



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# BIODEGRADACE POLYESTERŮ A DALŠÍCH POLYMERŮ V PROSTŘEDÍ PŮDY A KOMPOSTU

BIODEGRADATION OF POLYESTERS AND OTHER POLYMERS IN SOIL AND COMPOST

## DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

**Bc. František Papala**

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

**prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

**BRNO 2022**

## Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1716/2021 Akademický rok: 2021/22  
Ústav: Ústav chemie potravin a biotechnologií  
Student: **Bc. František Papala**  
Studijní program: Chemie a technologie potravin  
Studijní obor: Potravinářská chemie a biotechnologie  
Vedoucí práce: **prof. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

### Název diplomové práce:

Biodegradace polyesterů a dalších polymerů v prostředí půdy a kompostu

### Zadání diplomové práce:

1. Vypracovat literární rešerši na zadané téma
2. Studium biodegradace vybraných polyesterů v prostředí kompostu
3. Studium biodegradace vybraných polyesterů v půdě
4. Kultivační posouzení toxicity polymerních materiálů a kompostů z nich připravených

### Termín odevzdání diplomové práce: 13.5.2022:

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu.  
Toto zadání je součástí diplomové práce.

-----  
Bc. František Papala  
student

prof. Ing. Stanislav Obruča,  
Ph.D.  
vedoucí práce

prof. RNDr. Ivana Márová, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2022

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **Abstrakt**

Tato diplomová práce studuje biodegradaci polyhydroxybutyrátu (PHB) a polyesteru kyseliny mléčné (PLA) v prostředí půdy a kompostu. Experimentální část se zabývá rozdíly degradace mezi prostředími a vlivem degradovaných polymerů na samotné prostředí. Testy odhalily, že především vyšší teplota a popřípadě vyšší vlhkost prostředí mají velký vliv na rychlost biodegradace. V prostředí kompostu došlo k viditelnému úbytku všech polymerů, zatímco polymery v prostředí půdy nevykazovaly viditelnou změnu a ani hmotnostní úbytek v 8. týdnu experimentu. Přestože snímky z SEM prokázaly pomalou mikrobiální degradaci PHB v prostředí půdy, ani u jednoho ze vzorků PLA toto k vidění nebylo. Což by naznačovalo abiotickou degradaci PLA. Germinační a ani růstový test, které využily připravené komposty přetížené testovanými polymery jako substrát, respektive hnojivo, nevykazovaly ve většině případů signifikantní rozdíly mezi jednotlivými rostlinami napříč substráty. Díky tomu můžeme předpokládat, že polymery a ani jejich degradační produkty vznikající v rámci procesu kompostování nejsou fytotoxické.

## **Klíčová slova**

Polyhydroxybutyrát, polyester kyseliny mléčné, biodegradace, kompost, germinační test, růstový test

## **Abstract**

This diploma thesis studies the biodegradation of polyhydroxybutyrate (PHB) and polylactic acid (PLA) within soil and compost environments. The experimental part of this work is concerned with the differences in degradation across environments and the effects of degraded polymers on the environment itself. Experiments revealed that higher temperature and potentially also higher humidity substantially affect the rate of biodegradation. A significant degradation of all the polymers was observed in the compost medium, while polymers within the soil medium did not demonstrate any visible change nor change in mass after the 8<sup>th</sup> week of experiment. Even though SEM images revealed slow microbial degradation of soil PHB, this was not seen in any of the soil-incubated PLA samples. This might indicate primarily abiotic mechanism of PLA degradation. Germination and grow tests, which used the prepared polymer-enriched compost as a substrate and fertilizer, respectively, did not in most cases reveal any significant differences between individual plants across substrates. This seems to imply that neither the examined polymers nor their degradation products generated during composting are phytotoxic.

## **Key words**

Polyhydroxybutyrate, polylactic acid, biodegradation, compost, germination test, growth test

PAPALA, František. *Biodegradace polyesterů a dalších polymerů v prostředí půdy a kompostu*. Brno, 2022. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citoval. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studenta

### **Poděkování**

Nejprve bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce prof. Ing. Stanislavu Obručovi, Ph.D. za poskytnutí tématu, cenné připomínky a odborné vedení práce. Ing. Juraji Vodičkovi konzultantovi této práce, patří velké poděkování za spoustu konzultací, pomoci s experimenty a také cennými připomínkami při psaní této práce. Taktéž děkuji své rodině a přátelům za motivaci a podporu při důležitých momentech.

## OBSAH

1 Úvod.....	8
2 Teoretická část .....	9
2.1 Bioplasty .....	9
2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty .....	9
2.1.2 Kyselina polymléčná.....	10
2.2 Degradace biopolymerů.....	11
2.2.1 Abiotická degradace .....	11
2.2.2 Biologická degradace.....	13
2.3 Prostředí biodegradace biopolymerů .....	14
2.3.1 Kompostování.....	14
2.3.2 Půda .....	16
2.3.3 Normy pro posouzení biodegradačních procesů.....	17
2.4 Rostliny.....	19
2.4.1 Růst rostlin.....	19
2.5 Současný stav řešené problematiky .....	20
3 Experimentální část.....	25
3.1 Použité materiály .....	25
3.1.1 Suroviny a polymery použité na kompostování .....	25
3.1.2 Použité přístroje .....	25
3.2 Pracovní postupy.....	25
3.2.1 Použitý postup pro biodegradaci polymerů v prostředí kompostu .....	25
3.2.2 Použitý postup pro biodegradaci polymerů v prostředí půdy .....	27
3.2.3 Stanovení maximální vodní kapacity pomocí Kopeckého válečků .....	28
3.2.4 Test klíčivosti.....	29
3.2.5 Růstový test.....	30

4 Výsledky a diskuze .....	33
4.1 Biodegradace polymerů v prostředí kompostu .....	33
4.1.1 Změny kompostu během testu .....	33
4.1.2 Analýza biodiverzity kompostu .....	34
4.2 Germinační test .....	41
4.3 Růstový test.....	43
4.4 Biodegradace polymerů v prostředí půdy .....	46
4.4.1 Změny polymerů v průběhu experimentu.....	47
5 Závěr .....	50
6 Literatura:.....	52
7 Seznam použitých zkratk .....	62
8 přílohy .....	63
8.1 Obsah destičky Biolog EcoPlates™ .....	63
8.2 Složení králíčího krmiva .....	63

# 1 ÚVOD

Svět se snaží ubírat ekologičtějším směrem, ke kterému patří nejen ekologičtější zdroje energie, ale také třeba snížení znečištění planety látkami petrochemického původu. A nejlepším řešením pro snížení objemu produkce nerozložitelných plastů je prevence jejich používání a použití ekologičtější alternativy, kterou v dnešní době nabízí biodegradabilní plasty jako jsou polyhydroxybutyrát (PHB), či různé formy polyesteru kyseliny mléčné (PLA). I dopad těchto materiálů na prostředí degradace je důležité zkoumat, abychom mohli posoudit, zda jsou ekologičtější než petrochemické polymery.

Různá prostředí mají rozdílné vlastnosti, které mohou mít vliv na proces degradace polymerů. Zatímco industriální kompost nabývá vyšších teplot a vlhkosti, tak půda v závislosti na místě původu bývá chladnější a sušší, což může mít vliv na jak abiotickou část biodegradace, tak tyto vlastnosti také ovlivňují mikrobiální konsorcium daného prostředí, které hraje také významnou roli při degradaci biotické.

Jaké jsou rozdíly mezi prostředími pro degradaci polymerů? Když už polymery degradují, jak významný je vliv prostředí? Pokud by to vliv mělo, bude negativní, neutrální či pozitivní? I na tyto otázky se předložená diplomová práce pokusila najít odpověď.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Bioplasty

Bioplasty jsou polymerní materiály, které na pohled a dotek vypadají stejně jako komerční plasty vyrobené z fosilních surovin a také dosahují velmi podobných mechanických vlastností. Musí být biodegradovatelné nebo vyrobeny z obnovitelných zdrojů, ale nemusí splňovat oba tyto předpoklady současně. V závislosti na těchto předpokladech rozlišujeme dvě skupiny, a to biodegradovatelné a tzv. bio-based bioplasty, které však nejsou biologicky rozložitelné. Bio-based bioplasty se od komerčních plastů nijak neliší, kromě substrátu, ze kterého jsou vyráběny – k jejich produkci mohou být použity obnovitelné suroviny jako je kukuřice, či cukrová třtina. Tudíž se tento druh bioplastů může podílet na řešení možných nedostatků vstupních surovin, ale už neposkytují ekologické výhody, jaké nabízí biodegradovatelné bioplasty. Mezi takto vzniklé bioplasty patří například bio-PET (bio-polyethylentereftalát) nebo bio-PE (bio-polyethylen) [1, 2].

Bioplasty biodegradovatelné v přírodě také mají podobné mechanické vlastnosti jako komerční plasty, ale mohou mít menší odolnost vůči vnějším vlivům jako je teplota, či vlhkost. Ale mají tu výhodu, že se na jejich produkci můžou použít odpadní produkty z jiných výrobních procesů a ve většině případů jsou biokompatibilní a netoxické. Některé z těchto bioplastů jsou makromolekulární látky produkované živými organismy. Mezi nejznámější bioplasty patří celulóza nebo škrob, avšak v poslední době se značně zkoumají mikrobiální polyestery – polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA jsou účinně odbourávány v životním prostředí, protože mnoho mikroorganismů v půdě vylučuje hydrolytické enzymy, které štěpí esterovou vazbu polymeru. Další biodegradabilní polymer je polyester kyseliny mléčné (PLA), u kterého část výroby musí probíhat synteticky [1, 2].

#### 2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty

PHA jsou netoxické, biokompatibilní a biodegradabilní alifatické polyestery, které vznikly činností mikroorganismů při stresových podmínkách jako rezerva uhlíku a energie. Syntetizují je  $G^+$  i  $G^-$  bakterie. Největší předností PHA je rychlá biodegradace za aerobních i anaerobních podmínek [3–5].

Kvůli stereospecifitě PHA syntáz jsou všechny monomery – 3-hydroxylalkánové kyseliny v R-konfiguraci. PHA jsou ukládány intracelulárně a za určitých podmínek mohou tvořit až 90 % hmotnosti sušiny [5]. PHA mohou být tvořeny z různých zdrojů, ať už obnovitelných (škrob, sacharóza, celulóza), z vedlejších produktů potravinářského průmyslu (melasa, syrovátka, glycerol) nebo z různých chemikálií (propanová kyselina) [5, 6].

Je identifikováno až 150 rozdílných monomerních jednotek PHA, takže nabízí možnost vzniku biodegradabilních polymerů s rozdílnými vlastnostmi, kdy mohou vznikat heteropolymery z různých monomerních jednotek [4, 5, 7]. Podle délky řetězce monomeru můžeme PHA rozdělit do tří skupin. S nejkratším řetězcem jsou SCL-PHA (short-chain-length PHA), které mají v monomeru do 5 atomů uhlíků. Monomery s 6 až 14 atomy uhlíků tvoří MCL-PHA (medium-chain-length PHA) a od 15 atomů uhlíků a více mají nejdelší monomery LCL-PHA (long-chain-length PHA). Jsou velmi vzácné a dosud nebyly objeveny přirozeně se vyskytující v prostředí, lze je připravit pouze uměle [5, 8, 9].

Poly-3-hydroxybutyrát – P3HB, je nejznámější zástupce PHA, kdy monomerní jednotka je 3-hydroxybutyrát. Podle produkčního mikroorganismu jsou monomerní jednotky polymerizovány do molekulových hmotností v rozmezí 200–3 000 kDa, [7, 10].

Jak bylo zmíněno výše, mikroorganismy jsou schopné produkovat heteropolymery s různými vlastnostmi, toho můžeme dosáhnout stimulací přidavkem vhodných substrátů do média producenta [2, 7, 13]. Častými ko-monomerními jednotkami s nejrozšířenějším 3-hydroxybutyrátem jsou 3-hydroxyvalerát, 3-hydroxyhexanoát nebo 4-hydroxybutyrát. Například inkorporace 4-hydroxybutyrátu do polymerního řetězce zlepšuje biokompatibilitu a mechanické vlastnosti polymeru [2, 11, 12].

### **2.1.2 Kyselina polymléčná**

Kyselina polymléčná je alifatický polyester, jehož základní monomerní jednotkou je kyselina 2-hydroxypropanová (mléčná). Jednotlivé monomery jsou vyráběny fermentací sacharidového zdroje bakteriemi mléčného kvašení. Přestože samotná polymerizace probíhá synteticky, výsledný produkt není toxický a považuje se za biologicky odbouratelný [3].

Kyselina mléčná je opticky aktivní, a to díky tomu, že vlastní chirální uhlík ve své molekule. Nalézá se tedy ve dvou enantiomerech, a to L–a D-formě. Oba polymery složené čistě z jedné formy laktátu jsou relativně pružné a mají vysokou pevnost v tahu. Jejich kopolymery se liší v některých fyzikálních a mechanických vlastnostech v závislosti na poměru L- a D-formy. Tento poměr ovlivňuje stupeň krystalinity, která také určuje rozpustnost PLA v organických rozpouštědlech [3, 13].

## **2.2 Degradace biopolymerů**

Degradací se rozumí jakákoliv fyzikální, či chemická změna polymeru, která je důsledkem vlivu prostředí, mezi které řadíme světlo, vlhkost, chemické podmínky, teplo nebo biologickou aktivitu. Degradace se projevuje ve změně mechanických, optických, či elektrických vlastností, také se může projevovat změnou barvy, praskáním nebo delaminací. Změny také probíhají na úrovni molekul jako je štěpení vazeb, chemická přeměna a tvorba nových funkčních skupin. Nejen prostředí, ale i samotný polymer má vliv na degradaci. Rozlišujeme dva typy degradací: abiotickou a biologickou [14].

### **2.2.1 Abiotická degradace**

Abiotická degradace zahrnuje všechny vlivy, které nejsou spojeny s živými organismy, především se jedná o vlivy jako UV záření, zvýšená teplota, přítomnost kyslíku (oxidační procesy) a přítomnost vody (hydrolýza). Polymery jsou většinou vystaveny více vlivům současně a jeden vliv může pomoci druhému k urychlení degradace [15]. Například UV záření napomáhá tvorbě radikálů, a ty pak podporují oxidaci [16]. Zvýšením teploty dochází ke katalýze hydrolýzy [17]. Dostupné faktory a fyzické vlastnosti polymeru ovlivňují rozklad materiálu na jednotlivé monomery, kdy přítomnost mikroorganismů schopných degradace konkrétních monomerů může tento proces urychlit [18]

#### **2.2.1.1 UV záření**

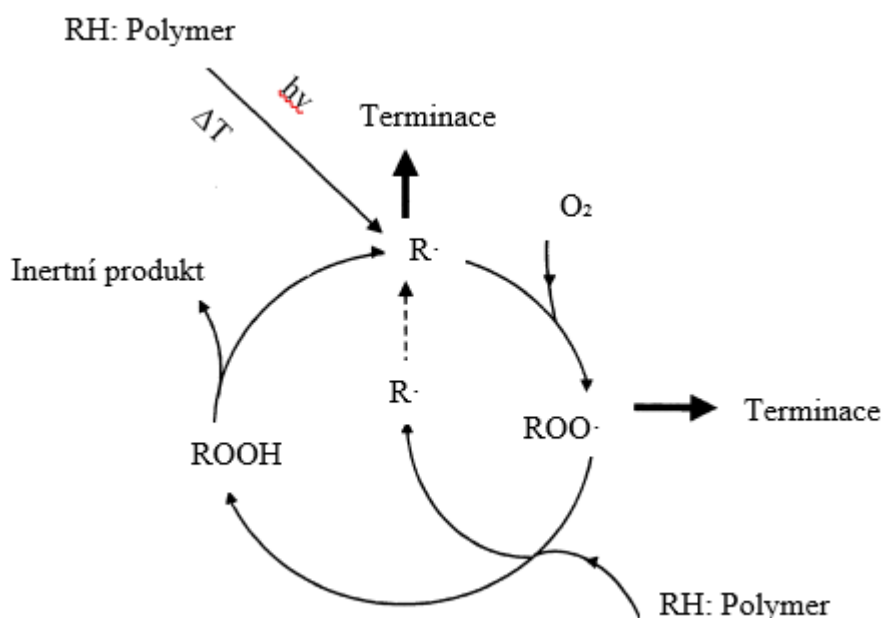
Ultrafialové záření může být polymerem absorbováno, odraženo nebo propuštěno skrz. V závislosti na chemické struktuře jsou látky schopné absorbovat světelné záření v konkrétním rozmezí vlnových délek daných pro konkrétní látku. V důsledku absorpce záření dochází k rozpadu makromolekul na kratší molekuly, které můžou být náchylnější k další degradaci třeba oxidací [16].

### 2.2.1.2 Zvýšená teplota

Vliv teploty můžeme rozdělit na dva efekty. Prvním efektem je katalytická činnost pro ostatní degradační faktory, především pro degradaci hydrolytickou a oxidační. Obecněji pomáhají zvyšovat energii potřebnou k iniciaci degradačních procesů. Druhým typem je jeho samotný vliv na degradaci materiálu. Zvýšená teplota i kolísavě může mít za následek nejprve vratné, poté až nevratné změny ve struktuře. Teplota například ovlivňuje krystalinitu a roztažnost polymeru a může dojít až k tepelné degradaci (deformaci, či rozpadu na menší celky polymerů). Těmito procesy pak opět pomáhá následné degradaci, protože zlepšuje přestup ostatních degradačních faktorů jako je kyslík, či voda [17].

### 2.2.1.3 Přítomnost kyslíku

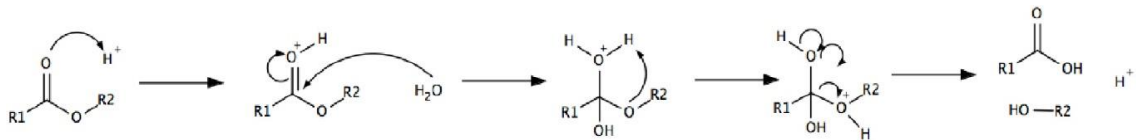
Za přítomnosti kyslíku dochází k oxidaci polymeru. Oxidace probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je iniciace, kdy se pomocí světla a tepla disociují vazby a vznikají volné radikály. Během druhého kroku dochází k propagaci, to znamená, že radikál reaguje s kyslíkem, dokud nedojde k třetí fázi. Tou je terminace, při které dochází k zániku radikálů (viz Obrázek 1). Během oxidace může dojít ke štěpení makromolekul na menší molekuly, k síťování nebo vzniku nových funkčních skupin, čímž se změní vlastnosti daného polymeru. Vliv kyslíku na degradaci polymerů je podmíněn mnoha faktory jako je stupeň krystalinity polymeru, množství dvojných vazeb nebo stupeň zesíťování [16].



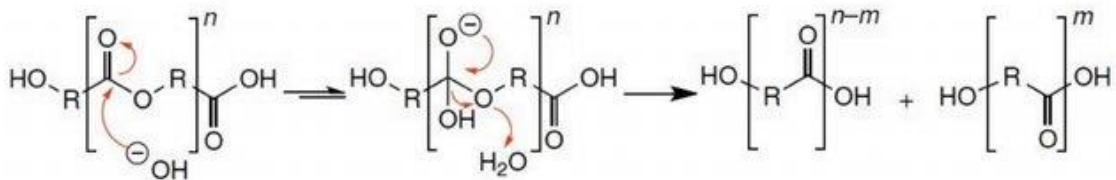
Obrázek 1: Schéma degradace polymeru oxidací [19]

### 2.2.1.4 Přítomnost vody

Po chemické stránce může voda některé polymery hydrolyzovat. Voda je amfoterní látka, může se chovat jako zásada i jako kyselina, a proto může ve vodním prostředí docházet jak ke kyselé (viz Obrázek 2), tak zásadité hydrolyze (viz Obrázek 3). Po stránce fyzikální může působit jako změkčovadlo nebo její vliv se může ukázat ve formě bobtnání nebo praskání materiálu [20].



Obrázek 2: Mechanismus kyselé hydrolyzy [21]



Obrázek 3: Schéma mechanismu alkalické hydrolyzy [22]

### 2.2.2 Biologická degradace

K biologické degradaci dochází za pomoci enzymů, ve většině případů hydroláz, které produkují přítomné mikroorganismy. Konkrétní enzymy závisí na typu vazby spojující jednotlivé monomery polymeru. Většina enzymů katalyzuje určitý typ děje, jako například esterázy, které pomáhají hydrolyzovat esterové vazby [23]. S tímto souvisí specifita konkrétních enzymů. Obecně platí, že čím méně specifické budou, tím více substrátů mohou štěpit, ale také mohou štěpit konkrétní substráty pomaleji než enzymy specifické pro daný substrát. Příkladem vysoce specifických esteráz jsou PHA depolymerázy produkované řadou mikroorganismů k odbourání PHA. Enzymy mohou působit intracelulárně k rozkladu endogenních zásob PHA (u PHA producentů) nebo mohou být vylučovány do prostředí a rozkládat materiál mimo mikroorganismus. Extracelulární enzymy zajišťují důležitý rozklad na menší celky, které poté mohou být zpracovány uvnitř buňky [24].

Biologická degradace probíhá ve třech krocích. Prvním krokem je vznik mikrobiálního filmu, který ovlivňuje vnější morfologické vlastnosti jako je barva, či lesk a také dochází

k degradaci aditiv. Ve druhém kroku je polymer pomocí extracelulárních enzymů degradován na menší celky jako jsou oligomery a monomery – tato fáze se nazývá biofragmentace. V posledním kroku, tzv. asimilaci, jsou tyto menší celky pohlceny buňkou, kde dochází k mineralizaci. Rozložení těchto menších celků závisí na finálním akceptoru elektronů, kdy za přítomnosti kyslíku dochází k rozkladu na oxid uhličitý a vodu a v anaerobních podmínkách vzniká methan, oxid uhličitý, vodík a případně i další metabolity [25].

## **2.3 Prostředí biodegradace biopolymerů**

Prostředí, ve kterém se odehrává biodegradace, má vliv na průběh samotné biodegradace, a to jak z pohledu na abiotickou část degradace, tak i na tu biologickou. Přestože fyzikálně-chemické vlastnosti prostředí ovlivňují degradaci abiotickou, mají vliv i na skladbu mikroorganismů a podmiňují tak i rychlost biofragmentace. Mezi tyto vlastnosti patří například teplota, pH, vlhkost, množství dostupného kyslíku, poměr C/N a velikost částic, respektive napadnutelná plocha rozkládaného materiálu. Mezi nejčastěji zkoumané prostředí biodegradace patří půda a kompost, ale zkoumá se také mořská a sladká voda (viz například [26, 27]).

### **2.3.1 Kompostování**

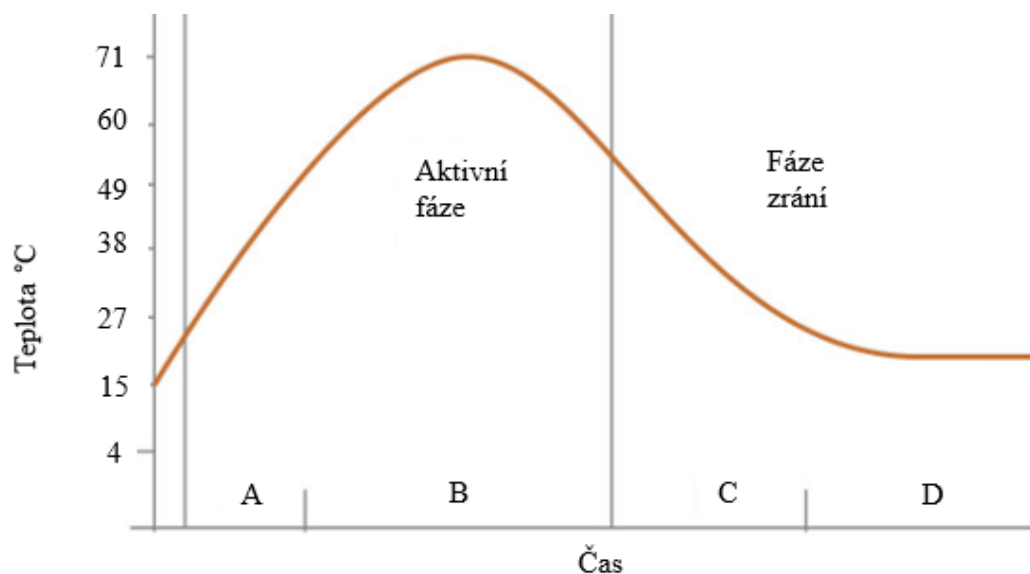
Kompostování je aerobní biologický proces, ve kterém dochází k biologické degradaci organické hmoty až na humusu podobný produkt. Mezi nejčastější materiály, které bývají kompostovány patří zemědělské odpady, popřípadě další zbytky potravin [26]. Proces probíhá za přírodních podmínek. V závislosti na typu použitého substrátu, podmínkách kompostování a regionálního původu obsahuje zralý kompost určité množství minerálních látek, a proto se používá jako hnojivo, čímž je zajištěno vrácení těchto látek do půdy. Jedná se především o dusík, fosfor, draslík, dále pak vápník, hořčík a síru [28]. Také může obsahovat prvky jako jsou železo, mangan a molybden, nebo jiné mikroelementy, které mají v malé koncentraci pozitivní efekt na rostlinou výživu [29].

#### **2.3.1.1 Kompostovací fáze**

Kompostování dělíme do dvou hlavních fází, které se následně dělí na další dvě fáze. První hlavní fáze je zvaná aktivní, kdy se nejprve začíná podfází mezofilní, a poté následuje podfáze termofilní, což také označuje zastoupení typu mikroorganismů. Druhá hlavní fáze je „vytvrzovací“ (neboli stabilizační), pod kterou spadá opět mezofilní

rekolonizace a nakonec zrání (viz Obrázek 4). Drobné organismy – jako například žížaly, háďátka, půdní hmyz a další, zajišťují počáteční rozpad organického materiálu na menší částice, který zvětšuje plochu, která může být napadnuta mikroorganismy. Tato činnost je podporována mechanicky, pomocí různých drtičů a jiných přístrojů [26].

V aktivní fázi, konkrétně fázi mezofilní dochází k nárůstu mezofilních organismů při teplotním optimu mezi 24–40 °C. Nejjednodušeji rozkládané substráty jako cukry a škrob jsou využívány jako první dostupný zdroj energie a stavební materiál [26]. Sloučeniny obtížněji dostupné mikrobiálnímu využití jako lignin a celulóza tvoří většinu kompostu na konci této podfáze. Při dostatečném objemu a hustotě kompostu teplota roste s aktivitou mikroorganismů a poté – při překročení teploty okolo 40 °C přechází do druhé podfáze, a to fáze termofilní [26, 30].



Obrázek 4: Závislost kompostovací fáze na čase. Fáze: A= Mezofilní, B= Termofilní, C= Mezofilní, D= Zrání [31]

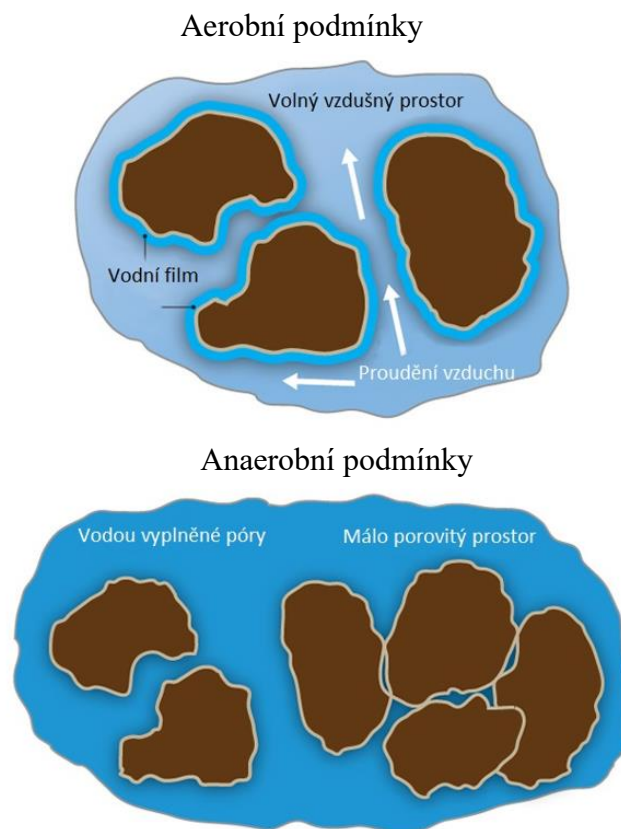
V termofilní podfázi teplota většinou rychle roste až k 70 °C. Takto vysoká teplota zajišťuje eliminaci patogenních mikroorganismů a semen plevelů. Protože v této fázi dochází k největší mikrobiální aktivitě ze všech fází, je třeba zajišťovat dostatek kyslíku, dokud většina uhlíkového zdroje není degradována. Délka této fáze závisí na typu substrátů, velikosti kompostu a podmínkách prostředí. Zbylý materiál degraduje daleko pomaleji a dochází k útlumu mikrobiální aktivity, a tedy také ke snížení teploty [26].

Jak teplota klesá, mezofilní organismy opět kolonizují kompost a kompost přechází do fáze dozrávání. S úbytkem látek, které mohou být degradovány klesá náročnost na množství přítomného kyslíku. Organický materiál se dále rozkládá a je přeměňován na stabilní huminové látky, přičemž potenciální toxické organické kyseliny jsou odstraněny v této fázi [32]. Při značné počáteční nezralosti kompostu tato fáze může být delší, přičemž počáteční nezralost kompostu může nastat z důvodu nedostatku přítomného kyslíku při aktivní fázi, nedostatku nebo naopak přebytku vlhkosti. Nezralý kompost může obsahovat vysoký obsah organických kyselin, extrémní hodnoty pH, vysoký obsah soli a vysoký poměr C:N, kde toto všechno může poškodit, či usmrtit rostliny, pokud by byl kompost použit k hnojení půdy [26].

### **2.3.2 Půda**

Půda, to je prostředí, které je v podstatě všude okolo nás. V půdě dochází také jako v kompostu k degradaci organického uhlíku až na oxid uhličitý, popřípadě metan a další produkty. Z pohledu klíčových vlastností, jako je především teplota, půda nedosahuje takových vysokých teplot jako kompost, což určuje jiná mikrobiální složení konsorcia v půdě. Taktéž nebývá tak aerována jako kompost, a to může zapříčinit, že dochází k anaerobní degradaci ve větší míře, než je tomu v kompostu (viz Obrázek 5).





*Obrázek 5: Aerobní a anaerobní podmínky [33]*

Tyto rozdílné vlastnosti mají vliv na degradaci různých polymerů. Tak se může stát, že polymery jako například PLA budou degradovány daleko pomaleji než v jiných prostředích, protože bude docházet především k degradaci abiotické, později i k pomalejší degradaci mikroorganismy.

### 2.3.3 Normy pro posouzení biodegradačních procesů

Normy pro charakterizaci biodegradačních procesů můžeme rozdělit podle různých kritérií, jako jsou aerobní/anaerobní podmínky, různé pracovní teploty ovlivňující mikrobiální složení na mezofilní (okolo 25 °C) a termofilní (okolo 58 °C). Také je můžeme členit dle způsobu, jakým byla měřena míra degradace, kde obrázek 7 nabízí přehled o nejpoužívanějších metodikách k měření degradace materiálu, rozdělených do čtyř hlavních skupin a v neposlední řadě v jakém velikostním měřítku test probíhal [34].

Ve většině norem zabývajících se kompostem, půdou, či jiným prostředím pro testování biodegradability materiálů, se řeší dvě zásadní kritéria, která mohou být v rámci různých norem upravována nebo potvrzována dalšími ukazateli [35]. První z kritérií je stupeň

degradace (obvykle definována jako hmotnostní ztráta) testovaných materiálů, která by měla dosáhnout aspoň 90 %. Doba trvání testu se odvíjí podle použité metody a daných podmínek. Při dosažení aspoň 60 % se pohlíží na tento materiál jako na potenciálně biodegradabilní [35, 36]. Druhé kritérium se zabývá vlivem degradovaných materiálů na prostředí, jestli nějakým způsobem ovlivňují ekologii, biologické procesy a fyzikální zrání prostředí [34–36].

### ***2.3.3.1 Normy kompostování za aerobních podmínek***

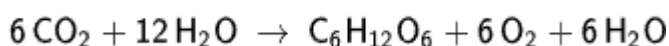
Mezi nejznámější normy zabývající se kompostováním za aerobních podmínek v laboratorním měřítku jsou normy ISO 20200 (viz [37]) a ISO 14855 (viz [38, 39]), popřípadě norma ISO 16929 (viz [40]) podobná podmínkám normě ISO 20200, ale je koncipována pro pilotní měřítko [34, 35]. ISO 20200 zkoumá stupeň rozpadu materiálu v kompostu v laboratorních kontrolovaných podmínkách za termofilních teplot  $58 \pm 2$  °C po minimální dobu 45 dnů až maximálně 90 dnů, respektive se může test prodloužit o dalších 45 až 90 dnů za mezofilních teplot  $25 \pm 2$  °C (při pokojové teplotě), pokud nedošlo k dostatečnému rozpadu. Norma popisuje diagnostické parametry použitelné k hodnocení míry rozkladu (případně kompostovatelnosti) plastů. Mezi tyto parametry patří pach kompostu, jeho vzhled, stanovení pH, poměr C/N, stanovení těkavých látek, stanovení hmotnostního úbytku sušiny kompostu a stanovení hmotnostního úbytku polymeru [37]. ISO 14855 je metodou zaměřující se na stanovení finální aerobní biodegradace a stupeň rozpadu plastů za kontrolovaných laboratorních podmínek, kdy by se teplota měla pohybovat kolem 58 °C po dobu nepřesahující 6 měsíců. Norma má dvě části, kdy první část obecně popisuje postup kompostování a stanovením uvolněného CO<sub>2</sub>, druhá se zabývá gravimetrickým stanovením uvolněného CO<sub>2</sub>. Díky této metodě lze zjistit procentuální konverzi organického uhlíku na uvolněný oxid uhličitý [38, 39].

### ***2.3.3.2 Normy anaerobní biodegradace***

Norma EN 13432 se zabývá kompostovatelností a anaerobní zpracovatelností plastových obalových materiálů pomocí čtyř charakteristik, mezi které patří rozpad materiálu neboli fragmentace, odbourání během biologického procesu na CO<sub>2</sub>, vliv na probíhající biologický proces a vliv na kvalitu výsledného kompostu. Norma pohlíží jinak na podmínky pro domácí kompostování a pro kompostování industriální [41].

## 2.4 Rostliny

Rostliny jsou povětšinou fotosyntetická eukaryota. Vyšší rostliny jsou mnohobuněčné organismy obsahující tkáně diferenciovaných buněk. Tyto zelené organismy získávají energii ze slunečního záření pomocí fotosyntézy, složitého biochemického procesu, jehož produkty jsou energie formou makroergních přenašečů, voda a molekulární kyslík. Během tohoto procesu dochází k fixaci vzdušného oxidu uhličitého do řetězce cukrů, které jsou produkty tzv. Calvinova cyklu (temnostní fáze fotosyntézy). Vzniklé cukry jsou rostlinou dále využívány pro katabolické i anabolické účely (sumární rovnice viz Obrázek 6) [42].



*Obrázek 6: Celková rovnice fotosyntézy [43]*

Co se týče nutrientů důležitých pro život rostliny, tak ty rostliny získávají především z půdy. Jedná se zejména o vodu, sloučeniny dusíku, fosfor, draslík, hořčík a další minoritní nutrienty, které závisí na konkrétních potřebách rostliny. A většina také potřebuje kyslík důležitý pro respiraci [44].

### 2.4.1 Růst rostlin

Rostliny mohou být limitovány v růstu nejen živinami, ale také okolními faktory jako je teplota a světlo, popřípadě znečištění prostředí fytotoxiny. Tyto faktory ovlivňují rychlost růstu rostlin.

#### 2.4.1.1 Fytotoxické látky

Fytotoxiny jsou jedovaté až toxické pro rostliny, což znamená že omezují až zastavují růst rostlin. Fytotoxické látky mohou být připraveny uměle, jako herbicidy, mohou vznikat v rostlinách nebo mikroorganismech, popřípadě vznikat přirozenou chemickou reakcí [45]. Také se tento pojem může používat k popisu toxických chemických látek produkovaných rostlinami. Většinou se jedná o látky používané k ochraně před predátory, často to jsou produkty sekundárního metabolismu jako jsou alkaloidy, terpeny, či fenolické látky [46]. V této diplomové práci bude použit pojem fytotoxická látka jako látka toxická pro rostliny, jenž může být potenciálně i toxická pro lidi [47].

#### **2.4.1.2 Rostliny používané pro testy fytotoxicity**

Každý druh rostliny je jinak náchylný vůči různým limitujícím faktorům. V případě této diplomové práce nás zajímají jakékoliv fytotoxické látky přítomné v bioplastech, které by mohly zastavit, popřípadě omezit růst rostlin. Pro testování fytotoxicity se využívá test klíčivosti, kdy se nechají klíčit semena rostlin ve zkoumaném prostředí. Po určité době se stanovuje, kolik z nich vyklíčilo a jak moc vyrostly kořeny, listy a stonek. Tyto hodnoty se poté porovnávají se semeny, která klíčila v kontrolním prostředí [48]. Nejčastější použitá semena pro test klíčivosti jsou: locika setá (*Lactuca sativa*), řeřicha setá (*Lepidium sativum*), rajče jedlé (*Solanum lycopersicum*) a pekingské zelí (*Brassica rapa*). Tato semena se využívají, protože jsou citlivá na fytotoxické látky a jsou schopná rychlého růstu [49].

### **2.5 Současný stav řešení problematiky**

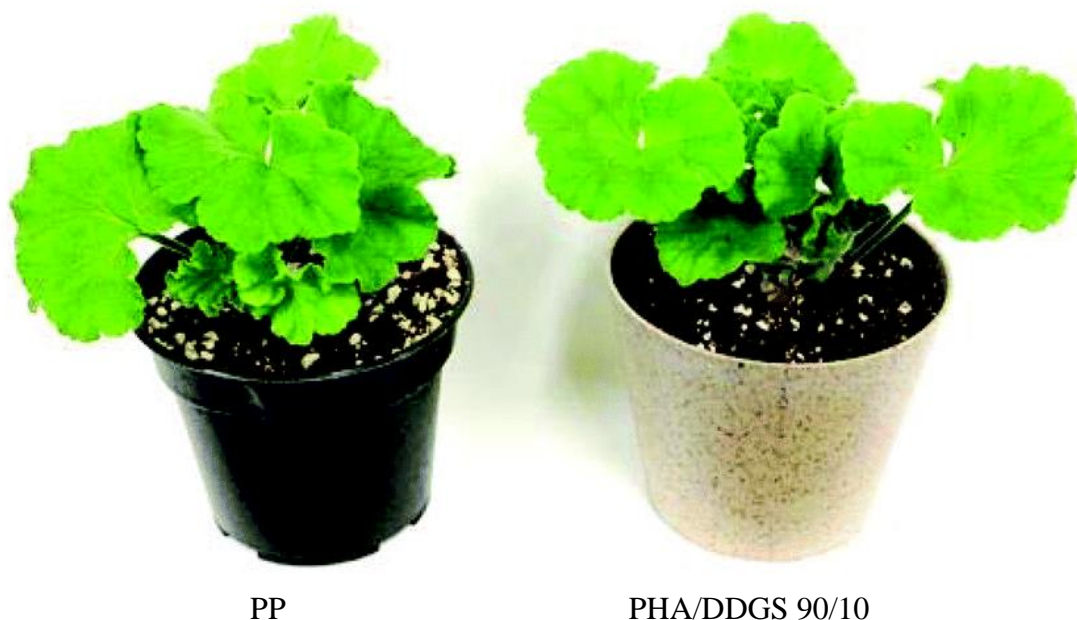
V dnešní době se používají různé normy pro kompostovací testy. Jak bylo řečeno dříve, mezi často používané normy patří ISO 20200 (viz [37]) a ISO 14855 (viz [38, 39]). Tyto normy popisují, za jakých podmínek by měly testy probíhat a způsoby stanovení samotného stupně rozkladu daného materiálu. Mimo tyto normy se také sleduje, jaký vliv má rozklad materiálu na výsledný kompost či půdu. Stupeň rozkladu se zjišťuje pomocí zachytávání uvolněného oxidu uhličitého, stanovení hmotnostního úbytku pomocí gravimetrie, či pomocí spektrometrických metod [35].

Testy kompostovatelnosti se především zaměřují na rozklad zkoumaných materiálů, přičemž se zkoumají homopolymery, kopolymery i kompozity. Je zkoumáno, jak rozklad urychlit pomocí změny podmínek nebo přidáním aditiv, které by mohly navíc zlepšit vlastnosti materiálů. V poslední době se objevují práce, které po skončení kompostování provádí testy ekotoxicity a klíčivosti semen s použitím kompostu, ve kterém byly zkoumané materiály rozkládány (viz například [48, 50]).

Experiment s kompostováním směsi PLA a PHA vedla Arrieta a kol. (viz [51]) dle normy ISO-20200. Vzorky v tenkém filmu byly tvořené PLA a plastifikátory, popřípadě směsí PLA, PHA a plastifikátory. Čisté PLA bylo použito jako kontrolní vzorek. Všechny vzorky vykazovaly ztrátu hmotnosti vyšší než 90 % po 28 dnech inkubace, což naznačuje kompostovatelnost všech těchto vzorků. Schopnost PHB působit jako nukleační činidlo ve směsi s PLA zpomalovalo rozpad této směsi, zatímco plastifikátory rozpad

zrychlovaly. Přítomnost změkčovadel podporovala povrchovou hydrolyzu vedoucí ke ztrátě mechanických vlastností, což také usnadňovalo rozpad [51].

Biodegradaci PHA a kompozitů PHA s 10 % sušených lihovarnických výpalků (DDGS) zkoumali Madbouly a kol. (viz [52]). Test probíhal za anaerobních podmínek, kdy testované polymery byly umístěny do nerozložitelného síťového sáčku a poté zahrabány 10 cm pod povrch půdy. Teplota v průběhu experimentu byla 21,1 °C, půda byla rovnoměrně zavlažována jednou týdně 2,5 cm<sup>3</sup> vody a test probíhal po dobu 24 týdnů, kdy co 4 týdny byl vytáhnut vzorek pro změření změn vlastností polymerů. Vzorky byly ještě testovány na fytotoxicitu před a po degradaci v půdě, kdy polymery byly namlety na částice menší než 1 milimetr a smíchány s půdou v množství 1000 až 10000 ppm hmotnosti a jako kultivační rostlina bylo použito rajče (*Solanum lycopersicum L.*). Vyhodnocovalo se vzejití sazenic, jejich výška a vizuální známky zastavení růstu, změny barvy, či jiných abnormalit. Testy fytotoxicity neprokázaly žádné negativní účinky jak PHA, tak kompozitního materiálu PHA/DDGS 90/10 pro klíčení semen nebo jejich růstu, a proto jsou vhodné i jako květináče místo komerčních plastových nádob (viz Obrázek 7). Navíc přidání DDGS k PHA může snížit náklady na cenu materiálu, zvýšit biologickou rozložitelnost a zlepšit mechanické vlastnosti PHA [52].



Obrázek 7: Testovací rostlina rostoucí vlevo v polypropylenové nádobě a vpravo v nádobě zkompozitu polyhydroxyalkanoátu (PHA) a sušených lihovarnických výpalků (DDGS) v poměru 90/10 [52]

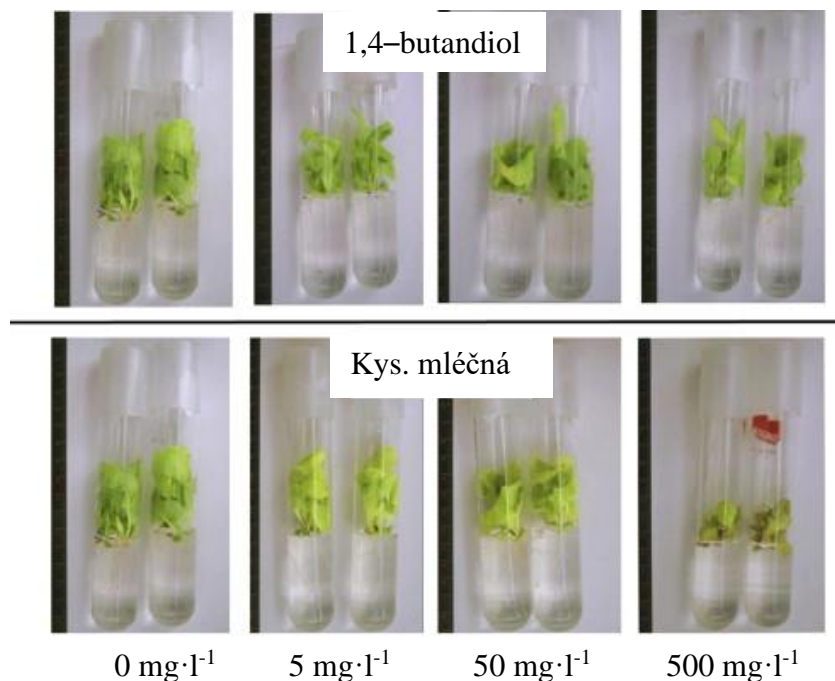
Arcos-Hernandez a spol. (viz [50]) zkoumali kopolymer PHBV s obsahem HV mezi 12 mol. % až 72 mol. %. Tyto kopolymery byly produkovány mikroorganismy z aktivovaného kalu neboli smíšenou kulturou, která využívala odpadní syrovátku. Jako kontrolní vzorek byla použita celulóza a podle normy ASTM D 5988-03 byla hodnocena biodegradabilita. Pomocí upraveného Hillova modelu bylo očekáváno, že všechny testované kopolymery PHBV dosáhnou 90 % biodegrace po 10,7 až 22,2 měsících. Přestože neexistovala jasná korelace mezi morfologií polymeru a celkovou rychlostí jeho degradace, je zřejmé, že morfologie ovlivnila mechanismus degradace. Test klíčivosti semen řeřichy (*Lepidium sativum*) neodhalil viditelné fyto toxické účinky jako důsledek biodegradační aktivity filmu [50].

Biodegradabilitu PHA v tropických půdách zkoumali Boyandin a kol. (viz [53]). Konkrétně byl zkoumán homopolymer PHB a kopolymer PHVB ve formě tenkého filmu a pelet. Experimenty byly prováděny za přírodních podmínek, kdy se nechaly volně v půdě na Klimatických testovacích stanicích (CTS) rusko-vietnamského výzkumného a testovacího centra ve Vietnamu. Výsledky ukázaly, že se homopolymer PHB rozkládal rychleji než kopolymer PHVB. Forma mezi různými polymery nehrála roli, ale tenké filmy se v rámci stejného polymeru rozkládaly rychleji než pelety, protože mají větší aktivní povrch oproti peletám. Za zmínku taky stojí, že kontrolní PE ve formě filmu se za celou dobu nezměnil. Rentgenová strukturní analýza ukázala mírné zvýšení stupně krystalinity u všech vzorků PHA, tento efekt naznačuje preferenci degradace amorfní formy PHA půdní mikroflórou v tropických podmínkách [53].

Bandini a spol. (viz [54]) se zabývali biodegradovatelnými polymery v průmyslových podmínkách pro anaerobní digesci a aerobní kompostování potravinového odpadu. Měřili se dva polymery, a to Starch based bioplastics (SBB), což je bioplast na bázi škrobu, který pocházel z pytlů na organický odpad a PLA, což je polymer synteticky vyrobený z kyseliny mléčné, která byla z kompostovatelných lahví na vodu. Jako pozitivní kontrolní vzorek byl použit celulózový filtrační papír a jako negativní nerozložitelná kontrola byl použit nízko-hustotní polyethylenový film z běžných obalů. Všechny materiály byly nastříhány na stejnou velikost a podrobeny stejným podmínkám. Nejprve byly podrobeny anaerobní digesci bez přístupu vzduchu za zvýšené teploty na 55 °C po dobu 23 dní. A poté následovalo odstranění tekutých složek a přidání lignocelulózových komponent ke zbytku a následně tato směs byla zahřívána na 65 °C po

dobu 21 dnů. Následně prováděli testy klíčivosti s hlávkovým salátem (*Lactuca sativa* cv. *Trocadero*) a rajčetem (*Lycopersicon esculentum* cv. *Tres Cantos*). Výsledky ukazují vliv PLA na snížení klíčivosti těchto semen v důsledku snížení pH okolí. Polymer SBB negativní vliv na klíčivost neměl [54].

Martin-Closas a kol. (viz [48]) cílili na vytvoření *in vitro* kontrolovaného systému pro testování ekotoxicity, která by odhalila dostávání toxických látek do půdy biodegradací bioplastů. Zkoumali vliv různých koncentrací kyseliny jantarové, adipové, mléčné a 1,4-butandiolu na půdu pomocí testu klíčivosti a srovnávali je s kontrolními vzorky rostlin v pozdějším vývoji (viz Obrázek 8). Přestože klíčivost nebyla ve většině případů ovlivněna, signifikantní účinky se projeví později při pozorování kořene, výhonků a listů, kdy kořeny byly citlivější než výhonky a kořínky. Výsledky u hlávkového salátu (*Lactuca sativa* cv. *Trocadero*) a rajčete (*Lycopersicon esculentum* cv. *Tres Cantos*) se podstatně nelišily, ale indikují potřebu testovat přesné cílové druhy. Testy ukázaly, že kyselina adipová inhibuje růst, kyselina jantarová neměla žádný efekt, 1,4-butandiol do určité míry růst zvýšil a kyselina mléčná vyžaduje podrobnější výzkum. Prolin jako rostlinný metabolit, který se zvyšuje za nedostatku vody, se jeví jako možný marker pro ekotoxicitu [48].



Obrázek 8: Salátové sazenice po 28 dnech kultivace s různými koncentracemi 1,4-butandiolu a kyseliny mléčné [48]

Tato diplomová práce navazuje a prohlubuje výzkum diplomových prací Ing. Terezy Hollé [55] a Ing. Juraje Vodičky [56], kteří zkoumali rozklad polyesteru kyseliny mléčné (PLA) a polyhydroxybutyrátu (PHB), a dopad jejich rozkladu na prostředí kompostu. V této práci se využívá jejich zkušeností a postupů při přípravě testu kompostovatelnosti. Práce má za cíl prohloubit dosavadní výsledky přidat jednoduchý test klíčivosti semen vybraných druhů rostlin, a popřípadě použití testu pro měření ekotoxicity.



## **3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **3.1 Použité materiály**

#### **3.1.1 Suroviny a polymery použité na kompostování**

- Hobliny pro hlodavce (Limara)
- Králičí krmivo (Apetit BF granule, složení viz příloha (kapitola 8.2))
- Zralý kompost rostlinného původu (Kompostárna Fertia Blansko)
- Kukuřičný škrob (Amylon)
- Kukuřičný olej (Olitalia)
- Močovina, p.a. (Sigma-Aldrich)
- Sacharóza, p.a. (Lach-ner)
- Polyhydroxybutyrát – granule, Biomer® P310 (Biomer)
- Polylaktát, amorfní – granule, Ingeo™ Biopolymer 4060D (NatureWorks)
- Polylaktát, semi-krytalický – granule, Ingeo™ Biopolymer 4043D (NatureWorks)
- Chloroform stabilizovaný amylenem

#### **3.1.2 Použité přístroje**

- Váhy (Denver instrument S-4002)
- Vibrační prosévací přístroj, síto s velikostí ok 4 mm (HAVER EML 200 digitalT)
- Biologický inkubátor (BINDER BD 115)
- Vlhkoměr (značku si zjistíme)
- Plastové dózy pro kompost a půdu 3 l, rozměry 19,5×30×7,5 cm (Tontarelli)
- Běžné laboratorní vybavení a sklo
- Kopeckého válečky
- Led lampa (VIPARSPECTRA P2000 200W)
- Rozprašovací zařízení (Polaron)
- Elektronový mikroskop (ZEISS EVO LS 10)

### **3.2 Pracovní postupy**

#### **3.2.1 Použitý postup pro biodegradaci polymerů v prostředí kompostu**

Parametry pro kompostování byly převzaty z normy IS/ISO 20200. Bylo vedeno 8 oddělených kompostů, kdy 2 z nich obsahovaly granule polyhydroxybutyrátu,

2 semi-krystalický polylaktát, další 2 amorfni polylaktát a poslední 2 byly bez polymerů a sloužily jako blank. Podle Tabulka 1 byla namíchána směs pro kompostování.

*Tabulka 1: Složení suché kompostovací směsi*

Komponenta	Hmotnostní zastoupení [%]
Dřevěné piliny	40
Krmivo pro králíky	30
Zralý kompost	10
Kukuřičný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuřičný olej	4
Močovina	1

Králíčí krmivo ve formě granulí bylo nadrceno a poté přeseto přes síto s průměrem 4 mm. Bylo vyvrtáno 6 aeračních děr o průměru 5 mm do každého víka plastové dózy. Všechny suché složky kompostovací směsi byly smíchány dohromady a následně zality destilovanou vodou, aby vlhkost celé směsi činila 55 % (hmotnostních). Takto připravený kompost byl rozdělen na 8 částí do 8 dóz, kdy pevná část vážila 250 g na dózu a voda 305,6 g. Kompostovací dózy byly umístěny do inkubátoru, který byl temperován na 58 °C. Pozice patra dóz byla měněna jednou týdně a pozice v rámci jednoho patra byla měněna pokaždé, co byla prováděna nějaká operace s nimi (míchání, zalívání). Petriho misky s destilovanou vodou byly umístěny na dno inkubátoru a pravidelně doplňovány, aby sloužily jako odparníky.

Zatížení kompostu polymerem činilo 20 g na 250 g kompost, což je 8% zatížení. Tedy větší zatížení, než navrhuje sama norma IS/ISO 20200 a to z toho důvodu, že tento experiment by měl sloužit jako simulace prostředí industriální kompostárny v situaci, kdy bude kompost bioplasty „přetížen“. Polymer byl navážen na 2 desetinná místa a poté volně rozsypán do jednotlivých dóz. Test probíhal 14 týdnů za teploty 58 °C. Poté se teplota snížila na 25 °C na dva týdny. Pak do konce testu, což byly 2 týdny, se vyndal

z inkubátoru a nechal stát při laboratorní teplotě. Teplota se snížila tak, aby kompost mohl dozrát. Test byl prováděn podle Tabulka 2.

*Tabulka 2: Časový harmonogram operací při kompostování*

<b>Číslo dne</b>	<b>Operace</b>
0	Založení kompostu, zalití destilovanou vodou a promíchání
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Přídavek destilované vody, promíchání
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Zvlhčení destilovanou vodou
30-98	Zvlhčení destilovanou vodou dvakrát týdně, promíchání jednou za dva týdny
98-126	Zvlhčení destilovanou vodou podle potřeby, promíchání jednou za dva týdny

### **3.2.2 Použitý postup pro biodegradaci polymerů v prostředí půdy**

Opět bylo vedeno 8 oddělených dóz s půdou, kdy 2 z nich obsahovaly granule polyhydroxybutyrátu, 2 semi-krytalický polylaktát, další 2 amorfni polylaktát a poslední 2 byly bez polymerů a sloužily jako blank.

Půda pro tento experiment byla získána z pole v Soběšovicích. Velikost pole je 3x10 m, kdy pole bylo pomyslně rozděleno na 10 částí a z každé části byl odebrán reprezentativní díl půdy.

Poté byla půda přeseta na vibračním prosévacím přístroji, kdy velikost ok činila 4 mm. Následně byla změřena objemová vlhkost půdy pomocí ručního vlhkoměru. Do každé dózy bylo nasypáno 650 g půdy a poté zalito 30 ml destilované vody. Pozice patra dóz byla měněna jednou týdně a pozice v rámci jednoho patra byla měněna pokaždé, co byla prováděna nějaká operace s nimi (míchání, zalívání). Petriho misky s destilovanou vodou byly umístěné na dno inkubátoru a pravidelně doplňovány, jakožto odparníky. Test byl prováděn podle Tabulka 3.

*Tabulka 3: Časový harmonogram operací při experimentu s půdou*

<b>Číslo dne</b>	<b>Operace</b>
0	Založení experimentu s půdou, zalití destilovanou vodou a promíchání
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Přídavek destilované vody podle potřeby, promíchání

Navážka polymeru činila 20 g na dózu, kdy tyto polymery byly rozděleny na 10 částí a umístěny do pytlíků ze síťového materiálu monofilu s velikostí ok 250  $\mu\text{m}$ . Pytlíky po navážení polymeru na dvě desetinná místa byly uzavřeny sešitím jednotlivých stran a také kromě polymeru obsahovaly ještě laminový papírek s číselným označením vzorku. Poté byly pytlíky položeny na spodek dózy a překryty půdou. Experiment trval 8 týdnů při temperované teplotě 25 °C. Jednou týdně byl odebrán jeden pytlík pro analýzu hmotnostního úbytku. Dózy s půdou po založení experimentu jsou vidět na Obrázek 9.



Obrázek 9: Prostředí půdy s polymery (převrstveny půdou) v době založení experimentu

### **3.2.2.1 Sledování změn povrchu polymerů pomocí SEM**

Vzorky z nultého, čtvrtého a osmého týdne experimentu degradace v prostředí půdy byly vybrány pro tuto analýzu. Malá část z každého vzorku byla připevněna na matrici pomocí uhlíkové pásky a poté potažena zlatem v rozprašovacím zařízení. Pozorování byla provedena zachytáváním sekundárních elektronů pomocí detektoru rastrového elektronového mikroskopu. Urychlovací napětí činilo 5kV.

### **3.2.3 Stanovení maximální vodní kapacity pomocí Kopeckého válečku**

Kopeckého váleček byl naplněný až po okraj půdou a položený na Petriho misku byl umístěn do skleněné vaničky, která byla poté naplněna do poloviny výšky Kopeckého válečku destilovanou vodou. Po dvaceti čtyř hodinách byl váleček z vaničky vyjmut a

položen na filtrační papír, kde se nechal odstát další dvě hodiny. Po uplynutí této doby byl váleček uzavřen a zvážen. Díky tomuto měření bylo zjištěno, jakou maximální kapacitu vody je půda schopna udržet. Tento údaj, konkrétně 70 % hodnota z něj, byla dále používána při růstových testech (viz 3.2.5), aby nedocházelo k přebytečnému zalévání rostlin. Maximální vodní kapacita na 100 g byla spočítána pomocí Rovnice 1, poté byla pře počítána na 70 %.

*Rovnice 1: Výpočet maximální vodní kapacity na 100 g půdy*

$$m_{vc} = \frac{(m_{H_2O} - m_v) \cdot 100}{m_H - m_v}$$

kde  $m_H$  je hmotnost kopeckého válečku s půdou,  $m_v$  je hmotnost kopeckého válečku,  $m_{H_2O}$  je hmotnost kopeckého válečku s absorbovanou a udržanou vodou a konstanta 100 je použita pro převod na 100 g půdy.

### 3.2.4 Test klíčivosti

Test klíčivosti byl proveden podle dvou mírně lišících se postupů. V obou případech probíhal v Petriho miskách. V prvním testu byly jako substráty oužity 4 testované vzorky kompostů využitě pro růstový test (viz příprava v odstavci 3.2.5). Jako negativní kontrola byla použita vata s destilovanou vodou, komerčně dostupný kompost a půda použitá pro růstový test. Všechny vzorky byly testovány v triplicátech. Petriho misky se substráty byly poté zality destilovanou vodou a na zalitý substrát bylo položeno 10 semínek salátu hlávkového (*Lactuca sativa* cv. *Trocadero*). Misky byly inkubovány ve tmě při teplotě 25 °C po dobu 4 dnů. Ve druhém testu byly použity extrakty kompostů a extrakt z komerčního kompostu a destilovaná voda jako negativní kontrola. Extrakty byly připraveny inkubací kompostův destilované vodě v hmotnostním poměru 1:2,5 po dobu 1 h při laboratorní teplotě a za neustálého třepání na orbitální třepače. Následně byla směs centrifugována při 6000 rpm po dobu 10 minut. Extrakt byl aplikován na lehce vlhčenou vatu (destilovanou vodou) Petriho miskách. Druhý test byl prováděn po dobu 6 dnů za kontrolovaných světelných podmínek – střídavě 12 h světla (LED lampa) a 12 h tmy. Po naklíčení semen byl stanoven počet klíčků v každé misce, následně byly měřeny délka kořene (od špičky k uzlu) a délka stonku (od uzlu k hypokotylu – děložním listům). Výsledky byly porovnány mezi sebou pomocí analýzy Kruskal-Wallis ANOVA a mediánového testu využitím programu STATISTICA®, hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### 3.2.5 Růstový test

Pro růstový test byl použit hlávkový salát (*Lactuca sativa cv. Trocadero*). Semínka salátu byla předem naklíčena v půdě při 20 °C po dobu 4 dnů za kontrolovaných světelných podmínek – střídavě 12 h světla (LED lampa) a 12 h tmy. Květináče použity pro růstový test byly velikosti 10x10x8 cm. Samotný test také probíhal za kontrolovaných světelných podmínek, kdy světelná fáze (12 hodin) byla zajištěna lampou s intenzitou svítivosti přibližně 1200 luxů. Substráty pro růstový test byly složeny z 4 kompostů (viz odstavec 3.1.3) a komerčního kompostu, kdy jednotlivé substráty byly připraveny smícháním příslušného kompostu s půdou v poměru 1:3. Jako kontrolní substrát byla použita čistá půda. Vláha substrátu byla držena na 70 % maximální vodní kapacity půdy, která byla vypočítána podle rovnice č.1. a byla doplňována třikrát týdně. Zároveň byla kontrolována teplota a eventuálně udržována mezi 21 a 25 °C. Test probíhal po dobu 4 týdnů a poté byla rostlinám změřena délka kořene (od špičky k uzlu), délka stonku rostliny (od uzlu k poslednímu dvojlistí), počet listů a jejich délka, váha rostliny a množství chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a karotenoidů v listech. Množství chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů bylo získáno pomocí Rovnice 2, Rovnice 3 a Rovnice 4. Absorbance potřebné pro tyto rovnice byly naměřeny z roztoků získaných extrakcí barviva z rozetřených listů rostlin pomocí acetonu.

*Rovnice 2: Výpočet množství chlorofylu a*

$$Chl_a = 12,21 \cdot \lambda_{663} - 2,81 \cdot \lambda_{646}$$

kde  $\lambda_{663}$  je absorbance roztoku při vlnové délce 663 nm, respektive při 646 nm pro  $\lambda_{646}$ .

*Rovnice 3: Výpočet chlorofylu b*

$$Chl_b = 20,13 \cdot \lambda_{646} - 5,03 \cdot \lambda_{663}$$

*Rovnice 4: Výpočet karotenoidů*

$$C_x + c = \frac{(1000 \cdot \lambda_{470} - 3,27 \cdot Chl_a - 104 \cdot Chl_b)}{198}$$

kde  $\lambda_{470}$  je absorbance roztoku při vlnové délce 470 nm a  $Chl_{a, b}$  je vypočítané množství chlorofylu *a*, respektive *b*. Výsledky byly porovnány pomocí analýzy rozptylu (ANOVA), analýzy Kruskal-Wallis ANOVA a mediánového testu využitím programu STATISTICA<sup>®</sup>, hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .

### 3.2.5.1 Analýza biodiverzity kompostu pomocí Biolog EcoPlates™

Destička obsahuje 31 uhlíkových zdrojů a jednu negativní kontrolu (voda) v triplikátu. Zdroje se skládají z aminokyselin, aminů, uhlovodíků, karboxylových kyselin, fenolových sloučenin a polymerů. Jednotlivé uhlíkové zdroje jsou vypsány v příloze viz tabulka č. 5. Jako indikátor růstu mikroorganismů na uhlíkových zdrojích slouží fialové zbarvení, které vzniká redukcí tetrazoliového barviva při respiraci mikroorganismů.

Pro extrakci mikroorganismů byla připravena směs z 3 g substrátu (kompostu a půdy) a 50 ml 0,85% roztoku NaCl, který byl poté inkubován 20 minut při teplotě 30 °C za stálého třepání při 180 rpm. Poté byla směs dekantována po dobu 10 minut. Do každé jamky destičky bylo napipetováno 25 µl supernatantu a 125 µl 0,85% roztoku NaCl. Následně byly destičky umístěny do inkubátoru, kde byly inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 168 hodin. Míra zbarvení jamek byla měřena pomocí spektrofotometrického měření absorbance při vlnové délce 590 nm na ELISA readeru. První měření se uskutečnilo po 48 hodinách, každé další bylo měřeno po 24 hodinách až do 168 hodin.

Pomocí normalizovaných hodnot průměrného vývoje barvy jamky (AWCD) byla sledována míra utilizace substrátů mikroorganismy. Rovnice 5 popisuje výpočet AWCD.

$$AWDC = \sum \frac{(\lambda_i - \lambda_0)}{31}$$

*Rovnice 5: Výpočet průměrného vývoje barev*

kde  $\lambda_i$  je absorbance každé jamky,  $\lambda_0$  je nejnižší absorbance v destičce a číslo 31 je počet jamek (se substráty) jedné sady.

Dalším výpočtem byl Shannonův index biodiverzity  $H'$ , vypočítaný podle Rovnice 6, respektive Rovnice 7. Index slouží pro vyjádření vyrovnanosti mikroorganismů společenstva.

$$H' = - \sum_{i=1}^s p_i \cdot \ln(p_i)$$

*Rovnice 6: Výpočet Shannonova indexu diverzity*

kde

$$p_i = \frac{\lambda_i}{\sum \lambda_i}$$

*Rovnice 7: Výpočet proměnné  $p_i$*

kde  $\lambda_i$  je absorbance dané jamky v sadě a  $\sum \lambda_i$  označuje sumu všech absorbancí v dané sadě.

Pro zjištění obecné biologické odlišnosti sledovaných kompostů a půdy byla použita analýza hlavních komponent (PCA), která byla vypracována z hodnot AWCD pro 168 hodin inkubace. Analýza byla zpracovaná pomocí softwaru STATISTICA<sup>®</sup>, hladina významnosti  $\alpha = 0,05$ .



## **4 VÝSLEDKY A DISKUZE**

### **4.1 Biodegradace polymerů v prostředí kompostu**

Komposty obohacené o různé polymery byly sloužily s kombinací s půdou jako substrátů pro pěstování salátů ke zjištění možné toxicity z degradovaných polymerů. Experiment probíhal podle upravené normy ISO 20200, kdy se blížil industriálnímu kompostování. Také byl využit pro porovnání s testem degradace polymerů v prostředí půdy, pro potvrzení předpokladu, že polymery za podmínek industriálního kompostování budou degradovány rychleji než v přirozeném prostředí půdy. To by mohlo přispět k potvrzení obecně akceptované hypotézy, že degradace pomocí kompostování by byla vhodnější metodou zpracování biopolyesterů než ukládání na skládky, kde bude proces dekompozice materiálu pomalý.

#### **4.1.1 Změny kompostu během testu**

Kompostovací test probíhal přes 20 týdnů, kdy prošel teplotami od 58 °C po 20 °C. Taktéž prošel různými fázemi, z počátku byl spíše světlejší a čím déle test probíhal, tím tmavší byly i jednotlivé komposty. Některé změny byly viditelné i pouhým okem, kdy opakovaně došlo k plesnivění substrátu, jak můžeme vidět na Obrázek 10.



*Obrázek 10: Na levé straně jsou komposty se semikrystalickým PLA a vpravo komposty bez polymerů*

Vůně měla povětšinu času neutrální charakter, což značilo dostatečnou vlhkost a aeraci kompostu. Pomocí mikroorganismů byl objem kompostu poměrně zredukován, avšak kompost přesto ještě nedošel k úplné zralosti, což bylo patrné z konzistence kompostů. Vyžrálý kompost může být poznán podle toho, že má drobtovitou strukturu, takže jeho jednotlivé složky nejsou rozeznatelné pouhým okem. Nezapáchá, ale může příjemně vonět jako lesní půda a má hnědou až tmavě hnědou barvu.

#### ***4.1.1.1 Změny polymerů v kompostu***

Kompostovací test a degradace polymerů v něm proběhla podle předpokladů a výsledků přechodných prací [55, 56]. Kdy amorfní PLA bylo úplně degradováno, semikrystalické PLA podlešlo změně molekulární hmotnosti, a přestože drželo tvar, tak při tlaku podléhalo deformaci a PHB viditelně ubylo.

#### **4.1.2 Analýza biodiverzity kompostu**

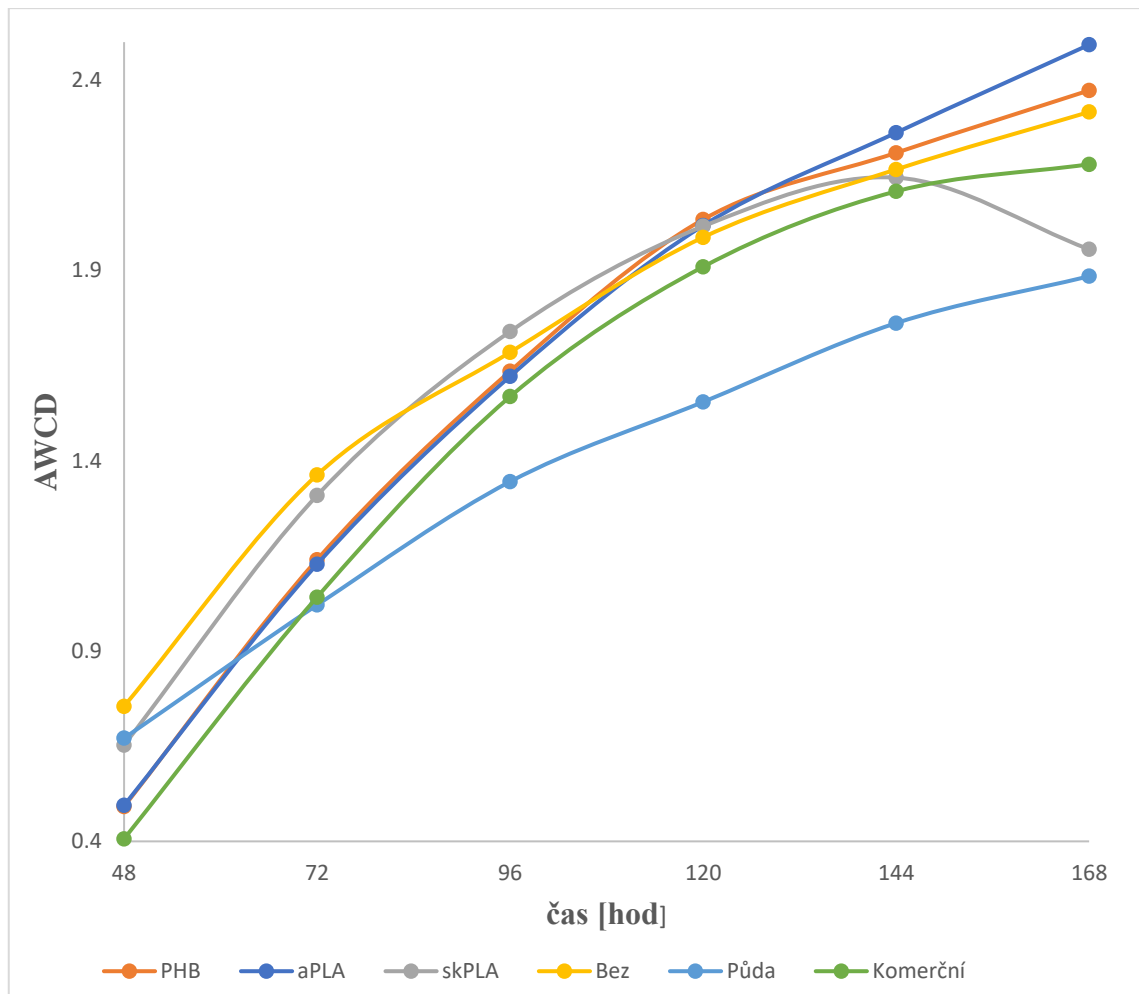
Mikrobiální rozmanitost kompostů byla posouzena pomocí mikrotitračních destiček BIOLOG EcoPlates™. Každé konsorcium bakterií má specifickou sadu zdrojů uhlíků,

kteře můžou (nebo nemůžou) být použity pro zisk energie. Tyto destičky využívají tohoto principu pro charakterizaci a klasifikaci heterotrofních mikrobiálních společenství. Jsou používány pro analýzu mikrobiálního společenství v půdě, vodě, kompostu a dalších prostředích, a to proto, že jsou schopné odhalit časové a prostorové změny mikrobiálních komunit [57].

Cílem uvedeného experimentu bylo odhalit, zda polymery, které degradovaly v jednotlivých kompostech ovlivnily mikrobiální společenství, případně do jaké míry byl vliv pozorovatelný. Jako kontrolní vzorky byly použity půda a suchý komerční kompost. Protože kvantitativní charakteristiky tohoto testu není možné kalibrovat, získaná data byla znormalizována na hodnoty AWCD, které byly dále použity pro výpočet  $H'$  a v poslední řadě použity pro PCA.

#### ***4.1.2.1 Průměrný vývoj barvy jamky AWCD***

Průměrný vývoj barvy jamky popisuje průměrný vývoj mikroorganismů v čase v dané sadě jamek vztažený na nejnižší hodnotu destičky. Tato analýza normalizuje naměřené hodnoty absorbance pro jednotlivé jamky a tím umožňuje zanedbat rozdílný počet jedinců daného mikroorganismu na počátku experimentu v jednotlivých jamkách.



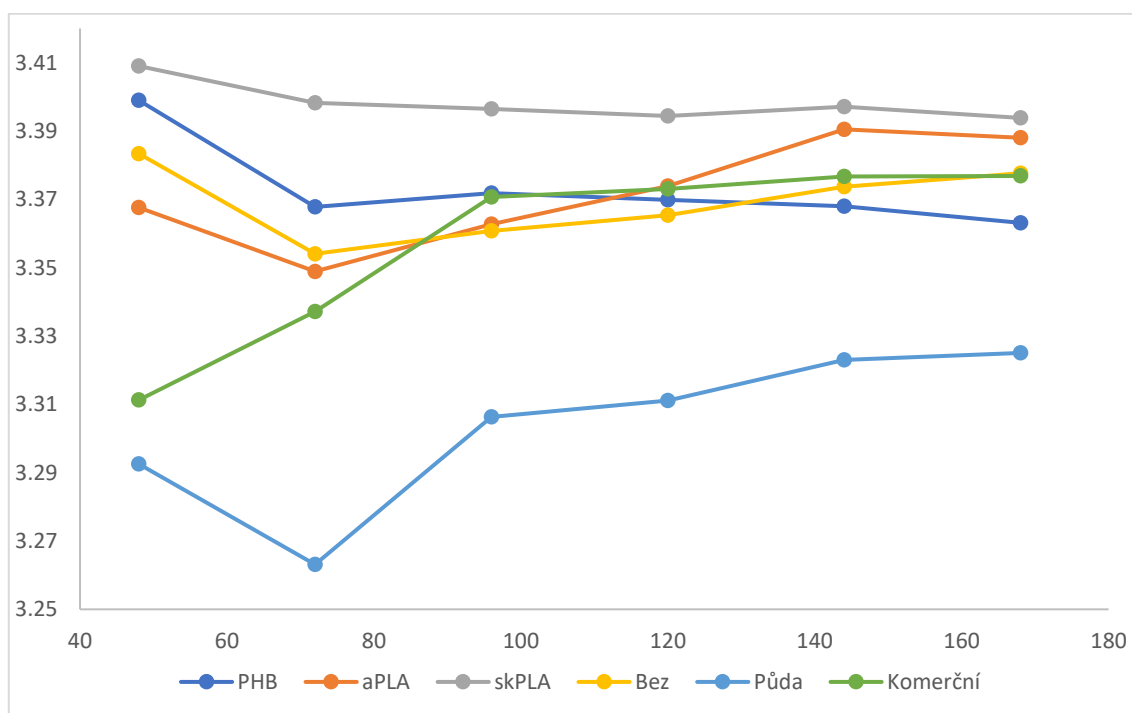
Obrázek 11: Časový vývoj AWCD pro jednotlivé substráty, kde PHB, aPLA, skPLA a Bez jsou zkoumané vzorky kompostů z 25. týdne testu a komerční označuje komerční kompost

Obrázek 11 ukazuje závislost AWCD na čase neboli průměrný vývoj mikroorganismů v čase. Všechny substráty vykazují vysokou podobnost s logaritmickou křivkou. Po 144. hodině došlo k zřetelnému úbytku AWCD pro vzorek se semikrystalickým PLA. K úbytku by nemělo docházet, neboť vzniklé barvivo by se nemělo dále odbourávat. Podobnost s logaritmickou křivkou naznačuje analogii s exponenciálním růstem a následné zpomalení do stacionární fáze. Z grafu je možné vidět, že všechny substráty kromě půdy mají podobný nárůst, a přestože mikroorganismy nalézající se v komerčním kompostu mohly mít delší *lag* fázi nebo jich ve vzorku na počátku experimentu mohlo být méně, bylo na konci inkubace destiček zaznamenán intenzivnější zbarvení než v případě půdy, avšak pořád se držely pod zkoumanými vzorky kompostů. Nižší hodnoty pro vzorek půdy mohly být způsobeny tím, že ve vzorku mikroorganismů odebraného z půdy je nižší početnost a aktivita mikroorganismů než například v prostředí kompostů.

Zatímco vzorek komerčního kompostu, který byl plně vyzrálý, drží se pod vzorky zkoumaných kompostů by mohl značit, že aktivita obsažených mikroorganismů není tak vysoká jako u připravených kompostů, které nebyly při testech zcela zralé.

#### 4.1.2.2 Shannonův index

Shannonův index rozmanitosti slouží k vyjádření nejistoty, jakou jsme schopni předpovědět druh jedince, který je náhodně vybrán ze vzorku [58]. Jinými slovy popisuje míru rozmanitosti druhů konkrétního společenství. V našem případě vyjadřuje schopnost mikrobiálního společenství využít rozdílné uhlíkové substráty a jeho vyrovnanost růstu na těchto substrátech, a odpovídá vývoji barvy jamky vůči celkovému vývoji v dané sadě jamek. Čím nižší hodnoty  $H'$  nabývá, tím je mikrobiálního společenství nevyrovnanější, což může značit dominanci nějakého druhu nebo rodu, neschopnost využít určité substráty, anebo kombinaci těchto stavů.



Obrázek 12: Shannonův index rozmanitosti

Hodnoty  $H'$  založených kompostů kromě vzorku s amorfním PLA v průběhu experimentu velice mírně klesaly, viz Obrázek 12. To mohlo být způsobeno rychlejším růstem mikroorganismů na konkrétních substrátech vůči ostatním substrátům, které byly využity později s delší lag fází. I růst konsorcií komerčního kompostu vykazoval nižší  $H'$  hodnotu do 96 hodin inkubace, kdy po tomto čase se hodnota  $H'$  ustálila, což

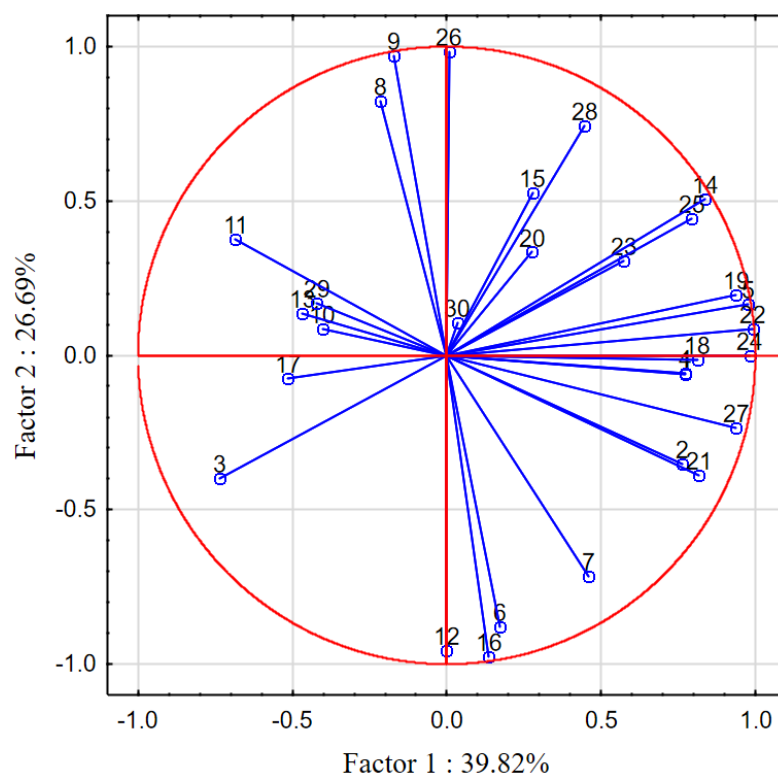
vypovídalo o vyváženosti systému, který potřeboval delší čas na adaptaci na různé uhlíkové substráty. Mikrobiální společenství odebrané z půdy vykazovalo dle předpokladu nižší schopnost využít různé uhlíkaté substráty. V celkovém výsledku však všechny vzorky po 96 hodinách inkubace vykazovaly vyváženost na substrátech, které byly schopné využít. Protože Shannonův index není schopný kvantifikovat ani určit počet druhů mikroorganismů schopných degradovat polymery, můžeme pouze předpokládat, že komposty, jež dosáhly vyšší rozmanitosti mikroorganismů, než čistá půda budou pravděpodobněji mít více druhů schopných degradace polymerů. Rozdíly mezi vzorky jsou velmi malé a bez statistické analýzy těžko porovnatelné. Přesto hodnoty z práce Hollé [55] vykazovaly podobné hodnoty, a tudíž můžeme předpokládat, že bioplasty v kompostu významně neovlivňují mikrobiální diverzitu kompostu.

#### ***4.1.2.3 Analýza hlavních komponent***

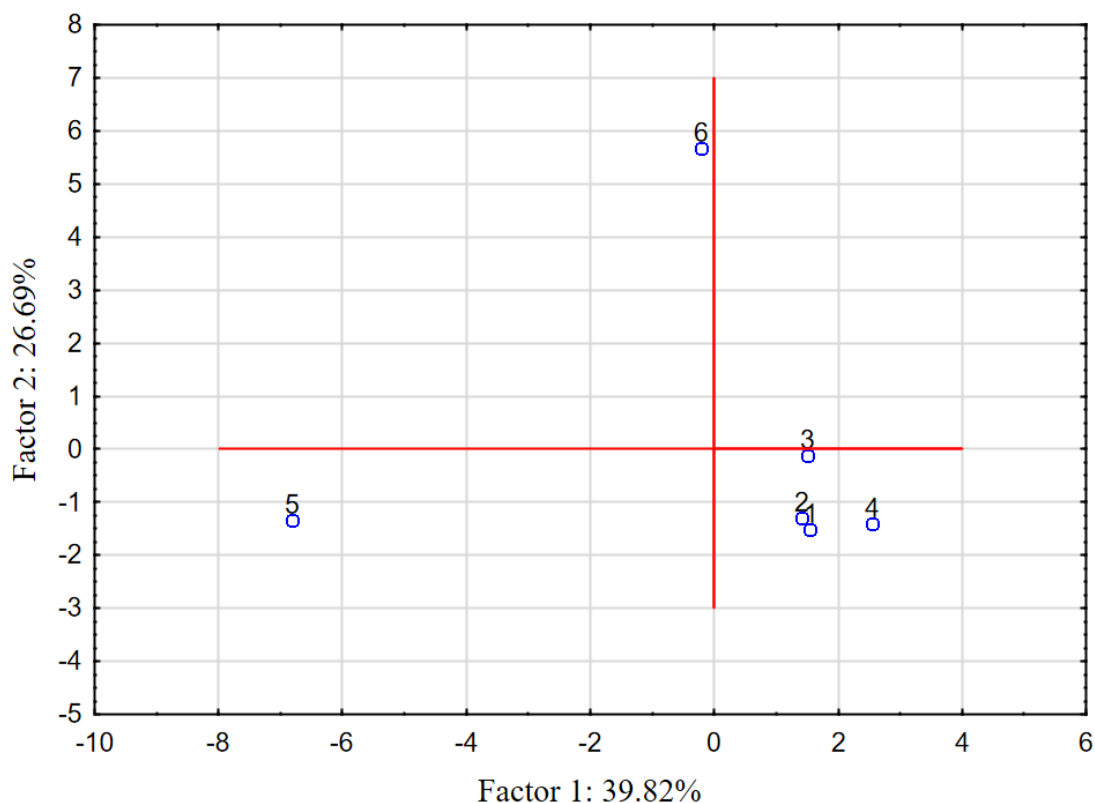
Pomocí analýzy hlavních komponent byly proměnné vyobrazeny ve dvojrozměrném prostředí neboli grafech. Tyto grafy ukazují zvýšenou aktivitu jednotlivých zkoumaných vzorků vůči konkrétním uhlíkatým substrátům. Pro výpočet byly využity hodnoty AWCD získané z předchozích výpočtů vývoje barvy jamky (viz 4.1.2.1) v čase inkubace 144, neboť v pozdějším čase došlo k nárůstu absorbance v některých jamkách, které spektrometr nebyl již schopný změřit. Z 31 uhlíkatých zdrojů bylo pro výpočet použito pouze 30, neboť použité vzorky neobsahovaly žádné mikroorganismy, jež by byly schopné využít 2-hydroxybenzoovou kyselinu.

Tabulka 4: Označení substrátů pro Obrázek 13

Substrát	číslo	Substrát	číslo
B-metyl-D-glukozid	1	N-acetyl-D-glukozamin	16
D-galaktono- $\gamma$ -lakton	2	$\gamma$ -aminobutánová kyselina	17
L-arginin	3	L-treonin	18
metylester kyseliny pyrohroznové	4	glykogen	19
D-xyloza	5	D-glukozaminová kyselina	20
D-galakturonová kyselina	6	itakonová kyselina	21
L-asparagin	7	glycyl-L-glutamová kyselina	22
Tween 40	8	D-celobioza	23
i-erytritol	9	glukoza-1-fosfát	24
L-fenylalanin	10	$\alpha$ -ketobutánová kyselina	25
Tween 80	11	fenyletylamin	26
D-manitol	12	$\alpha$ -D-laktoza	27
4-hydroxybenzoová kyselina	13	D,L- $\alpha$ -glycerofosfát	28
L-serin	14	D-jablečná kyselina	29
$\alpha$ -cyklodextrin	15	putrescin	30



Obrázek 13: Graf PCA popisující aktivitu substrátů



Obrázek 14: Graf PCA popisující aktivitu vzorků

Spojením Obrázek 13 a Obrázek 14 získáme přehled o aktivitě mikroorganismů na jednotlivých uhlíkatých substrátech rozdělených do kvadrantů, a také zjistíme, které vzorky vykazovaly zvýšené mikrobiální aktivity na těchto substrátech. Největší aktivita vzorků; byla v I. a IV. kvadrantu, kde zkoumané vzorky se držely mezi IV. kvadrantem a hranicí mezi I. a IV. kvadrantem. To potvrzuje předpoklad, že vzorky kompostu mají vyšší mikrobiální aktivitu než referenční vzorky, kterými jsou dozrálý kompost a půda (viz Obrázek 13). Navíc se zkoumané vzorky vyskytovaly v grafech blízko u sebe včetně kompostu bez polymerů, jak můžeme vidět na Obrázek 14, což podporuje hypotézu, že biodegradace bioplastů v prostředí kompostů nemá zásadní vliv na skladbu mikrobiálního zastoupení vůči vzorku bez bioplastů. Jak bylo již vypočteno pomocí Shannonova indexu (viz 4.1.2.2), půdní konsorciu má významnou aktivitu na nejmenším počtu substrátů. A v neposlední řadě mikrobiální konsorciu z komerčního vyzrálého kompostu preferovalo více substrátů než konsorciu z půdy, ale méně než konsorcia ze zkoumaných kompostů. Taktéž preferovalo jiné substráty než konsorcia zkoumaných kompostů, což mohlo být způsobeno délkou zrání, kdy mohlo dojít k úbytku druhového zastoupení



mikroorganismů a u zkoumaných kompostů by k tomu časem taky došlo, ale pro potvrzení této hypotézy by bylo třeba nechat zkoumané komposty plně dozrát.

Při porovnání uvedených grafů s grafy z diplomové práce Terezy Hollé [55], která dělala experiment za stejných podmínek, ale již ve 4. a 8. týdnu kompostování, lze předpokládat, že mikrobiální společenství se časem významně mění. Přestože výsledky Terezy Hollé popisují i negativní změny mikrobiální utilizace substrátů mezi 4. a 8. týdnem, tak můžeme vidět, že se tyto změny poté opět ztrácejí. Tento jev by mohl být způsoben tím, že zkoumané komposty v této diplomové práci byly měřeny až 25. týden a mikrobiální skladba se za tuto dobu pravděpodobně změnila. Vliv na tyto rozdíly mohla mít také nepřítomnost některých bioplastů, které byly v 25. týdnu testu již degradovány.

## 4.2 Germinační test

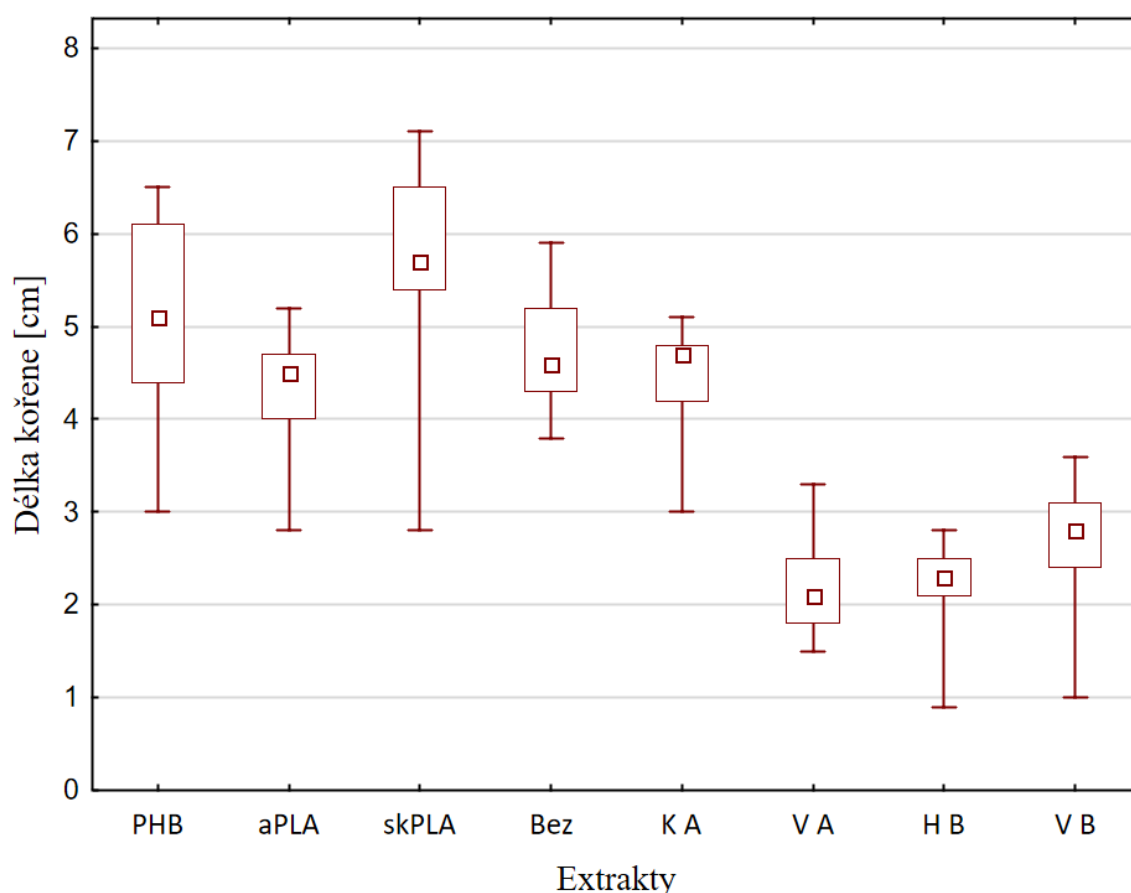
Výběr semen rostliny (hlávkového salátu) pro germinační test byl proveden na základě studií zabývajících se citlivostí semen vůči fytotoxickým látkám [49]. Klíčivost semen na extraktech zkoumaných vzorků byla vztažena vůči klíčivosti půdy (pozitivní kontroly), neboť obě kontroly dosáhly stejných výsledků procentuální vyklíčení vzorků. Klíčivost na extraktech zkoumaných vzorků vůči pozitivním kontrolám byla v jednom případě 95 % (PHB) a ve zbylých činila 100 %, viz Tabulka 5.

Tabulka 5: Výsledky germinačního testu

Substráty	Celkový počet vyklíčených semen	Procentuální vyklíčení vůči kontrolním vzorkům
PHB	19	95%
aPLA	20	100%
skPLA	20	100%
prázdný kompost	20	100%
vata	20	100%
komerční kompost	20	100%

Dále, semena klíčící na extraktech ze zkoumaných substrátů a komerčního kompostu nevykazovaly mezi sebou žádné v délce kořene a hypokotylu. Naopak signifikantní rozdíly byly nalezeny pro tyto vzorky při porovnání se semeny klíčícími v destilované vodě pro délku kořene, kdy semena klíčící na destilované vodě byla kratší. Tento rozdíl mohl být způsoben tím, že semena klíčící v destilované vodě se blížila ke svému velikostnímu maximum kvůli nedostatku živin. Naopak semena klíčící na extraktech

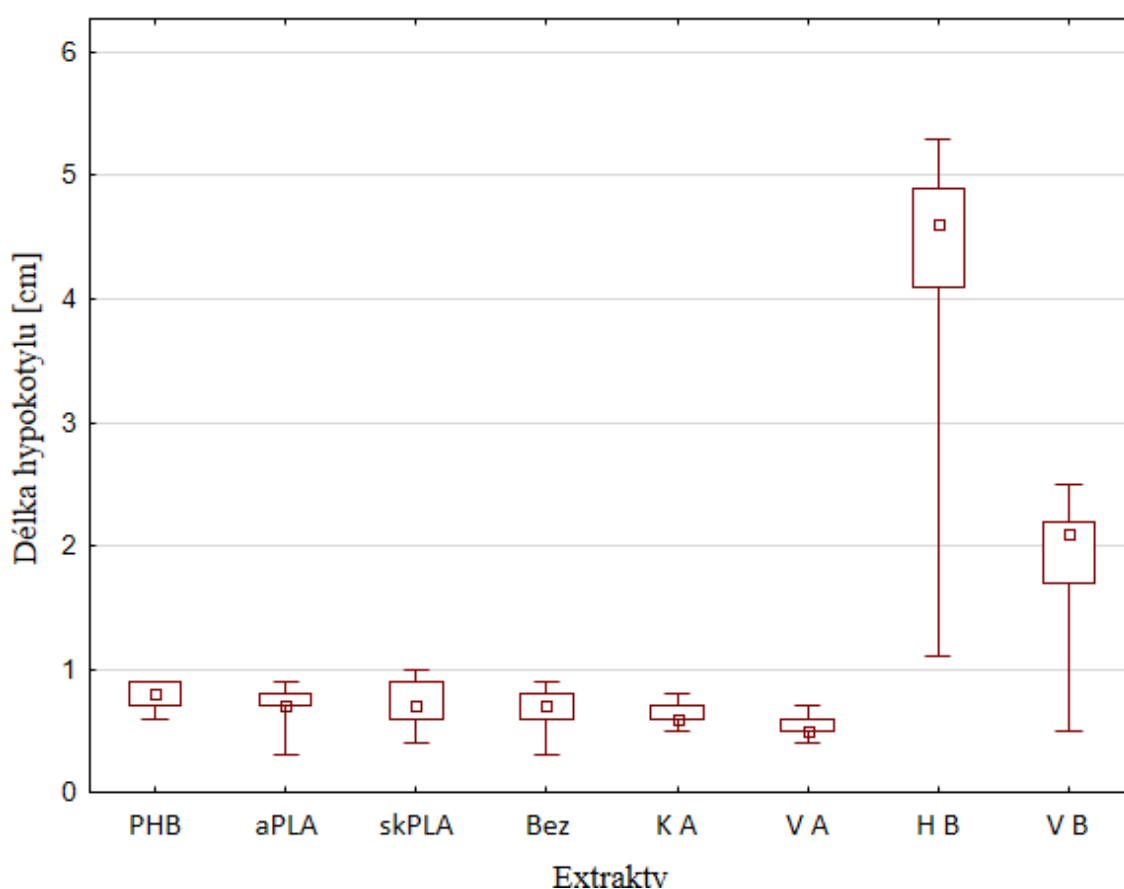
byly podporovány látkami potřebnými pro růst, které byly extrahované ze vzorků kompostů. Z těchto pozorování můžeme soudit, že biodegradace biopolymerů v prostředích kompostů neměla negativní vliv na germinační test v delším časovém horizontu, kdy pro další růst nepostačují pouze živiny z obalových částí semene. Naopak, byl pozorován pozitivní vliv extraktů kompostů na růst kořenů klíčků, viz Obrázek 15. Toto pozorování podporuje studie vedená Madbouly a spol. [52], která zkoumala vliv PHA a jejich kompozitů na germinaci semen rajčete, jenž neodhalila žádné negativní vlivy degradovaných materiálů. Taktéž Vostrejš a spol. (viz [59]), který zkoumal degradaci PHB filmů a filmů modifikovaných ligninem potvrdil netoxicitu těchto polymerů pomocí germinačního testu využitím seté hořčice (*Sinapis alba L.*).



Obrázek 15: Graf délky kořene pro jednotlivé extrakty z kompostů s přísadkou polymeru, konkrétně to byly PHB, amorfní PLA (aPLA), semikrystalické PLA (skPLA), kompost bez polymerů (Bez), vata (V) a komerční kompost (K), jako substráty byly použita vata a půda (HB), písmeno B u půdy a vaty označuje germinaci za tmy, respektive A označuje germinaci za upravených světelných podmínek

Semena klíčena za tmy na substrátech byla pravděpodobně limitována nedostatkem vody, z toho důvodu, že množství absorbované vody kompostem bylo vyšší než množství

absorbované vody vatou a půdou, tudíž vlhkost dostupná pro semena byla nižší u výše zmíněných substrátů. Pravděpodobně z toho důvodu klíčivost nedosahovala ve většině případů ani 10 % vůči pozitivním kontrolám. Vyklíčila pouze semena na vatě a půdě (HB a VB). Pozorovaný rozdíl mezi semeny klíčenými za tmy a se světelným režimem byl takový, že semenům za tmy rostl více hypokotyl a u semen se světlem byl víc vyvinutý kořen, jak můžeme vidět na Obrázek 15 a Obrázek 16. Tento rozdíl by mohl být vysvětlen rozdílnými potřebami rostliny, jejíž růst je zpomalen nedostatkem světla a rostlina se tak připravuje na čas, kdy bude mít přístup ke světlu, respektive kdy by mohla být za přístupu světla limitována nedostatkem živin v půdě.



Obrázek 16: Graf popisující průměrné délky hypokotyly pro jednotlivé extrakty a substráty

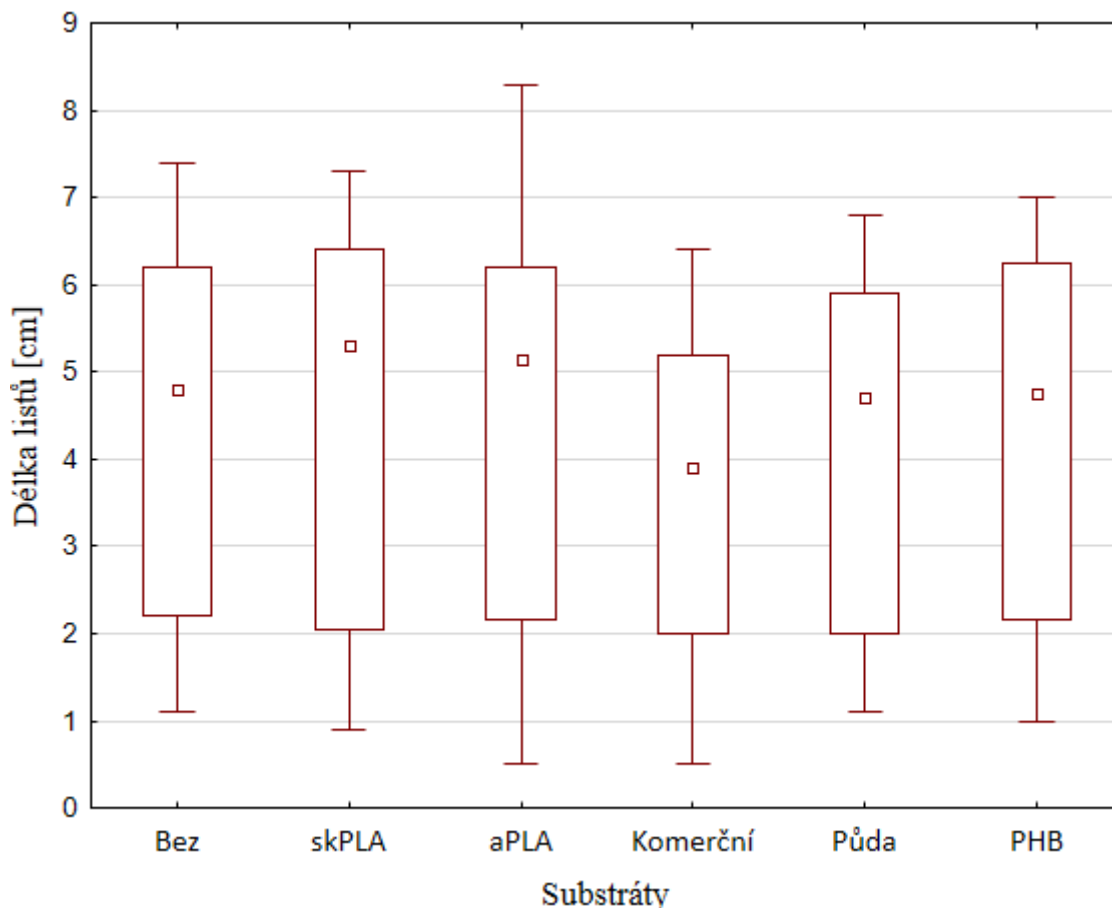
### 4.3 Růstový test

Růstový test byl použit pro odhalení, jestli ve zkoumaných prostředích bude docházet k růstu jednotlivých rostlin neboli jestli růst nebude zastaven či omezen fyto toxickými látkami potencionálně vzniklými při rozpadu bioplastů. Použitá rostlina byla stejná jako u germinačních testů (viz 4.2). Statistická analýza odhalila signifikantní rozdíly mezi

substráty u průměrné délky stonku a průměrné váhy. Konkrétně se jednalo o signifikantní rozdíl délky stonku rostlin rostoucích v substrátu s komerčním kompostem oproti zkoumaným kompostům s příměsí polymerů, viz Tabulka 6. U průměrné váhy rostlin se pouze odlišovaly vzorky rostoucí v komerčním kompostu a kompostu s příměsí semikrystalického PLA. Průměrná délka kořene a délka listů nevykazovaly signifikantní rozdíly mezi jednotlivými vzorky, jak můžeme vidět v Tabulka 6 a Obrázek 17. Pomocí HSD Tukeyho testu, respektive neparametrické alternativy Kruskal-Wallis ANOVA a mediánového testu byly vzorky pro jednotlivé parametry rozděleny do skupin podle signifikantních rozdílů, tzv. že vzorky s hvězdičkou v jednom sloupci nemají mezi sebou signifikantní rozdíly.

*Tabulka 6: Průměrné naměřené hodnoty rostlin pro jednotlivé substráty. Hvězdička u naměřené hodnoty označuje substrát, který se signifikantně lišil od ostatních substrátů*

Substráty	Průměrná délka kořene [cm]	Průměrná délka stonku [cm]	Průměrná váha rostliny [cm]
Půda	4.23 ± 0.55	1.50 ± 0.14	0.17 ± 0.01
Komerční kompost	4.73 ± 0.49	1.10 ± 0.33*	0.13 ± 0.01*
PHB	4.80 ± 0.00	1.80 ± 0.32	0.15 ± 0.01
Bez	4.98 ± 2.33	1.77 ± 0.45	0.16 ± 0.01
aPLA	5.38 ± 0.28	1.80 ± 0.28	0.18 ± 0.01
skPLA	5.70 ± 0.10	1.85 ± 0.24	0.15 ± 0.01



Obrázek 17: Graf popisující průměrnou délku listů podle přidavků substrátů k půdě: kompost bez polymeru, se semikrystalickým PLA, amorfním PLA, komerční kompost, PHB a čistá půda

Nejvyšší hodnoty obsahu chlorofylu *a* a *b* dosahovaly rostliny rostoucí s přidavkem kompostu bez polymeru, ale zároveň taky měly nejnižší hodnoty pro karotenoidy, viz Tabulka 7. Opačného výsledku dosáhly rostliny rostoucí v komerčním kompostu, tzn. měly nejvyšší množství karotenoidů, ale nejnižší množství chlorofylů. Rostliny rostoucí v kompostech s polymery (PHB, aPLA a skPLA) dosahovaly podobných hodnot pro měřené proměnné. Avšak listy jednotlivých vzorků neměly dostatečnou váhu, aby mohl být experiment proveden v triplikátu, nemohly být hodnoty chlorofylu *a* a *b* a karotenoidů statisticky porovnány.

Tabulka 7: Množství chlorofylu zjištěných z listů jednotlivých substrátů: kompost bez polymeru, se semikrystalickým PLA, amorfním PLA, komerční kompost, PHB a čistá půda

Substrát	Chlorofyl <i>a</i> [μg /ml]	Chlorofyl <i>b</i> [μg /ml]	Karotenoidy [μg /ml]
Bez	5.00	2.81	0.63
Semik	4.40	1.26	0.94
Amorf	4.12	1.55	0.89
Komerční	3.51	0.93	1.11
Půda	3.78	0.97	0.86
PHB	3.99	1.39	0.95

Chlorofyly a karotenoidy jsou rostlinné pigmenty, které absorbují světelnou energii a rostlina ji dále využívá při fotosyntéze. Množství chlorofylu závisí na druhu rostliny a stáří listu, podmínkách prostředí, jako jsou především světelné podmínky, ale také dostatečné množství minerálních látek a vlhkosti [60]. Kromě absorpce světelné energie karotenoidy ještě chrání fotosyntetizující systémy, když absorbovaná energie přesáhne fotosyntetickou kapacitu systému. Fotosyntetická kapacita se snižuje se zvyšováním stresových podmínek. Proto obsah karotenoidů se zvyšuje v situacích, kdy rostlině chybí dusík, zažívá sucha či je vystavena nadměrnému množství slunečního záření [61, 62]. Rozdílnost mezi jednotlivými rostlinami mohla být způsobena rozdílností mezi jednotlivými substráty, kdy komerční kompost jednotlivým rostlinám mohl poskytovat méně dusíku než ostatní substráty. Rostliny se mohly nacházet ve stresových podmínkách, a proto mohlo dojít k větší produkci karotenoidů nad chlorofyly, které navíc potřebují dusík, aby mohly být produkovány, jak popsal MUÑOZ-HUERTA a spol. v [63]. Tato problematika je nicméně daleko složitější a potřebovala by být zkoumána z více úhlů.

Kromě výsledků stanovení chlorofylů a karotenoidů v listech rostlin, které navíc nemohly být statisticky potvrzeny, tak růstový test odhalil negativní důsledek biodegradace biopolymerů v kompostech použitých jako hnojivo pro růst rostlin. K netoxicitě PHA dospěl také Madbouly a spol. [52], ale s použitím rajčete místo salátu.

#### 4.4 Biodegradace polymerů v prostředí půdy

Experiment biodegradace probíhající v prostředí půdy byl vytvořen pro zjištění vlivu rozdílných prostředí na samotnou biodegradaci. Biodegradace v půdě probíhala podle normy ISO 20200, ale za podmínek běžně se vyskytujícího prostředí, jako probíhala

v kompostu. Tudiž se lišila teplota, která byla nižší než v případě kompostovacího testu a to 25 °C po celou dobu testu, vlhkost, protože půda nebyla schopna udržet absolutní vlhkost na 55 % a v neposlední řadě také způsobem, jakým byly polymery do vsádky umístěny. Při inkubaci v půdě byly polymery umístěny do prostředí v pytlících z monofilových vláken, a to pro snazší odběr vzorku a jeho následnou analýzu. Pytlíky s polymery byly odebírány v týdenních intervalech. Četnost zalívání, umístění v inkubátoru a zatížení půdy polymery bylo stejné jako u kompostovacího testu. Oba testy měly více či méně simulovat přirozené prostředí, ale s rozdílnými cíli. Zatímco kompost měl sloužit k zjištění toxicity prostředí po degradaci polymerů, protože degradace polymerů v kompostu byla již prokázána v předešlých pracích (viz [55, 56]). Test biodegradace v půdě byl navržen pro sledování mechanismů a rychlosti degradace polymerů, kterým lze simulovat například přírodní skládkou nebo místa, kde někdo odhodil produkt z těchto kompostovatelných polymerů.

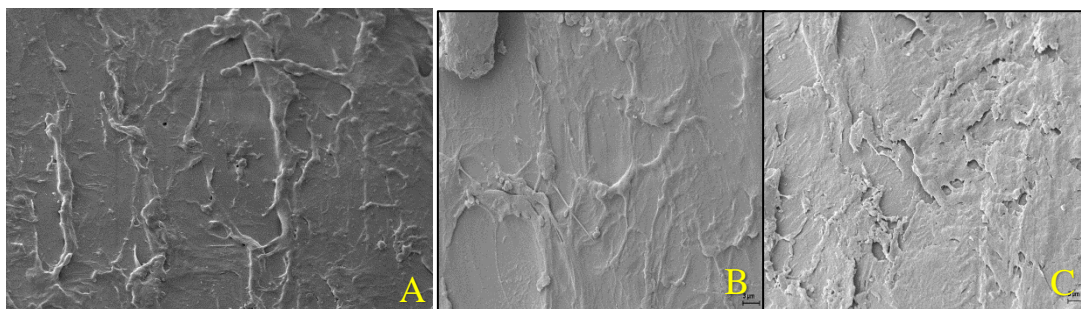
#### **4.4.1 Změny polymerů v průběhu experimentu**

Během 8 týdnů inkubace polymerů v půdě nedošlo skoro k žádným okem pozorovatelným změnám půdy nebo polymerů nacházejícím se uvnitř. Poslední týden v prostředí s polymerem PHB došlo k nárůstu plísně na sáčcích s tímto polymerem. Ale také nedošlo k žádnému hmotnostnímu úbytku mezi jednotlivými sáčky během celé doby experimentu, pouze byly pozorovány malé fluktuace hmotnosti včetně nepatrného nárůstu hmotnosti. Nárůst hmotnosti mohl být způsoben znečištěním polymerů mikroskopickými složkami půdy, přestože polymery byly čištěny před vážením. Protože komposty z kompostovacího testu měly sloužit především jako substráty pro růstový test, nebylo možné použít sáčky s polymerem jako v případě testu půdě. Proto výsledky testu v půdě byly porovnány s výsledky získanými v předchozích pracích, viz diplomová práce Hollé [55] a Vodičky [56].

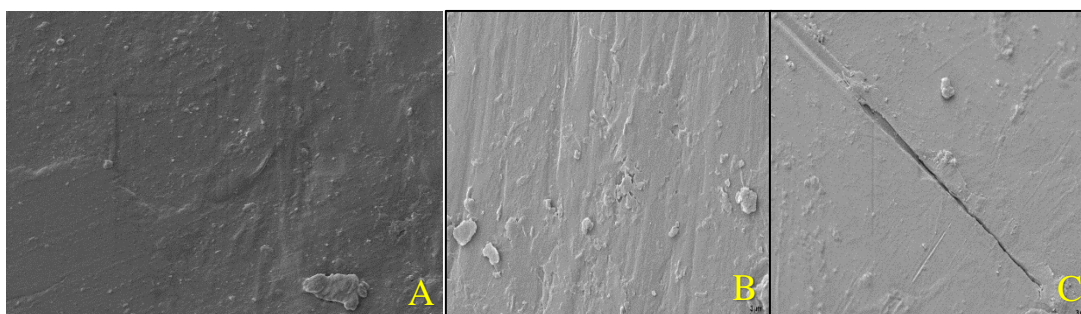
Po 8 týdnech kompostovacího testu činily úbytky polymerů mezi 40–100 % [55], zatímco úbytky hmotnosti v půdě degradaci polymeru neprokazují. To může být způsobeno nižší teplotou a nižší vlhkostí půdy, kdy tyto parametry ovlivňují skladbu a aktivitu mikroorganismů, které mají vliv na samotnou biodegradaci polymerů. Taktéž tyto parametry samy napomáhají k degradaci (viz. 2.2.1).

#### 4.4.1.1 Změny povrchů polymerů

Pro bližší zkoumání biodegradčních procesů a jejich mechanismů byly povrchy polymerů sledovány pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM). Pro tento účel byly použity polymery z 4. a 8. týdne experimentu. Vzorek amorfního PLA nevykazoval žádnou degradaci ani ve 4., či 8. týdnu experimentu, jak můžeme vidět na Obrázek 18.



Obrázek 18: Snímek ze SEM povrchu amorfního PLA, A je snímek před experimentem, B z 4. a C z 8. týdne experimentu, povrch byl 5000x přiblížen.



Obrázek 19: Snímek ze SEM povrchu semikrystalického PLA, A je snímek před experimentem, B z 4. a C z 8. týdne experimentu, povrch byl 5000x přiblížen

Taktéž ani semikrystalické PLA nevykazovalo žádné změny povrchu, jak je patrné z Obrázek 19. Dle výsledků naměřených Vasile a spol. [64] a Karamanlioglu a spol. [65], degraduje PLA při nižších teplotách (37 °C) a vlhkosti velmi pomalu a po degradaci amorfni části degraduje krystalická část ještě pomaleji. Ani po 150 či 360 dnech nebyla pozorována ztráta hmotnosti vyšší než 1 % [64, 65]. Tyto hodnoty korelují s naměřenými výsledky, kdy ani amorfni ani semikrystalické PLA nevykazovaly žádné známky degradace.

Přestože ani PHB nevykazovalo žádnou změnu hmotnosti, snímky ze SEM ukazují, že k určité mikrobiální degradaci došlo, a že se degradovaná část zvětšila mezi 4. a 8. týdnem experimentu, jak je patrné z Obrázek 20. Byly nalezeny i části povrchu, kde k žádné degradaci ještě nedošlo, což značí o nižší aktivitě mikroorganismů schopných degradace



polymeru. Vliv, kterým je způsobena povrchová degradace je opřen o studie, které vedli Madbouly a spol. [52] a Sharma a spol. [66], kteří zkoumali biodegradaci PHA a došli k závěru, že mikrobiální degradace probíhá formou povrchové eroze.



*Obrázek 20: Snímek ze SEM povrchu PHB, A je snímek před experimentem, B z 4. a C z 8. týdne experimentu, povrch byl 5000x přiblížen*

Při porovnání s daty naměřenými Boyandin a kol. [53], kteří měřili degradaci PHB filmů i pelet v půdě je pozorovaná analogie s uvedenými výsledky. Autoři naznačují, že teplota, a především vlhkost půdy má vysoký vliv na degradaci polymerů, neboť tyto faktory (ale i další jako je pH) ovlivňují aktivitu, množství a rozmanitost druhů schopných degradace polymerů [53].

## 5 ZÁVĚR

Prvotní experimenty zahrnovaly biodegradaci polymerů, konkrétně P3HB, amorfního PLA a semikrystalického PLA v prostředí kompostu a půdy. Následně po skončení kompostovacích experimentů byly komposty použity jako hnojivo pro zjištění, jestli degradace polymerů nezanechává v prostředí fytotoxické látky, které by mohly zpomalovat, až zastavovat růst rostlin. Test biodegradace v půdě byl proveden pro porovnání rychlosti degradace v prostředí kompostu a v půdě.

Degradace polyesterů v kompostovacím testu probíhala podle předpokladů, kdy polymeru PHB viditelně ubylo, amorfní PLA došlo k úplné degradaci a semikrystalické PLA sice drželo tvar, ale při tlaku na něj docházelo k deformaci až rozpadu na prach. Taktéž experimenty v prostředí půdy korespondovaly s literaturou a nedocházelo k žádné viditelné degradaci ani k hmotnostnímu úbytku polymerů. Snímky ze SEM prokázaly nízkou povrchovou degradaci PHB v prostředí půdy. Amorfní a semikrystalické PLA nevykazovaly žádné náznaky degradace, protože u nich dochází především k degradaci abiotické, která byla za podmínek testu (především nízká teplota) velmi zpomalená.

Semena salátu při germinačním testu nevykazovala při expozici extraktům testovaných kompostů žádnou sníženou germinaci či růst oproti kontrolním vzorkům. Naopak, po delší době germinace docházelo k zisku živin z extraktů kořenů a podpoře růstu kořenů oproti destilované vodě. Semena klíčena ve tmě vykazovala delší hypokotyl oproti semenům klíčeným s kontrolovaným světelným režimem.

Růstový test, v souladu s literaturou, neprokázal žádnou fytotoxicitu testovaných bioplastů a jejich degradačních produktů a rostliny ve většině případu vykazovaly lepší růst a další parametry, než tomu bylo u kontroly. To naznačuje, že komposty zatížené vysokým obsahem bioplastů mohou být bez obav použity jako hnojiva v zemědělství.

Porovnáním mezi degradací v prostředí kompostu a v půdě naznačuje, že industriální kompost by mohl sloužit jako lepší místo pro degradaci testovaných biopolymerů než pouhé ponechání polymerů například v prostředí přírodní skládky. Následně pro ještě lepší využití by po skončení kompostovacího testu mohl být kompost využit jako hnojivo pro zemědělské účely. Toho by mohly využít industriální kompostárny, které v dnešní době nepřijímají žádné odpadní plasty. Přestože je PLA v dnešní době občas používáno jako náhrada komerčních polymerů jako je například PE, tak může být pouze vyhozeno

do komunálního odpadu, který končí na skládkách, kde jeho degradace nedosahuje jeho plného potenciálu, jako například při industriálním kompostování. Použití ostatních biopolymerů jako například PHB je pořád významně limitováno vyšší cenou výroby. V souvislosti se zvyšujícím se zájmem o ekologii a při potvrzení udržitelnosti a bezpečnosti PHB, či jiného bioplastu by mohlo dojít ke zvýšení produkce těchto bioplastů. To by mohlo mít za následek snížení ceny a vytvoření podmínek pro výzkum optimalizace výroby pro tyto bioplasty.

Samotná problematika může být dále studována a popsána z mnoha úhlů. Například z pohledu prostředí, kdy je dále možné sledovat složení celého kompostu a jeho změny v průběhu biodegradace. Poté z pohledu úrovně degradace jednotlivých polymerů, jakých podmínek prostředí musí být dosaženo a za jakých podmínek bude degradace nejrychlejší. Dále z pohledu mikrobiální činnosti, respektive které mikroorganismy a jak se podílí na biodegradaci, popřípadě jako tomu bylo částečně v téhle práci, jestli produkty degradace polymerů ovlivňují růst rostlin a do jaké míry.

## 6 LITERATURA:

- [1] SIVAN, Alex. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2011, **22**(3), 422–426. ISSN 09581669. Available at: doi:10.1016/j.copbio.2011.01.013
- [2] SHIMAO, Masayuki. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology* [online]. 2001, **12**(3), 242–247. ISSN 09581669. Available at: doi:10.1016/S0958-1669(00)00206-8
- [3] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly (Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2001, **9**(2), 63–84. ISSN 15662543. Available at: doi:10.1023/A:1020200822435
- [4] SAVENKOVA, L, Z GERBERGA, V NIKOLAEVA, A DZENE, I BIBERS and M KALNIN. Mechanical properties and biodegradation characteristics of PHB-based films. *Process Biochemistry* [online]. 2000, **35**(6), 573–579. ISSN 13595113. Available at: doi:10.1016/S0032-9592(99)00107-7
- [5] REDDY, C.S.K, R GHAI, RASHMI and V.C KALIA. Polyhydroxyalkanoates: an overview. *Bioresource Technology* [online]. 2003, **87**(2), 137–146. ISSN 09608524. Available at: doi:10.1016/S0960-8524(02)00212-2
- [6] VOLOVA, T.G., A.N. BOYANDIN, A.D. VASILIEV, V.A. KARPOV, S.V. PRUDNIKOVA, O.V. MISHUKOVA, U.A. BOYARSKIKH, M.L. FILIPENKO, V.P. RUDNEV, Bùi BÁ XUÂN, Vũ VIỆT DŨNG and I.I. GITELSON. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, **95**(12), 2350–2359. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.08.023
- [7] SUDESH, K, H ABE and Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science* [online]. 2000, **25**(10), 1503–1555. ISSN 00796700. Available at: doi:10.1016/S0079-6700(00)00035-6
- [8] ANJUM, Anbreen, Mohammad ZUBER, Khalid Mahmood ZIA, Aqdas NOREEN, Muhammad Naveed ANJUM and Shazia TABASUM. Microbial

- production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* [online]. 2016, **89**, 161–174. ISSN 01418130. Available at: doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069
- [9] SHARMA, Vibhuti, Rutika SEHGAL and Reena GUPTA. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Properties and Modifications. *Polymer* [online]. 2021, **212**, 123161 [accessed. 2021-12-16]. ISSN 0032-3861. Available at: doi:10.1016/J.POLYMER.2020.123161
- [10] KUSAKA, S., H. ABE, S. Y. LEE and Y. DOI. Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant *Escherichia coli*. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 1997, **47**(2), 140–143. ISSN 0175-7598. Available at: doi:10.1007/s002530050902
- [11] CHEN, L.J. and M. WANG. Production and evaluation of biodegradable composites based on PHB–PHV copolymer. *Biomaterials* [online]. 2002, **23**(13), 2631–2639. ISSN 01429612. Available at: doi:10.1016/S0142-9612(01)00394-5
- [12] NORHAFINI, Hambali, L. THINAGARAN, K. SHANTINI, Kai-Hee HUONG, Ishak Muhammad SYAFIQ, Kesaven BHUBALAN and A. A. AMIRUL. Synthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) with high 4HB composition and PHA content using 1,4-butanediol and 1,6-hexanediol for medical application. *Journal of Polymer Research* [online]. 2017, **24**(11), 189. ISSN 1022-9760. Available at: doi:10.1007/s10965-017-1345-x
- [13] SVOBODA, Jiří. *Organická chemie*. I. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2005. ISBN 80-708-0561-7.
- [14] KARAMANLIOGLU, Mehlika and Geoffrey D. ROBSON. 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* [online]. 2013, **98**(10), 2063–2071. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2013.07.004
- [15] OJEDA, Telmo F.M., Emilene DALMOLIN, Maria M.C. FORTE, Rodrigo J.S. JACQUES, Fátima M. BENTO and Flávio A.O. CAMARGO. Abiotic and biotic

- degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2009, **94**(6), 965–970. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2009.03.011
- [16] ÁNGELES-LÓPEZ, Y G, A M GUTIÉRREZ-MAYEN, M VELASCO-PÉREZ, M BELTRÁN-VILLAVICENCIO, A VÁZQUEZ-MORILLAS and M CANO-BLANCO. Abiotic degradation of plastic films. *Journal of Physics: Conference Series* [online]. 2017, **792**, 012027. ISSN 1742-6588. Available at: doi:10.1088/1742-6596/792/1/012027
- [17] SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, Pedro E., Luis A. PÉREZ-MAQUEDA, Antonio PEREJÓN and José M. CRIADO. A new model for the kinetic analysis of thermal degradation of polymers driven by random scission. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2010, **95**(5), 733–739. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2010.02.017
- [18] QIU, Husen, Tida GE, Jieyun LIU, Xiangbi CHEN, Yajun HU, Jinshui WU, Yirong SU and Yakov KUZYAKOV. Effects of biotic and abiotic factors on soil organic matter mineralization: Experiments and structural modeling analysis. *European Journal of Soil Biology* [online]. 2018, **84**, 27–34. ISSN 11645563. Available at: doi:10.1016/j.ejsobi.2017.12.003
- [19] VAN KREVELEN, D.W. and K. TE NIJENHUIS. Chemical Degradation. In: *Properties of Polymers* [online]. B.m.: Elsevier, 2009, p. 779–786. Available at: doi:10.1016/B978-0-08-054819-7.00022-4
- [20] TOKIWA, YUTAKA and TOMOO SUZUKI. Hydrolysis of polyesters by lipases. *Nature* [online]. 1977, **270**(5632), 76–78. ISSN 0028-0836. Available at: doi:10.1038/270076a0
- [21] HUYER, Locke Davenport, Miles MONTGOMERY, Yimu ZHAO, Yun XIAO, Genevieve CONANT, Anastasia KOROLJ and Milica RADISIC. Biomaterial based cardiac tissue engineering and its applications. *Biomedical Materials* [online]. 2015, **10**(3), 034004. ISSN 1748-605X. Available at: doi:10.1088/1748-6041/10/3/034004

- [22] RYDZ, Joanna, Wanda SIKORSKA, Mariya KYULAVSKA and Darinka CHRISTOVA. Polyester-Based (Bio)degradable Polymers as Environmentally Friendly Materials for Sustainable Development. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2014, **16**(1), 564–596. ISSN 1422-0067. Available at: doi:10.3390/ijms16010564
- [23] KLIEM, Silvia, Marc KREUTZBRUCK and Christian BONTEN. Review on the Biological Degradation of Polymers in Various Environments. *Materials* [online]. 2020, **13**(20), 4586. ISSN 1996-1944. Available at: doi:10.3390/ma13204586
- [24] ONG, Su Yean, Jiun Yee CHEE and Kumar SUDESH. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology* [online]. 2017, **10**(2), 21–225. ISSN 19971389. Available at: doi:10.17516/1997-1389-0024
- [25] JAISWAL, Shweta, Babita SHARMA and Pratyosh SHUKLA. Integrated approaches in microbial degradation of plastics. *Environmental Technology & Innovation* [online]. 2020, **17**, 100567. ISSN 23521864. Available at: doi:10.1016/j.eti.2019.100567
- [26] CHEN, L., M. DE HARO MARTI, M. MOORE and C. FALEN. The composting process. Dairy Manure Compost Production and Use in Idaho. *University of Idaho*. 2011.
- [27] THELLEN, Christopher, Megan COYNE, Danielle FROIO, Margaret AUERBACH, Carl WIRSEN and Jo Ann RATTO. A Processing, Characterization and Marine Biodegradation Study of Melt-Extruded Polyhydroxyalkanoate (PHA) Films. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2008, **16**(1), 1–11. ISSN 1566-2543. Available at: doi:10.1007/s10924-008-0079-6
- [28] J. POSTMA and C. J. KOK. Effect of compost application on the soil microflora. *Seminar Proceedings Brussels*. 2001.
- [29] MADRID, F., R. LÓPEZ and F. CABRERA. Metal accumulation in soil after application of municipal solid waste compost under intensive farming conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [online]. 2007, **119**(3–4), 249–256

[accessed. 2022-03-30]. ISSN 0167-8809. Available  
at: doi:10.1016/J.AGEE.2006.07.006

- [30] KALINA, Miroslav. *Kompostování a péče o půdu*. Praha: Grada, 2004.
- [31] CHEN, L. Achieve maturity at the end of the manure composting process. Progressive dairy. <https://www.progressivedairycanada.com/topics/manure/achieve-maturity-at-the-end-of-the-manure-composting-process> . 19. November 2021.
- [32] PALANIVELOO, Kishneth, Muhammad Azri AMRAN, Nur Azeyanti NORHASHIM, Nuradilla MOHAMAD-FAUZI, Fang PENG-HUI, Low HUI-WEN, Yap KAI-LIN, Looi JIALE, Melissa Goh CHIAN-YEE, Lai JING-YI, Baskaran GUNASEKARAN and Shariza Abdul RAZAK. Food Waste Composting and Microbial Community Structure Profiling. *Processes* [online]. 2020, **8**(6), 723. ISSN 2227-9717. Available at: doi:10.3390/pr8060723
- [33] CRAIG COKER. *Aerobic Composting And Anaerobic Digestion* [online]. 28. March 2014 [accessed. 2022-03-30]. Available at: <https://www.biocycle.net/aerobic-composting-and-anaerobic-digestion/>
- [34] RUGGERO, Federica, Riccardo GORI and Claudio LUBELLO. Methodologies to assess biodegradation of bioplastics during aerobic composting and anaerobic digestion: A review. *Waste Management & Research* [online]. 2019, **37**(10), 959–975. ISSN 0734-242X. Available at: doi:10.1177/0734242X19854127
- [35] BRIASSOULIS, Demetres, Cyril DEJEAN and Pietro PICUNO. Critical Review of Norms and Standards for Biodegradable Agricultural Plastics Part II: Composting. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2010, **18**(3), 364–383. ISSN 1566-2543. Available at: doi:10.1007/s10924-010-0222-z
- [36] BRIASSOULIS, Demetres and Cyril DEJEAN. Critical Review of Norms and Standards for Biodegradable Agricultural Plastics Part I. Biodegradation in Soil. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2010, **18**(3), 384–400. ISSN 1566-2543. Available at: doi:10.1007/s10924-010-0168-1
- [37] *ISO 20200:2015 Standards Publication Plastics – Determination of the degree of disintegration of plastic materials under simulated composting conditions in a*



- laboratory-scale test* [online]. B.m.: Organization for Standardization. [accessed. 2022-03-30]. Available at: [www.iso.org](http://www.iso.org)
- [38] *ISO 14855-1:2012 – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 1: General method* [online]. B.m.: Organization for Standardization. [accessed. 2022-03-30]. Available at: [www.iso.org](http://www.iso.org)
- [39] *ISO 14855-2:2018 Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test* [online]. B.m.: Organization for Standardization. [accessed. 2022-03-30]. Available at: [www.iso.org](http://www.iso.org)
- [40] *ISO 16929:2021 Plastics — Determination of the degree of disintegration of plastic materials under defined composting conditions in a pilot-scale test 4th ed.* [online]. B.m.: Organization for Standardization. [accessed. 2022-03-30]. Available at: [www.iso.org](http://www.iso.org)
- [41] *ČSN 13432 Obaly – Požadavky na obaly využitelné ke kompostování a biodegradaci – Zkušební schéma a kritéria hodnocení pro konečné přijetí obalu.* Praha: J.L.LOGISTIKA
- [42] FIELD, Christopher B., Michael J. BEHRENFELD, James T. RANDERSON and Paul FALKOWSKI. Primary Production of the Biosphere: Integrating Terrestrial and Oceanic Components. *Science* [online]. 1998, **281**(5374), 237–240. ISSN 0036-8075. Available at: [doi:10.1126/science.281.5374.237](https://doi.org/10.1126/science.281.5374.237)
- [43] *CO2 v akváriu* [online]. [accessed. 2022-03-30]. Available at: <https://eshop-aqua.imks.cz/blog/co2-v-akvariu/>
- [44] WILFRED W. ROBBINS, T. ELLIOT WEIER and C. RALPH STOCKING. *Botany an Introduction to Plant Science*. 2nd ed. B.m.: John Wiley & Sons, 1940.
- [45] RAY F. EVERT and SUSAN E. EICHHORN. *Raven Biology of Plants*. 8th ed. B.m.: W. H. Freeman, 2012.

- [46] MCCALLA T. M. and HASKINS F. A. PHYTOTOXIC SUBSTANCES FROM SOIL MICROORGANISMS AND CROP RESIDUES. *BACTERIOLOGICAL REVIEWS*. 1964, **28**, 181–207.
- [47] TAKAYUKI SHIBAMOTO. *Introduction to Food Toxicology*. 2nd ed. B.m.: Academic Press, 2009.
- [48] MARTIN-CLOSAS, L., R. BOTET and A.M. PELACHO. An in vitro crop plant ecotoxicity test for agricultural bioplastic constituents. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2014, **108**, 250–256. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.03.037
- [49] LUO, Yuan, Jie LIANG, Guangming ZENG, Ming CHEN, Dan MO, Guoxue LI and Difang ZHANG. Seed germination test for toxicity evaluation of compost: Its roles, problems and prospects. *Waste Management* [online]. 2018, **71**, 109–114. ISSN 0956053X. Available at: doi:10.1016/j.wasman.2017.09.023
- [50] ARCOS-HERNANDEZ, Monica v., Bronwyn LAYCOCK, Steven PRATT, Bogdan C. DONOSE, Melissa A.L. NIKOLIĆ, Paul LUCKMAN, Alan WERKER and Paul A. LANT. Biodegradation in a soil environment of activated sludge derived polyhydroxyalkanoate (PHBV). *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2012, **97**(11), 2301–2312. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2012.07.035
- [51] ARRIETA, M.P., J. LÓPEZ, E. RAYÓN and A. JIMÉNEZ. Disintegrability under composting conditions of plasticized PLA–PHB blends. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2014, **108**, 307–318. ISSN 01413910. Available at: doi:10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.034
- [52] MADBOULY, Samy A., James A. SCHRADER, Gowrishankar SRINIVASAN, Kunwei LIU, Kenneth G. MCCABE, David GREWELL, William R. GRAVES and Michael R. KESSLER. Biodegradation behavior of bacterial-based polyhydroxyalkanoate (PHA) and DDGS composites. *Green Chem.* [online]. 2014, **16**(4), 1911–1920. ISSN 1463-9262. Available at: doi:10.1039/C3GC41503A

- [53] BOYANDIN, Anatoly N., Svetlana v. PRUDNIKOVA, Valery A. KARPOV, Vladimir N. IVONIN, Ngọc Linh ĐỖ, Thị Hoài NGUYỄN, Thị Mỹ Hiệp LÊ, Nikolay L. FILICHEV, Alexander L. LEVIN, Maxim L. FILIPENKO, Tatiana G. VOLOVA and Iosif I. GITELSON. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation* [online]. 2013, **83**, 77–84. ISSN 09648305. Available at: doi:10.1016/j.ibiod.2013.04.014
- [54] BANDINI, F, · A FRACHE, · A FERRARINI, · E TASKIN, · P S COCCONCELLI and · Edoardo PUGLISI. Fate of Biodegradable Polymers Under Industrial Conditions for Anaerobic Digestion and Aerobic Composting of Food Waste. *Journal of Polymers and the Environment* [online]. 2020, **28**, 2539–2550. Available at: doi:10.1007/s10924-020-01791-y
- [55] HOLLÁ, Tereza. *Kompostování biologicky rozložitelných biopolymerů*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [56] VODIČKA, Juraj. *Biodegradace bioplastů v prostředí kompostu*. Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně.
- [57] *Microbial Community Analysis* [online]. [accessed. 2022-05-03]. Available at: <https://www.biolog.com/wp-content/uploads/2020/05/00A-012-rD-EcoPlate-IFU.pdf>
- [58] TUCKER, Caroline M., Marc W. CADOTTE, Silvia B. CARVALHO, T. Jonathan DAVIES, Simon FERRIER, Susanne A. FRITZ, Rich GRENYER, Matthew R. HELMUS, Lanna S. JIN, Arne O. MOOERS, Sandrine PAVOINE, Oliver PURSCHKE, David W. REDDING, Dan F. ROSAUER, Marten WINTER and Florent MAZEL. A guide to phylogenetic metrics for conservation, community ecology and macroecology. *Biological Reviews* [online]. 2017, **92**(2), 698–715. ISSN 14647931. Available at: doi:10.1111/brv.12252
- [59] VOSTREJS, Pavel, Dana ADAMCOVÁ, Magdalena Daria VAVERKOVÁ, Vojtech ENEV, Michal KALINA, Michal MACHOVSKY, Markéta ŠOURKOVÁ, Ivana MAROVA and Adriana KOVALCIK. Active biodegradable packaging films modified with grape seeds lignin. *RSC Advances* [online]. 2020, **10**(49), 29202–29213. ISSN 2046-2069. Available at: doi:10.1039/D0RA04074F

- [60] NIINEMETS, ü. and F. VALLADARES. Photosynthetic Acclimation to Simultaneous and Interacting Environmental Stresses Along Natural Light Gradients: Optimality and Constraints. *Plant Biology* [online]. 2004, **6**(3), 254–268. ISSN 1435-8603. Available at: doi:10.1055/s-2004-817881
- [61] ORT, Donald R. When There Is Too Much Light. *Plant Physiology* [online]. 2001, **125**(1), 29–32. ISSN 1532-2548. Available at: doi:10.1104/pp.125.1.29
- [62] JALAL, K.C.A., A.A. SHAMSUDDIN, M.F. RAHMAN, N.Z. NURZATUL and M. ROZIHAN. Growth and Total Carotenoid, Chlorophyll a and Chlorophyll b of Tropical Microalgae (*Isochrysis* sp.) in Laboratory Cultured Conditions. *Journal of Biological Sciences* [online]. 2012, **13**(1), 10–17. ISSN 17273048. Available at: doi:10.3923/jbs.2013.10.17
- [63] MUÑOZ-HUERTA, Rafael, Ramon GUEVARA-GONZALEZ, Luis CONTRERAS-MEDINA, Irineo TORRES-PACHECO, Juan PRADO-OLIVAREZ and Rosalia OCAMPO-VELAZQUEZ. A Review of Methods for Sensing the Nitrogen Status in Plants: Advantages, Disadvantages and Recent Advances. *Sensors* [online]. 2013, **13**(8), 10823–10843. ISSN 1424-8220. Available at: doi:10.3390/s130810823
- [64] VASILE, Cornelia, Daniela PAMFIL, Maria RÂPĂ, Raluca Nicoleta DARIE-NIȚĂ, Amalia Carmen MITELUT, Elena Elisabeta POPA, Paul Alexandru POPESCU, Mihaela Cristina DRAGHICI and Mona Elena POPA. Study of the soil burial degradation of some PLA/CS biocomposites. *Composites Part B: Engineering* [online]. 2018, **142**, 251–262 [accessed. 2022-05-01]. ISSN 1359-8368. Available at: doi:10.1016/J.COMPOSITESB.2018.01.026
- [65] KARAMANLIOGLU, Mehlika and Geoffrey D. ROBSON. 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* [online]. 2013, **98**(10), 2063–2071 [accessed. 2022-05-01]. ISSN 0141-3910. Available at: doi:10.1016/J.POLYMDEGRADSTAB.2013.07.004
- [66] SHARMA, Parveen K., Nisha MOHANAN, Ravinder SIDHU and David B. LEVIN. Colonization and degradation of polyhydroxyalkanoates by lipase-

producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 2019, **65**(6), 461–475. ISSN 0008-4166. Available at: doi:10.1139/cjm-2019-0042

## 7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

PET	Polyethylentereftalát
PE	Polyethylen
PHA	Polyhydroxyalkanoát
PLA	Polyester kyseliny mléčné
skPLA	Semikrystalický polyester kyseliny mléčné
aPLA	Amorfní polyester kyseliny mléčné
SCL-PHA	PHA s krátkými řetězci monomerů (z angl. Short-chain-length PHA)
MCL-PHA	PHA se středně dlouhými řetězci monomerů (z angl. Medium-chain-length PHA)
LCL-PHA	PHA s dlouhými řetězci monomerů (z angl. Long-chain-length PHA)
P3HB	Poly-3-hydroxybutyrát
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop (z angl. scanning electron microscopy)
DDGS	Sušené lihovarnické výpalky
CTS	Klimatické testovací stanice
SBB	Bioplasty na bázi škrobu (z angl. starch based bioplastics)
SEC	Gelová permeační chromatografie
ELISA	Metoda ke kvantitativnímu stanovení antigenů (z angl. enzyme-linked immunosorbent assay)

## 8 PŘÍLOHY

### 8.1 Obsah destičky Biolog EcoPlates™

Tabulka 8: Uhlíkové složení EcoPlates™

	1	2	3	4
A	voda	B-metyl-D-glukozid	D-galaktono- $\gamma$ -lakton	L-arginin
B	metylester kyseliny pyrohroznové	D-xyloza	D-galakturonová kyselina	L-asparagin
C	Tween 40	i-erytritol	2-hydroxybenzooová kyselina	L-fenylalanin
D	Tween 80	D-manitol	4-hydroxybenzooová kyselina	L-serin
E	$\alpha$ -cyklodextrin	N-acetyl-D-glukozamin	$\gamma$ -aminobutánová kyselina	L-treonin
F	glykogen	D-glukozaminová kyselina	itakonová kyselina	glycyl-L-glutamová kyselina
G	D-celobioza	glukoza-1-fosfát	$\alpha$ -ketobutánová kyselina	fenyletylamin
H	$\alpha$ -D-laktoza	D,L- $\alpha$ -glycerofosfát	D-jablečná kyselina	putrescin

### 8.2 Složení králičího krmiva

- Vojtěšková moučka (41, 5%)
- Pšeničné otruby (22, 5%)
- Sladové klíčky (15%)
- Ječmen (8, 5%)
- Ovesné otruby (6%)
- Melasa z cukrové řepy
- Uhličitan vápenatý
- Chlorid sodný
- Monokalciumfosfát