,0 g
Roztok NH_4Cl (zásobní roztok 30 g/l)	3,0 g
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 1 g/l)	0,1 g
Roztok NaCl (zásobní roztok 50 g/l).....	5,0 g
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (zásobní roztok 3 g/l)	0,3 g

Jednotlivé soli byly naváženy a rozpuštěny ve 100 ml destilované vody.

Minerální médium (MM1)

Na přípravu 100 ml minerálního média MM1 bylo použito:

Roztok A (KH_2PO_4)	2,0 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	8,0 ml
Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	1,0 ml
Roztok NH_4Cl	1,0 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0 ml
Roztok NaCl	1,0 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Minerální médium se sníženým obsahem hořčnatých solí (MM2)

Na přípravu 100 ml minerálního média MM2 bylo použito:

Roztok A (KH_2PO_4)	4,0 ml
Roztok B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$)	16,0 ml
Roztok $\text{Mg}(\text{SO}_4) \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 ml

Roztok NH_4Cl	1,0 ml
Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,0 ml
Roztok NaCl	1,0 ml
Roztok $\text{Fe} (\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,0 ml
Roztok stopových prvků	0,1 ml

Jednotlivé složky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 100 ml. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Suspendační roztok (SR1)

Na přípravu 500 ml suspenčního roztoku bylo použito:

Tween 80	0,75 g
Difosforečnan sodný	2,0 g
Chlorid sodný	2,5 g
Destilovaná voda	500 ml

Roztok byl rozlit do 10 lahví po 50 ml. Do každé láhve bylo dáno 5-10 skleněných kuliček. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Suspendační roztok s 10x nižším obsahem Tween 80 (SR2)

Na přípravu 200 ml suspenčního roztoku bylo použito:

Tween 80	0,03 g
Difosforečnan sodný	0,8 g
Chlorid sodný	1,0 g
Destilovaná voda	200 ml

Roztok byl rozlit do 4 lahví po 50 ml. Do každé lahve bylo dáno 5-10 skleněných kuliček. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 125°C po dobu 30 minut.

Chloroformový roztok Ecoflexu I (c=0,050 mg/l)

Bylo naváženo 2,5 g granulí Ecoflex a rozpuštěno asi v 30 ml rozpouštědla chloroform a po rozpuštění doplněno chloroformem na celkový objem 50 ml.

Chloroformový roztok Ecoflexu II (c=0,125 mg/l)

Bylo naváženo 10,0 g granulí Ecoflex a rozpuštěno asi v 50 ml rozpouštědla chloroform a po rozpuštění doplněno chloroformem na celkový objem 80 ml.

Chloroformový roztok Ecoflexu III (c=0,025 g/l)

Bylo naváženo 5 g granulí Ecoflex a rozpuštěno asi ve 100 ml rozpouštědla chloroform a po rozpuštění doplněno chloroformem na celkový objem 200 ml.

Chloroformový roztok Ecoflexu IV (c=0,010 g/l)

Bylo naváženo 0,5 g granulí Ecoflex a rozpuštěno asi v 30 ml rozpouštědla chloroform a po rozpuštění doplněno chloroformem na celkový objem 50 ml.

6.3 Živná média

Kasein-sojový agar (Tryptic Soy agar, CASO agar)

Kasein sojový agar patří mezi univerzální živná média. Rostou na něm chemoorganotrofní bakterie [22].

Na přípravu 200 ml bylo použito:

Hydrolyzát kaseinu	3,0 g
Sojový pepton	1,0 g
NaCl	1,0 g
Agar	3,0 g
Destilovaná voda	200 ml

Všechny komponenty byly promíchány v láhvi a sterilizovány v autoklávu při 115°C po dobu 30 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah

láhve promíchán krouživým pohybem a po ochlazení na cca 50°C byl agar rozlit do sterilních Petriho misek a nechán ztuhnout.

Glycerol-dusičnanový agar

Na tomto agaru rostou mikroorganismy schopné využívat dusičnany jako zdroj dusíku. Rostou na něm tedy bakterie, aktinomycéty i plísňe [22].

Na přípravu 200 ml bylo použito:

Základ	4,9 g
Glycerol	4,0 g
NaCl	1,0 g
Destilovaná voda	200 ml

Základ:

NaCl	0,2 g
KNO ₃	0,5 g
CaCO ₃	0,02 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,02 g
K ₂ HPO ₄	0,16 g
FeSO ₄ .7H ₂ O.....	stopy
Agar	4,0 g

Všechny komponenty byly promíchány v láhvi a sterilizovány v autoklávu při 115°C po dobu 30 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah láhve promíchán krouživým pohybem a po ochlazení na cca 50°C byl agar rozlit do sterilních Petriho misek a nechán ztuhnout.

Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem

Používá se pro kultivaci půdních plísňí, protože zabraňuje rozrůstání mycelií některých rychle rostoucích rodů (Mucor, Rhizopus) a inhibuje růst bakterií [22].

Na přípravu 200 ml bylo použito:

Základ	6,0 g
Bengálská červeně 1%	1,4 ml
Trypton.....	200 mg
Destilovaná voda	200 ml

Základ:

Glukosa	2,0 g
NaNO ₃	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Chloramfenikol.....	0,012 g
Agar	3,6 g

Všechny komponenty byly promíchány v láhvi a sterilizovány v autoklávu při 115°C po dobu 30 minut. Po vyjmutí z autoklávu byl obsah láhve promíchán krouživým pohybem a po ochlazení na cca 50°C byl agar rozlit do sterilních Petriho misek a nechán ztuhnout.

Minerální agar

Na přípravu 200 ml bylo použito:

Roztok A (KH ₂ PO ₄)	8,0 ml
Roztok B (Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O)	32,0 ml
Roztok Mg(SO ₄) · 7 H ₂ O	0,4 ml
Roztok NH ₄ Cl	2,0 ml
Roztok CaCl ₂ · 2 H ₂ O	2,0 ml
Roztok NaCl	2,0 ml
Roztok Fe (NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ · 6H ₂ O	2,0 ml
Roztok stopových prvků	0,2 ml
Agar	3,0 g

Jednotlivé složky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na celkový objem 200 ml. Poté byla provedena sterilizace v autoklávu při 115°C po dobu 30 minut.

7 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ A LABORATORNÍ POMŮCKY

- Analytické váhy KERN 770, Německo
- Analyzátor uhlíku SSM-5000 A, Shimadzu Corp., Japonsko
- Aseptický laminární box Telstar, Španělsko
- Chladnička Ardo, ČR
- Chladnička Zanussi, ČR
- Elektrická sušárna UM 100, Memmert, Německo
- Elektromagnetická míchačka MM2 Laboratorní přístroje Praha, ČR
- Elektronový mikroskop VEGA LMU, Tescan s.r.o., ČR
- Etážový lis, FT UTB Zlín
- Hlubokomrazící box Biotech, Dánsko
- Laboratorní autokláv LaM-320 Sanoclav, Německo
- Lázeň vodní WBU 45 Memmert, Německo
- Luminometr kyvetový 20/20n East Port, Turner Biosystems, USA
- Mikrodávkočce (1-5 ml, 100-1000 μ l, 20-200 μ l, 2-20 μ l, 0,5-10 μ l) Biohit, Finsko; Discovery, Polsko; Brand, Německo
- Mikroskop CX 41 Olympus, Japonsko
- Minitřepačka MS1 Schoeller Pharma, ČR
- Plynotěsná injekční stříkačka Hamilton o objemu 100 μ l, USA
- Plynový chromatograf GC Agilent 7890 s programem ChemStation, USA
- Předvážky KERN WEW 1500-2M, Německo
- Sterilní filtr MILLEX GS 0,22 μ m MILLIPORE, Irsko
- Tedlarův vak o objemu 0,6 l
- Trouba 524 MORA, ČR
- Vakuová sušárna UFP 800, Memmert, Německo
- Vibrační třepačka Titramax 100 Heidolph, USA
- Vzduchovací motorek HP 6000 ATMAN, Silenta, ČR
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

8 METODIKA PROVEDENÝCH POKUSŮ

8.1 Sterilizace

Při provádění experimentů byly dodržovány zásady tzv. aseptické práce k zamezení kontaminace mikroorganismy. To vyžadovalo sterilizaci používaných roztoků a laboratorních pomůcek. Snížení kontaminace z ovzduší se dosahovalo prováděním prací v laminárním boxu.

8.2 Příprava a charakteristika vzorku

8.2.1 Charakteristika vzorku

Testovaný vzorek : Ecoflex

Vzorek byl dodán společností BASF spol. s.r.o. ve formě bílých granulí, z nichž byly připraveny různé formy vzorku.

Formy materiálu Ecoflex:

- fólie o tloušťce 100 μm (rozměry cca 3 x 7 mm)
- tenký povlak na perlitu
- prášek

Elementární analýza

Ecoflex byl testován z hlediska obsahu hlavních prvků. Obsah prvků (C, H a S) ve vzorku byl stanoven na přístroji Flash EA 1112 Elemental Analyzer. Výsledky byly získány od Ing. Lenky Trhlíkové, Laboratoř instrumentální analýzy, FT UTB Zlín.

- obsah uhlíku: 62,54%
- obsah vodíku: 6,76%
- obsah síry: 0,03%

Stanovení krystalinity vzorku

Krystalinita byla stanovena u Ecoflexu ve formě lisované fólie (tloušťka 100 μm), ve formě lité fólie (cca 100 μm) a prášku. Lisovaná fólie a prášek byly připraveny postupem popsáném v kap. 8.2.2. Litá fólie byla připravena

rozpuštěním 6,28 g vzorku v rozpouštědle chloroform o objemu 30 ml. (Navážka granulí Ecoflexu potřebná k získání 100 μm fólie byla vypočtena z rozměru Petriho misky, požadované tloušťky fólie Ecoflexu a hustoty materiálu Ecoflex). Polovina připraveného roztoku (15 ml) byla nalita na Petriho misku s minerálním agarem MM2 (příprava MM2 viz kap. 6.2) a nechána 24 hodin v digestoři k odpaření rozpouštědla. Po odpaření rozpouštědla byla vzniklá fólie z agaru sloupnuta a použita pro stanovení krystalinity. Krystalinita vzorku byla stanovena rentgenovou difrakční analýzou (XRD). Analýza byla provedena doc. Ing. Romanem Čermákem, Ph.D, Ústav inženýrství polymerů. Naměřené hodnoty krystalinity Ecoflexu v různých formách jsou uvedeny v kap. 9.1.

8.2.2 Příprava vzorku

Fólie o tloušťce 100 μm

Fólie byly připraveny lisováním granulí Ecoflex na ručním etážovém lisu. Teplota lisování byla 140°C. Navážka granulí potřebná k získání 100 μm fólie byla vypočtena z rozměru lisovacích desek, požadované tloušťky fólie Ecoflexu a hustoty materiálu Ecoflex [23]:

$$n = a \cdot b \cdot d \cdot \rho = 20 \cdot 20 \cdot 0,01 \cdot 1,25 = 5g \quad (1)$$

Kde:

n - navážka Ecoflexu (g)

a, b - rozměry lisovacích desek (cm)

d - požadovaná tloušťka fólie Ecoflex (cm)

ρ - hustota Ecoflexu (g/cm^3)

Připravené fólie byly následně nastříhány na kousky o rozměrech cca 3 x 7 mm. Byla provedena elektronová mikroskopie vzorku znázorněná na Obr. 3 v kap. 9.

Vzorek ve formě tenkého povlaku na perlitu

Cílem bylo získat tenký povlak obalující perlit pro biodegradační testy (kap. 8.5), tak aby bylo množství Ecoflexu v láhvi s perlitem 500 mg. Byl vytvořen roztok (chloroformový roztok Ecoflexu I o $c = 0,050$, viz kap.6.2), který byl dávkován do lahví s obsahem 6,67 g perlitu v množství 10 ml a důkladně promíchán s perlitem. Následně byla láhev s perlitem vyfoukávána vzduchem po dobu 24 hodin k odstranění veškerého rozpouštědla. Opět byla provedena elektronová mikroskopie vzorku znázorněná na Obr. 4 v kap. 9.

Prášek

Byly připraveny dva různě koncentrované chloroformové roztoky Ecoflexu viz kap. 6.2. (chloroformový roztok Ecoflexu II o $c = 0,125$ mg/l a chloroformový roztok Ecoflexu III o $c = 0,025$ mg/l).

Pro získání prášku se k připraveným roztokům přidával děličkou etanol v množství asi dvojnásobku objemu roztoků a tím došlo k jejich vysrážení. Poté se vzniklá sraženina přefiltrovala přes fritu a získaný prášek byl ponechán 24 hodin v digestoři k odpaření rozpouštědla.

K roztoku o koncentraci $c = 0,125$ mg/l bylo postupně po kapkách přidáno 160 ml etanolu, k druhému roztoku o koncentraci 0,025 mg/l bylo přidáno 500 ml etanolu. Došlo k rovnoměrnému vysrážení obou roztoků v celém objemu. Přefiltrováním a vysušením byl získán prášek, který byl opět pozorován elektronovým mikroskopem. (Obr. 5 v kap. 9).

8.3 Charakteristika substrátů

8.3.1 Půdní substrát

Jako substrát pro testování biodegradace v půdním prostředí sloužilo 7 druhů půd. Těchto 7 půd charakterizuje všechny zemědělské druhy půd vyskytující se v České republice.

Půdy byly před použitím k jednotlivým experimentům prosity na síť o velikosti ok 2 mm.

U jednotlivých půd byla stanovena sušina a proveden mikrobiologický rozbor. Ostatní charakteristiky byly získány od Ing. Jiřího Janáka, MZLU Brno, kdy jednotlivé půdy byly klasifikovány podle mezinárodně uznávané klasifikace IUSS Working Group WRB, 2006.

Tab. 3: Druhy půd z jednotlivých lokalit (Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno)

Lokalita	Horizont	Půdní druh
Vatín	Ap (ornice)	kambizem modální na ortorule
N. Město na Moravě	Ap (ornice)	kambizem modální na syenitu
Veverské Knínice	Ap (ornice)	hnědozem modální na spraši
Bratčice	Ap (ornice)	černozem modální na spraši
Ivaň	Ah (humózní lesní)	fluvizem modální na nevápnitých aluviálních sedimentech
Popice	Ap (ornice)	černozem modální na polygenetické hlíně
Hodonín	Ap (ornice)	regozem arenická na navátém písku

Tab. 4: Zrnitostní charakteristika půd (Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno)

Lokalita	Obsah částic (%)			Zrnitostní třída
	2,00-0,05	0,05-0,002	< 0,002	
Vatín	51,13	37,53	11,33	písčitá hlína
Nové Město na Moravě	50,49	40,60	8,91	hlína
Veverské Knínice	12,19	60,39	27,43	prachovitá jílovitá hlína
Bratčice	20,24	53,48	26,28	prachovitá hlína
Ivaň	17,68	57,55	24,77	prachovitá hlína
Popice	42,62	38,86	18,52	hlína
Hodonín	91,56	3,27	5,17	písek

Tab. 5: Hodnoty půdních reakcí jednotlivých půd
(Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno)

Lokalita	pH _{H₂O}	pH _{KCl}
Veverské Knínice	6,44	6,33
Vatín	6,06	4,23
Nové Město na Moravě	7,10	5,18
Bratčice	7,28	6,28
Ivaň	7,04	5,49
Popice	8,06	7,52
Hodonín	6,12	4,43

Kde:

pH_{H₂O} – aktivní půdní reakce

pH_{KCl} – výměnná (potenciální) půdní reakce

Stanovení sušiny půd

Do předem zvážených Petriho misek bylo na analytických vahách naváženo 2 g půdy s přesností $\pm 0,0001$ g a vysušeno do konstantní hmotnosti v sušárně při 105°C. Po zchladnutí na laboratorní teplotu byly misky zváženy s přesností $\pm 0,0001$ g. Stanovení sušiny bylo provedeno 3krát vedle sebe pro všech 7 druhů půd. Sušina půd byla vyjádřena v procentech (kap. 9.2, Tab. 14).

Mikrobiologický rozbor půd

Mikrobiologický rozbor půd byl zaměřený na stanovení hlavních skupin mikroorganismů (celkový počet chemoorganotrofních bakterií, stanovení vláknitých plísní) a na stanovení vybrané skupiny půdních mikroorganismů (aktinomycéty) [22].

Rozbor půd byl proveden kultivační metodou. Mikroorganismy mají schopnost sorbovat se na půdní částice, proto bylo potřeba vytřepávat vzorky

půd do suspenčních roztoků, které uvolňují mikrobiální buňky z půdních částic [22].

Výtřep vzorku

Do sterilního suspenčního roztoku SR1 (složení viz. kap. 6.2) o objemu 50 ml bylo naváženo 5 g vzorku půdy (získalo se tak ředění 10^{-1}) a po dobu 15 minut bylo třepáno v ruce. Poté se nechala půda odsedimentovat a následně byl supernatant ředěn desetinou řadou a vyočkován na příslušná živná média.

Desetinné ředění

Do sterilních ependorfek bylo nadávkováno 900 μ l sterilního fyziologického roztoku a k tomu bylo nadávkováno 100 μ l suspenze půdních mikroorganismů z láhve se suspenčním roztokem (tj. z ředění 10^{-1}), tím bylo získáno ředění 10^{-2} . Odpipetováním 100 μ l z ependorfky o ředění 10^{-2} do další ependorfky s fyziologickým roztokem bylo získáno ředění 10^{-3} . Tímto způsobem se pokračovalo až do ředění 10^{-7} .

Očkování živných půd

Z připravených ependorfek o ředění 10^{-2} až 10^{-7} se vyočkovávalo po 100 μ l na předem připravená živná média, aby byla získána ředění podle níže uvedeného rozpisu. Očkováním objemu 100 μ l šlo vlastně o další desetinné zředění. Ředění 10^{-1} se získalo odebráním 1 ml přímo ze suspenčního roztoku a ředění 10^{-2} odebráním 100 μ l ze suspenčního roztoku. Každé ředění bylo inokulováno na živná média 3krát vedle sebe. Inokulovaná množství byla rozetřena po celém povrchu agarů sterilními skleněnými hokejkami a následně odsušena v laminárním boxu. Inkubace probíhala při 25°C po dobu 3 dnů u stanovení chemoorganotrofních bakterií a po dobu 7 dnů u ostatních. Poté byly u nejvhodnějších misek spočítány kolonie a přepočteny podle ředění a na sušinu půd. Počty mikroorganismů byly vyjádřeny v jednotkách CFU/g sušiny a uvedeny v kap. 9.2 (Tab. 15).

Rozpis ředění:

Kasein-sojový agar (stanovení počtu chemoorganotrofních aerobních bakterií): ředění 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7}

Glycerol-dusičnanový agar (stanovení počtu aktinomycét): ředění 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6}

Půdní agar s bengálskou červení a chloramfenikolem (stanovení počtu půdních vláknitých plísňí): ředění 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} .

8.3.2 Substrát vyztálého kompostu

Jako substrát pro testování biodegradace v prostředí vyztálého kompostu sloužily dva zahradnické komposty od firmy AGRO CS, a.s. Komposty byly inkubovány ve vodní lázni při 58°C za stálého provzdušňování a zvlhčování destilovanou vodou.

Vyztálé komposty obsahovaly zkompostované suroviny rostlinného původu s přídávkem dolomitického vápence. Dodávají do půdy základní živiny, zejména dusík, ale i základní prvky.

U obou kompostů byla stanovena sušina, spalitelný podíl a proveden mikrobiologický rozbor. Ostatní charakteristiky byly uvedeny výrobcem kompostů.

Tab. 6: Charakteristika kompostu – chemické a fyzikální vlastnosti (AGRO CS, a.s.)

Charakteristika kompostů			
pH	Spalitelné látky	Celkový dusík	Nerzložitelné příměsy
6,0 – 8,5	min 45 % sušiny	min 0,6 % sušiny	max 2 %

Sušina kompostů byla stanovena stejným způsobem jako u půd (kap. 8.3.1). Výsledky jsou uvedeny v kap. 9.2 (Tab. 17).

Spalitelný podíl

U kompostu byla nejprve stanovena sušina. Poté bylo naváženo do předem vyžíhaného a zváženého kelímku 0,6 g kompostu s přesností $\pm 0,0001$ g. Vzorek byl žíhán v peci při 550°C po dobu 2 hodin a po ochlazení v exsikátoru zvážen. Spalitelný podíl byl vypočten odečtením zbytku vzorku po spálení od sušiny vzorku a vyjádřen v % (kap. 9.2, Tab. 17).

Celkový uhlík (TC)

Pro stanovení celkového uhlíku (TC) byl použit analyzátor uhlíku Shimadzu TOC 5000A.

Vzorek byl zoxidován v proudu kyslíku ve spalovací trubici při teplotě 950°C. Vzniklý CO₂ byl detekován na NDIR detektoru (Non-Disperse Infrared Detector), kde signál vznikající absorpcí příslušné vlnové délky byl registrován jako plocha píku přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku. Výsledky byly uvedeny v % TC (kap. 9.2, Tab. 17).

Mikrobiologický rozbor byl proveden postupem uvedeným v kapitole 8.3.1. (mikrobiologický rozbor půd). Na rozdíl od půd byl navíc stanoven celkový počet termofilních bakterií (ředění 10⁻⁴ až 10⁻⁷). Inkubace probíhala při 58°C po dobu 7 dnů. Rozdílná byla také inkubace u stanovení celkového počtu aktinomycét, která v případě kompostu probíhala při 58°C. Výsledky mikrobiologického rozboru jsou uvedeny v kap. 9.2 (Tab. 16).

8.4 Pokus o izolaci degradačních mikroorganismů na minerálním agaru

Cílem byla izolace mikroorganismů schopných degradace vzorku Ecoflex.

Pokus byl prováděn s tenkým filmem Ecoflex na Petriho miskách s minerálním agarem inukolovaným směsnou kulturou půdních mikroorganismů.

Minerální agar (MM2) byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 6.3.

Příprava tenkého filmu Ecoflex o tloušťce několik μm

Tenký film materiálu Ecoflex byl vytvořen nadávkováním 500 μl chloroformového roztoku Ecoflexu (chloroformový roztok Ecoflexu IV o c = 0,010 mg/l, kap. 6.2) na Petriho misku s minerálním agarem. Roztok byl rozlit tak, aby vytvořil po celé misce tenkou vrstvu a nechán 24 hodin v boxu k odpaření rozpouštědla. Po odpaření rozpouštědla byl tenký film naočkován

suspenzí půdních mikroorganismů (ředění 10^{-2}) a po odsušení proběhla inkubace při 25°C ve tmě.

Pokus byl proveden pro tři půdy z lokalit: Bratčice, Ivaň, Popice. Tyto půdy byly vybrány podle nejvyššího počtu chemoorganotrofních aerobních bakterií zjištěného mikrobiologickým rozbořem půd (kap. 8.3.1).

Byla provedena mikroskopie mikrobiálních kolonií pomocí optického mikroskopu. Na podložní sklíčko byla nalepena oboustranná páska, na kterou byla nanesena kličkou kolonie a tímto způsobem byla zafixována. Poté byl preparát obarven zředěným karbolfuchsinem po dobu 60 vteřin a poté opláchnut destilovanou vodou a vysušen. Preparát byl pozorován světelným mikroskopem pomocí imerzního objektivu při zvětšení 1000krát. Preparát byl pozorován i bez použití imerze při zvětšení 1000krát.

8.5 Stanovení biologické rozložitelnosti vzorku pomocí sledování produkce oxidu uhličitého

Principem metody bylo sledování produkce oxidu uhličitého, který vznikal jako produkt aerobní biodegradace vzorku Ecoflex. Ecoflex zde byl jediným zdrojem uhlíku a energie pro mikroorganismy přítomné v substrátu, které se podílely na rozkladu testovaného vzorku.

Biodegradace vzorku byla prováděna za aerobních podmínek v půdním prostředí a v prostředí vyvrátého kompostu.

Kromě produkce CO₂ byla sledována spotřeba O₂, která ukazovala na dodržení aerobních podmínek během biodegradačního pokusu.

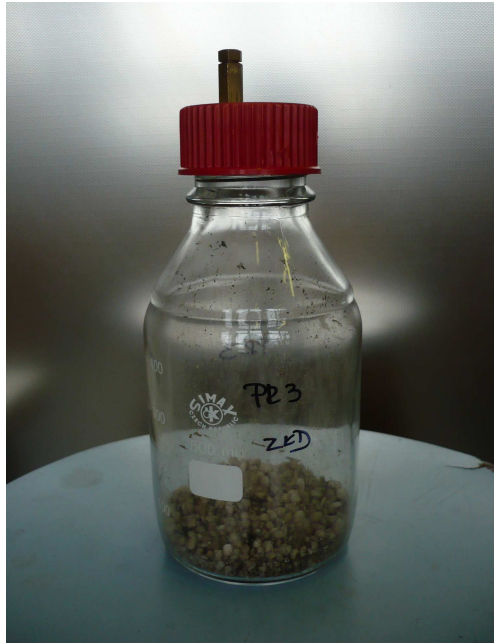
8.5.1 Příprava biodegradačního pokusu

Bioreaktory (láhve pro biodegradační testy)

Pro biodegradační testy byly použity láhve o objemu 500 ml s celkovým objemem plynné fáze 580 ml. Láhve byly uzavřeny uzávěrem s otvorem pro patronu se septem (Obr. 2).

Obsah bioreaktorů

- substrát (7 druhů půd, 2 druhy vyžralého kompostu)
- perlit (Agroperlit od firmy AGRO CS, a.s.)
- vzorek Ecoflex (různé formy)
- minerální médium MM2 (složení viz kap. 6.2)



Obr. 2: Bioreaktor (láhev pro aerobní biodegradační testy)

Příprava substrátů

Před navážením substrátů do reaktorů bylo nutno provést stanovení sušiny substrátů (půda, vyžralý kompost). Stanovení sušiny bylo provedeno podle postupu uvedeného v kap. 8.3.1. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 17 v kap. 9.2.

Příprava perlitu

Perlit byl před použitím 3krát propláchnut v destilované vodě a vysušen v sušárně při 105°C. Perlit sloužil k zvýšení pórovitosti a provzdušnění substrátů.

8.5.2 Biodegradace v půdním prostředí

Pro testování biodegradace vzorku v půdním prostředí byly použity vzorky Ecoflexu ve formě fólií o tloušťce 100 μm nastřihané na kousky velikosti asi 3 x 7 mm. Jako půdní substrát sloužilo všech 7 druhů půd.

Do reaktorů byl navážena půda v množství 1,67 g sušiny půdy. Půda byla naředěna perlitem v poměru 1:4 (1,67 g sušiny půdy na 6,67 g perlitu). Vzorek ve formě 100 μm fólií byl dávkován do lahví v množství 0,5 g, naváženým na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Obsah bioreaktorů byl nakonec zvlhčen 6,67 ml minerálního média MM2, dodávající do prostředí rozpuštěné živiny. Slepé pokusy byly připraveny stejným způsobem jen bez testovaného vzorku. Po dokonalém promíchání obsahu lahví probíhala inkubace při 25°C ve tmě.

Testování biodegradace vzorku v půdním prostředí probíhalo ve dvou biodegradačních pokusech.

V prvním pokusu byly použity 2 druhy půd z lokalit Ivaň a Bratčice. Vzorky Ecoflexu byly testovány 3krát vedle sebe, slepé pokusy také 3krát vedle sebe (Tab. 7).

Ve druhém pokusu bylo využito zbývajících 5 druhů půd z lokalit Popice, Hodonín, Nové Město na Moravě, Vatín a Veverské Knínice. Vzorky i slepé pokusy byly nasazeny 2krát vedle sebe (Tab. 8).

Tab. 7: Nasazení pokusu 1 (půdní prostředí)

Lokalita půdy	Označení lahví	Látka/ forma vzorku	Navážka vzorku (g)	Navážka půdy (g)	Sušina půdy (%)	Celkový uhlík vzorku (%)
Ivaň	I1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5006	1,93	86,62	62,54
	I2		0,5008			
	I3		0,5014			
Ivaň	IS1	Slepý pokus	---	1,93	86,62	---
	IS2		---			
	IS3		---			
Bratčice	B1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5062	1,87	89,32	62,54
	B2		0,5048			
	B3		0,5056			
Bratčice	BS1	Slepý pokus	---	1,87	89,32	---
	BS2		---			
	BS3		---			

Tab. 8: Nasazení pokusu 2 (půdní prostředí)

Lokalita půdy	Označení lahví	Látka/ forma vzorku	Navážka vzorku (g)	Navážka půdy (g)	Sušina půdy (%)	Celkový uhlík vzorku (%)
Popice	P1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5023	1,74	96,18	62,54
	P2		0,5066			
Popice	PS1	Slepý pokus	---	1,74	96,18	---
	PS2		---			
Hodonín	H1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5006	1,68	99,61	62,54
	H2		0,5027			
Hodonín	HS1	Slepý pokus	---	1,68	99,61	---
	HS2		---			
N.Město na Moravě	N1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5063	1,92	87,13	62,54
	N2		0,5090			
N.Město na Moravě	NS1	Slepý pokus	---	1,92	87,13	---
	NS2		---			
Vatín	V1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5013	1,97	84,98	62,54
	V2		0,5001			
Vatín	VS1	Slepý pokus	---	1,97	84,98	---
	VS2		---			
Veverské Knínice	K1	Ecoflex fólie 100 μ m	0,5023	1,91	87,37	62,54
	K2		0,5050			
Veverské Knínice	KS1	Slepý pokus	---	1,91	87,37	---
	KS2		---			

8.5.3 Biodegradace v prostředí vyzrálého kompostu

Pro testování biodegradace vzorku v prostředí vyzrálého kompostu byly použity vzorky Ecoflexu ve formě fólií o tloušťce 100 μm nastřižané na kousky velikosti asi 3 x 7 mm, tenkého povlaku na perlitu a prášku.

Do reaktorů byl navážen vyzrálý kompost v množství 1,67 g sušiny kompostu. Kompost byl naředěn perlitem v poměru 1:4 (1,67 g sušiny kompostu na 6,67 g perlitu). Vzorek ve formě 100 μm fólií a prášku byl dávkován do lahví v množství 0,5 g, naváženým na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. Tenký povlak Ecoflexu na perlitu byl vytvořen postupem popsáním v kap. 8.2.2 (chloroformový roztok Ecoflexu I o c = 0,050) a byl dávkován do lahví ve formě roztoku v množství 10 ml. Obsah bioreaktorů byl nakonec zvlhčen 6,67 ml minerálního média MM2. Slepé pokusy byly připraveny stejným způsobem jen bez testovaného vzorku.

Jako referenční látka byla použita mikrokrystalická celulóza, která sloužila v testu jako pozitivní kontrola. Do reaktorů byla navážena v množství 0,2 g s přesností $\pm 0,0001$ g.

Po dokonalém promíchání obsahu lahví probíhala inkubace ve tmě při 58°C.

Testování biodegradace vzorku v půdním prostředí probíhalo ve třech biodegradačních pokusech.

V prvním pokusu byl použit vzorek ve formě 100 μm fólií a testování probíhalo v prostředí kompostu 1. Vzorky i slepé pokusy byly nasazeny 3krát vedle sebe. (Tab. 9).

Ve druhém pokusu byl použit vzorek ve formě tenkého povlaku na perlitu a prášku. Byl využit kompost 2. Byla testována i celulóza jako pozitivní kontrola pokusu. Vzorky, slepé pokusy i referenční látka byly nasazeny 3krát vedle sebe (Tab. 10).

Ve třetím pokusu byl použit vzorek ve formě 100 μm fólií. Testování probíhalo v prostředí kompostu 2. Vzorky byly testovány 3krát vedle sebe. (Tab. 11).

Tab. 9: Nasazení pokusu 1 (prostředí vyžralého kompostu 1)

Označení lahví	Látka/ forma vzorku	Navážka vzorku (g)	Navážka kompostu (g)	Sušina kompostu (%)	Celkový uhlík vzorku (%)
KOMP 1S	Slepý pokus	---	2,95	47,68	---
KOMP 2S					
KOMP 3S					
KOMP 1	Ecoflex / fólie 100 µm	0,5058	2,95	47,68	62,54
KOMP 2		0,5060			
KOMP 3		0,5017			

Tab. 10: Nasazení pokusu 2 (prostředí vyžralého kompostu 2)

Označení lahví	Látka/ forma vzorku	Navážka vzorku (g)	Navážka kompostu (g)	Sušina kompostu (%)	Celkový uhlík vzorku (%)
S1	Slepý pokus	---	3,03	55,17	---
S2		---			
S3		---			
CEL1	Celulóza	0,2012	3,03	55,17	42,39
CEL2		0,2016			
CEL3		0,2016			
TF1	Ecoflex / tenký povlak na perlitu	0,5063	3,03	55,17	62,54
TF2		0,5063			
TF3		0,5063			
PR1	Ecoflex / prášek	0,5010	3,03	55,17	62,54
PR2		0,5001			
PR3		0,5019			

Tab. 11: Nasazení pokusu 3 (prostředí vyžralého kompostu 2)

Označení lahví	Látka/ forma vzorku	Navážka vzorku (g)	Navážka kompostu (g)	Sušina kompostu (%)	Celkový uhlík vzorku (%)
2 KOM 1	Ecoflex / fólie 100 µm	0,5040	3,03	55,17	62,54
2 KOM 2		0,5024			
2 KOM 3		0,5005			

8.5.4 Analýza oxidu uhličitého plynovou chromatografií

Produkce CO_2 i spotřeba O_2 byly stanoveny metodou plynové chromatografie na plynovém chromatografu GC Agilent 7890.

Analýza byla prováděna na dvou skleněných náplňových kolonách délky 1,829 m zapojených do série. Nejdříve byl analyzován CO_2 na koloně s náplní Porapak Q (velikost částic 80/100 MESH) a poté došlo k přepnutí ventilu na druhou kolonu s molekulovým sítem (velikost částic 60/80 MESH), kde byl analyzován O_2 . K přepínání ventilů mezi kolonami docházelo pomocí tlakového dusíku resp. vzduchu.

Jako nosný plyn sloužilo helium (He) čistoty 4.6. K detekci složek byl použit tepelně vodivostní detektor (TCD).

K vyhodnocení signálů byl použit program GC ChemStation. Vyhodnocení bylo prováděno metodou přímé kalibrace použitím plyných standardů. Pro sestavení kalibrační křivky pro CO_2 byl použit kalibrační plyn Linde Gas, a.s. Praha (směsný syntetický plyn 1 a 2 viz. kap. 6.1) a pro analýzu O_2 byla kalibrační křivka sestavena z obsahu kyslíku ve vzduchu.

V Tab. 12 jsou uvedeny podmínky, za kterých byla provedena analýza CO_2 a O_2 .

Tab. 12: Podmínky měření CO_2 a O_2 na přístroji GC Agilent 7890

Parametr		Hodnota
Teplota ($^{\circ}\text{C}$)	Termostat	60
	Injektor	200
	Detektor	250
Nosný plyn	Průtok (ml/min)	53
Přepínání ventilů	Čas (min)	0,9 (CO_2)
		2,0 (O_2)

8.5.5 Postup měření

Nejdříve byla sestrojena kalibrační křivka využitím kalibračního plynu a poté měřeny vzorky.

Před odběrem plynu byly nejprve láhve se vzorky intenzivně protřepány v ruce a poté byl vzorek plynu odebírán z láhve přes septum pomocí injekční stříkačky Hamilton o objemu 100 μl a nastříknuty do plynového chromatografu. Láhve s obsahem kompostu byly použity k měření až po vyhladnutí na laboratorní teplotu. Po analýze byly vzorky provzdušněny.

Měření vzorků v půdním prostředí probíhalo zpočátku v týdenních intervalech, poté byly intervaly prodlouženy až na 4 týdny. Vzorky v prostředí vyzrálého kompostu byly měřeny nejprve v třídních intervalech a poté v týdenních intervalech. Časové intervaly měření byly určeny podle hodnot produkce CO_2 a podle spotřeby O_2 . V případě rychlého nárůstu CO_2 a tomu odpovídající vyšší spotřeby O_2 byly intervaly zkracovány a obráceně.

8.5.6 Provzdušňování lahví (bioreaktorů)

Bioreaktory byly provzdušňovány vzduchem vháněným pomocí silikonových hadiček napojených na čerpadlo. Pomocí čerpadla byl vzduch vháněn přes promývací láhev s 5M roztokem NaOH, kde docházelo k záhytu atmosférického CO_2 . Za absorbér s NaOH byl zapojen absorbér s 0,05M $\text{Ba}(\text{OH})_2$ jako pojistka při vyčerpání veškerého roztoku NaOH. Provzdušňování bylo prováděno po dobu 10 minut za stálého ručního protřepávání lahví.

8.5.7 Zpracování naměřených dat

Naměřená data byla zpracována s použitím následujících vzorců [24]:

• Denní produkce uhlíku ve formě CO_2

$$m_{(d)C} = \frac{M_C \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(\text{CO}_2) \cdot \frac{V_{st}}{S_{st}} \cdot \frac{S_{vz}}{V_{vz}} \cdot 1000 \quad (2)$$

$m_{(d)C}$	- množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO_2 (mg)
M_C	- atomární hmotnost uhlíku (g/mol)
p	- tlak v okamžiku provzdušňování (kPa)
R	- molární plynová konstanta (J/K.mol)

T	- termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování (K)
V_g	- plynný objem láhve (ml)
$w(\text{CO}_2)$	- množství CO_2 v kalibračním plynu (%)
V_{st}, V_{vz}	- dávkovaný objem plynné fáze standardu resp. vzorku do plynového chromatografu (μl)
S_{st}, S_{vz}	- signál detektoru u standardu resp. vzorku ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)

• Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO_2

Pokud nedochází k provzdušňování bioreaktorů, je kumulativní produkce rovna produkci denní. Pokud je systém provzdušňován, je kumulativní produkce uhlíku ve formě CO_2 dána vztahem:

$$m_{(k)C2} = m_{(k)C1} + m_{(d)C2} \quad (3)$$

$m_{(k)C2}$	- kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření (mg)
$m_{(k)C1}$	- kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření (mg)
$m_{(d)C2}$	- denní produkce uhlíku z aktuálního měření (mg)

• Substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2

Jedná se o denní produkci uhlíku ze systémů se vzorky, sníženou o produkci uhlíku ze slepých pokusů, tj. o produkci ze samotných substrátů (půda, vyžrálý kompost).

• Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2

$$D_C = \frac{m_{(s)C}}{m_C \cdot TC} \quad (4)$$

D_C	- procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 (%)
$m_{(s)C}$	- substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2 (mg)
m_C	- hmotnost testovaného materiálu (mg)
TC	- obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu (%)

• Procentuelní obsah O₂ v láhvi

$$\% O_2 = \frac{w_{(O_2)} \cdot S_{vz} \cdot V_{st}}{S_{st} \cdot V_{vz}} \quad (5)$$

% O₂ - aktuální procento kyslíku obsaženého v láhvi (%)

w_(O₂) - obsah kyslíku ve vzduchu (%)

S_{st}, S_{vz} - signál detektoru u standardu resp. vzorku (μV.s)

V_{st}, V_{vz} - dávkovaný objem plynné fáze standardu resp. vzorku do plynového chromatografu (μl)

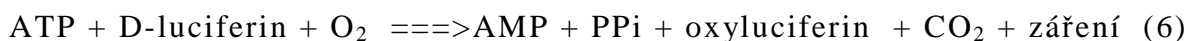
8.6 Stanovení mikrobiální biomasy pomocí měření obsahu ATP

8.6.1 Luminometrie – měření obsahu ATP

Tato metoda přináší schopnost vyjádřit nejen množství biomasy mikroorganismů, ale také její fyziologický stav [25]. Všechny živé buňky obsahují ATP (adenosintrifosfát), plní energetickou funkci při běžných buněčných procesech. Při odumření buněk je ATP rychle rozloženo a může tak sloužit jako míra biomasy [26, 27].

Množství ATP v živých buňkách lze měřit pomocí luminometrie, což je metoda měřící intenzitu emitovaného záření vytvořeného chemickou reakcí [28]:

luciferáza



Princip testu: Před analýzou je ATP uvolněno z buněk do roztoku použitím Extraktantu B/S. Po extrakci princip spočívá v použití luciferázy, enzymu katalyzujícího aktivaci D-luciferinu adenosintrifosfátem a následující oxidaci na excitovaný oxyluciferin. Excitovaný oxyluciferin při návratu vyzáří světelná kvanta [27].

Intenzita záření je přímo úměrná množství ATP, které informuje o množství buněk obsažených ve vzorku. Intenzita záření je měřena pomocí

zařízení luminometru. Výsledky jsou vyjadřovány jako relativní jednotky záření (RLU) [28]. Světelné záření je měřeno před a po přidání známého množství ATP standardu. Tím je možné vypočítat množství ATP v neznámém vzorku vyjádřený v pmolech (10^{-12} mol) [26].

Rovnice pro výpočet množství ATP (pmol) [26]:

$$\text{ATP}_{\text{smp}} = I_{\text{smp}} / (I_{\text{smp} + \text{std}} - I_{\text{smp}}) \quad (7)$$

Kde:

ATP_{smp} - množství ATP ve vzorku (pmol)

I_{smp} - intenzita záření u vzorku (RLU)

$I_{\text{smp} + \text{std}}$ - intenzita záření u vzorku se standardním přídatkem (RLU)

8.6.2 Nasazení pokusu

Vzorek byl testován ve formě fólií o tloušťce 100 μm v půdním prostředí. Byly použity tři druhy půd s nejbohatším mikrobiálním oživením (počty mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 15: Mikrobiologický rozbor půd), a to z lokalit Ivaň, Bratčice a Popice.

Testovaný vzorek byl navážen na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g v množství 10 mg do sterilních vialek a byl inokulován suspenzí půdních mikroorganismů ředěnou 1000krát.

Suspenze půdních mikroorganismů byla vytvořena navážením 5 g půdy do suspenzačního roztoku SR2 (příprava SR2 viz kap. 6.2) a třepáním po dobu 15 minut v ruce. Poté se nechala půda odsedimentovat, a následně bylo odebráno 140 μl supernatantu a nadávkováno do sterilní zkumavky se 14 ml minerálního média MM2 (příprava média MM2 viz kap. 6.2). Navážený vzorek Ecoflexu byl inokulován 200 μl vytvořené suspenze půdních mikroorganismů a byl inkubován ve vialkách na vibrační třepačce při 25°C ve tmě. Slepé pokusy byly vytvořeny stejným způsobem jen bez přidání vzorku.

Vzorky i slepé pokusy byly nasazeny 3krát vedle sebe pro osm sad měření (celkem 144 vialek). Vzorky se slepými pokusy byly nejprve

proměřeny v nultý den a poté po pětidenních intervalech. Po 15 dnech inkubace byl interval měření prodloužen na 10 dní a poté na 15 dní. Pro zachování aerobních podmínek během experimentu byly vialky provzdušňovány, a to vždy po 14 dnech inkubace.

8.6.3 Postup měření celkového ATP

Činidla pro měření ATP:

- ATP Reagent HS – lyofilizované činidlo obsahující luciferázu a luciferin
- Diluent B – pufr používaný k rozředění ATP Reagent HS
- Extraktant B/S
- ATP standard

Roztok enzymu luciferázy byl připraven smícháním činidla ATP Reagent HS s činidlem Diluent B. Po důkladném promíchání se roztok enzymu rozpípetoval po 1 ml do ependorfeček a ponechal v hlubokomrazícím boxu. Před použitím k měření byl roztok enzymu nejprve rozmražen a poté důkladně promíchán.

Před měřením byl do všech vialek přidán extraktant v množství 200 μ l, který sloužil k uvolnění ATP z buněk půdních mikroorganismů do roztoku. Po extrakci se do prázdné ependorfečky odebralo 40 μ l extraktantu a přidal enzym luciferáza v množství 160 μ l. Vše se řádně promíchalo a změřilo na přístroji luminometru. Poté bylo přidáno 10 μ l standardu, opět promícháno a změřeno. Získaná hodnota intenzity vzorku se standardním přídatkem musela být alespoň 10krát vyšší než naměřená intenzita samotného vzorku, jinak se muselo přistoupit k ředění vzorku redestilovanou vodou. Výsledky naměřené přístrojem byly vyjádřeny jako relativní jednotky záření (RLU). Tyto hodnoty byly přepočteny podle rovnice (7) na množství ATP v jednotkách pmol. Výsledky byly zpracovány s přihlédnutím k ředění vzorku a vyjádřeny graficky jako závislost množství ATP v pmolech na dnech inkubace vzorků (Obr. 14, kap. 12).

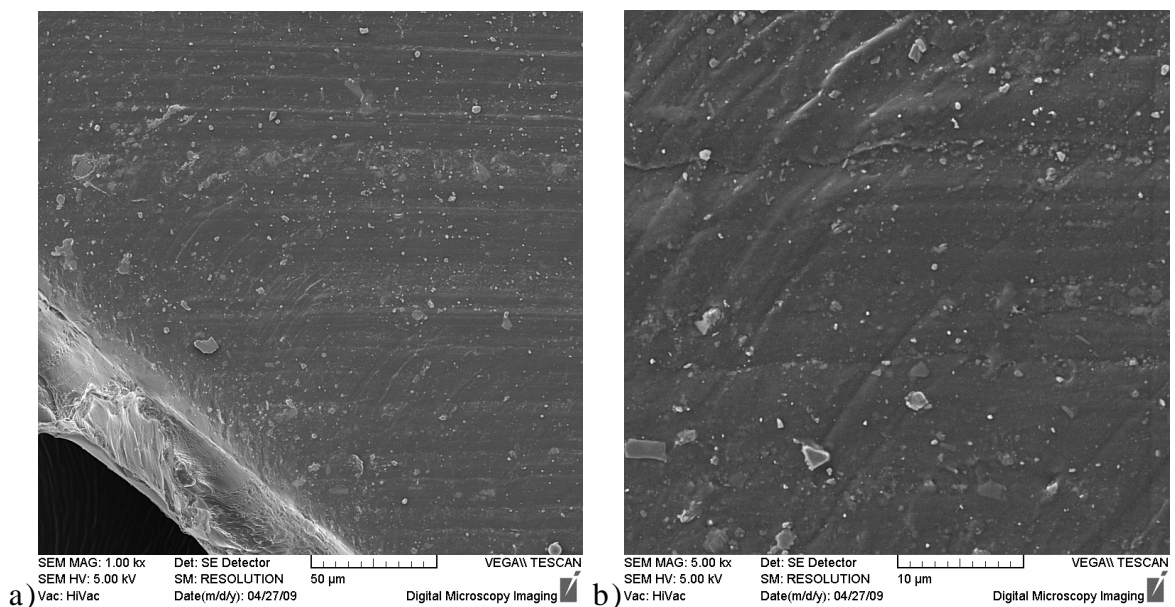
III. VÝSLEDKY A DISKUSE

9 CHARAKTERISTIKA VZORKU A SUBSTRÁTŮ

9.1 Charakteristika vzorku

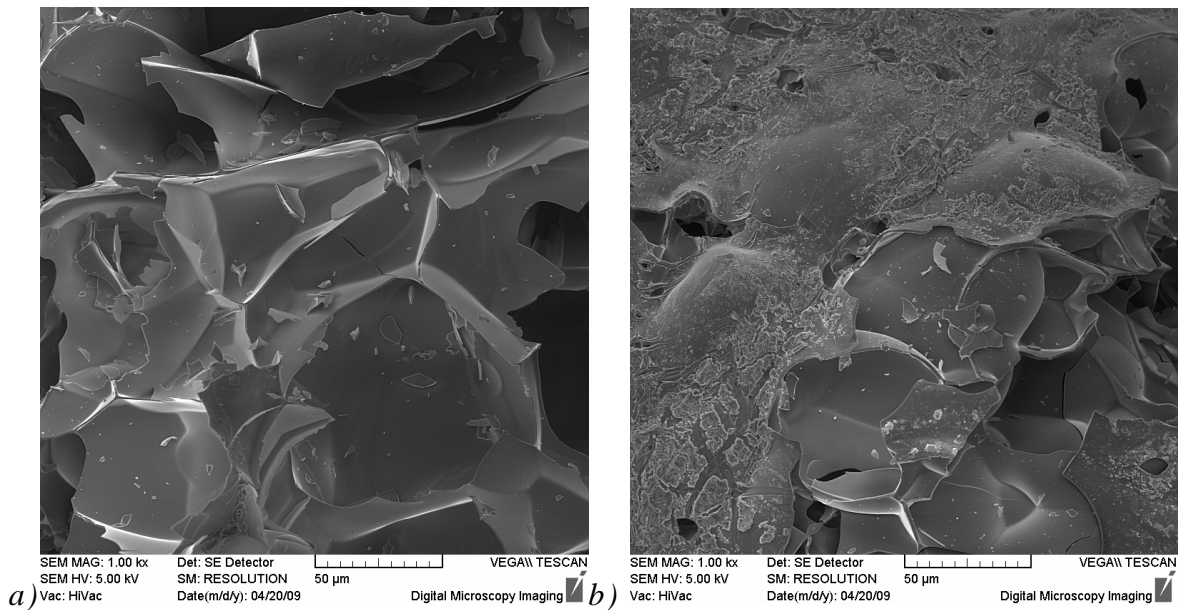
Pro tuto diplomovou práci byl použit vzorek Ecoflex od firmy BASF, spol. s.r.o. Vzorek byl poskytnut ve formě granulí vykazující malý specifický povrch. Pro získání vzorku s vyšším specifickým povrchem bylo nutno připravit jiné formy vzorku, které byly dále používány pro různé analýzy. Ecoflex byl připraven ve formě fólií o tloušťce 100 μm , prášku a tenkého povlaku obalující perlit. Příprava těchto forem vzorku je popsána v kap. 8.2.2. U jednotlivých forem Ecoflexu byla provedena skenovací elektronová mikroskopie při různých zvětšeních na elektronovém mikroskopu VEGA LMU od firmy Tescan. Před vlastní analýzou byly vzorky pokoveny zlatem a platinou. Získané snímky jednotlivých forem vzorku při různém zvětšení jsou znázorněné na Obr. 3-5.

Na Obr. 3 je znázorněn Ecoflex ve formě 100 μm lisované fólie. Ze snímků je zřejmý hladký povrch fólie.

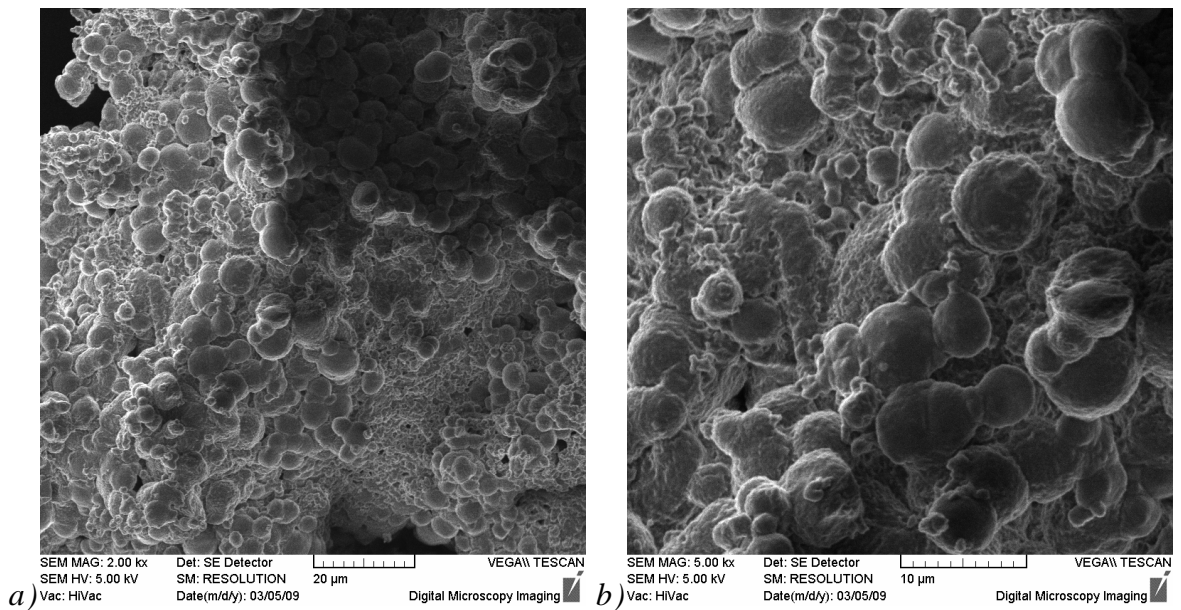


Obr. 3: Elektronová mikroskopie Ecoflexu ve formě fólie o tloušťce 100 μm , a) 1000x zvětšené, b) 5000x zvětšené

Na Obr. 4a) lze vidět čistý perlit bez přítomnosti Ecoflexu. Jsou zde vidět bublinky perlitu na povrchu jakoby rozbité. Na vedlejším snímku (b) je zobrazen perlit pokrytý tenkou vrstvou Ecoflexu. Zdá se, že Ecoflex tvoří na perlitu povlak o tloušťce menší než 1 μm . Je vidět, že vzorek s perlitem je porézní a vykazuje větší specifický povrch než zmíněné fólie.



Obr. 4: Elektronová mikroskopie a) čistého perlitu, 1000x zvětšené, b) Ecoflexu ve formě tenkého povlaku na perlitu, 1000x zvětšené



Obr. 5: Elektronová mikroskopie Ecoflexu ve formě prášku, a) 2000x zvětšené, b) 5000x zvětšené

Na Obr. 5 je vidět struktura vzorku ve formě prášku. Prášek je tvořen kuličkami o velikosti do 50 μm .

Ze snímků, získaných skenovaní elektronovou mikroskopií, je možno vidět, že vzorek ve formě prášku a povlaku na perlitu má mnohem vyšší specifický povrch než vzorek ve formě 100 μm fólií. Tato skutečnost se projevuje v prováděných testech s tímto materiálem, konkrétně v biodegradačních testech v prostředí vyzrálého kompostu. Výsledky z těchto testů jsou popsány v kap. 11.2.

U vzorku ve formě 100 μm fólií byla prováděna elementární analýza s cílem získat informaci o obsahu prvků uhlíku, vodíku a síry ve vzorku. Analýza byla prováděna na přístroji Flash EA 1112 Elemental Analyzer Ing. Lenkou Trhlíkovou, Laboratoř instrumentální analýzy, FT UTB Zlín (výsledky viz. kap.8.2.1). Hodnota obsahu uhlíku ve vzorku byla použita při výpočtech u stanovení CO_2 metodou plynové chromatografie (Tab. 7-11).

Dále bylo provedeno stanovení krystalinity Ecoflexu. Cílem bylo popsat vliv krystalinity různých forem vzorku na biodegradaci. Krystalinita vzorku byla stanovena rentgenovou difrakční analýzou (XRD). Analýza byla provedena u vzorku ve formě lité fólie a lisované fólie doc. Ing. Romanem Čermákem, Ph.D., Ústav inženýrství polymerů, FT UTB Zlín (přípravy vzorků jsou popsány v kap. 8.2.1 a 8.2.2). Domníváme se, že výsledky u lité fólie by mohly odpovídat vzorku ve formě povlaku na perlitu, který je rovněž připravován z chloroformového roztoku Ecoflexu. Výsledky naměřené krystalinity vzorků jsou uvedeny v Tab. 13. Z technických a časových důvodů nebylo prozatím možno provést měření i u vzorku ve formě prášku.

Tab. 13: Procenta krystalinity Ecoflexu ve formě lité fólie, lisované fólie a prášku

Forma vzorku	Krystalinita (%)
litá fólie (tloušťka cca 100 μm)	18,8
lisovaná fólie (tloušťka 100 μm)	20,6
prášek	nestanoveno

Krystalinita vzorku může obecně mít vliv na biodegradaci vzorků [10]. Čím nižší hodnota krystalinity, tím snadnější biodegradace vzorku. Z Tab. 13 vyplývá, že naměřená krystalinita Ecoflexu ve formě lité fólie a lisované fólie se od sebe významně neliší, přesto nižší hodnota krystalinity u lité fólie může znamenat snadnější biodegradaci vzorku, což se i potvrdilo v testu biodegradability v prostředí vyžralého kompostu (kap. 11.2). Lisovaná fólie o tloušťce 100 μm vykazuje v půdním i kompostovacím biodegradačním testu nižší hodnoty mineralizace vzorku, což by odpovídalo vyšším hodnotám naměřené krystalinity vzorku. Krystalinitu však nebylo možno stanovit u vzorku ve formě prášku, proto nemáme dostatek informací pro dokázání vlivu krystalinity na biodegradaci vzorku. Rozdíly v mineralizaci Ecoflexu však byly zaznamenány u různých forem vzorku v prostředí vyžralého kompostu, kde biodegradaci pravděpodobně ovlivňuje různý specifický povrch jednotlivých forem vzorku (viz kap. 11.2). Přes popsání rozdílů v krystalinitě se domníváme, že rozhodující vliv na rozdílnou biodegradabilitu různých forem vzorku má jejich specifický povrch.

9.2 Charakteristika použitých půd a kompostů

Pro testování biodegradace vzorku byl použit jako zdroj mikroorganismů půdní substrát a substrát vyžralého kompostu.

Jako půdní substrát sloužilo 7 druhů půd, charakterizujících všechny zemědělské druhy půd vyskytující se v České republice. U jednotlivých půd byla stanovena sušina (Tab. 14) a proveden mikrobiologický rozbor (Tab. 15). Postupy jednotlivých stanovení jsou popsány v kap. 8.3.1. Ostatní charakteristiky jako půdní druhy, zrnitostní charakteristika půd a hodnoty půdních reakcí byly získány od Ing. Jiřího Jandáka, MZLU Brno (Tab. 3-5).

Tab. 14: Sušina půd

Lokalita	Sušina (%)
Ivaň	86,62
Bratčice	89,32
Popice	96,18
Hodonín	99,61
N.Město na Moravě	87,13
Vatín	84,98
Veverské Knínice	87,37

Tab. 15: Mikrobiologický rozbor půd

Celkový počet buněk (CFU/g sušiny)			
Stanovení/ Lokalita	Chemorganotrofní aerobní bakterie	Aktinomycéty	Půdní vláknité plísně
Ivaň	$9,81 \cdot 10^6$	$6,18 \cdot 10^6$	$2,25 \cdot 10^5$
Bratčice	$5,65 \cdot 10^6$	$3,30 \cdot 10^6$	$5,37 \cdot 10^4$
Popice	$4,83 \cdot 10^6$	$4,83 \cdot 10^6$	$6,65 \cdot 10^4$
Hodonín	$2,71 \cdot 10^6$	$2,11 \cdot 10^5$	$2,56 \cdot 10^5$
Nové Město na Moravě	$4,59 \cdot 10^6$	$3,44 \cdot 10^6$	$6,89 \cdot 10^4$
Vatín	$3,18 \cdot 10^6$	$2,71 \cdot 10^6$	$1,82 \cdot 10^4$
Veverské Knínice	$5,26 \cdot 10^6$	$2,92 \cdot 10^6$	$3,78 \cdot 10^3$

Dle mikrobiologického rozboru půd byly pro určité testy vybírány půdy s nejbohatší mikroflórou (např. pro pokus o izolaci degradačních mikroorganismů - kap. 8.4, stanovení celkového ATP - kap. 8.6). Konkrétně byly využity půdy Ivaň, Bratčice a Popice.

Druhý substrát – vyzrálý zahradnický kompost od firmy AGRO CS, a.s., byl využíván jen v kompostovacích biodegradačních testech, kdy byla zjišťována produkce CO₂ metodou plynové chromatografie. Byly využity dva druhy různě vyzrálých kompostů (Tab. 17). U obou kompostů byla stanovena sušina, spalitelný podíl a proveden mikrobiologický rozbor. Výsledky jsou uvedeny v Tab. 16 a Tab. 17. Ostatní charakteristiky byly uvedeny výrobcem kompostů (kap. 8.3.2, Tab. 6). Kompost 1 se lišil od druhého kompostu vyšší dobou zrání a vyššími počty termofilních bakterií a aktinomycét.

Tab. 16: Mikrobiologický rozbor kompostu 1 a 2

Celkový počet buněk (CFU/g sušiny)	Kompost 1	Kompost 2
Termofilní bakterie	1,01. 10 ⁸	2,01.10 ⁷
Chemoorganotrofní aerobní bakterie	1,03. 10 ⁷	2,07.10 ⁷
Aktinomycéty	1,17. 10 ⁷	7,45.10 ⁵
Vláknité plísně	0	0

Tab. 17: Charakteristika kompostu – stanovené fyzikální a chemické vlastnosti

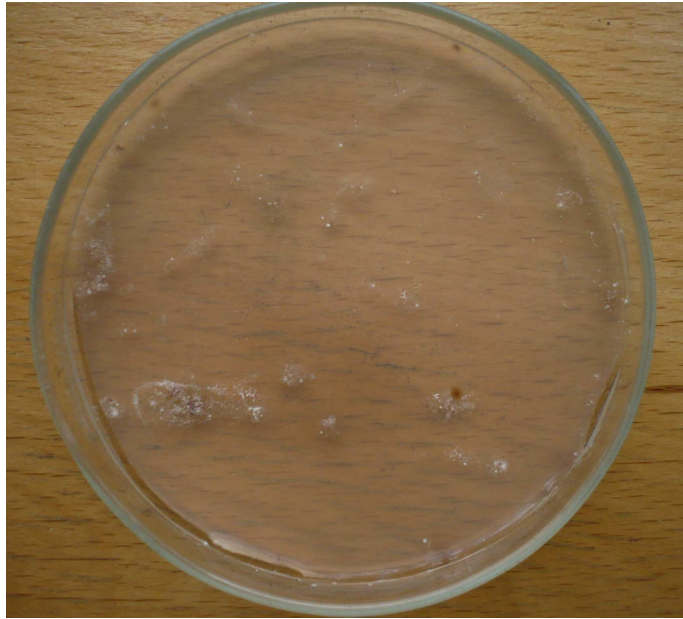
Charakteristika	Kompost 1	Kompost 2
Doba zrání (měs.)	2	1,5
Sušina (%)	47,68	55,17
Spalitelný podíl (%)	41	57
Celkový uhlík (%)	---	19,14

10 POKUS O IZOLACI DEGRADAČNÍCH MIKROORGANISMŮ NA MINERÁLNÍM AGARU

Cílem tohoto pokusu bylo izolovat případné degradéry kopolyesteru Ecoflex z vybraných půdních vzorků. Byla zkoušena klasická metoda, kdy zkoumaný materiál je jediným zdrojem uhlíku a energie. Protože Ecoflex je ve vodě nerozpustný byl problém s přípravou ztužených médií s jeho obsahem. Počáteční pokusy o vytvoření suspenze Ecoflexu pomocí jeho chloroformového roztoku selhaly, proto byl vyzkoušen postup, kdy na povrchu minerálního agaru byl vytvořen tenký (několik μm) film, který by mohl umožnit přijímat mikroorganismům minerální látky z agaru a zároveň posloužil jako uhlíkatý substrát. Provedení pokusu je popsáno v kap. 8.4.

Bylo využito tří druhů půd z lokalit Bratčice, Ivaň, Popice, jednalo se o vzorky s nejbohatší mikroflórou (počty mikroorganismů jsou uvedeny v Tab. 8: Mikrobiologický rozbor půd). Byl sledován růst mikroorganismů na povrchu filmu Ecoflex u jednotlivých Petriho misek inokulovaných suspenzí půdních mikroorganismů vybraných půd.

Po 14 dnech inkubace byl patrný výraznější nárůst mikroorganismů pouze u půdy z lokality Popice (Obr.6). Byly zpozorovány dva typy mikrobiálních kolonií – bílá práškovitá kolonie a hnědě zbarvené plaky rostlé dovnitř agaru. Oba typy kolonií byly přeočkovány sterilní kličkou na novou Petriho misku s minerálním agarem pokrytým tenkým filmem Ecoflex. Inkubace probíhala při 25°C ve tmě.



Obr. 6: Nárůst mikroorganismů na filmu Ecoflex (inokulovaný suspenzí půdních mikroorganismů z lokality Popice)

Po 14 dnech inkubace došlo k nárůstu obou typů kolonií - bílých práškovitých kolonií a hnědých kolonií (opět vrostlých do agaru) (Obr.7).



Obr. 7: Nárůst dvou typů kolonií přeočkovaných na nový minerální agar s filmem Ecoflex

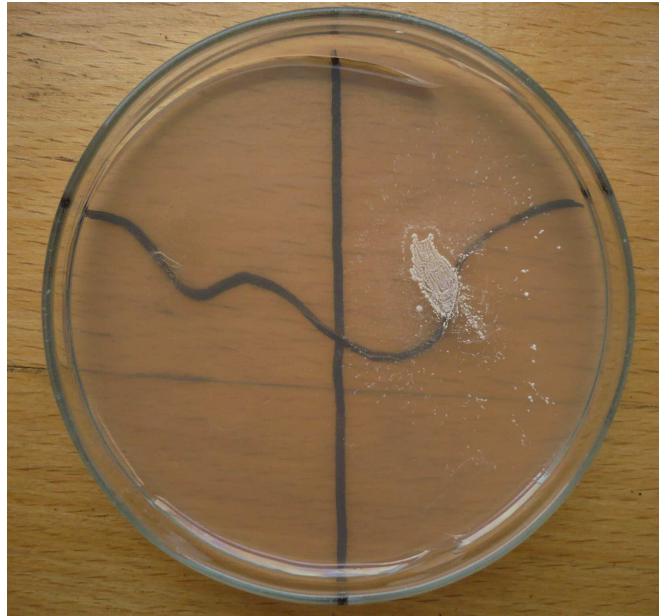
Po obarvení kolonií barvivem karbolfuchsin (postup popsany v kap. 8.4) byla provedena mikroskopie obou typů kolonií. Bílá práškovitá kolonie byla pozorována pomocí imerzního objektivu, kdy při zvětšení 1000krát byla zpozorována tlustší vlákna patřící pravděpodobně plísním. Při pozorování preparátu bez použití imerze byla při zvětšení 1000krát viditelná plísňová vlákna a spory.

Stejným způsobem se postupovalo i v případě druhého typu kolonie. Byla shledána tenčí vlákna pravděpodobně skupiny aktinomycét.

Mikroskopicky byl pozorován také povrch zkoumaného filmu na Petriho miskách porostlého oběma typy kolonií. Nebyly zde shledány žádné viditelné známky degradace filmu.

Oba typy kolonií byly opět přeočkovány na novou Petriho misku s minerálním agarem, ale tentokrát jen z poloviny pokrytou tenkým filmem Ecoflexu. To bylo vyzkoušeno z důvodu prokázání, zda obě kolonie rostou na povrchu filmu Ecoflexu, nebo zda rostou pouze na minerálním agaru. Kolonie byly tedy naočkovány jak na tenký film Ecoflex tak i na samotný minerální agar. Po pětidenní inkubaci při 25°C došlo k růstu obou typů kolonií na povrchu filmu Ecoflex i na samotném agaru (Obr. 8).

Poté byly obě kolonie naočkovány jen na samotný minerální agar bez tenkého filmu Ecoflex. Po inkubaci po dobu sedmi dní při 25°C došlo ke stejnému nárůstu obou typů kolonií jako v předchozích případech (Obr. 9). Z toho lze usuzovat, že mikroorganismy narostlé během pokusu rostou na minerálním agaru bez ohledu zda je na něm vrstva materiálu Ecoflex či nikoli. Izolované kmeny tedy nejsou degradátory kopolyesteru Ecoflex a další práce s nimi byly zastaveny.



Obr. 8: Narostlé kolonie mikroorganismů (vlevo hnědá kolonie, vpravo bílá práškovitá kolonie) po naočkování na agar s filmem Ecoflex - spodní část a agar bez Ecoflexu - vrchní část)



Obr. 9: Kolonie dvou typů kolonií mikroorganismů rostoucí na minerálním agaru bez tenkého filmu Ecoflex

11 POSOUZENÍ BIODEGRADABILITY VZORKU ECOFLEX Z HLEDISKA PRODUKCE OXIDU UHLIČITÉHO

Míra biodegradace vzorku byla sledována měřením produkce oxidu uhličitého. Dále byl sledován obsah kyslíku v bioreaktorech jako kontrola aerobních podmínek biodegradace. Pro stanovení vyprodukovaného CO_2 a množství O_2 v lahvích byla použita plynová chromatografie. Příprava biodegradačního pokusu včetně postupu měření jsou popsány v kapitole 8.5.1 – 8.5.6. Všechny parametry uvedené na obrázcích (Obr. 10 - 13) byly vypočteny podle rovnic viz. kap. 8.5.7.

11.1 Biodegradace vzorku v půdním prostředí

Pro testování biodegradace Ecoflexu v půdním prostředí byl použit vzorek ve formě fólií o tloušťce 100 μm . Jako půdní substrát bylo využito všech sedmi druhů zemědělských půd. Inkubace probíhala při 25°C ve tmě. U půd z lokality Ivaň a Bratčice (pokus 1) bylo testování ukončeno po 103 dnech. U ostatních půd (pokus 2) nebyl test ještě ukončen a nadále je sledován průběh biodegradace. Pro závěry této diplomové práce byly použity výsledky z 69 dne inkubace vzorku. Testovaný vzorek i slepé pokusy byly nasazeny 3krát vedle sebe u půd z lokality Ivaň a Bratčice a pro ostatní půdy bylo testování provedeno 2krát vedle sebe.

Vyhodnocení biodegradace Ecoflexu v půdním prostředí je znázorněno na Obr. 10 a Obr. 11.

Na Obr. 10 je znázorněn průběh odbourávání Ecoflexu pro jednotlivé půdní substráty. Hodnota D_c značí procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 . Nejdříve byl proveden pokus 1 jen se dvěma vybranými druhy půd s nejbohatší mikroflórou z důvodu vyzkoušení správného provedení pokusu a po 76 dnech probíhajícího pokusu 1 byl nasazen pokus 2 se zbývajících druhy půd.

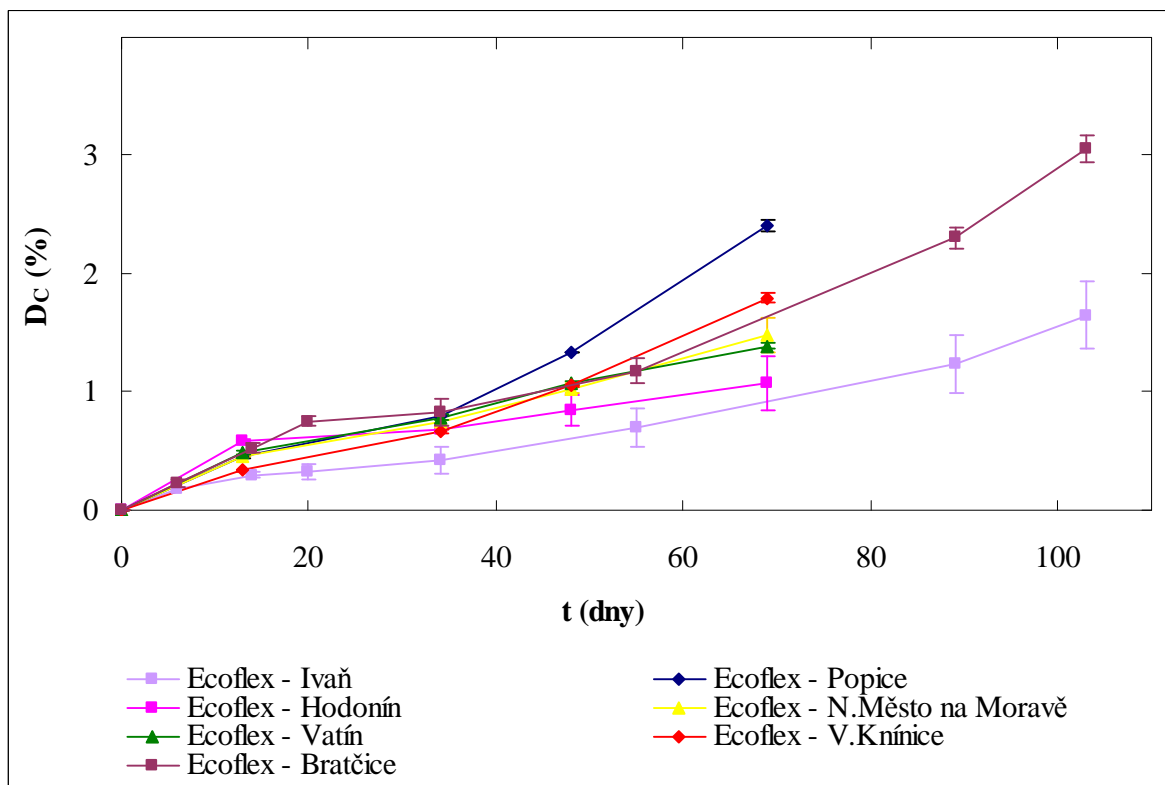
V prvním pokusu byla biodegradace Ecoflexu do 34 dne velmi pozvolná, kdy bylo dosaženo 0,43 % mineralizace vzorku v případě půdy Ivaň a 0,83 %

mineralizace v prostředí půdy Bratčice (Obr. 10 - křivky Ecoflex-Ivaň a Ecoflex-Bratčice). Poté došlo k mírnému zvýšení rychlosti biodegradace u obou druhů půd až na konečnou hodnotu, kdy bylo za 103 dní dosaženo 1,64 % mineralizace vzorku u půdy Ivaň a 3,05 % u půdy Bratčice. Z důvodu velmi nízké rychlosti biodegradace vzorku Ecoflex byl pokus 1 ukončen.

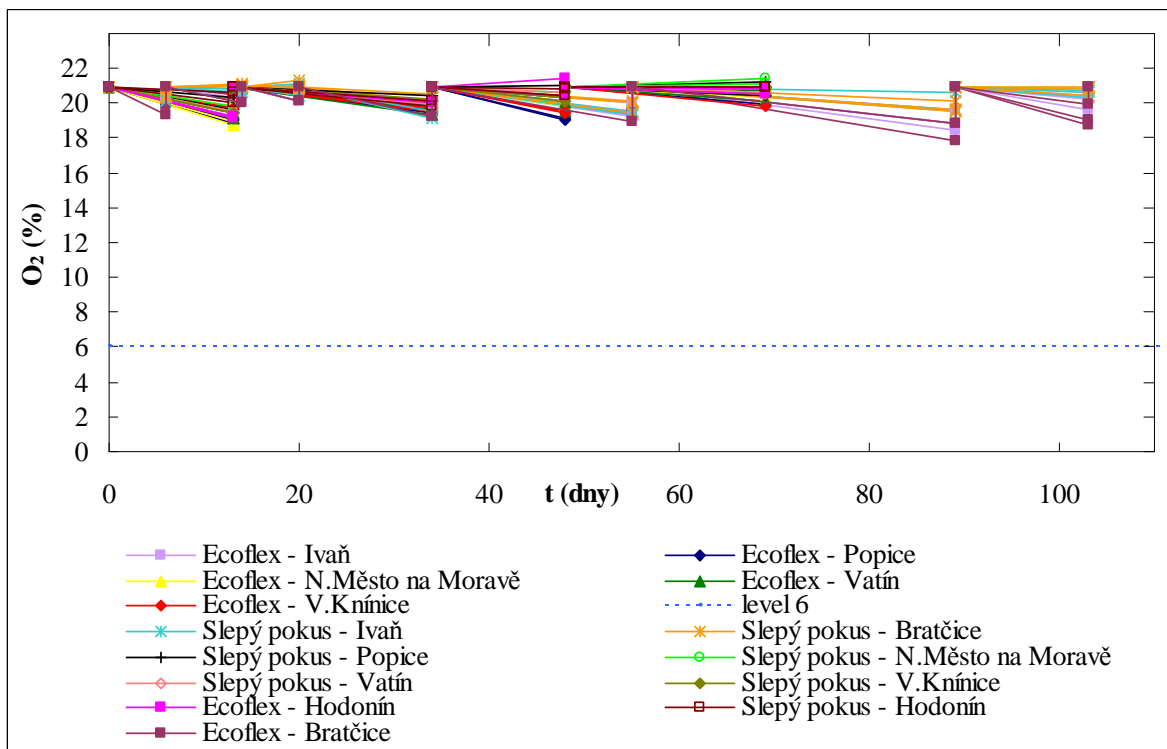
V pokusu 2, kdy byly nasazeny vzorky Ecoflexu se zbývajícími druhy půd, je průběh odbourávání vzorku znázorněn na Obr. 10. Z průběhu křivek je opět patrná pomalá biodegradace vzorku. U půd N. Město na Moravě, Vatín a Hodonín docházelo ke konstantnímu pomalému nárůstu mineralizace Ecoflexu, kdy za 69 dní bylo dosaženo 1,48 % mineralizace vzorku u půdy N. Město na Moravě, 1,38 % u půdy Vatín a 1,07% u půdy z lokality Hodonín. U zbývajících půd Popice a Veverské Knínice docházelo od 34 dne inkubace k o něco vyššímu nárůstu rychlosti biodegradace ve srovnání s ostatními půdy pokusu 2 až na hodnotu 2,39 % mineralizace vzorku u půdy Popice a 1,79 % u půdy Veverské Knínice. Pokus 2 není v současné době ukončen a bude nadále sledován. Pokud nedojde k významnějšímu nárůstu hodnot mineralizace vzorku pohybující se v desítkách procent, bude pokus 2 ukončen po 100 dnech trvání experimentu.

Nejvyšší hodnotu mineralizace vzorku vykazoval vzorek v prostředí půdy Bratčice a to 3,05 % za 103 dní.

Na Obr. 11 jsou znázorněny kyslíkové poměry v bioreaktorech v průběhu biodegradačního pokusu. Z důvodů zachování aerobních podmínek po celou dobu pokusu bylo nutné reaktory provzdušňovat (kap. 8.5.6). Na Obr. 11 je znázorněna hodnota level 6 %, která značí hranici pod kterou nesměla klesnout % kyslíku, aby pokus probíhal za aerobních podmínek a nedošlo tak ke zpomalení aktivity mikroorganismů. Reaktory byly provzdušňovány po 4 týdenních intervalech, kdy nedošlo k překročení hranice 6 %, a proto nemusel být zvolen kratší interval provzdušňování lahví. Po celou dobu pokusu neklesla hodnota kyslíku pro všechny druhy půd pod 17 %, což souvisí i s nízkou produkcí CO₂ během pokusu.



Obr. 10: Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO_2 vzorku Ecoflex ve formě 100 μm fólií - půdní prostředí (vynesené body jsou průměrem ze 2 nebo 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce)



Obr. 11: Aktuální koncentrace O_2 v bioreaktorech (vzorek Ecoflex ve formě 100 μm fólií - půdní prostředí). Pilovitý tvar křivek je způsoben pravidelným provzdušňováním lahví, při kterém se koncentrace kyslíku vždy vrátí na původní hodnotu.

11.2 Biodegradace vzorku v prostředí vyzrálého kompostu

Pro testování biodegradace Ecoflexu v prostředí vyzrálého kompostu bylo použito 2 druhů kompostu (charakteristika viz kap. 9.2). Kompost 1 se lišil od druhého kompostu vyšší dobou zrání (Tab. 17) a vyššími počty termofilních bakterií a aktinomycét (Tab. 16). Vzorek byl testován ve formě 100 μm fólií, prášku a tenkého povlaku na perlitu. Jako pozitivní kontrola byla testována mikrokrystalická celulóza. Inkubace probíhala při 58°C ve tmě. Všechny kompostování testy ještě nejsou ukončeny a stále probíhá sledování biodegradace vzorku.

V prvním pokusu byl vzorek nasazen ve formě fólií o tloušťce 100 μm a jako substrát byl použit kompost 1. Pro závěry této diplomové práce byly použity výsledky ze 83 dne inkubace vzorku. Protože první výsledky ukazovaly, že biodegradace probíhala velmi omezeně podobně jako v případě

půdy, zamýšleli jsme se, zda není příčinou forma vzorku, tedy fólie s velmi malým povrchem. K těmto úvahám nás rovněž přivedla skutečnost, že v literatuře je biodegradace Ecoflexu v kompostu popsána, na rozdíl od půdy, že probíhá údajně velmi snadno (kap. 4.2.1). Pokusili jsme se tedy vzorek převést do formy, která by vykazovala větší specifický povrch (viz kap. 9.1). Protože kompost použitý v pokusu 1 již nebyl k dispozici, byl použit kompost nový (kompost 2).

Ve druhém pokusu byl tedy použit vzorek v nových formách a to ve formě tenkého povlaku na perlitu a prášku, současně byla testována referenční látka celulóza. Jako substrát sloužil kompost 2. Výsledky jsou zhodnoceny ze 54 dne experimentu.

Ve třetím pokusu byl vzorek dávkován opět ve formě 100 μm fólií, ale v prostředí kompostu 2. Účelem pokusu 3 bylo zopakovat experiment s fólií v prostředí nového kompostu, abychom vyloučili možnost, že její špatná biodegradabilita v pokusu 1 byla způsobena kompostem, v tomto pokusu použitým. Výsledky jsou popsány ze 49 dne inkubace vzorku. Testované formy vzorku, slepé pokusy i referenční látka byly testovány 3krát vedle sebe.

Vyhodnocení biodegradace Ecoflexu v prostředí vyzrálých kompostů je znázorněno na Obr. 12 a Obr. 13.

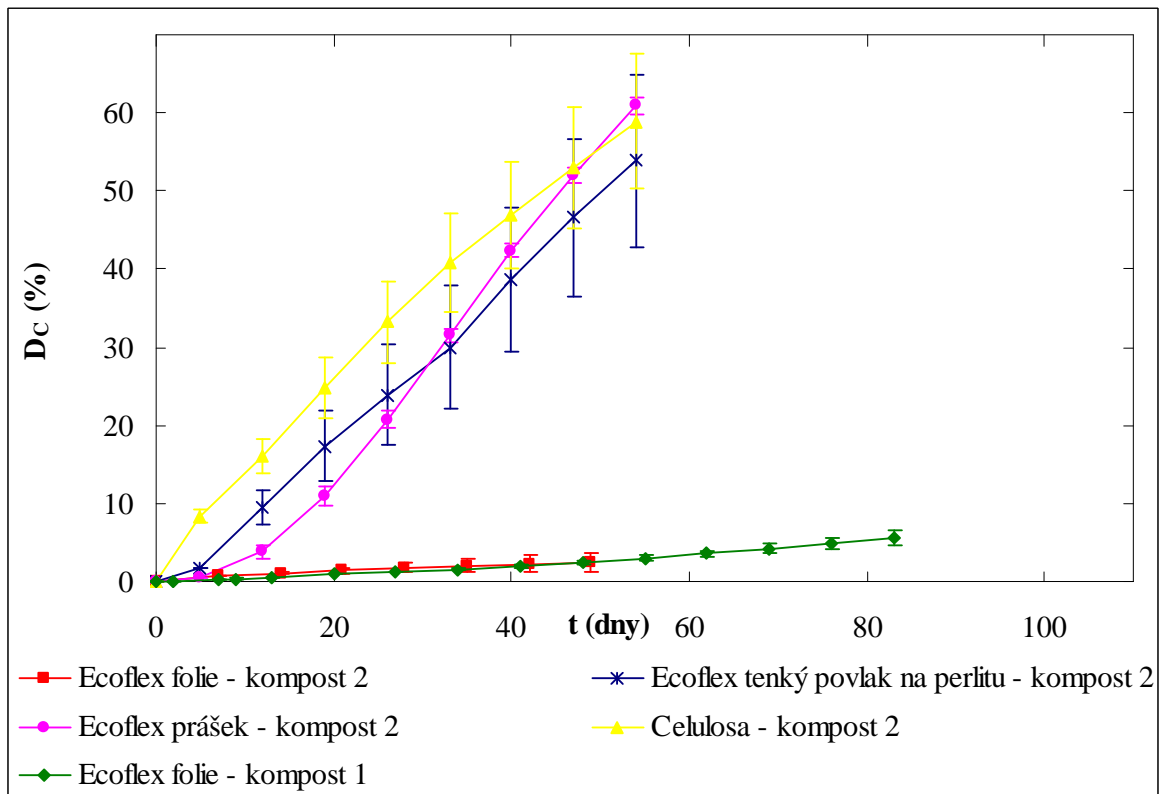
Na Obr. 12 je znázorněn průběh odbourávání různých forem Ecoflexu v prostředí kompostu 1 a 2. Z obrázku je zřejmé, že mineralizace vzorku dosahovala vyšších hodnot v případě vzorku ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu než u vzorku ve formě 100 μm fólií. Biodegradace vzorku ve formě 100 μm fólií byla velmi pozvolná jak v prostředí kompostu 1 tak i v kompostu 2. Křivka Ecoflex fólie-kompost 2 téměř kopíruje křivku Ecoflex fólie-kompost 1. To znamená, že odbourávání Ecoflexu ve formě fólií je téměř shodné v obou typech kompostů. Mineralizace vzorku ve formě fólií dosahovala v případě kompostu 1 za 48 dní 2,38 % (za 83 dní 5,56 %) a v případě kompostu 2 dosahovala za 49 dní hodnoty 2,42 %. Odlišný průběh

biodegradačních křivek vykazoval vzorek ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu.

Odbourávání vzorku ve formě tenkého povlaku na perlitu probíhalo téměř stejnou rychlostí jako odbourávání referenční látky, jen počáteční nárůst procenta mineralizace byl v případě referenční látky oproti vzorkům vyšší. Degradace vzorku ve formě prášku byla zpočátku pomalejší než u tenkého povlaku, ale od 26. dne inkubace došlo k nárůstu degradační rychlosti a v 54. dnu inkubace dosáhla hodnoty 60,90 % a tím dosáhla o 2 % vyšší hodnoty mineralizace než celulóza (58,87 %). Mineralizace vzorku ve formě tenkého povlaku byla 54.den experimentu 53,92 %.

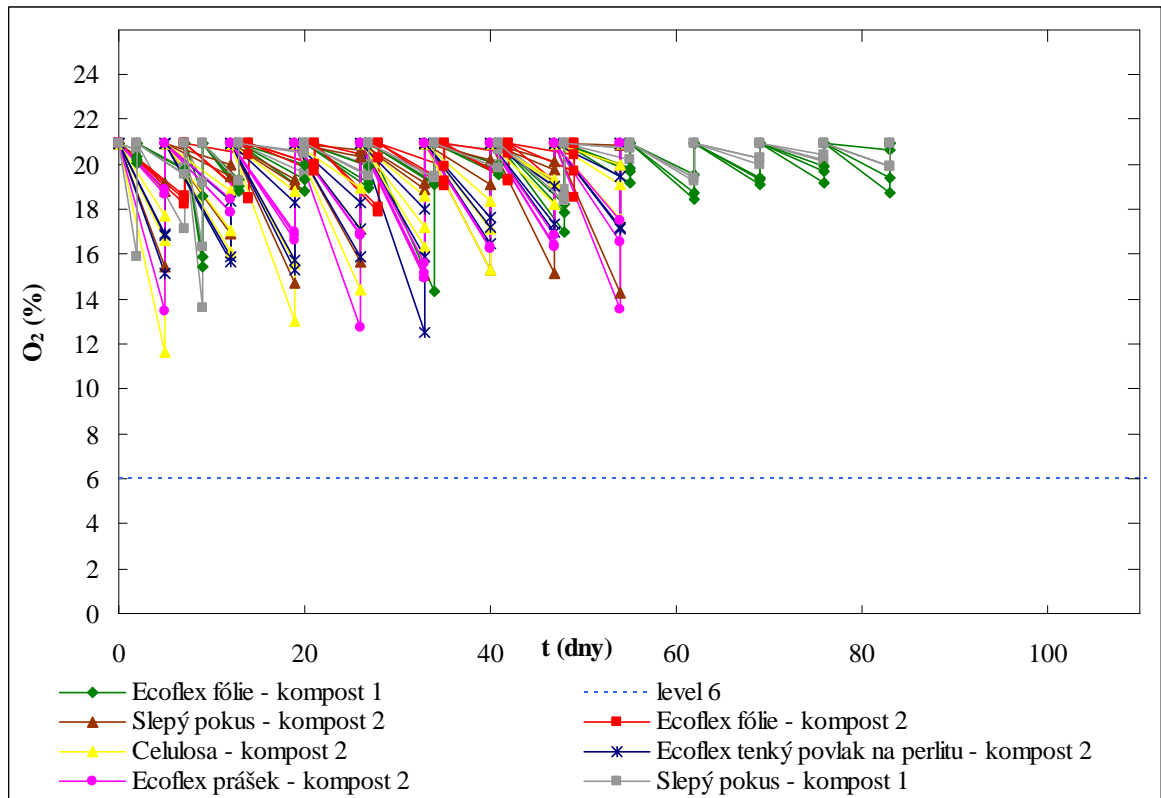
Rychlost odbourávání celulózy a vzorku ve formě tenkého povlaku na perlitu byla od 12 dne inkubace cca 7-8 % za týden a vzorku ve formě prášku cca 10 % za týden.

Nedokonalostí pokusu 2 je skutečnost, že pozorovaná produkce CO₂ ve dvou lahvích ze sledovaného souboru zaostávala za svými dvěma paralelně sledovanými opakováními. Nemáme pro toto chování dobré vysvětlení, zajímavé je, že podobná nesrovnalost se děje i u druhé diplomové práce, řešené v letošním roce, kde je hodnocení pomocí GC používáno, zatímco v minulých letech nic podobného pozorováno nebylo. Jedná se pravděpodobně o nějaký technický nedostatek. Konkrétně se jednalo o láhev referenční látky (celulóza) a láhev s tenkým povlakem na perlitu. V případě celulózy, bylo dosaženo za 54 dní 58,87 % mineralizace při zahrnutí výsledků ze všech lahví a 71,04 %, kdyby byla vyloučena láhev vykazující odlišnou biodegradaci vzorku. U tenkého povlaku byla mineralizace 53,92 % za 54 dní při použití výsledků ze všech lahví a 69,49 % při zahrnutí výsledků jen ze 2 lahví. Vyloučením odlišných výsledků, naměřených vždy u jedné láhve sledovaného souboru, bychom získali více než o 10 % vyšších hodnot mineralizace zmíněných forem vzorku.



Obr. 12: Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO_2 vzorku Ecoflex ve formě 100 μm fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku - prostředí vyzrálého kompostu 1 a 2 (vynesené body jsou průměrem ze 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce)

Na Obr. 13 jsou znázorněny kyslíkové poměry v bioreaktorech v průběhu biodegradačního pokusu. Reaktory byly provzdušňovány po týdenních intervalech, kdy nedošlo k překročení hranice 6 %, a proto nemusel být zvolen kratší interval provzdušňování lahví.



Obr. 13: Aktuální koncentrace O_2 v bioreaktorech (vzorek Ecoflex ve formě 100 μm fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku – prostředí vyžralého kompostu 1 a 2). Pilovitý tvar křivek je způsoben pravidelným provzdušňováním lahví, při kterém se koncentrace kyslíku vždy vrátí na původní hodnotu.

Závěrem lze říci, že míra biodegradace vzorku ve formě 100 μm fólií je téměř stejná v prostředí půdy jako v prostředí vyžralého kompostu. V kompostu bylo dosaženo jen o 1 % vyšší hodnoty mineralizace vzorku než v půdě. Nejlepší prostředí pro odbourávání Ecoflexu představovala půda z lokality Bratčice a Popice.

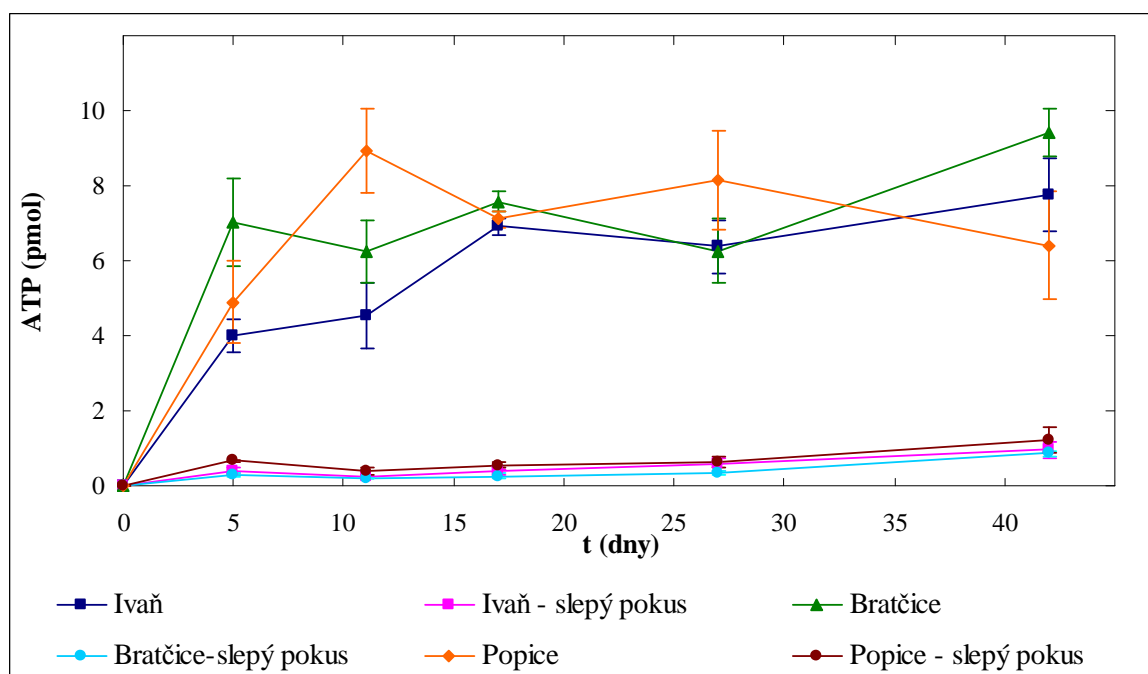
Biodegradace vzorku ve formě fólií v prostředí půdy i kompostu byla velmi pomalá cca 2 % za 69 dní, a proto se přistoupilo k jiné alternativě testování vzorku, a to přípravou jeho jiných forem - prášku a tenkého povlaku na perlitu, které se vyznačovaly vyšším specifickým povrchem než fólie. V tomto případě již byly zjištěny značné rozdíly v procentech mineralizace vzorku oproti testování fólií. Nadějně se jeví výsledky dosažené

u vzorku ve formě prášku, jehož degradace byla 60,90 % za 54 dní a dosáhla tak jen o 2 % nižšího výsledku než bylo získáno u dobře rozložitelné referenční látky. I vzorek ve formě tenkého povlaku na perlitu nejevil pomalou biodegradaci a za 54 dní bylo dosaženo 53,92 % mineralizace vzorku, což je o asi 7 % méně než u Ecoflexu ve formě prášku. Zdá se tedy, že pravděpodobně větší specifický povrch má rozhodující vliv na biodegradabilitu vzorku. To může mít velmi zajímavý praktický dopad pro přípravu případných biodegradovatelných výrobků z Ecoflexu. Například přidávkem vhodného biodegradovatelného plniva je možné docílit toho, že aktivní povrch bude větší než u fólie s čistého Ecoflexu.

Nově vytvořené formy Ecoflexu tedy vykazovaly vyšší míru biodegradace než vzorek ve formě fólií, testovaný jak v prostředí půdy tak i v kompostu. Protože nově vytvořené formy vzorku nebyly testovány v obou substrátech – půdě a kompostu, ale jen v kompostu nemohou být výsledky mezi sebou srovnány. Proto budou navazovat práce s materiálem Ecoflex ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu a bude sledována jeho biodegradace právě v půdním prostředí. Testování bude probíhat s použitím všech 7 druhů zemědělských půd a budou sledovány rozdíly v mineralizaci vzorků u jednotlivých druhů půd.

12 STANOVENÍ MIKROBIÁLNÍ BIOMASY POMOCÍ MĚŘENÍ OBSAHU ATP

Cílem pokusu bylo ověření metody sledování biodegradace Ecoflexu pomocí stanovení bakteriálního ATP. Množství ATP bylo měřeno pomocí přístroje luminometru. Účelem pokusu bylo jednak ověřit možnosti této metodiky pro sledování biodegradace materiálu ve vodném prostředí a jednak, v případě Ecoflexu, zjistit zda vzorek obsahuje nějaký podíl látek, které mohou být snadno degradovány a zda degradace trvale pokračuje, nebo je po počátečním nárůstu zbrzděna. Ecoflex byl použit ve formě fólií o tloušťce 100 μm a jako zdroj mikroorganismů k jeho rozkladu sloužila suspenze půdních mikroorganismů, získaná ze 3 druhů zemědělských půd (Ivaň, Bratčice a Popice). Vzorky i slepé pokusy byly testovány 3krát vedle sebe pro 8 sad měření. Měření probíhalo zpočátku po pěti dnech, poté byl interval prodloužen na 10 dnů a pak na 15 dnů. Výsledky naměřené přístrojem byly přepočteny pomocí rovnice (7) z jednotek RLU na množství ATP v jednotkách pmol (Obr. 14).



Obr. 14: Naměřené hodnoty celkového ATP pro tři druhy půd v jednotlivých dnech inkubace (vynesené body jsou průměrem ze 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce)

Z Obr. 14 je zřejmý jasný rozdíl mezi slepým pokusem a pokusem v přítomnosti vzorku. V případě slepého pokusu došlo k nárůstu mikroorganismů, vyjádřeným množstvím ATP, nepřesahující hodnotu 2 pmol ATP v průběhu celého testovacího období. U vzorků byl pozorován ihned po 5 dnech inkubace nárůst mikroorganismů, dosahující hodnot ATP 3,98 pmol u půdy Ivaň a 4,88 pmol u půdy Popice. Nejvyšší nárůst byl pozorován u půdy Bratčice a to dosažením hodnoty ATP 7,02 pmol. Celkově byl nárůst ATP asi 10krát vyšší než u slepých pokusů. Tento nárůst byl pravděpodobně způsoben vyextrahováním nízkomolekulárního podílu vzorku do prostředí a jeho následným využitím mikroorganismy jako zdroje uhlíku či energie. Po počátečním nárůstu došlo k ustálení hladiny ATP. Došlo pravděpodobně ke zužitkování Ecoflexu mikroorganismy, kdy mikroorganismy nadále přežívaly v prostředí, a proto také nedocházelo k významnému poklesu ATP. Z obrázku tedy vyplývá, že biodegradace Ecoflexu ve vodném prostředí probíhá, ale jen zvolna a tento fakt může mít souvislost s pomalou biodegradací vzorku ve formě 100 μm fólií při biodegradčních testech v prostředí půdy a vyzrálého kompostu (viz kap. 11). Příčinou může být opět malý specifický povrch fólií.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zavést metodiku práce s novým materiálem Ecoflex, především byly připraveny jeho různé formy. Dále bylo cílem navrhnout a vyzkoušet metodiku sledování biodegradability vzorku v prostředí půdy a vyzrálého kompostu. Míra biodegradace vzorku v půdě a kompostu byla sledována analýzou vyprodukovaného oxidu uhličitého metodou plynové chromatografie. Dále byla vyzkoušena metoda sledování biodegradace Ecoflexu pomocí stanovení bakteriálního ATP.

Vzorek byl v biodegradačních testech testován v různých formách a to ve formě 100 μm fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku. Výsledky dosažené mineralizace vzorku v půdě a kompostu jsou shrnuty do následujících tabulek (Tab. 18 a 19).

Tab. 18: Souhrn výsledků biodegradace Ecoflexu v půdním prostředí

Lokalita půdy	Forma vzorku	Inkubace (dny)	Mineralizace (%)
Ivaň	fólie (100 μm)	103	1,6
Bratčice		103	3,1
Popice		69	2,4
N.Město na Moravě		69	1,5
Hodonín		69	1,1
Vatín		69	1,4
Veverské Knínice		69	1,8

Tab. 19: Souhrn výsledků biodegradace Ecoflexu v prostředí vyzrálého kompostu

Druh kompostu	Forma vzorku	Inkubace (dny)	Mineralizace (%)
Kompost 1	fólie (100 μm)	48	2,4
Kompost 2	fólie (100 μm)	49	2,4
Kompost 2	tenký povlak na perlitu	54	54
Kompost 2	prášek	54	61

Biodegradace Ecoflexu ve formě 100 μm fólií probíhala u všech druhů zemědělských půd na hranici prokazatelnosti. I v kompostu probíhala degradace fólií velmi pozvolna. Bylo zvažováno, jestli forma vzorku není příčinou pomalé degradace vzorku, proto byl vzorek převeden do formy vykazující větší specifický povrch než v případě fólií. V tomto případě již byly zjištěny značné rozdíly v procentech mineralizace vzorku ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu oproti testování fólií. Zdá se tedy, že pravděpodobně větší specifický povrch má rozhodující vliv na biodegradabilitu vzorku. Protože u vzorku ve formě prášku a tenkého povlaku na perlitu byla biodegradace zkoumána jen v prostředí kompostu, ale nebyla testována v půdě, nemohou být výsledky dosažené mineralizace jednotlivých forem vzorku mezi sebou srovnány. Proto bude pokračováno v testování Ecoflexu právě v prostředí půdy ve formách vykazujících vyšší specifický povrch.

U vybraných půdních vzorků byl proveden pokus o izolaci případných degradérů kopolyesteru Ecoflex. Byl sledován nárůst mikroorganismů na tenké vrstvě Ecoflexu pokrývající minerální agar. Došlo však ke stejnému nárůstu mikroorganismů na materiálu Ecoflex jako na samotném agaru. Z toho lze usuzovat, že izolované kmeny nebyly degradátory Ecoflexu a v dalším zkoumání tedy nebylo pokračováno.

Biodegradace Ecoflexu ve formě fólií byla sledována také ve vodném prostředí pomocí stanovení bakteriálního ATP luminometrickou metodou. Po 5 dnech inkubace byl již zaznamenán nárůst množství ATP oproti slepým pokusům, kdy obsah ATP u vzorků byl asi desetkrát vyšší (3,98 pmol u půdy Ivaň) než u slepých pokusů (0,41 pmol). Po počátečním nárůstu však už nedocházelo k významnějšímu nárůstu množství ATP, což mohlo být pravděpodobně způsobeno tím, že došlo ke spotřebování nízkomolekulárního podílu vzorku. Dále se hladina ATP ustálila. Můžeme zde vidět souvislost s pomalou degradací vzorku ve formě fólií u biodegradačních pokusů v půdě i kompostu. Vysvětlením pomalé biodegradace fólií Ecoflexu může být opět jejich malý specifický povrch.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Slavíková, H. *Biodegradabilní plasty a jejich využití*. [on-line]. [cit. 2008-11-21] . Dostupný z www: < www.odpadoveforum.cz/symposium/TextyOF/424.pdf >.
- [2] *Biodegradovatelné polymery v obalové technice*. [on-line]. [cit. 2008-11-21] . Dostupný z www: <www.packagingcz.cz/pdf/2004_06/Packaging_06_04-6.pdf >.
- [3] Yamamoto, M., Witt, U., Skupin, G., Beimborn, D., Müller, R.J. *Biodegradable Aliphatic-Aromatic Polyesters "Ecoflex"*. [on-line]. [cit. 2008-11-21] . Dostupný z www: <www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf_v04/bpol4011_299_305.pdf>.
- [4] Witt, U., Einig, T., Yamamoto, 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.
- [5] Chen, Y., Tan, L., Chen, L., Yang, Y., Wang, X. *Study on biodegradable aromatic/aliphatic copolyesters*, Brazilian Journal of Chemical Engineering (2007).
- [6] *Biodegradable Polymers – Inspired by Nature: Ecoflex, Ecovio*. [on-line]. [cit. 2008-12-03] . Dostupný z www: < http://www.plasticsportal.net/wa/plasticsEU~en_GB/function/conversions:/publish/common/upload/biodegradable_plastics/Ecoflex_Brochure.pdf >.
- [7] Witt, U., Müller, R.J., Deckwer, W.D. *Biodegradation behavior and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance*, Journal of environmental polymer degradation (1997), pg. 81-89.
- [8] Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*, Biotechnology Advances 26 (2008), pg. 246-265.
- [9] Singh, B., Sharma, N. *Mechanistic implications of plastic degradation*, Polymer Degradation and Stability 93 (2008), pg. 561-584.

- [10] Olewnik, E., Czerwinski, W. *Synthesis, structural study and hydrolytic degradation of copolymer based on glycolic acid and bis-2-hydroxyethyl terephthalate*, *Polymer Degradation and Stability* 94 (2009), pg. 221-226.
- [11] Müller, R.J. *Biological degradation of synthetic polyesters-Enzymes as potential catalysts for polyester recycling*, *Process Biochemistry* 41 (2006), pg. 2124-2128.
- [12] Marten, E., Müller, R.J., Deckwer, W.D. *Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic-aromatic copolyesters*, *Polymer Degradation and Stability* 88 (2005), pg. 371-381.
- [13] Herzog, K., Müller, R.J., Deckwer, W.D. *Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases*, *Polymer Degradation and Stability* 91 (2006), pg. 2486-2498.
- [14] Wu, C., Gan, Z. *A novel method of studying polymer biodegradation*, *Polymer* 39 (1998), pg. 4429-4431.
- [15] Müller, R.J., Witt, U., Rantze, E., Deckwer, W.D. *Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents*, *Polymer Degradation and Stability* 59 (1998), pg. 203-208.
- [16] Chen, X., Chen, W., Zhu, G., Huang, F., Zhang, J. *Synthesis, ¹H-NMR Characterization, and Biodegradation Behavior of Aliphatic-aromatic random copolyester*, *Journal of Applied Polymer Science* 104 (2007), pg. 2643-2649.
- [17] Berti, C., Celli, A., Marchese, P., Barbiroli, G., Credico, D.F., Verney, V., Commereuc, S. *Novel copolyesters based on poly(alkylene dicarboxylate)s: 1. Thermal behavior and biodegradation of aliphatic-aromatic random copolymers*, *European Polymer Journal* 44 (2008), pg. 3650-3661.
- [18] Adamus, G., Dacko, P., Musiol, M., Sikorska, W., Sobota, M., Biczak, R., Herman, B., Rychter, P., Krasowska, K., Rutkowska, M., Kowalczyk, M. *Degradation of selected synthetic polystyrenes in natural conditions*, *Polimery* (2006), pg. 539-546

- [19] Kleeberg, I., Hetz, C., Kroppenstedt, Müller, R.J., Deckwer, W.D. *Biodegradation of Aliphatic-Aromatic Copolyesters by Thermomonospora fusca and Other Thermophilic Compost Isolates*, Applied and Environmental Mikrobiology 64 (1998), pg. 1731-1735.
- [20] Kijchavengkul, T., Auras, R., Rubino, M., Ngouajio, M., Fernandez R.T. *Assessment of aliphatic/aromatic copolyester biodegradable mulch films. Part I: Field study*, Chemosphere 71 (2008), pg. 942-953.
- [21] 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.
- [22] Růžička, J. *Mikrobiologická cvičení*, UTB Academia Centrum Zlín. Zlín 2001. ISBN 80-7318-017-0.
- [23] Kuřitka I., Slobodian P., Saha N.: *Recyklace a zneškodňování tuhých odpadů*, UTB ve Zlíně, Fakulta technologická 2006, str. 17-19.
- [24] Gerych, P. *Biodegradace polyethylenu s prooxidanty*. UTB ve Zlíně, Fakulta technologická, diplomová práce 2008.
- [25] *Růst mikroorganismů a jeho sledování – stanovení biomasy mikroorganismů*. [on-line]. [cit. 2009-03-22]. Dostupný z www: <www.geopolymer.cz/uiozp/studmat/2008912145649/Úloha7.doc>
- [26] *ATP Biomass Kit HS, návod k použití*. [on-line]. [cit. 2009-04-10]. Dostupný z www: <<http://www.biothema.com/sitespecific/biothema/files/ATP-Biomass-Kit.pdf>>
- [27] *Měření aktivit mikroorganismů*. [on-line]. [cit. 2009-03-22]. Dostupný z www: <http://www.recetox.muni.cz/sources/prednasky/hofman/03_ekotox2.pdf>.
- [28] *Sledování úrovně hygieny v potravinářských provozech*. [on-line]. [cit. 2009-03-22]. Dostupný z www: <http://www.vscht.cz/ktk/www_324/lab/navody/oborI/MO.pdf>.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

PBT	Poly(butylentereftalát)
M	Modulární jednotky
LDPE	Nízkohustotní polyethylen
ASTM	American Society for Testing and Materials
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
DSC	Diferenciální skenovací kolorimetrie
NMR	Nukleární magnetická rezonance
XRD	Rentgenová difrakční analýza
AFM	Skenovací snímací mikroskopie
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
PET	Poly(ethylentereftalát)
T.fusca	Termomonospora fusca
GC	Plynově chromatografická analýza
GPC	Gelová permeační chromatografie
GC-MS	Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
ATP	Adenosintrifosfát
MM	Minerální médium
SR	Suspendační roztok
MZLU	Masarykova zemědělská a lesnická univerzita
CFU	Colony Forming Units (počet kolonií tvořících jednotek)
TC	Celkový uhlík
NDIR	Nedisperzní infračervený detektor
TCD	Tepelně vodivostní detektor
RLU	Relativní jednotky záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Chemická struktura aromaticko-alifatického kopolyesteru	14
Obr. 2: Bioreaktor (láhev pro aerobní biodegradační testy)	49
Obr. 3: Elektronová mikroskopie Ecoflexu ve formě fólie o tloušťce 100 μm, a) 1000x zvětšené, b) 5000x zvětšené	61
Obr. 4: Elektronová mikroskopie a) čistého perlitu, 1000x zvětšené, b) Ecoflexu ve formě tenkého povlaku na perlitu, 1000x zvětšené.....	62
Obr. 5: Elektronová mikroskopie Ecoflexu ve formě prášku, a) 2000x zvětšené, b) 5000x zvětšené	62
Obr. 6: Nárůst mikroorganismů na filmu Ecoflex (inokulovaný suspenzí půdních mikroorganismů z lokality Popice)	68
Obr. 7: Nárůst dvou typů kolonií přeočkovaných na nový minerální agar s filmem Ecoflex	68
Obr. 8: Narostlé kolonie mikroorganismů (vlevo hnědá kolonie, vpravo bílá práškovitá kolonie) po naočkování na agar s filmem Ecoflex - spodní část a agar bez Ecoflexu - vrchní část).....	70
Obr. 9: Kolonie dvou typů kolonií mikroorganismů rostoucí na minerálním agaru bez tenkého filmu Ecoflex	70
Obr. 10: Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO ₂ vzorku Ecoflex ve formě 100 μm fólií - půdní prostředí (vynesené body jsou průměrem ze 2 nebo 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce).....	73
Obr. 11: Aktuální koncentrace O ₂ v bioreaktorech (vzorek Ecoflex ve formě 100 μm fólií - půdní prostředí). Pilovitý tvar křivek je způsoben pravidelným provzdušňováním lahví, při kterém se koncentrace kyslíku vždy vrátí na původní hodnotu.	74
Obr. 12: Procenta mineralizace uhlíku ve formě CO ₂ vzorku Ecoflex ve formě 100 μm fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku - prostředí vyzrálého kompostu 1 a 2 (vynesené body jsou průměrem ze 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce).....	77
Obr. 13: Aktuální koncentrace O ₂ v bioreaktorech (vzorek Ecoflex ve formě 100 μm fólií, tenkého povlaku na perlitu a prášku – prostředí	

vyzrálého kompostu 1 a 2). Pilovitý tvar křivek je způsoben pravidelným provzdušňováním lahví, při kterém se koncentrace kyslíku vždy vrátí na původní hodnotu. 78

Obr. 14: Naměřené hodnoty celkového ATP pro tři druhy půd v jednotlivých dnech inkubace (vynesené body jsou průměrem ze 3 měření, chybové úsečky odpovídají směrodatné odchylce) 80

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Základní materiálové vlastnosti materiálu Ecoflex (50 µm fólie) [3,6,7]	15
Tab. 2: DIN V 54900 – Zkoumání kompostovatelnosti polymerních materiálů [3].....	19
Tab. 3: Druhy půd z jednotlivých lokalit (Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno).....	43
Tab. 4: Zrnitostní charakteristika půd (Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno)	43
Tab. 5: Hodnoty půdních reakcí jednotlivých půd (Ing. Jiří Jandák, MZLU Brno)	44
Tab. 6: Charakteristika kompostu – chemické a fyzikální vlastnosti (AGRO CS, a.s.)	46
Tab. 7: Nasazení pokusu 1 (půdní prostředí).....	51
Tab. 8: Nasazení pokusu 2 (půdní prostředí).....	51
Tab. 9: Nasazení pokusu 1 (prostředí vyzrálého kompostu 1)	53
Tab. 10: Nasazení pokusu 2 (prostředí vyzrálého kompostu 2).....	53
Tab. 11: Nasazení pokusu 3 (prostředí vyzrálého kompostu 2)	53
Tab. 12: Podmínky měření CO ₂ a O ₂ na přístroji GC Agilent 7890.....	54
Tab. 13: Procenta krystalinity Ecoflexu ve formě lité fólie, lisované fólie a prášku	63
Tab. 14: Sušina půd	65
Tab. 15: Mikrobiologický rozbor půd	65
Tab. 16: Mikrobiologický rozbor kompostu 1 a 2	66
Tab. 17: Charakteristika kompostu – stanovené fyzikální a chemické vlastnosti	66
Tab. 18: Souhrn výsledků biodegradace Ecoflexu v půdním prostředí	82
Tab. 19: Souhrn výsledků biodegradace Ecoflexu v prostředí vyzrálého kompostu.....	82