VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ
FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV CHEMIE A TECHNOLOGIE OCHRANY ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
INSTITUTE OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF ENVIRONMENTAL PROTECTION

STUDIUM DEGRADAČNÍCH PROCESŮ BIOPLASTŮ
STUDY ON DEGRADATION PROCESSES OF BIOPLASTICS

TEZE DIZERTAČNÍ PRÁCE
SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

AUTOR PRÁCE Ing. Jakub Fojt
AUTHOR

ŠKOLITEL prof. Ing. Jiří Kučerík, Ph.D.
SUPERVISOR

BRNO 2023

Abstrakt

Biodegradabilní bioplasty jsou v současné době vyvíjeny jako ekologičtější náhrada za konvenční plasty, která má najít uplatnění v zemědělství nebo v obalových materiálech. Se vzrůstající produkcí těchto výrobků poroste i pravděpodobnost jejich průniku do životního prostředí. U biodegradabilních materiálů se předpokládá jejich rychlá biodegradace, čímž by měly snižovat množství mikroplastů v životním prostředí. Biodegradabilita je v současné době určována pomocí biodegradačních testů, jejichž parametry jsou definovány velmi obecně a často neodrážejí reálné podmínky, ve kterých se bude bioplast rozkládat v životním prostředí. O osudu a vlivu těchto částic v různých ekosystémech (především v půdě, kde předpokládáme nejvyšší kontaminaci) je toho v současné době známo velmi málo. Proto se tato disertační práci zabývá kritickým zhodnocením biodegradačního testu v půdě dle normy ISO 17556:2012, který doplňuje následným stanovením reziduí bioplastu. K tomuto účelu je zde prezentován vývoj analytické metody ke stanovení mikrobioplastů polyhydroxybutyrátu a polymléčné kyseliny založená na metodách používaných ke stanovení konvenčních mikroplastů. Dále je zde také diskutován vliv mikrobioplastů na půdu se zaměřením na efekty, které mohou představovat problémy v zemědělství. Je zde popsán vliv mikrobioplastů na abiotické (chování půdní vody, struktura půdy) a biotické (změna půdní diverzity, cyklus nutrientů) vlastnosti půdy ihned po jejich vstupu do půdy. Taktéž je zde studován vliv biodegradace a dlouhodobého působení mikrobioplastů na půdní organickou hmotu, obsah nutrientů a půdní mikrobiální diverzitu (popsanou pomocí aktivity 5 hlavních enzymů podílejících se na cyklech uhlíku, dusíku a fosforu). V poslední kapitole jsou pak demonstrované vybrané problémy, se kterými je možné se setkat při aplikaci bioplastových produktů v zemědělství, kdy může dojít k rychlejšímu růstů hub (plísní) přirozeně se vyskytujících v půdě. Výsledkem této disertační práce je širší pohled na problematiku bioplastů v životním prostředí, který může sloužit posouzení vhodnosti aplikace bioplastových produktů současné generace v zemědělství a možného nakládání s bioplastovým odpadem.

Klíčová slova

bioplasty, mikrobioplasty, mikroplasty, biodegradace, půda, půdní organická hmota, plastisféra, polyhydroxybutyrát

Abstract

Biodegradable bioplastics are currently developed as a more environmentally friendly replacement for conventional plastics to be used in agriculture or packaging materials. As the production of these products increases, so will the likelihood of introducing them in the environment. Biodegradable materials are expected to biodegrade rapidly, thereby they should reduce the number of microplastics in the environment. Biodegradability is currently determined by biodegradation tests, the parameters of which are defined in very general terms and often do not reflect the actual conditions under which the bioplastic will degrade in the environment. There is a lack of knowledge about the fate and impact of these particles in different ecosystems (especially in soil, where contamination is expected to be highest). Therefore, in this dissertation, we critically evaluate the ISO soil biodegradation test and extend it with a subsequent determination of bioplastic residues in soil. For this reason, an analytical method for the determination of polyhydroxybutyrate and polylactic acid microplastics based on methods used for the determination of conventional microplastics. The effect of microbioplastics on soil is also discussed, focusing on the effects that may pose problems in agriculture. The influence of microbioplastics on abiotic (soil water properties, soil structure) and biotic (soil diversity, nutrient cycling) soil properties immediately after their entry into the soil are described. The effect of biodegradation and long-term presence of microbioplastics in soil on soil organic matter, nutrient content, and soil microbial diversity (described by determining the activity of 5 key enzymes involved in carbon, nitrogen, and phosphorus cycling) are also studied. The last chapter demonstrates the potential problems that can be encountered when bioplastic products are applied in agriculture, where the growth of fungi and molds naturally occurring in the soil can be accelerated. As a result of this dissertation, a comprehensive view of bioplastics in the environment is presented, which can serve to assess the suitability of the application of current generation bioplastic products in agriculture and the possible management of bioplastic waste.

Key words

Bioplastics, micro-bioplastics, microplastics, biodegradation, soil, soil organic matter, plastisphere, polyhydroxybutyrate

OBSAH

OBSAH 4

Úvod 5

Současný stav poznání 7

1 Plastové zemědělství 7

2 Biodegradabilní polymery často používané v zemědělství či určené pro kompostování 8

3 Osud bioplastů v životním prostředí 9

3.1 Biodegradace bioplastů 9

4 Stanovení mikroplastů na bázi konvenčních plastů ve složkách životního prostředí 10

4.1 Extrakce a purifikace 10

5 Stanovení biodegradabilních mikroplastů P3HB a PLA 12

Cíl disertační práce 12

Diskuze výzkumných otázek 14

1 Výzkumná otázka 1: Jak relevantní je využití norem pro biodegradaci pro pochopení osudu biodegradabilních plastů v půdě? 14

2 Výzkumná otázka 2: Je možné stanovit mikrobioplasty podobnými metodami jako konvenční mikroplasty? 17

3 Výzkumná otázka 3: Je vliv mikrobioplastů na životní prostředí srovnatelný s doposud známým vlivem konvenčních mikroplastů? 20

4 Výzkumná otázka 4: Existují nějaká rizika využití biodegradabilních plastů v zemědělství? 23

Závěr 27

Bibliografie 29

Životopis 37

Úvod

V roce 2016 bylo vyrobeno celosvětově 391 miliónů tun plastového materiálu [1]. Plasty jsou využívány především kvůli svým výborným užitným vlastnostem, mezi které patří například stabilita vůči chemikáliím, hydrolýze, mikroorganismům, světlu, teplu, nízká hustota a mechanické vlastnosti [2]. Některé tyto vlastnosti ale způsobují problémy při zpracování nebo likvidaci plastového odpadu. V důsledku toho pouze 9 % všech plastů, které byly za posledních 65 let vyrobeny, bylo zrecyklováno, 12 % bylo spáleno ve spalovnách a zbylých 79 % bylo uloženo ve skládkách. Zbytek se tedy nachází v přírodě [3]. Současné výzkumy odhadují, že v oceánech plave 5 biliónů plastových kousků vážících dohromady 250 miliónů tun a každý rok přibývá dalších 8 miliónů tun [4; 5].

V půdě jsou odhady koncentrace mikroplastů složitější, a to především kvůli komplikovanějšímu osudu mikroplastů v půdách, interakci s jednotlivými komponentami, silnému matričnímu efektu a problematické extrakci mikroplastů z půdy. Proto existuje v současnosti pouze limitované množství studií zaměřených na stanovení koncentrace mikroplastů v půdě [6]. Nicméně, některé odhady uvádějí, že koncentrace mikroplastů v terestrických ekosystémech může být 4–23krát vyšší než ve vodních [7].

Předpokládá se, že konvenční (oil-based) plasty degradují velmi pomalu ve všech složkách životního prostředí [8], jejich postupný rozklad vede k tvorbě mesoplastů (velikost nejdelšího rozměru 1 až 10 mm), mikroplastů (1 až 1000 μm) a nanoplastů (1 až 1000 nm) [9]. Jakmile se mikroplast dostane do půdy, stává se součástí komplexní půdní organické hmoty a minerálních substituentů, díky čemuž se jeho perzistence ještě zvýší [10]. K transportu mikroplastů do půdy pak může dojít například atmosférickou depozicí [11], v půdě půdními živočichy, jakými jsou chvostoskoci [12] či žížaly [13], nebo aplikací čistírenských kalů a kompostů na zemědělské půdy apod. [14].

Obecně jsou mikroplasty rozdělovány na primární a sekundární. Primární mikroplasty jsou vyráběny záměrně a využívají se v kosmetice, čistících přípravcích a obráběcích směsích. Sekundární mikroplasty vznikají z plastů oděrem nebo rozpadem větších plastových předmětů nebo částic [15]. Kvůli tomu se v oceánech, ve sladkovodních ekosystémech a v půdách tyto částice akumulují, což vyvolává obavy z negativních vedlejších efektů [16; 17]. Již bylo prokázané, že nebezpečné jsou například svojí schopností adsorbovat a koncentrovat nebezpečné chemické látky z vody, jako jsou léčiva nebo pesticidy, a tím sloužit jako nosiče těchto sloučenin do těl organismů [18]. Při vysokých koncentracích mikroplastů ve vodních ekosystémech byla prokázána i chronická reprodukční toxicita u mikroorganismů, vyšší mortalita, potíže s příjmem potravy, endokrinní disrupce, oxidativní stres a poruchy imunity a nervového systému [19; 20; 21; 22].

Dále rostou obavy o možných efektech mikroplastů na lidi, protože tyto částice byly detekovány v lidském těle [23; 24]. Obecně platí, že s klesajícím poloměrem částic roste reaktivita a aktivní povrch, proto je možné předpokládat u nanoplastů vyšší biologickou aktivitu a schopnost adsorpce. Nanočástice

plastů se také vyznačují schopností pronikat buněčnou stěnou, čímž dochází k transportu nasorbovaných látek přímo do buněk [25]. Mikroplasty mohou mít také negativní vliv na rostliny, kde snižují klíčivost semen, omezují přísun vody do rostliny, redukují růst kořenů a vyvolávají oxidativní stres u rostlin a tím pádem nižší produkci biomasy [26; 27; 28; 29].

Mikroplasty se taky vyznačují povrchem, na kterém prosperují pouze některé druhy mikroorganismů, který je kolonizován a vede k uvolňování pouze některých extracelulárních enzymů, které ovlivňují degradaci mikroplastů a cykly nutrientů [30; 31; 32]. Mikroplasty v půdě taktéž ovlivňují pH půdy, obsah půdní organické hmoty (SOM, z anglického soil organic matter), transport půdních polutantů a živin [26; 33]. Mimo to bylo zjištěno, že mikroplasty v půdě negativně ovlivňují její strukturu, tvorbu agregátů, porozitu a půdní vodní kapacitu [7; 6].

Na problémy s recyklací a likvidací plastového odpadu Evropská komise zareagovala v lednu roku 2018, kdy zveřejnila svoji vizi, kde mimo podpory recyklace plastů uvedla možné využití a rizika použití biodegradovatelných plastů [34; 35]. Evropská chemická agentura se také pokouší omezit množství mikroplastů v kosmetických přípravcích [36]. Mezi biodegradovatelné plasty patří obecně takové, u kterých dochází za stanovených podmínek (teplota, pH, vlhkost apod.) k rozpadu působením mikroorganismů. Rozpad takového plastu je doprovázen vznikem vody, methanu a/nebo CO_2 a biomasy. Mezi první obory využívající bioplasty se řadí medicína, která využívá biodegradabilní plasty již od konce 80. let a kde slouží jako specifické nosiče účinné látky, jako náhrada lidských tkání a chirurgické implantáty [37]. Velkou popularitu získaly bioplasty také v 3D tisku [38]. Jako materiály jsou biodegradabilní plasty slibná alternativa ke konvenčním, většinou nebiodegradabilním plastům [34]. Proto se biodegradabilní bioplasty začínají využívat pro výrobu obalů na jídlo, mulčovacích folií, geotextilií, tašek na odpad, kosmetiky a oblečení [37]. V roce 2021 bylo celosvětově vyprodukováno 2,22 miliónů MT biobased plastů, z čehož 51,5 % byly biodegradabilní bioplasty) [39]. Předpokládá se, že do roku 2027 se toto množství zvýší až na 6,30 milionů MT [40].

Nicméně, k úplné biodegradaci bioplastů dochází pouze za velmi specifických podmínek, mezi nejdůležitější pak patří vhodná teplota, pH a optimální vlhkost, bohaté prostředí na mikroorganismy a dostatek živin [41]. Jednotlivá prostředí, ve kterých dochází k biodegradaci, jsou od nejagresivnějšího kompostu (teplota, bakterie, houby) > půda (houby, bakterie) > sladká voda (bakterie) > až po mořskou vodu („zředěné bakterie“). Z pořadí vyplývá, že optimální a kontrolovatelné podmínky pro biodegradaci splňuje pouze průmyslový kompost. V reálných ekosystémech nejsou podmínky biodegradace často splnitelné, což vede ke značnému zpomalení biodegradace. Jedním z prvních nejdůležitějších kroků degradace je biofragmentace, která je závislá na množství enzymů. Enzymy jsou produkovány intracelulárně, a proto pro jejich exkreci jsou nutné poměrně specifické podmínky. V případě, že nejsou splněny, tak vznikají biodegradabilní mikroplasty (mikro-bioplasty) paradoxně mnohem rychleji u biodegradovatelných plastů než u běžných (oil-based) plastů [42]. Osud takto vzniklých mikroplastů [6]

ale je, na rozdíl od mikroplastů z konvenčních plastů studován velmi málo [10]. První články týkající se této problematiky naznačují, že mikro-bioplasty mohou taktéž představovat nebezpečí pro životní prostředí [43; 44; 45].

Proto, vzhledem k rostoucí produkci a využití bioplastů, je třeba toto téma otevřít a prostudovat. Prvním krokem pro rozhodnutí o přítomnosti mikroplastů jakéhokoliv typu v životním prostředí a následně o jejich možném vlivu na něj je jejich jednoznačná identifikace a kvantifikace. Nicméně, jak je poukazováno v dalších částech této práce, v současné době neexistují analytické metody pro stanovení biodegradabilních mikroplastů, ani ve vodách, ani v půdách případně v kompostu [46]. Jak je dále diskutováno, lze se inspirovat, alespoň metodicky, v pracích zabývajících se analýzou konvenčních mikroplastů. Jak už bylo řečeno dříve, největší výzvu představují analýzy mikroplastů v půdách, proto je tato práce zaměřena hlavně na tyto analýzy. Jako modelové představitele biodegradabilních plastů byly vybrány polyhydroxyalkanoáty a kyselina polymléčná, o které v posledních 20 letech vzrůstá zájem, což se projevuje i vzrůstajícím počtem publikací, které se jimi zabývají. Tato práce se nezabývá bioplasty ze škrobu a modifikovaných škrobů (byť představují cca 18 % všech bioplastů), protože zatím jsou poly(3-hydroxybutyrát) P3HB a PLA považovány za polymery s vyšším potenciálem ke tvorbě mikroplastů.

Současný stav poznání

1 Plastové zemědělství

Od té doby, kdy se začaly globálně používat v zemědělství mulčovací folie, vzrostlo riziko vzniku plastových reziduí v zemědělské půdě, které se s největší pravděpodobností rozpadají na mikroplasty [47]. Nejčastěji používanými plasty v zemědělství jsou plastové filmy, folie, netkané textilie pro mulčování, kolíky a trubky pro tunelové struktury, stínící sítě chránicí proti kroupám, klíčící nádoby, připínáčky a svorky pro uchycení rostlin anebo biodegradabilní kryty nebo disky pro semena. Přibližně 60 % plodin by v současné době nebylo možné efektivně pěstovat bez použití plastů v zemědělství. Na druhou stranu 1 ha zemědělské půdy může ročně přispět k tvorbě 80 až 200 kg mikroplastů za jeden rok [48]. Kvůli obavám z rostoucího množství plastového odpadu na polích roste popularita biodegradabilních plastů v zemědělství. Jejich biodegradabilita zřídka dosahuje 100 % [49] (anebo není možné zaručit jejich biodegradabilitu především z důvodu kolísající teploty a vlhkosti během roku) a tím pádem jsou podezřelé ze zhoršování kontaminace zemědělských půd mikroplasty s tím, že mikro-bioplasty vykazují podobné nebo stejné ekotoxikologické a sorpční vlastnosti a jsou považovány za perzistentní polutanty. Současným trendem v zemědělství je nahrazování konvenčních plastů biodegradabilními [50], což by mělo ideálně vést kromě žádaného bezodpadového nebo téměř bezodpadového zemědělství také ke snížení půdní vlhkosti a zadržování vody pod mulčovací folií, čímž je docíleno snížení nebezpečí napadení houbovým onemocněním a také k omezení hypoxie kořenů [48]. Při tom se předpokládá možný vznik mikroplastů z těchto bioplastů [42].

2 Biodegradabilní polymery často používané v zemědělství či určené pro kompostování

V této práci byla provedena literární rešerše pomocí Clarivate Analytics Web of Science a Google Scholar se zaměřením na dva biopolymery s největším potenciálem uplatnění v zemědělství (P3HB a PLA), na jejich využití a jejich potenciální analytické metody vhodné k jejich stanovení v různých substrátech se zaměřením na komplikované a komplexní matrice jako je například půda. Pro porovnání byly vyhledány analytické metody vhodné ke stanovení konvenčních mikroplastů.

Mezinárodní unie pro čistou a užitnou chemii definuje biodegradabilní polymery jako „Polymery, které podléhají biodegradaci způsobené biologickou aktivitou, což se projevuje snižováním jejich hmotnosti“ [51]. Tato definice by mohla označit jako biodegradabilní polymery i polymery, které jsou pouze rozpustné ve vodě. Proto při definici biodegradabilních plastů vyžadují některé další organizace i úplnou mineralizaci plastu na oxid uhličitý, vodu a biomasu (CEN/TR 15351:2006) [34]. Tuto definici potom využívají pro normování testů biodegradability ve sladké a slané vodě, v půdě a kompostu různé národní a mezinárodní organizace jako je například Mezinárodní organizace pro standardizaci u norem EN ISO 14851:1999, EN ISO 17556 [52] nebo ASTM D 5338 a ASTM D 6400. Kombinací více relevantních norem vznikají certifikáty, které by měly zaručovat biodegradovatelnost certifikovaného materiálu jako je například belgický Vincotte OK Biodegradable nebo německý DIN CERTCO [53]. Cílem těchto certifikátů je eliminace slabin jednotlivých norem. Mimo informace o biodegradovatelnosti testovaného materiálu, která je získána kombinací biodegradačních testů v různých relevantních ekosystémech, je testována nebezpečnost produktů biodegradace pro životní prostředí pomocí ekotoxických testů. Také udávají formu a jednotlivé body, které má mít protokol výsledků testování. Tyto certifikáty naopak neberou v potaz různé podmínky, které jsou dány geografickou polohou místa, kde je produkt používán, a také změnou ročních období. Také mimo ekotoxikologické testy neřeší nijak charakteristiku produktů biodegradace.

Mezi vysoce biodegradabilní a biokompatibilní polymery patří polyhydroxyalkanoáty, které jsou syntetizovány bakteriemi jako zásobní energetické polymery [54; 55]. Nejrozšířenějším zástupcem PHA je poly(3-hydroxybutyrát) (P3HB). Tento polymer je produkován velkým množstvím gramnegativních i grampozitivních bakterií (*pseudomonas sp., bacillus sp., methylobacterium sp.*) ve stresových podmínkách vyvolaných nedostatkem živin [56]. P3HB je slabě hydrofobní materiál, který vykazuje velkou krystalinitu, vysokou teplotu tání a nízkou pružnost, což komplikuje jeho zpracování a omezuje možné využití v průmyslovém měřítku [54]. Mechanické vlastnosti P3HB mohou být vylepšeny přídavkem dalších polymerů (kyselina polymléčná), vytvořením kopolymerů (s kyselinou 3-hydroxyvalerovou) nebo přídavkem plastifikátorů [56; 54]. Přídavkem aditiv se může výrazně zpomalit biodegradace výsledného produktu [2]. Proto se do těchto směsných plastů (blendů) přidávají látky usnadňující biodegradaci jako je například škrob. Dalším faktorem znesnadňujícím uplatnění PHB je

jeho vysoká ekonomická náročnost při výrobě. Snížení ceny lze například dosáhnout výrobou z odpadních materiálů. Velmi dobrým zdrojem uhlíku pro bakterie syntetizující P3HB je například použitý řepkový fritovací olej, který má navíc vysokou výtěžnost, kdy lze teoreticky z jednoho gramu oleje získat více než jeden gram PHA [55]. Dále je možné využít pro výrobu P3HB biomasu, odpadní produkty cukrovarnického průmyslu nebo hydrolyzát kávových sedlin [54]. Problematická je extrakce P3HB z bakteriální biomasy, na které se v současné době používá chloroform a další neekologická rozpouštědla. Řešením by mohlo být část fritovacího oleje zmýdelnit, použít k extrakci PHB a poté opět rozložit na mastné kyseliny, které je možné využít jako substrát pro bakterie a výrobu dalšího PHB [57].

Druhým velmi rozšířeným biodegradabilním polymerem je kyselina polymléčná (PLA). Jedná se o biobased alifatický polyester. PLA je velmi dobře absorbovatelná těly lidí a zvířat, proto se výrazně rozvíjí její využití v medicínských implantátech. Na rozdíl od biodegradace v organismech dochází k neenzymatické degradaci tohoto biopolymeru [58]. Proto pro biodegradaci vyžaduje vyšší teplotu a vlhkost a je tedy možné ji biodegradovat pouze v průmyslovém kompostu [59]. Velkou popularitu si PLA drží také u 3D tisku [38; 60]. Vzhledem k tomu, že je snadné ho zpracovat a jeho vlastnosti jsou v porovnání s ostatními biodegradabilními polymery, a i některými polymery vyrobenými z ropy (vysoká pevnost a nízká propustnost pro plyny), lepší, je mu věnována posledních 20 let velká pozornost [61]. I přes tyto výhody je možné téměř vždy nalézt vhodnější, a především levnější konvenční plast. Cenu PLA (cena za pelety začíná v současné době na 500 $ za tunu) [62] lze snížit přídavkem levných aditiv na základě biomasy nebo jiných zemědělských produktů, například dřevní moučky nebo škroby.

3 Osud bioplastů v životním prostředí

3.1 Biodegradace bioplastů

K tomu, aby mohlo dojít k biodegradaci daného materiálu, je nutné, aby mohly mikroorganismy biodegradovaný materiál použít jako zdroj potravy nebo energie, tj. aby byla schopné ho metabolizovat svým enzymatickým aparátem. Tuto podmínku splňují jen velmi malé ve vodě rozpustné molekuly, mezi které polymery obecně nepatří. Proto biodegradace probíhá ve čtyřech krocích. Prvním krokem je biodeteriorace, při které je povrch materiálu pokrytý biofilmem, jehož působením dojde k fragmentaci na menší částice. V dalším kroku dojde k depolymerizaci působením extracelulárních enzymů z mikroorganismů v biofilmu. Následně u vzniklých malých molekul může dojít k přestupu do buněk mikroorganismu, tomuto procesu se říká bioasimilace. V posledním kroku může dojít k mineralizaci, při které vznikají voda, dusík a v případě aerobní biodegradace vzniká oxid uhličitý a u anaerobní biodegradace vzniká hlavně methan [2; 34].

Velmi častou metodou pro určení rychlosti aerobní biodegradace jsou respirometrické metody [63; 64; 65]. Tyto metody využívají skutečnosti, že při aerobní biodegradaci se spotřebovává kyslík a uvolňuje oxid uhličitý. Při anaerobní biodegradaci je měřen objem vzniklého methanu [66]. Dále je možné

sledovat fyzikální změny testovaného materiálu, jako jsou například úbytek hmotnosti, vizuální změny vzorku, změny mechanických vlastností atd. [53].

Jednou ze slabin použitých norem je, že neberou v potaz žádné informace o prostředí, kde má probíhat biodegradace, proměnnost podmínek způsobenou geografickou polohou, kde bude produkt biodegradovat a změnou ročních období. Nejlépe je možné tento problém demonstrovat na teplotě, při které mají testy probíhat. Například ISO 14851 udává teplotu při testování 20 až 25 °C, což je teplota, která je snadno dosažitelná v laboratorních podmínkách, ale absolutně nekoresponduje s podmínkami, které se vyskytují v reálném životním prostředím České republiky. Dále se normy nedostatečně věnují rozsahu biodegradace (například ASTM D 6400 vyžaduje pouze biodegradaci z 60 %) a počítají biodegradaci z celkové hmotnosti vzorku a při tom neberou v potaz přítomnost nebiodegradabilních aditiv (například plnidlo uhličitan vápenatý). Velmi často je také prostředí pro testování biodegradability nadefinováno k určitému účelu nebo podmínkám zájmu, proto se například testují zvlášť aerobní a anaerobní biodegradace v odpadních vodách, sladkovodních ekosystémech a mořských ekosystémech. K dalšímu zkreslení výsledků může dojít díky různému přístupu k inokulu, nedostatečné reprodukovatelnosti výsledků a nedostatku způsobů, jak testovat v neřízeném prostředí. Dále se žádné normy nezabývají charakteristikou produktů biodegradace. Pro posouzení bezpečnosti biodegradace bioplastů je nutné provést testy ekotoxicity těchto produktů a také tyto produkty charakterizovat pomocí technik analytické chemie (velikost a tvar částic, jejich koncentrace a chemické složení, rezidua aditiv, vedlejší produkty biodegradace) [53]. Kvůli tomu je rychlost biodegradace silně závislá na mnoha parametrech a je nutná značná opatrnost při označení materiálu jako „biodegradabilní“ v otevřeném životním prostředí [53]. Při nepříznivých podmínkách může trvat biodegradace bioplastu i několik desetiletí, díky čemuž dochází k produkci mikroplastů podobně jako u konvenčních plastů [2; 53].

4 Stanovení mikroplastů na bázi konvenčních plastů ve složkách životního prostředí

4.1 Extrakce a purifikace

Matrice obsahující mikroplasty je velmi často tvořena organickými a anorganickými příměsemi [67]. Nejjednodušší a nejlevnější způsob, jak odstranit ze vzorku větší částice, je sítování [67; 68; 10]. Obsahuje-li vzorek nadbytečné množství vody je možné ji odstranit filtrací nebo jejím odpařením. Pro separaci mikroplastů ze vzorku je také možné využít jejich rozdílné hustoty od zbytku matrice a použít hustotní frakcionace. K tomuto účelu se používají roztoky solí (NaCl, $CaCl_2$, $ZnCl_2$, NaI) [67; 68; 69].

Organické sloučeniny přítomné ve vzorku, které by mohly negativně ovlivnit stanovení, je možné odstranit jejich rozkladem [67]. Vzhledem k tomu, že jsou konvenční plasty až na výjimky odolné vůči agresivnímu chemickému prostředí, je možné použít pro rozklad organické složky vzorku silná oxidační činidla, báze a kyseliny. Velmi častá je metoda rozkladu pomocí katalytické mokré oxidace [67; 68; 69]. Pro tuto metodu jsou nejčastěji použity peroxid vodíku, chlornan sodný a Fentonovo činidlo nebo roztoky alkalických hydroxidů a silných kyselin [68; 70].

Za kvalitativní metody stanovení mikroplastů považujeme takové, které jsou schopny rozlišit mikroplasty od matrice a jiných částic (celulózy, písku, skla...) a identifikovat typ polymeru u nalezených mikroplastů. Semikvalitativní metody pak dokážou určit např. počet částic mikroplastů vztažených na objem či hmotnost matrice, případně podíl plochy zaujímané mikroplasty na mikroskopickém substrátu. Velmi často využívanou metodou pro stanovení mikroplastů je vizuální identifikace pomocí mikroskopu. Jedná se o rychlou a jednoduchou metodu. Touto metodou je možné zjistit tvar, texturu a typ povrchu částice. Na druhou stranu tímto způsobem není možné identifikovat částice menší než ~100 μm [71; 72]. Dále pak při této metodě může dojít k falešně pozitivní identifikaci mikroplastu nebo naopak mikroplast nemusí být rozpoznatelný od jiných složek matrice [67; 69].

Pro kvalitativní stanovení mikroplastů o rozměrech větších než 10 μm je vhodné použít FTIR. Pro charakterizaci částic větších než 1 μm lze použít Ramanovou spektroskopii. Touto metodou ale nelze stanovit polymery citlivé na fotodegradaci, jako je například PVC. Obě metody jsou komplementární a je potřeba je volit i s ohledem na strukturu mikroplastu očekávaného ve vzorku. Metodou FTIR je možné stanovit mikroplasty se strukturou, kde se vibrací atomů v molekule mění její dipólový moment, zatímco Ramanovou spektroskopií je možné stanovit mikroplasty se strukturou molekuly, kde se vibrací atomů mění polarizovatelnost molekul [67].

Stále častěji se pro kvalitativní analýzu mikroplastů v různých složkách životního prostředí využívají destruktivní metody, mezi které patří Py–GC/MS (pyrolýzní plynová chromatografie s hmotnostně-spektrometrickou detekcí), desorpční-GC/MS a LC (kapalinová chromatografie). Dümichen a kol. stanovil pomocí TED–GC/MS PP, PE a PS ve fermentačních reziduích odebraných z bioplynové stanice a PE, PS a PET ve vodě z řek. Tato metoda je výhodná svojí rychlostí, malou spotřebou vzorku (20 mg) a možností vynechat časově náročnou úpravu vzorku, mezi nevýhody patří vysoké nároky na homogenizaci vzorku [73]Kvantitativní stanovení konvenčních mikroplastů

Kvantitativní stanovení mikroplastů (zejména v půdě a jiných komplexních pevných či koloidních matricích) je v současné době velká analytická výzva. Právě komplexita odebraného vzorku znesnadňuje analýzu díky možným interferencím s analytem, vytvářením falešného pozitivního nebo negativního signálu [74]. Za kvantitativní stanovení považujeme takové, které je schopno odlišit plast a matrici či jiné materiály, dává informaci o druhu plastu (alespoň přibližně) a zároveň uvádí koncentraci mikroplastů v chemickém smyslu (tedy zejména hmotnostní či objemovou).

Jednou ze slibných kvantitativních metod je stále Py–GC/MS. Při této metodě je vzorek pyrolyzován v inertní atmosféře a vzniklé plynné produkty jsou zachyceny v rozpouštědle nebo vedeny (nejčastěji kapilárou) přímo do GC-MS. Výhodou je možné stanovení směsí více plastů a je možné analyzovat vzorek bez jakékoliv úpravy. Nevýhodou je, že neposkytuje informace o počtu, velikosti a tvaru mikroplastů [67]. Jako další termoanalytická technika vhodná ke kvantifikaci mikroplastů v půdě je termogravimetrie (TGA).

5 Stanovení biodegradabilních mikroplastů P3HB a PLA

S příchodem produktů z biodegradovatelných plastů na trh je možné předpokládat, že bude nutné řešit problematiku mikroplastů stejně jako u konvenčních plastů, které mohou být kvůli nedokonalé nebo příliš pomalé biodegradaci zdrojem velkého množství mikroplastů v krátkém časovém období [42]. Přestože by mělo být setrvání mikroplastů z biodegradabilních materiálů v životním prostředí kratší než u konvenčních plastů, mikroplasty z biodegradabilních plastů mohou mít podobné negativní vlastnosti jako u konvenčních mikroplastů [34]. Metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení těchto částic v současné době až na výjimky neexistují, přestože by mohly být užitečné pro zhodnocení kontaminace životního prostředí, ale i pro verifikaci testů biodegradability, kdy v současnosti není možné uspokojivě analyzovat testovací medium na rezidua těchto materiálů.

Pro extrakci zmíněných bioplastů z půdy nebo dalších tuhých matric je možné použít jen některé metody používané u konvenčních mikroplastů. Jde především o fyzikální procesy jako filtrace, sítování nebo sedimentační frakcionace [68]. Kvůli špatné odolnosti vůči agresivním chemickým podmínkám není možné použít pro rozklad organických složek matrice žádné agresivní chemikálie. Jako jedna z alternativ se jeví rozpuštění bioplastů v chloroformu [75]. Při tomto kroku se však vyextrahují i další organické látky, především frakce huminových látek, proto by musel být extrakt náročně přečištěn.

Cíl disertační práce

Jak vyplývá z předcházejících částí, v současnosti je největší zájem o bioplasty typu PLA a PHA. Při jejich aplikaci je velmi pravděpodobný vznik sekundárních mikrobioplastů, ačkoliv životní prostředí může být samozřejmě kontaminováno i jejich primárními mikrobioplasty. Vzhledem k tomu, že problematika kontaminace životního prostředí mikrobioplasty je nová (o čemž svědčí minimální množství publikovaných prací), je třeba se zamyslet nad jednotlivými fázemi výzkumu v této oblasti. Proto bylo právě PHB zvoleno jako modelový bioplast pro všechny experimenty uvedené v této disertační práci a pro porovnání výsledků byl použit v některých experimentech další bioplast PLA a konvenční plast PET. Zkušenosti s mikroplasty z konvenčních plastů v půdě napovídají, že výzkum bude směřován několika provázanými směry: 1) nalezení metod pro analýzu mikroplastů v půdě případně v jejích částech (nebo analogických substrátech), 2) studiem osudu mikrobioplastů v půdě (tzn. transport, biodegradace, biofragmentace…), 3) objasněním, jak mikrobioplasty ovlivňují ekosystémové funkce půdy (například zádrž vody, sekvestraci uhlíku, primární produkci atd.). Je zřejmé, že směr „1“ determinuje úspěch směru „2“, směr „3“ lze pak úspěšně řešit jen pokud jsme vyřešili směr „2“.

V této disertační práci se těchto témat dotýkáme přímo i nepřímo, pro pochopení osudu biodegradabilních plastů jsou často využívány normy pro biodegradaci v různých prostředích (nejčastěji OECD, ISO, ASTM). Proto jsou tyto normy v této práci brány jako výchozí bod, jsou diskutovány podmínky a výsledky a je poukázáno na jejich nedostatky, protože zdaleka neodrážejí reálné problémy

biodegradabilních plastů (které například mohou vést k nevhodnému nakládání s bioplastovým odpadem nebo nesprávnému využití bioplastů v zemědělství a následné tvorbě mikrobioplastů). Další kapitolou jsou analytické metody využívané pro extrakci, purifikaci a kvalitativní a kvantitativní stanovení konvenčních mikroplastů v komplexních pevných matricích, jako je půda nebo aktivovaný kal. Nicméně, jak vyplývá z literární rešerše, v současné době téměř neexistují analogické robustní, rychlé a citlivé analytické metody ke stanovení mikrobioplastů v půdě, které by pomohly verifikovat testy biodegradability analýzou produktů biodegradace, objasnit osud potencionálně vzniklých mikrobioplastů a jejich vliv na životní prostředí. Jestliže by použití bioplastů nevedlo k redukci vzniku mikroplastů jak se všeobecně předpokládá, ale naopak při jejich biodegradaci by mikroplasty vznikaly rychleji, je důležité zjistit jaký vliv mají na životní prostředí (tj. zda se liší nebo je stejný ve srovnání s konvenčními plasty). Tyto efekty jsou v této práci sledovány se zaměřením na vlastnosti důležité v zemědělství, protože zemědělská půda je jedním z hlavních receptorů mikrobioplastů, kde poškození jejich vlastností může vést ke snížení efektivity zemědělské produkce. Na konci této práce jsou proto také prezentovány výsledky z testování prototypu „inteligentního“ potahovaného hnojiva, na kterém jsou demonstrovány možné vlivy takovéhoto výrobku na půdu. Tím se tedy všechny zmíněné směry prolínají a z nich pak vyplývají některé dílčí výzkumné otázky:

- **O1:** Jak relevantní je využití norem pro biodegradaci pro pochopení osudu biodegradabilních plastů v půdě?
- **O2:** Je možné stanovit mikrobioplasty v půdě podobnými metodami jako konvenční mikroplasty?
- **O3:** Je vliv mikrobioplastů na životní prostředí srovnatelný s doposud známým vlivem konvenčních mikroplastů?
- **O4:** Existují nějaká rizika využití biodegradabilních plastů v zemědělství?

V následujících kapitolách jsou diskutovány výsledky dosažené během doktorského studia. Část z výsledků již byla publikována (viz přílohy na konci této práce), část se „nevešla“ do publikací a část tvořila výsledky projektů, na nichž jsem posledních několik let pracoval. Cílem následujícího textu je tedy seznámit čtenáře s podstatnými výsledky disertační práce, ale také se zkušenostmi, které byly získány a cestami, které byly v průběhu práce testovány.

Diskuze výzkumných otázek

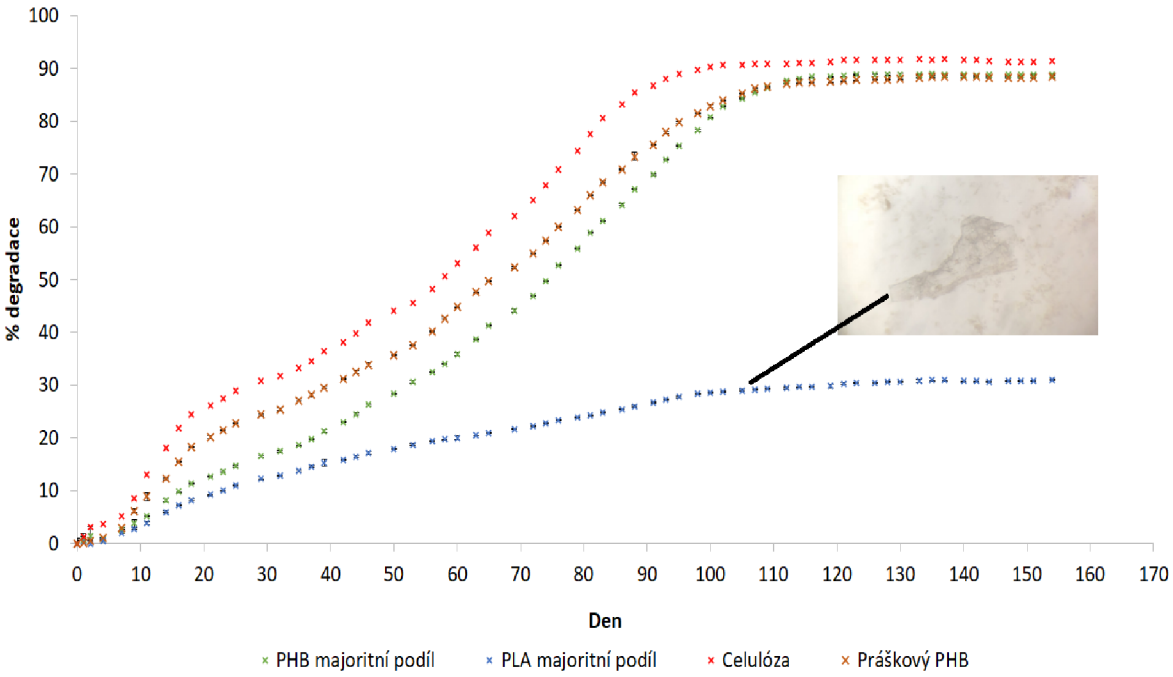
1 Výzkumná otázka 1: Jak relevantní je využití norem pro biodegradaci pro pochopení osudu biodegradabilních plastů v půdě?

První téma, se kterým jsme se začali zabývat při práci s biodegradabilními bioplasty bylo testování jejich biodegradability. Ve spolupráci s Firmou NAFIGATE a kolegy z Ústavu chemie materiálů jsme začali vyvíjet nové materiály a výrobky na bázi PHB v rámci projektu MPO TRIO „Smart fertilizers“. Při těchto experimentech jsme prostudovali většinu dostupných norem a provedli první biodegradační experimenty. Jejich výsledkem bylo překvapující zjištění, že biodegradabilní polymer kompletně zdegradoval jen zřídka během definované doby, a proto jsme se důkladně zaměřili na různé typy biodegradačních experimentů, a jak jsou experimentální podmínky relevantní pro životní prostředí (například koncentrace mikroorganismů ve vodě, která v ISO normě může být mezi 30 až 1000 $mg \cdot l^{-1}$, nebo teplota experimentu s půdou mezi 20 až 28 °C).

Rychlost biodegradace a biodegradabilita bioplastových materiálů je obvykle měřena pomocí biodegradačních testů, které byly diskutovány výše [76]. V těchto testech je testovaný materiál vystaven vlivu mikroorganismů za kontrolovaných podmínek (většinou nastavených tak, aby byly ideální pro biodegradaci). Rychlost biodegradace pak silně závisí právě na množství mikroorganismů, na teplotě, vlhkosti, pH, velikosti částic testovaného materiálu a dalších parametrech [34]. Biodegradaci taktéž ovlivňuje typ bioplastu a aditiva v něm obsaženého. Například ve směsi dvou různě biodegradovatelných bioplastů dojde přednostně k biodegradaci lépe biodegradovatelného bioplastu, čímž se výrazně zhorší mechanické vlastnosti materiálu, který se poté rychleji rozpadne na mikrobioplasty [45]. Ty jsou ale tvořeny hůře biodegradovatelným bioplastem, a proto se biodegradace výrazně zpomalí, anebo i zastaví.

Toto chování bioplastového „blendu“ jsme pozorovali právě v prvním kompletním biodegradačním experimentu, který byl proveden s folií obsahující majoritní podíl PHB (snadno degradovatelného bioplastu) a folií obsahující majoritní podíl PLA (hůře biodegradovatelného bioplastu). Obě folie byly nastříhány na čtverečky s velikostí strany 0,5 cm a pro porovnání byl experiment proveden i s práškovým PHB, kde velikost částic byla mezi 64 a 125 μm, a s práškovou celulózou. Experiment proběhl v artificiální vodě inokulované čistírenským aktivovaným kalem dle normy ISO 14851:1999 a biodegradabilita byla měřena metodou stanovení spotřeby kyslíku. Z výsledku na Obrázku 1 vyplývá, že nejrychleji zdegradovala celulóza; práškové PHB a folie s majoritním podílem PHB zdegradovaly téměř ze 100 % přibližně za 115 dnů. Folie s majoritním podílem PLA zdegradovala přibližně ze 30 % za stejnou dobu, kde většinu zdegradované části nejspíše tvoří PHB a další plniva. Zpomalení biodegradace je možné pozorovat zhruba po 100 dnech experimentu, kdy do konce experimentu (54 dnů) zdegradovalo pouze 2,7 % fólie. Z tohoto důvodu je možné předpokládat (nebo i extrapolovat), že kompletní biodegradace, tj. mineralizace této fólie by trvala i za těchto ideálních podmínek několik let

a v reálném prostředí životního prostředí pak tedy ještě déle. Na dně reakční nádoby byl po ukončení experimentu odebrán sediment, na kterém byly pod mikroskopem detekovány mikrobioplasty vzniklé z folie (Obrázek 1). Jejich povrch byl zvrásněný důlky vzniklými biodegradací snadno biodegradabilního materiálu, kvůli kterým došlo během experimentu k rozpadu folie (k rozpadu také přispělo neustálé míchání na třepačce, které bránilo sedimentaci aktivovaného kalu) na mikrobioplasty s ostrými hranami.



Obrázek 1: Výsledky biodegradačního experimentu bioplastových folií ve vodě

Nejčastějším způsobem měření biodegradace jsou biodegradační testy založené na respirometrii (měření spotřeby kyslíku nebo uvolněného oxidu uhličitého), které jsou zatíženy velkou experimentální chybou způsobenou manipulací s respirometrem (doplňování kyslíku, výměnou KOH nasyceného oxidem uhličitým), nevydýcháním veškerého CO_2 (mikroorganismy část uhlíku používají pro stavbu svých těl) a i změnou chování mikroorganismů v přítomnosti mikrobioplastu způsobujícího stres, který vede k odlišné biodegradaci uhlíku v matrici vzorku a blanku.

V této práci proto navrhuji neurčovat biodegradovatelnost pouze z biodegradačních experimentů, ale také analýzou biodegradačního media po ukončení experimentu (bude diskutováno v další části). Tuto problematiku demonstrují výsledky experimentů z článku v Příloze E disertační práce, kde je vidět, že například u půd s nejnižší počáteční koncentrací PHB není ani v jednom případě dosaženo 100 % biodegradace měřené respirometricky, i když z biodegradačních křivek vyplývá, že u všech půd s počáteční koncentrací 0,5 došlo k ukončení biodegradace téměř v polovině experimentu a u půd

s počáteční koncentrací PHB 1 % byla ukončena chvíli před ukončením experimentu. V půdách obsahující 3 % PHB stále probíhala biodegradace a mikrobioplasty PHB zde byly viditelné i bez použití mikroskopu (Obrázek 2). Při analýze PHB v půdách pomocí termogravimetrie byla zjištěna ve všech půdách biodegradace vyšší než při respirometrickém stanovení, což naznačuje, že část uhlíku z bioplastu nebylo mineralizováno, ale že bylo imobilizováno v SOM (patrně ve formě mikrobiální biomasy).

Obrázek 2: Půda s původní koncentrací PHB 3 % po 300 dnech biodegradačního experimentu. Bílé částice jsou mikrobioplasty PHB

Odpovědí na výzkumnou otázku 1 tedy je, že normy využívané pro testování biodegradability bioplastů nereflektují dostatečně environmentálně relevantní podmínky vyskytující se v životním prostředí. Navíc i za těchto ideálních podmínek nebylo vždy dosaženo 100 % biodegradace a nebylo jasné, zdali z bioplastu vznikly stabilnější mikrobioplasty, anebo byla část uhlíku imobilizována v SOM (a tím došlo k ovlivnění půdy). Proto se ukázalo, jako nezbytné analyzovat rezidua bioplastů. Nicméně, jak ukázala literární rešerše, v současné době téměř neexistují vhodné metody pro tyto analýzy.

2 Výzkumná otázka 2: Je možné stanovit mikrobioplasty podobnými metodami jako konvenční mikroplasty?

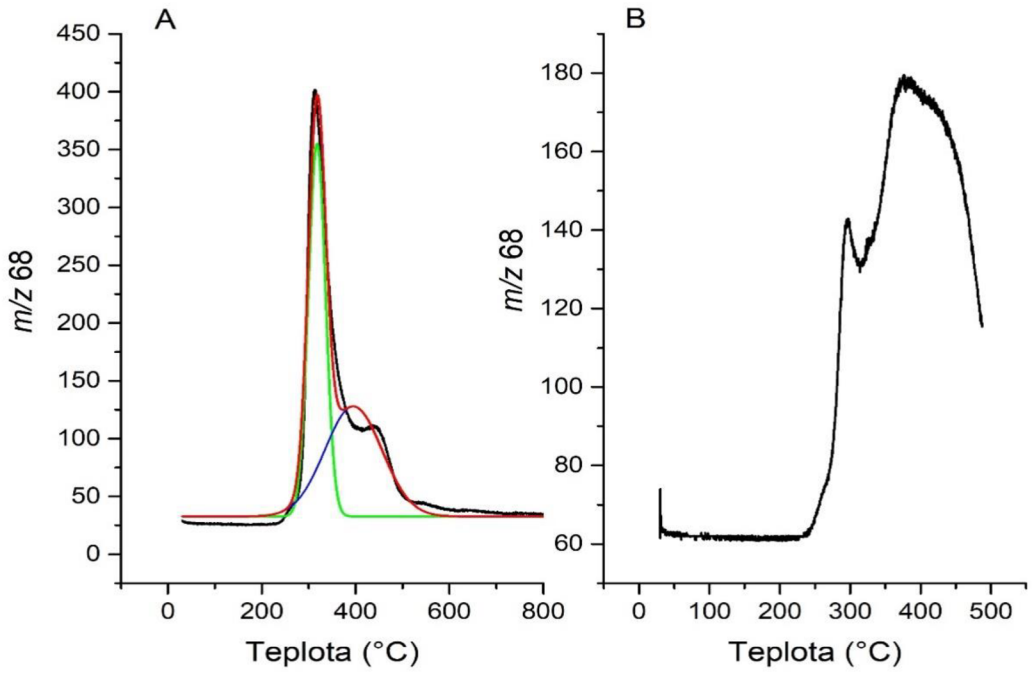
Při vývoji vhodné metody pro stanovení mikrobioplastů v půdě jsme provedli literární rešerši zaměřenou na stanovení konvenčních mikroplastů a pokoušeli se zjistit, zda by některé z nich šly využít ke stanovení mikrobioplastů. Výsledkem této práce bylo critical review [76].

Předúprava vzorků je velmi často časově náročná, a proto je výhodnější zvolit metody stanovení mikrobioplastů, kde je možné analyzovat vzorek přímo bez nějaké další manipulace. Mezi takovéto metody patří metody založené na termickém rozkladu vzorku a následné analýze uvolněných plynů. U těchto metod je možné stanovit pouze množství mikrobioplastu ve vzorku. Tímto postupem tedy není možné zjistit velikost částic, jejich tvar a počet (jako například u FTIR mikroskopie) [77]. Nejjednodušší je analyzovat vzorky, když je k dispozici nekontaminovaná matrice (blank). Toto je právě případ vzorků z biodegradačních experimentů. Pro detekci i stanovení mikrobioplastů v těchto půdách je pak možné využít pouze samotné termogravimetrie, kdy je množství mikrobioplastu určeno přímo z úbytku hmotnosti v teplotním intervalu typickém pro daný mikrobioplast odečteného od úbytku hmotnosti v blanku ve stejném teplotním intervalu (Obrázek 2 v Příloze E disertační práce). V Příloze E disertační práce jsou takto analyzovány vzorky půd po biodegradačním experimentu PHB v různých typech půdy. Při této metodě je limitujícím faktorem malý objem měřících pánviček (200 µl), a také odlišné složení SOM v půdách se vzorky a v půdách se slepým pokusem z důvodu odlišného chování mikroorganismu v přítomnosti cizích částic.

U reálných environmentálních vzorků není často nekontaminovaná matrice k dispozici, proto je potřeba využít sofistikovanějších metod. V [78] je využita metoda TG-MS pro stanovení mikrobioplastů PLA a PHB v půdě, při které byly nejdříve určeny charakteristické *m/z* změřeným čistých bioplastů (PHB = 68 a 86; PLA = 29 a 43). Poté byly vytvořeny kalibrační směsi. Pro odstranění experimentální chyby z důvodu nehomogenity vzorků byly půdy spikovány přímo v pánvičkách. Při experimentech nebyly pozorovány plynné produkty termického rozkladu s vyššími *m/z*, což bylo vysvětleno nízkou teplotou transfer kapiláry (maximální teplota vyhřívání u použitého přístroje byla 300 °C), kvůli které došlo ke kondenzaci těchto plynných produktů před tím, než se dostaly do hmotnostního spektrometru. V této práci byl ověřený minimální vliv signálu matrice stanovením závislosti poměru obou charakteristických *m/z* na koncentraci analytu (Obrázek 6 a 7 v [78]). V případě vyššího obsahu interferující SOM by nebylo možné tuto metodu použít. Kritické to je v případě PLA, u které jsou zvolené m/z tak nízké, že by mohla být matrice snadno jejich zdrojem. V tomto případě by pak bylo nutné použít přístroj s kapilárou vyhřívanou na vyšší teplotu, anebo přístroj s přímým vstupem z termogravimetru do hmotnostního spektrometru. LOQ u tohoto experimentu se pohybovalo v rozmezí 1,82 až 4,72 %, takže je tato metoda vhodná pouze pro silně kontaminované půdy. Tento přístup může být, ale použit pro vývoj metody, kde je místo termogravimetrie použita pyrolýza, při které se analyzují výrazně vyšší

množství vzorku (TG-MS využívá typicky desítky mg vzorku u analytické pyrolýzy to můžou být až gramy vzorku).

Nejkomplexnější matricí, se kterou jsme se setkali, byl aktivovaný kal, na kterém jsme také testovali možnosti metody vyvinuté pro půdy. Výsledky této práce již nebyly publikovány v [78], budou publikovány separátně později. Tyto vzorky mohou pocházet přímo z čistíren odpadních vod, anebo z vysušených vzorků biodegradačních experimentů ve vodě, kde se aktivovaný kal používá jako zdroj mikroorganismů. Problematické je, že se v buňkách aktivovaného kalu PHB vyskytuje jako zásobní zdroj energie mikroorganismů a je proto nutné při analýze odlišit přírodní PHB od PHB antropogenního původu. V tomto případě je možné využít toho, že přírodní PHB je vázané na proteiny přímo v buňkách a termálně degraduje při vyšších teplotách než PHB antropogenního původu, které se nachází volně ve vzorku. Při těchto experimentech je nezbytné postupovat při vysušování vzorku a homogenizaci velmi opatrně aby došlo k co nejmenšímu porušení buněk bakterií aktivovaného kalu, a tím pádem uvolnění přírodního PHB. Experiment se spikovaným čistírenským kalem byl proveden za stejných podmínek jako u experimentu v [78]. Na Obrázku 3 jsou výsledky tohoto experimentu, kde v části A je výsledek analýzy aktivovaného kalu spikovaného 0,7 % PHB. Černou čarou je zde označen signál získaný z přístroje pro *m/z* 68. Vzhledem k tomu, že se píky přírodního a antropogenního PHB překrývají, je nutné je oddělit matematickou dekonvolucí. Lze tím získat ostrý pík antropogenního PHB (zelená čára) a přírodního PHB (modrá čára). Červená čára poté znázorňuje sloučení obou píků, u kterého je vidět nepřesnost při fitování píku přírodního PHB, a proto je zde potřeba zvolit pokročilejší způsob oddělení těchto píků. Na Obrázku 3B je záznam z analýzy blanku, kde je možné také vidět pík antropogenního PHB. PHB se uvolnilo z buněk kvůli nešetrné manipulaci s aktivovaným kalem, která vedla k narušení některých buněk bakterií aktivovaného kalu. Bude proto nutné vyvinout lepší způsob sušení a homogenizace těchto vzorků, které povede k menšímu narušování buněk mikroorganismů.



Obrázek 3: A) záznam z experimentu s vysušeným aktivovaným kalem spikovaným 0,7 % PHB (černá čára), zelená čára je fitovaný pík antropogenního PHB, modrá čára je fitovaný pík přírodního PHB a červenou čárou je označený součet obou píků. B) záznam nespikovaného aktivovaného kalu.

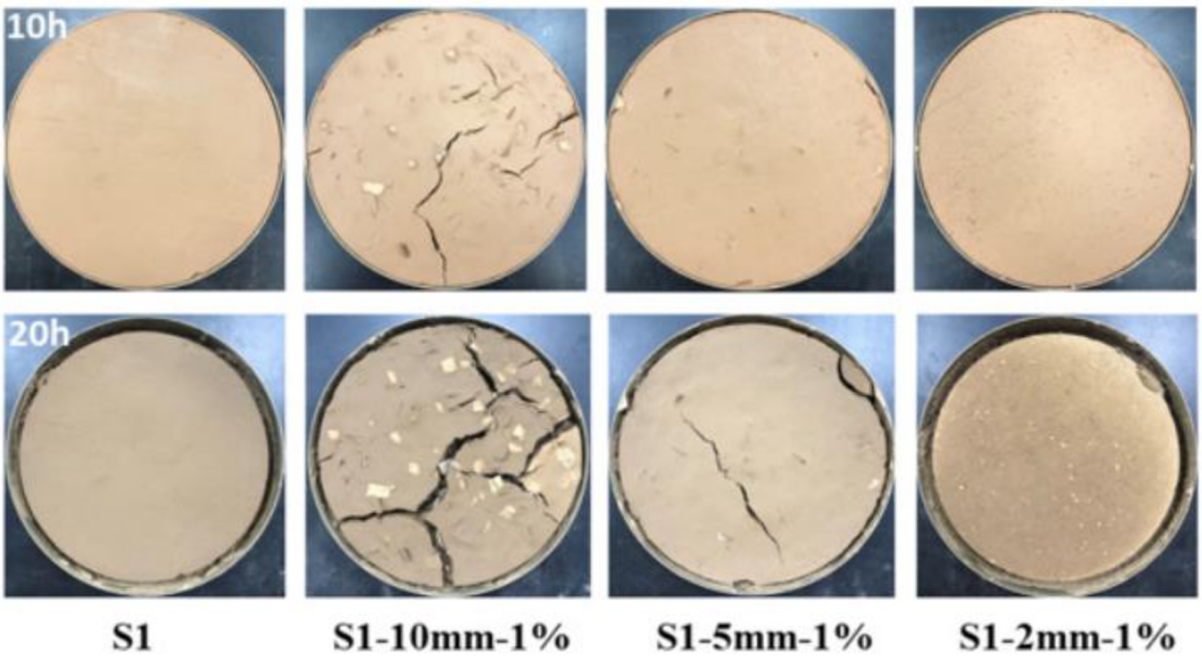
Nakonec jsme tedy vyvinuli metodu založenou na TG případně TG-MS, která může otevřít cestu pro relativně snadné a rutinní analýzy mikrobioplastů v půdě. Její největší slabinou jsou vysoké limity detekce a kvantifikace, které je ale možné snížit analyzováním většího množství vzorku najednou a použití přístroje s kapilárou vyhřívanou na vyšší teplotu nebo, jak předpokládáme, přístroje s přímým vstupem z TG do MS. Pro analýzu mikrobioplastů PHB v aktivovaném kalu je potřeba vyřešit problém s uvolněním přírodního PHB mimo buňky aktivovaného kalu použitím méně agresivní sušící metody a problém se sloučenými píky. Je nutné tedy najít buď vhodné podmínky analýzy (například optimalizovat rychlost ohřevu), při kterých budou odděleny, anebo využit lepší matematický model pro jejich dekonvoluci.

Odpověď na výzkumnou otázku 2 tedy je, že některé metody používané pro stanovení konvenčních mikroplastů je možné použít pro stanovení mikrobioplastů. Je nutné se vyhnout předúpravě vzorků agresivními chemikáliemi, a proto jsou vhodné metody pro tyto analýzy ty, které umožňují analýzu vzorků bez potřeby čištění, extrakce a zakoncentrování analytů. Taktéž nesmí analytické signály matrice vzorků interferovat se signálem analytů. Obě tyto podmínky splňuje vyvinutá TG, respektive TG-MS metoda, u které je potřeba snížit limity detekce.

3 Výzkumná otázka 3: Je vliv mikrobioplastů na životní prostředí srovnatelný s doposud známým vlivem konvenčních mikroplastů?

Vzhledem k tomu, že se produkce bioplastů neustále zvyšuje a předpokládá se jejich využití v zemědělství, je pravděpodobné, že se tento typ materiálu brzy stane jedním z půdních kontaminantů. Bioplasty jsou také často prezentovány jako ekologičtější náhrada konvenčních plastů pro omezení vzniku mikroplastů. V předchozích kapitolách bylo ale diskutováno, že naopak mohou v některých případech vést k rychlejšímu vzniku mikrobioplastů a proto je potřeba zjistit jaký vliv budou mít mikrobioplasty na půdu v porovnání s mikroplasty. Díky tomu bude možné posoudit, které aplikace bioplastů dávají smysl, a které by mohly být problematické. Vliv mikrobioplastů na půdu může být sledován z různých pohledů, například by tyto částice mohly ovlivnit fyzikálně chemické vlastnosti půdy, půdní živočichy, rostliny a mikroorganismy. Chování mikrobioplastů v půdě se kvůli jejich biodegradabilitě bude měnit s časem, proto je potřeba popsat jejich efekty v době, kdy vstoupí do půdy, v době, kdy bude probíhat jejich biodegradace, a také jak ovlivní půdu po tom, co kompletně zdegradují.

V experimentech v [79] jsme zjistili, že ihned po vstupu do půdy bude vliv mikrobioplastů a mikroplastů na SOM podobný, protože se při jejich interakcí s půdou uplatňuje pouze jejich velikost a hydrofobicita (která je u zkoumaného PET a PHB podobná) a nikoliv jejich biodegradabilita. Tyto efekty jsou popsány v [79], kde jsou experimenty s PET mikroplasty a PHB mikrobioplasty v rašelině vystavené různým relativním vlhkostem. Rašelina byla zvolena z důvodu vysokého podílu SOM, díky kterému je možné lépe pozorovat efekty mikročástic na půdu a eliminovat vliv interakcí mezi mikrobioplasty a minerální částí (minerální) půdy. Jejímu vystavení různým vlhkostem bylo dosaženo různé rigidity struktury SOM a tím pádem i různých forem půdní vody, na kterých byly následně pozorovány efekty mikročástic. Vliv na obsah půdní vody nebyl u obou mikročástic v rámci experimentální chyby pozorován, takže není možné říct, zdali mikroplasty, anebo mikrobioplasty mají na tento parametr nějaký efekt. Na druhou stranu, bylo zjištěno, že přítomnost mikro(bio)plastů v půdě snižuje desorpční entalpii vody a ovlivňuje vodní molekulové můstky. Z tohoto důvodu může dojít k narušení struktury půdy a vysychání půdy, které se v makroskopickém měřítku projevuje vznikem prasklin v půdě. Podobné efekty v experimentech s PE folií v půdě pozoroval i Wan a kol., který následně publikoval Obrázek 4 zobrazující tyto půdní praskliny [80]. Vliv PHB na živé organismy byl studován v rámci interního projektu KInG na žížalách *Eisenia fetida*, u kterých bylo pozorováno nepatrné snížení hmotnosti v akutním testu a snížení porodnosti nových jedinců v reprodukčním testu v testech dle metodiky OECD.



Obrázek 4:Půda vystavena vlivu 1% kontaminaci PE folie o různé velikosti po dobu 10 a 20 hodin [80]

Bioplasty jsou většinou tvořeny pouze atomy C, H a O, vazby mezi nimi jsou snadno metabolizovatelné, a proto bioplasty představují snadno dostupný zdroj uhlíku pro půdní organismy. Výsledkem pak je, že jejich vstup do půdy a následná biodegradace vede k porušení rovnováhy živin z důvodu prudkého nárůstu obsahu půdního uhlíku. V [81] jsou publikovány výsledky květináčových experimentů se salátem, který rostl v půdě kontaminované různými koncentracemi PHB a s různým obsahem písku po dobu 8 týdnů. Následně bylo analyzováno množství sklizené biomasy, mikrobiální aktivita a druhové složení mikrobiálního biomu. Bylo zjištěno, že v půdě s nízkým obsahem písku (a tedy i vyšším obsahem živin) vedlo přidání PHB do půdy k přednostní spotřebě PHB uhlíku a tím pádem k ochuzení půdy o dusík, což se negativně projevilo na množství vyprodukované biomasy. Přídavek PHB také způsobil nárůst množství mikroorganismů schopných degradovat PHB na úkor ostatních mikroorganismů. Na druhou stranu u půd s větším množstvím písku (60 až 80 %) byl pozorovaný nárůst enzymatické aktivity, který mohl být způsobený tím, že PHB uhlík částečně nahradil funkci SOM, které bylo v této půdě nedostatek. Tudíž nelze říct, že by měla přítomnost PHB v půdě vždy pouze negativní efekty a vždy bude záležet na typu půdy a na množství živin v ní obsažených a na časovém měřítku.

V Příloze E disertační práce jsou uvedeny výsledky experimentu s třemi různými půdami spikovanými třemi koncentracemi PHB (0,5; 1 a 3 % PHB) inkubovanými po dobu 300 dnů v respirometru. Z termogravimetrického stanovení zbytkového obsahu PHB vyplynulo, že v půdě s nejnižším obsahem PHB veškeré PHB zdegradovalo po méně než 200 dnech a je tedy možné pozorovat ovlivnění SOM biodegradací z dlouhodobého hlediska. V půdách s obsahem 1 % PHB dle termogravimetrie právě v době ukončení experimentu došlo ke kompletní biodegradaci a je tedy možné posoudit přímý vliv biodegradace na půdy a v půdách s nejvyšší koncentrací není PHB zcela zdegradováno a je tedy možné

pozorovat vliv dlouhodobé biodegradace na půdu. Analýza půdní vlhkosti v testovaných půdách potvrdila vysychání půd s vyšším obsahem SOM zjištěné v [79]. U půdy s nižším obsahem SOM došlo při experimentu k mírnému zvýšení půdní vodní kapacity. Termogravimetrické stanovení celkové SOM a jejich frakcí zase ukazuje jaký má vliv na půdu dlouhodobá zvýšená mikrobiální aktivita způsobená mikrobioplasty, došlo zde totiž ke snížení celkové a stabilizované SOM oproti blanku, což naznačuje, že by mikrobioplasty mohly v půdě způsobovat priming effect, kvůli kterému přichází půda o část půdního uhlíku, který je do atmosféry vydýchán mikroorganismy ve formě CO_2.

Podobné jevy byly také popsány v některých studiích s experimenty s konvenčními mikroplasty [82; 83]. To znamená, že příčinou těchto jevů nemusí souviset pouze s biodegradací bioplastů. Při vstupu těchto částic do půdy může dojít k oxidativnímu stresu mikroorganismů, který následně vede ke zvýšení jejich aktivity a tím pádem k degradaci SOM a narušení cyklů nutrientů [83]. Taktéž na povrchu konvenčních mikroplastů dochází k selekci mikroorganismů, čímž vzniká na mikroplastech biofilm (nika) označovaný jako plastisféra [17; 84]. Tyto organismy pak intenzivně produkují extracelulární enzymy, které taktéž ovlivňují vlastnosti půdy [83]. Tyto negativní efekty jsou v těchto článcích popsané často v případech vysokých koncentracích mikroplastů (na rozdíl od našich experimentů, kde je možné pozorovat vliv mikrobioplastů už při koncentraci 0,1 %) a jsou pozorovány jen v některých půdách [85]. Pro určení toho, které způsobují pouze biodegradabilní mikroplasty, a které jsou naopak společné pro mikroplasty a mikrobioplasty je potřeba experimenty zopakovat se zástupci konvenčních mikroplastů.

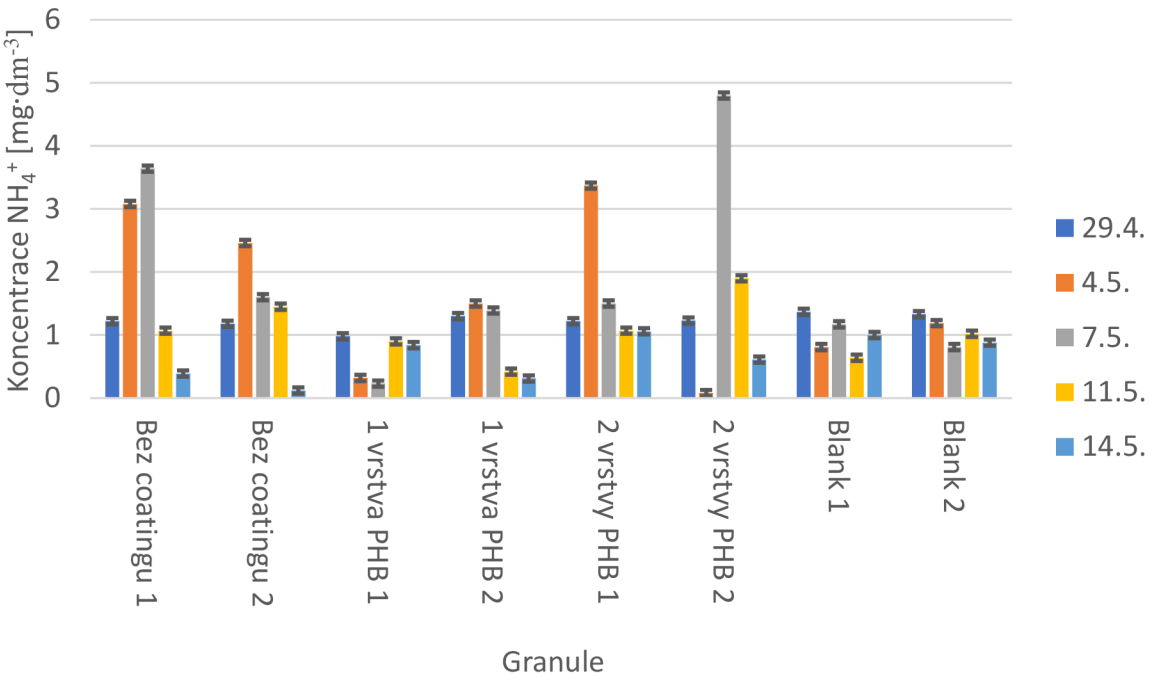
Odpovědí na výzkumnou otázku 3 je, že mikrobioplasty mohou mít podobné efekty na půdní abiotické vlastnosti, především na půdní vodu a strukturu. Stejně tak na obou typech těchto částic se daří jen některým druhům mikroorganismů, a tím ovlivňují mikrobiální diverzitu v půdě v okolí částice. Na rozdíl od konvenčních mikroplastů se u mikrobioplastů prosazují taktéž efekty způsobené jejich biodegradací, tzn. narušení rovnováhy nutrientů v půdě a rychlejší degradace SOM (priming effect).

4 Výzkumná otázka 4: Existují nějaká rizika využití biodegradabilních plastů v zemědělství?

Jak je patrné z odpovědi na výzkumnou otázku 3, otázka 4 již byla částečně zodpovězena. Je zřejmé, že používání bioplastových výrobků může mít za určitých podmínek negativní vliv na zemědělskou půdu.

Dalšími aspekty, které je nutné brát v úvahu je fakt, že již samotné biodegradabilní produkty mohou obsahovat zárodky cizorodých mikroorganismů přímo z výroby. Lze také uvažovat, zda biodegradabilní výrobky nemohou způsobit narušení diverzity půdních mikroorganismů, tím že se na jejich povrchu bude dařit jen některým z nich, anebo může dojít biodegradací ke vzniku mikrobioplastu, který ovlivní fyzikálně chemické vlastnosti půdy a tím i půdní organismy. Tím pádem může jejich aplikace do zemědělské půdy teoreticky vést k nižším výnosům zemědělských plodin, a případně také ke zvýšení objemů použitých pesticidů, což je proti logice ekologického zemědělství.

Jako příklad testování zemědělských výrobků uvádíme v této práci vývoji inteligentního hnojiva, které bylo vyvinuto ve formě granulí obsahujících přibližně 50 % močoviny a 50 % PHB pokrytých různým počtem vrstev PHB (vyvinuto v rámci projektu MPO TRIO Smart Fertilizers) Tyto granule se vyznačují postupným uvolňováním močoviny a mají omezit odplavování části hnojiva dešťovou vodou a tím snížit potřebné množství hnojiva použité na polích a průnik nutrientů do povrchových vod, kde způsobují eutrofizaci. Nejdříve bylo sledováno uvolňování močoviny z granulí v půdním výluhu pomocí stanovení amoniových iontů vzniklých hydrolýzou močoviny. Byly použity granule bez coatingu, s jednou vrstvou PHB a dvěma vrstvami PHB. Experiment trval po dobu 16 dnů. V pravidelných intervalech byl odebírán 1 ml suspenze, který byl přefiltrován a analyzován pomocí analytické sady Merck 114752 Ammonium test (LOQ uvedené výrobcem 0,05 $mg \cdot dm^{-3}$). Na Obrázku 5 jsou výsledky tohoto experimentu. Jsou zde uvedeny všechny granule bez průměrování výsledků, protože u každé granule došlo k uvolnění a spotřebě močoviny v jinou dobu. U granulí bez coatingu je vidět okamžitý nárůst koncentrace amoniových iontů, protože zde měla voda přímý přístup k močovině. U ostatních granulí je možné vidět nejdříve úbytek amoniových iontů, které byly spotřebovány při biodegradaci coatingu a následný nárůst koncentrace těchto iontů uvolněných z granule. U většiny granulí pak byl pozorován dramatický úbytek amoniových iontů pod úroveň blanku, což naznačuje, že veškeré hnojivo bylo spotřebováno na biodegradaci granule.

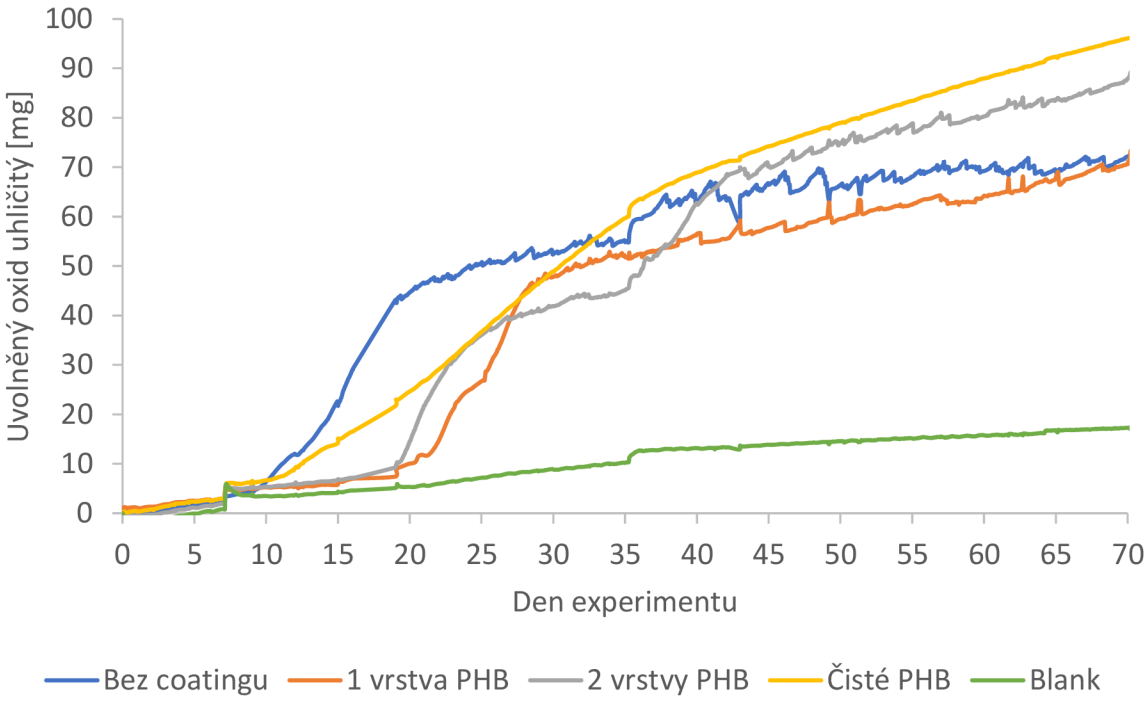


Obrázek 5: Výsledky experimentu s granulemi inteligentního hnojiva. Legenda tohoto grafu obsahuje datum, kdy bylo provedeno stanovení koncentrace amoniových iontů. Experiment začal dne 29.4.

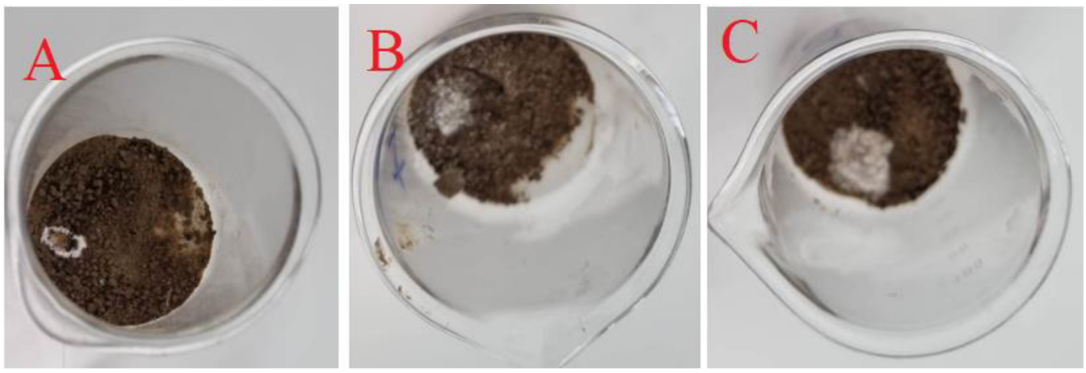
Pro posouzení reálného chování granulí v půdě byly granule inkubovány v půdě v respirometru za stejných podmínek jako při biodegradačních experimentech. Půda byla nejdříve inkubována po dobu 7 dnů, a potom byla přidána granule do každé nádobky s výjimkou nádobek s čistým PHB a blankem. Uvolnění močoviny indikoval prudký nárůst uvolněného CO_2 z důvodu vyšší aktivity mikroorganismů v nadbytku půdního dusíku. Na Obrázku 6Obrázek 6 je zobrazeno uvolňování CO_2 v čase, každá granule, blank a čisté PHB bylo inkubováno ve dvou různých nádobkách a výsledky byly pro přehlednost zprůměrovány. U granulí bez coatingu je pozorován okamžitý nárůst uvolněného CO_2 ihned po vložení granule do půdy. U granulí s jednou vrstvou coatingu je pozorován podobný nárůst se 14denním zpožděním způsobeným degradací coatingu. U granulí se dvěma vrstvami coatingu je jasně vidět, že jedna z granulí měla defektní vrstvu a uvolnila močovinu již po 12 dnech (první prudký nárůst v produkci CO_2), což je srovnatelné s granulemi s jednou vrstvou coatingu a u druhé granule došlo k uvolnění močoviny až po 28 dnech od vložení granule. Je tedy možné říct že jedna vrstva coatingu zpomalila uvolnění močoviny o 14 dnů. Tento experiment probíhal dále po dobu 468 dnů, během něhož nedošlo k úplnému rozložení granulí.

Považujeme za velice důležité, že při vyjmutí půd z přístroje byla ve většině nádobek pozorována plíseň v okolí zbytků granulí (Obrázek 7). Z toho je možné usuzovat, že PHB v půdě upřednostňuje růst hub (plísní), které se v půdě běžně vyskytují a vede k jejich přemnožení. To je v souladu s výsledky z experimentů v [81], kde byl zjištěn nárůst plísní oproti ostatním mikroorganismům ve většině vzorků.

První náznaky možnosti snadné kontaminace PHB výrobků jsme také pozorovali v laboratoři při sušení PHB po mokrém sítování, kdy byly některé vzorky napadeny plísní. Vzhledem k tomu, že výskyt této plísně v laboratoři způsobil masivní úhyn v chovu okřehku menšího, bylo nutné sušit PHB v jiné laboratoři. Vizuální analýza naznačila, že se mohlo jednat o *Fusarium oxysporum*, která je přirozenou součástí půdního edafonu a má na některé rostliny silně fytotoxické účinky [86]. V kombinaci s efekty bioplastů na fyzikální a chemické vlastnosti půdy, které byly popsány v předchozí kapitole se ukazuje jako důležité, veškeré bioplastové produkty určené pro zemědělství před použitím důkladně otestovat a aktivně bránit napadení patogenními mikroorganismy. Podobně je tomu samozřejmě i s obalovými a dalšími materiály. Nicméně, toto jsou témata, která přesahují rámec této disertační práce.



Obrázek 6: Uvolňovaný CO_2 při inkubaci granulí chytrého hnojiva v respirometru



Obrázek 7: Granule chytrého hnojiva po ukončení experimentu. A) granule bez coatingu, B) granule s jednou vrstvou coatingu, C) granule s dvěma vrstvami coatingu

Odpověď na výzkumnou otázku 4 tedy je, že využíváním bioplastových produktů by mohlo docházet ke vstupu invazních mikroorganismů žijících na těchto výrobcích, a také ovlivnění mikrobiální diverzity a vznik mikrobioplastů, jejíž vliv na půdu je popsán v Odpovědi na výzkumnou otázku 3. Nejzásadnějším problémem se zdá případ, kdy bioplasty v půdě mohou podporovat růst plísní, které následně povede k větší aplikaci fungicidů na zemědělské půdy.

Závěr

Produkty vyrobené z biodegradabilních bioplastů začínají nahrazovat produkty vyrobené z konvenčních plastů kvůli tlaku ze strany organizací a zákazníků. Spotřebitelé se potom mohou mylně domnívat, že tyto materiály nepředstavují pro životní prostředí žádnou hrozbu, čímž se může zvýšit odhazování odpadků v životním prostředí (littering), bioplastové produkty můžou používat špatným způsobem, a tím mohou neúmyslně zatížit životní prostředí [87]. Kvůli Jevonsovu paradoxu (jev, při kterém úsporné opatření vyvolá větší spotřebu) může také dojít k vyšší spotřebě biobased-plastu a tím i vyšší produkci (bio)plastového odpadu [88], pro jehož recyklaci v současné chvíli neexistuje infrastruktura. Velmi častým způsobem jeho likvidace je kompostování. Takto vzniklý kompost může obsahovat velké množství mikrobioplastů vzniklých nekompletní biodegradací, kterými se může kontaminovat půda. Proto některé kompostárny separují bioplasty z bioodpadu, které poté končí ve spalovnách nebo na skládkách [89]. Taktéž nesprávné využívání bioplastů v zemědělství může být významným (byť relativně krátkodobým) zdrojem mikrobioplastů v půdě [45].

Není zcela objasněno, zdali bude tento odpad stát za masivní tvorbou mikročástic s velkou sorpční schopností, chronickou toxicitou pro živé organismy nebo negativním vlivem na půdu. Současné normy, na základě, kterých jsou nové materiály testovány a certifikovány, neodráží reálné podmínky, kterým budou bioplasty vystaveny v životním prostředí a není v nich kladen důraz na detekci reziduí vzniklých při biodegradaci. Proto je potřeba vyvinout spolehlivou a rychlou metodu pro stanovení těchto částic ve všech složkách životního prostředí, a především v půdě. Jak vyplývá z této práce, metody pro stanovení mikrobioplastů mohou být inspirovány již vyvinutými přístupy, nicméně bioplasty mají svá specifika, která je nutné při volbě metody brát na zřetel. Jde především o jejich chemickou nestabilitu, díky které není možné použít při rozkladu matrice agresivní chemikálie, čímž se významně komplikuje celá analýza a je nutné použít metody, které nevyžadují žádnou předúpravu vzorku. A také přirozený výskyt analyzovaného polymeru nebo jeho monomerů může interferovat s analytickým signálem, který dává mikrobioplastová kontaminace. Zde představené metody (**Příloha E** disertační práce a [78]) mají potenciál být základem pro takovouto metodu a je zde představena cesta, kterou by mohly být vylepšeny, aby byly dostatečně citlivé k analýzám reálných vzorků.

Při vývoji nových bioplastových materiálů, anebo výrobků je potřeba důkladně ověřit jejich biodegradabilitu v podmínkách, kde se předpokládá jejich end-of-life a ideálně po biodegradačním experimentu výsledky verifikovat analýzou reziduí bioplastů. Nedílnou součástí certifikace nových produktů by měla být analýza jejich vlivu na životní prostředí, a to při jejich vstupu do testovaného ekosystému, během jejich biodegradace a po jejich biodegradaci. Bez těchto experimentů není možné zaručit bezpečnost jejich používání.

Přestože jsou v této práci prezentovány možné problémy plynoucí z používání bioplastů, musíme zmínit, že jsou právě bioplasty možnou nadějnou cestou k omezení vzniku mikroplastů, které sami o

sobě představují riziko pro životní prostředí. Tato práce má poukázat na slabiny při testování biodegradability a možný vliv bioplastů na životní prostředí, které je nutné brát v úvahu při vývoji nových materiálů. Při tom je tedy nutné nejen zabezpečit jejich konec života (biodegradace, recyklace), ale i definovat limity jejich využívání a podmínky, za kterých je jejich vliv na životní prostředí minimální nebo nejlépe pozitivní, jak je často deklarováno. Proto by měly být biodegradabilní plasty zařazeny do zvláštní kategorie plastového odpadu. Následně je nutné vypracovat strategie na snadné a ekonomicky výhodné metody jejich fyzikální recyklace, která je v současné době komplikovaná (například při recyklaci PHB dochází k jeho degradaci) [50]. Není možné spoléhat pouze na jejich kompostování, které v současné době není ekonomické, může vést ke kontaminaci půdy mikrobioplasty a tudíž nedává příliš smysl [90]. A neměla by se ani opomíjet osvěta laické veřejnosti, jak tyto produkty využívat, a hlavně jak správně zacházet s bioplastovým odpadem.

Bibliografie

1. Statista 2022.

2. Bagheri, A.; Laforsch, C.; Greiner, A.; Agarwal, S. Fate of So-Called Biodegradable Polymers in Seawater and Freshwater. *Global Challenges* 2017, *vol. 1*, 1-5.

3. Geyer, R.; Jambeck, J.; Law, K. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances* 2017, *vol. 3*.

4. Andrady, A. Microplastics in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 2011, *vol. 62*, 1596-1605.

5. Guo, X.; Wang, J. The chemical behaviors of microplastics in marine environment: A review. *Marine Pollution Bulletin* 2019, *vol. 142*, 1-14.

6. Rillig, M. Microplastic in Terrestrial Ecosystems and the Soil?. *Environmental Science & Technology* 2012, *vol. 46*, 6453-6454.

7. de Souza Machado, A.; Kloas, W.; Zarfl, C.; Hempel, S.; Rillig, M. Microplastics as an emerging threat to terrestrial ecosystems. *Global Change Biology* 2018, *vol. 24*, 1405-1416.

8. Ward, C.; Armstrong, C.; Walsh, A.; Jackson, J.; Reddy, C. Sunlight Converts Polystyrene to Carbon Dioxide and Dissolved Organic Carbon. *Environmental Science & Technology Letters* 2019, *vol. 6*, 669-674.

9. Hartmann, N.; Hüffer, T.; Thompson, R.; Hassellöv, M.; Verschoor, A.; Daugaard, A.; Rist, S.; Karlsson, T.; Brennholt, N.; Cole, M. et al. Are We Speaking the Same Language? Recommendations for a Definition and Categorization Framework for Plastic Debris. *Environmental Science & Technology* 2018, *vol. 53*, 1039-1047.

10. Bläsing, M.; Amelung, W. Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. *Science of The Total Environment* 2018, *vol. 612*, 422-435.

11. Liu, K.; Wang, X.; Fang, T.; Xu, P.; Zhu, L.; Li, D. Source and potential risk assessment of suspended atmospheric microplastics in Shanghai. *Science of The Total Environment* 2019, *vol. 675*, 462-471.

12. Maaß, S.; Daphi, D.; Lehmann, A.; Rillig, M. Transport of microplastics by two collembolan species. *Environmental Pollution* 2017, *vol. 225*, 456-459.

13. Rillig, M.; Ziersch, L.; Hempel, S. Microplastic transport in soil by earthworms. *Scientific Reports* 2017, *vol. 7*.

14. van den Berg, P.; Huerta-Lwanga, E.; Corradini, F.; Geissen, V. Sewage sludge application as a vehicle for microplastics in eastern Spanish agricultural soils. *Environmental Pollution* 2020, *vol. 261*.

15. Laskar, N.; Kumar, U. Plastics and microplastics: A threat to environment. *Environmental Technology & Innovation* 2019, *vol. 14*.

16. Thompson, R. Lost at Sea: Where Is All the Plastic?. *Science* 2004, *vol. 304*, 838-838.

17. Wang, C.; Wang, L.; Ok, Y.; Tsang, D.; Hou, D. Soil plastisphere: Exploration methods, influencing factors, and ecological insights. *Journal of Hazardous Materials* 2022, *vol. 430*.

18. Guo, X.; Chen, C.; Wang, J. Sorption of sulfamethoxazole onto six types of microplastics. *Chemosphere* 2019, *vol. 228*, 300-308.

19. Jaikumar, G.; Brun, N.; Vijver, M.; Bosker, T. Reproductive toxicity of primary and secondary microplastics to three cladocerans during chronic exposure. *Environmental Pollution* 2019, *vol. 249*, 638-646.

20. Bosker, T.; Olthof, G.; Vijver, M.; Baas, J.; Barmentlo, S. Significant decline of Daphnia magna population biomass due to microplastic exposure. *Environmental Pollution* 2019, *vol. 250*, 669-675.

21. Lu, Y.; Zhang, Y.; Deng, Y.; Jiang, W.; Zhao, Y.; Geng, J.; Ding, L.; Ren, H. Uptake and Accumulation of Polystyrene Microplastics in Zebrafish (Danio rerio) and Toxic Effects in Liver. 2016, *vol. 50*, 4054-4060.

22. Ding, W.; Li, Z.; Qi, R.; Jones, D.; Liu, Q.; Liu, Q.; Yan, C. Effect thresholds for the earthworm Eisenia fetida: Toxicity comparison between conventional and biodegradable microplastics. *Science of The Total Environment* 2021, *vol. 781*.

23. Ragusa, A.; Svelato, A.; Santacroce, C.; Catalano, P.; Notarstefano, V.; Carnevali, O.; Papa, F.; Rongioletti, M.; Baiocco, F.; Draghi, S. et al. Plasticenta: First evidence of microplastics in human placenta. *Environment International* 2021, *vol. 146*.

24. Prata, J.; da Costa, J.; Lopes, I.; Duarte, A.; Rocha-Santos, T. Environmental exposure to microplastics: An overview on possible human health effects. *Science of The Total Environment* 2020, *vol. 702*.

25. Ferreira, I.; Venâncio, C.; Lopes, I.; Oliveira, M. Nanoplastics and marine organisms: What has been studied?. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 2019, *vol. 67*, 1-7.

26. Boots, B.; Russell, C.; Green, D. Effects of Microplastics in Soil Ecosystems: Above and Below Ground. 2019, *vol. 53*, 11496-11506.

27. Li, L.; Luo, Y.; Li, R.; Zhou, Q.; Peijnenburg, W.; Yin, N.; Yang, J.; Tu, C.; Zhang, Y. Effective uptake of submicrometre plastics by crop plants via a crack-entry mode. *Nature Sustainability* 2020, *vol. 3*, 929-937.

28. Yuan, W.; Zhou, Y.; Liu, X.; Wang, J. New Perspective on the Nanoplastics Disrupting the Reproduction of an Endangered Fern in Artificial Freshwater. 2019, *vol. 53*, 12715-12724.

29. Giorgetti, L.; Spanò, C.; Muccifora, S.; Bottega, S.; Barbieri, F.; Bellani, L.; Ruffini Castiglione, M. Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and Allium cepa during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 2020, *vol. 149*, 170-177.

30. Ghosh, S.; Qureshi, A.; Purohit, H. Microbial degradation of plastics: Biofilms and degradation pathways. *Contaminants in Agriculture and Environment: Health Risks and Remediation* 2019, 184-199.

31. (Orr), I.; Hadar, Y.; Sivan, A. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a strain of Rhodococcus ruber. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2004, *vol. 65*.

32. Free, C.; Jensen, O.; Mason, S.; Eriksen, M.; Williamson, N.; Boldgiv, B. High-levels of microplastic pollution in a large, remote, mountain lake. *Marine Pollution Bulletin* 2014, *vol. 85*, 156-163.

33. Lozano, Y.; Aguilar-Trigueros, C.; Onandia, G.; Maaß, S.; Zhao, T.; Rillig, M.; Macinnis-Ng, C. Effects of microplastics and drought on soil ecosystem functions and multifunctionality. *Journal of Applied Ecology* 2021, *vol. 58*, 988-996.

34. Haider, T.; Völker, C.; Kramm, J.; Landfester, K.; Wurm, F. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie International Edition* 2018, *3*, 1-5.

35. Report from the commision to the europian parliament and the coaching: on the impact of the use of oxo-degradable plastic, including oxo-degradable plastic carrier bags, on the environment. In Proceedings of the An official website of the European Union; Brussels, 2018; p. .

36. ECHA.

37. Van de Velde, K.; Kiekens, P. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing* 2002, *vol. 21*, 433-442.

38. Ferreira, R.; Amatte, I.; Dutra, T.; Bürger, D. Experimental characterization and micrography of 3D printed PLA and PLA reinforced with short carbon fibers. *Composites Part B: Engineering* 2017, *vol. 124*, 88-100.

39. European Bioplastics: Bioplastics market data 2022.

40. Agnihotri, S.; Shukla, S.; Pilla, S. Sustainability Issues in Bioplastics. *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering* 2019.

41. Bastioli, C. *Handbook of biodegradable polymers*; Rapra Technology: Shrewsbury, 2005; p. ; ISBN 18-595-7389-4.

42. Sintim, H.; Bary, A.; Hayes, D.; English, M.; Schaeffer, S.; Miles, C.; Zelenyuk, A.; Suski, K.; Flury, M. Release of micro- and nanoparticles from biodegradable plastic during in situ composting. *Science of The Total Environment* 2019, *vol. 675*, 686-693.

43. Zimmermann, L.; Dombrowski, A.; Völker, C.; Wagner, M. Are bioplastics and plant-based materials safer than conventional plastics? In vitro toxicity and chemical composition. *Environment International* 2020, *vol. 145*.

44. Qin, M.; Chen, C.; Song, B.; Shen, M.; Cao, W.; Yang, H.; Zeng, G.; Gong, J. A review of biodegradable plastics to biodegradable microplastics: Another ecological threat to soil environments?. *Journal of Cleaner Production* 2021, *vol. 312*.

45. Shruti, V.; Kutralam-Muniasamy, G. Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. *Science of The Total Environment* 2019, *vol. 697*.

46. Crawford, C.; Quinn, B. *Microplastic pollutants*; 2017 ed.; Elsevier: Amsterdam, 2017; p. ; ISBN 978-0-12-809406-8.

47. Steinmetz, Z.; Wollmann, C.; Schaefer, M.; Buchmann, C.; David, J.; Tröger, J.; Muñoz, K.; Frör, O.; Schaumann, G. Plastic mulching in agriculture. Trading short-term agronomic benefits for long-term soil degradation?. *Science of The Total Environment* 2016, *vol. 550*, 690-705.

48. Siwek, P.; Domagala-Swiatkiewicz, I.; Bucki, P.; Puchalski, M. Biodegradable agroplastics in 21st century horticulture. *Polimery* 2019, *vol. 64*, 480-486.

49. Kasirajan, S.; Ngouajio, M. Polyethylene and biodegradable mulches for agricultural applications: a review. *Agronomy for Sustainable Development* 2012, *vol. 32*, 501-529.

50. Shruti, V.; Kutralam-Muniasamy, G. Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics. *Science of The Total Environment* 2019, *vol. 697*.

51. Vert, M.; Doi, Y.; Hellwich, K.; Hess, M.; Hodge, P.; Kubisa, P.; Rinaudo, M.; Schué, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). *Pure and Applied Chemistry* 2012, *vol. 84*, 377-410.

52. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium -- Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer 1999.

53. Harrison, J.; Boardman, C.; O'Callaghan, K.; Delort, A.; Song, J. Biodegradability standards for carrier bags and plastic films in aquatic environments: a critical review. *Royal Society Open Science* 2018, *vol. 5*.

54. Obruca, S.; Benesova, P.; Petrik, S.; Oborna, J.; Prikryl, R.; Marova, I. Production of polyhydroxyalkanoates using hydrolysate of spent coffee grounds. *Process Biochemistry* 2014, *vol. 49*, 1409-1414.

55. Obruca, S.; Marova, I.; Snajdar, O.; Mravcova, L.; Svoboda, Z. Production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Cupriavidus necator from waste rapeseed oil using propanol as a precursor of 3-hydroxyvalerate. *Biotechnology Letters* 2010, *vol. 32*, 1925-1932.

56. Ansari, S.; Fatma, T.; Appanna, V. Cyanobacterial Polyhydroxybutyrate (PHB): Screening, Optimization and Characterization. *PLOS ONE* 2016, *vol. 11*.

57. Pospisilova, A.; Novackova, I.; Prikryl, R. Isolation of poly(3-hydroxybutyrate) from bacterial biomass using soap made of waste cooking oil. *Bioresource Technology* 2021, *vol. 326*.

58. Shimao, M. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology* 2001, *vol. 12*, 242-247.

59. Karamanlioglu, M.; Robson, G. The influence of biotic and abiotic factors on the rate of degradation of poly(lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polymer Degradation and Stability* 2013, *vol. 98*, 2063-2071.

60. Ezeh, O.; Susmel, L. Fatigue behaviour of additively manufactured polylactide (PLA). *Procedia Structural Integrity* 2018, *vol. 13*, 728-734.

61. Hamad, K.; Kaseem, M.; Ayyoob, M.; Joo, J.; Deri, F. Polylactic acid blends: The future of green, light and tough. *Progress in Polymer Science* 2018, *vol. 85*, 83-127.

62. Fahim, I.; Chbib, H.; Mahmoud, H. The synthesis, production & economic feasibility of manufacturing PLA from agricultural waste. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 2019, *vol. 12*.

63. Emadian, S.; Onay, T.; Demirel, B. Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management* 2017, *vol. 59*, 526-536.

64. Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium -- Method by analysis of evolved carbon dioxide 2018.

65. Chinaglia, S.; Tosin, M.; Degli-Innocenti, F. Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level. *Polymer Degradation and Stability* 2018, *vol. 147*, 237-244.

66. Bátori, V.; Åkesson, D.; Zamani, A.; Taherzadeh, M.; Sárvári Horváth, I. Anaerobic degradation of bioplastics: A review. *Waste Management* 2018, *vol. 80*, 406-413.

67. He, D.; Luo, Y.; Lu, S.; Liu, M.; Song, Y.; Lei, L. Microplastics in soils: Analytical methods, pollution characteristics and ecological risks. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 2018, *vol. 109*, 163-172.

68. Sun, J.; Dai, X.; Wang, Q.; van Loosdrecht, M.; Ni, B. Microplastics in wastewater treatment plants: Detection, occurrence and removal. *Water Research* 2019, *vol. 152*, 21-37.

69. Silva, A.; Bastos, A.; Justino, C.; da Costa, J.; Duarte, A.; Rocha-Santos, T. Microplastics in the environment: Challenges in analytical chemistry - A review. *Analytica Chimica Acta* 2018, *vol. 1017*, 1-19.

70. Hurley, R.; Lusher, A.; Olsen, M.; Nizzetto, L. Validation of a Method for Extracting Microplastics from Complex, Organic-Rich, Environmental Matrices. *Environmental Science & Technology* 2018, *vol. 52*, 7409-7417.

71. Song, Y.; Hong, S.; Jang, M.; Han, G.; Rani, M.; Lee, J.; Shim, W. A comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. *Marine Pollution Bulletin* 2015, *vol. 93*, 202-209.

72. Shim, W.; Hong, S.; Eo, S. Identification methods in microplastic analysis: a review. *Analytical Methods* 2017, *vol. 9*, 1384-1391.

73. Dümichen, E.; Eisentraut, P.; Bannick, C.; Barthel, A.; Senz, R.; Braun, U. Fast identification of microplastics in complex environmental samples by a thermal degradation method. *Chemosphere* 2017, *vol. 174*, 572-584.

74. David, J.; Weissmannová, H.; Steinmetz, Z.; Kabelíková, L.; Demyan, M.; Šimečková, J.; Tokarski, D.; Siewert, C.; Schaumann, G.; Kučerík, J. Introducing a soil universal model method (SUMM) and its application for qualitative and quantitative determination of poly(ethylene), poly(styrene), poly(vinyl chloride) and poly(ethylene terephthalate) microplastics in a model soil. *Chemosphere* 2019, *vol. 225*, 810-819.

75. Krishnan, S.; Chinnadurai, G.; Perumal, P. Polyhydroxybutyrate by Streptomyces sp: Production and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules* 2017, *vol. 104*, 1165-1171.

76. Fojt, J.; David, J.; Přikryl, R.; Řezáčová, V.; Kučerík, J. A critical review of the overlooked challenge of determining micro-bioplastics in soil. *Science of The Total Environment* 2020, *vol. 745*.

77. Ivleva, N. Chemical Analysis of Microplastics and Nanoplastics: Challenges, Advanced Methods, and Perspectives. *Chemical Reviews* 2021, *vol. 121*, 11886-11936.

78. Fojt, J.; Románeková, I.; Procházková, P.; David, J.; Brtnický, M.; Kučerík, J. A Simple Method for Quantification of Polyhydroxybutyrate and Polylactic Acid Micro-Bioplastics in Soils by Evolved Gas Analysis. *Molecules* 2022, *vol. 27*.

79. Fojt, J.; Denková, P.; Brtnický, M.; Holátko, J.; Řezáčová, V.; Pecina, V.; Kučerík, J. Influence of Poly-3-hydroxybutyrate Micro-Bioplastics and Polyethylene Terephthalate Microplastics on the Soil Organic Matter Structure and Soil Water Properties. 2022, *vol. 56*, 10732-10742.

80. Wan, Y.; Wu, C.; Xue, Q.; Hui, X. Effects of plastic contamination on water evaporation and desiccation cracking in soil. *Science of The Total Environment* 2019, *vol. 654*, 576-582.

81. Brtnicky, M.; Pecina, V.; Holatko, J.; Hammerschmiedt, T.; Mustafa, A.; Kintl, A.; Fojt, J.; Baltazar, T.; Kucerik, J. Effect of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate amendment on the soil biochemical properties and fertility under varying sand loads. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture* 2022, *vol. 9*.

82. Tuson, H.; Weibel, D. Bacteria–surface interactions. *Soft Matter* 2013, *vol. 9*.

83. Burns, R.; DeForest, J.; Marxsen, J.; Sinsabaugh, R.; Stromberger, M.; Wallenstein, M.; Weintraub, M.; Zoppini, A. Soil enzymes in a changing environment: Current knowledge and future directions. *Soil Biology and Biochemistry* 2013, *vol. 58*, 216-234.

84. Zettler, E.; Mincer, T.; Amaral-Zettler, L. Life in the "Plastisphere": Microbial Communities on Plastic Marine Debris. 2013, *vol. 47*, 7137-7146.

85. Liu, H.; Yang, X.; Liu, G.; Liang, C.; Xue, S.; Chen, H.; Ritsema, C.; Geissen, V. Response of soil dissolved organic matter to microplastic addition in Chinese loess soil. *Chemosphere* 2017, *vol. 185*, 907-917.

86. Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C. Fusarium oxysporum and its biocontrol. *New Phytologist* 2003, *vol. 157*, 493-502.

87. Taufik, D.; Reinders, M.; Molenveld, K.; Onwezen, M. The paradox between the environmental appeal of bio-based plastic packaging for consumers and their disposal behaviour. *Science of The Total Environment* 2020, *vol. 705*.

88. Alcott, B. Jevons' paradox. *Ecological Economics* 2005, *vol. 54*, 9-21.

89. Barrett, A. The Battle Between Oregon Composters and the Biodegradable Products Institute. In Proceedings of the Bioplastics NEWS; 2019; p. .

90. Vrbová, M. Biodegradabilní plasty v procesech nakládání s odpady. Odborná zpráva o postupu a dosažených výsledcích za rok 2015, Praha, 2015, p. .

Životopis

Jakub Fojt

Datum narození: 20.2. 1992 **Email:** xcfojt@fch.vut.cz **Telefon:** +420 734 498 003

Adresa: U Sýpky 23, Rajhradice 664 61

Pracovní zkušenosti

2017–2018	Laboratorní technik v Centru materiálu výzkumu, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
2018–2019	Senior researcher v Nafigate Corporation
2019–2022	Výzkumný pracovník v Centru materiálu výzkumu, Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická
2022	Technickohospodářský pracovník, Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, Vysoké učení technické v Brně, fakulta chemická

Vzdělání

2013–2016	Vysoké učení technické, Fakulta chemická, bakalářský studijní program: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, ukončeno státní závěrečnou zkouškou
2016–2018	Vysoké učení technické, Fakulta chemická, magisterský navazující studijní program: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, ukončeno státní závěrečnou zkouškou
2018	Vysoké učení technické, Fakulta chemická, doktorský studijní program: Ústav chemie a technologie ochrany životního prostředí, předpokládané ukončení březen 2023

Projekty

2019–2021	Smart fertilizers a Vývoj nové materiálové základny na základě Hydal PHA pro náhradu mikroplastů, TRIO Ministerstvo průmyslu a obchodu
2021–2022	Environmental risk assessment of polyhydroxybutyrate micro-bioplastics, Interní VUT grant KInG, hlavní řešitel

Pedagogické zkušenosti

2022	Sustanaibility and Global Change II; Green Materials for Green Technologies, Energy and Depollution; Technologie chemických výrob; Základy chemických technologií; Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně (přednášky)

2020–2021 Audiovizuální digitalizace předmětů Praktikum z analytické chemie I a II a Praktikum z ekotoxikologie – Natáčení videí, střih a tvorba anglických titulků

2018–2021 Konzultant 3 bakalářských a 3 diplomových prací (Ing. Kameníková, Ing. Palucha, Ing. Denková)

2018–2021 Praktikum z analytické chemie I a II, Praktikum z environmentální chemie, Fakulta chemická, Vysoké učení technické v Brně (Výuka v praktiku)

2019 Chemie, Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně (přednášky, zkoušení)

Publikace

- FOJT, J.; DAVID, j.; PŘIKRYL, R.; ŘEZÁČOVÁ, V.; KUČERÍK, J. A critical review of the overlooked challenge of determining micro-bioplastics in soil. Science of the Total Environment, 2020, vol. 745, no. 140975, p. 1-12. ISSN: 0048-9697.
- FOJT, J.; ROMÁNEKOVÁ, I.; PROCHÁZKOVÁ, P.; DAVID, J.; BRTNICKÝ, M.; KUČERÍK, J. A Simple Method for Quantification of Polyhydroxybutyrate and Polylactic Acid Micro-Bioplastics in Soils by Evolved Gas Analysis. MOLECULES, 2022, vol. 27, no. 6, p. 1-16. ISSN: 1420-3049.
- FOJT, J.; DENKOVÁ, P.; BRTNICKÝ, M.; HOLÁTKO, J.; ŘEZÁČOVÁ, V.; PECINA, V.; KUČERÍK, J. Influence of Poly-3-hydroxybutyrate Micro-Bioplastics and Polyethylene Terephthalate Microplastics on the Soil Organic Matter Structure and Soil Water Properties. Environmental Science and Technology, 2022, vol. 56, no. 15, p. 1-11. ISSN: 1520-5851.
- BRTNICKÝ, M.; PECINA, V.; HOLÁTKO, J.; HAMMERSCHMIEDT, T.; MUSTAFA, A.; KINTL, A.; FOJT, J.; BALTAZAR, T.; KUČERÍK, J. Effect of biodegradable poly-3-hydroxybutyrate amendment on the soil biochemical properties and fertility under varying sand loads. Chemical and Biological Technologies in Agriculture, 2022, vol. 9, no. 75, ISSN: 2196-5641.

Konference (přednášky)

- 9th World Congress on Biopolymers & Bioplastics, Londýn, Spojené Království 2019
- Termoanalytický seminář 2019, Brno, Česká republika
- Chemistry is Life 2020, Brno, Česká republika
- 17th International Congress on Thermal Analysis and Calorimetry, Krakow, Polsko, 2021
- 6th Central and Eastern European Conference on Thermal Analysis and Calorimetry and 15th Mediterranean Conference on Calorimetry and Thermal Analysis, Split, Chorvatsko, 2021
- Chemistry is Life 2021, Brno, Česká republika

Zahraniční stáže

2021 National Institute for Laser, Plasma and Radiation Physics Bucharest, Rommania (14 dnů)

2022 The Ohio State University, School of Environment and Natural Resources, Columbus, Ohio, Spojené státy americké (3 měsíce)

Kurzy

2019 Seminář Interpretace vibračních spekter na VŠCHT v Praze

2021 Kurz pokročilé statistické analýzy, Kurz projektového managementu, Kurz akademického psaní

Ocenění

2018 Cena děkana za nejlepší diplomovou práci

2020 Cena děkana za vynikající výzkumnou a publikační činnost

2021 Cena studentů za nejlepší příspěvek v Sekci organické, environmentální chemie a biochemie na studentské konferenci Chemistry is life 2021