

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Pavel Hušek

Biodegradace nových typů lehčených polyuretanů v různých environmentálně relevantních mikrokosmech

Biodegradation of new types of lightweight polyurethanes in different environmentally-relevant microcosms

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Innemanová, Ph.D.

Praha, 2021

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

Podpis

Poděkování

V první řadě bych chtěl poděkovat své školitelce RNDr. Petře Innemanové, Ph.D. za její čas, obrovskou ochotu a skvělou spolupráci. Dále děkuji spolužačkám z magisterského studia za podporu při studiu, především pak Janě Esterlové a Kateřině Pražanové za pomoc při laboratorní činnosti a cenné rady během tvorby práce. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat svým rodičům za podporu, kterou mi při studiu poskytli.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	11
2.1. Polyuretany.....	11
2.1.1. Biodegradace plastů.....	14
2.1.2. Biodegradace polyuretanů.....	15
2.2. Metody určování biodegradability plastů v půdě.....	20
2.2.1. Ukazatele degradace materiálu.....	20
2.2.2. Normované metodiky.....	22
2.3. Metody identifikace a stanovení mikroorganismů v biodegradačních studiích.....	24
2.4. Vlastnosti půd z pohledu biodegradace polyuretanů.....	25
3. Cíle a hypotézy.....	27
4. Metodika.....	28
4.1. Použité chemikálie a laboratorní technika.....	28
4.1.1. Chemikálie a materiály.....	28
4.1.2. Laboratorní technika.....	28
4.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě.....	28
4.2.1. Charakteristika testovaného materiálu.....	29
4.2.2. Analýza použitých půd.....	30
4.2.3. Stanovení biodegradace.....	30
4.3. Stanovení obsahu fosfolipidových mastných kyselin.....	31
4.3.1. Extrakce lipidů.....	31
4.3.2. Frakcionace lipidů.....	32
4.3.3. Transterifikace.....	32
4.3.4. Vyhodnocení obsahu mastných kyselin.....	33
4.4. Statistické zpracování dat.....	33
5. Výsledky.....	34
5.1. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě.....	34
5.2. Výsledky stanovení fosfolipidových mastných kyselin.....	36
6. Diskuze.....	41
7. Závěr.....	44
8. Zdroje.....	45
9. Přílohy.....	52

Abstrakt

Diplomová práce se zabývá novým typem lehčené polyuretanové pěny (PUR), která byla připravena za účelem dosažení biodegradovatelnosti dle současně platných norem biodegradovatelnosti plastových materiálů. Materiál má předpokládané využití jako nosič pro pachové odpuzovače zvíře v zemědělské krajině, kde by po skončení životnosti materiál mohl být ponechán samovolnému rozkladu v půdním prostředí.

Testovaný materiál PUR BIO-10 byl podroben testu biodegradovatelnosti dle standardizované metody ASTM D5988-03 v laboratorních mikrokosmech. Biodegradovatelnost byla testována ve dvou opakováních a dvou odlišných půdních prostředích – lesním a polním, která byla vybrána s ohledem na předpokládané budoucí využití materiálu jakožto pachového ohradníku. Dle metodiky byla biodegradovatelnost měřena jako mineralizace materiálu záchytem oxidu uhličitého. Byly provedeny dva experimenty s odlišným nastavením – během prvního experimentu byl materiál vpraven přímo do půdy a během druhého experimentu byl materiál uzavřen v litterbagu, aby nedocházelo k jeho kontaminaci půdou, která způsobovala problémy v dalších analýzách. V případě prvního experimentu byla po 90 dnech naměřena mineralizace materiálu v lesní půdě $10,65 \pm 2,54 \%$ a $20,48 \pm 9,18 \%$ v půdě polní; v druhém experimentu byla po 32 dnech naměřena v lesní půdě míra rozložení materiálu $3,88 \pm 3,42 \%$ a v půdě polní $8,96 \pm 1,79 \%$. V tomto opakování je rozdíl rozložitelnosti mezi půdami statisticky signifikantní.

Po skončení biodegradačního testu byly z testovaných půd vyjmuty testované materiály a podrobeny analýze fosfolipidových mastných kyselin (analýza PLFA). Výstupem této analýzy je přehled skupin mikroorganismů, které se v době extrakce nacházely v biofilmu na materiálu a pravděpodobně se tak účastnily jeho rozkladu. Během prvního experimentu byly materiály ponechány přímo v půdě a po statistickém vyhodnocení dat analýzy PLFA se soubory lesní a polní půdy od sebe statisticky nelišily. Během druhého experimentu byly materiály uchovány v litterbagu, který měl zabránit kontaminaci testovaného materiálu půdou a zkreslení výsledků analýzy PLFA. Po vyhodnocení výsledků PLFA z druhého pokusu byla zjištěna větší participace mikrobiálního společenstva v lesní půdě – konkrétně zástupců hub, které se v souboru dat statisticky významně lišily.

Klíčová slova: lehčené polyuretany, biodegradace, PLFA, mikrobiální společenstva

Abstract

Presented diploma thesis focuses on a new type of lightweight polyurethane foam (PUR), which has been manufactured with the intention of it being biodegradable within currently valid norms on biodegradation of plastic materials. The future use of said polyurethane foam is as carrier for odor repellent to avoid wildlife-vehicle collisions in agriculture landscape, where, after the end of its lifespan it could be left to biodegrade in soil the environment.

The examined material, PUR BIO-10, was tested for biodegradability in laboratory microcosms according to standardized method ASTM D5988-03. Biodegradability was tested in two separate soil types – forest soil and agricultural soil, which have been selected with the future use of the material in mind. According to the method biodegradability was measured as mineralization of the material by capturing evolved carbon dioxide. Two trials with different treatments were executed. In the first trial the material was introduced directly into the soil and in the second trial the material was tested in a litterbag to avoid soil contamination which was problematic for further analysis. During the first trial, after 90 days, the mineralization of polyurethane foam was 10.65 ± 2.54 % in the forest soil and 20.48 ± 9.18 % in the agricultural soil. During the second trial, after 32 days, the mineralization was 3.88 ± 3.42 % in the forest soil and 8.96 ± 1.79 % in the agricultural soil. In the second trial the difference between the soils was statistically significant.

After the end of the biodegradation experiments the tested material was extracted from the microcosms and further tested with analysis of phospholipid fatty acids (PLFA analysis). Said analysis is used for screening of microbial communities and specifically in this case it should provide information about which groups of microbial community have been present on the tested material during extraction and presumably participated in the biodegradation. During the first trial the tested material was placed directly into the soil and after data evaluation the forest and agricultural soil samples did not differ in their microbial community composition. During the second trial the material was kept in a litterbag, which was used as a protection of the material from contamination by soil, which could cause a distortion of results from the PLFA analysis. After the second trial data evaluation it was found that the forest soil microbial community, especially fungi, have been statistically significantly more present on the tested material.

Key words: lightweight polyurethanes, biodegradation, PLFA, microbial communities

Seznam zkratk

ANOVA – Analýza variance

ASTM – Americká společnost pro testování materiálů (z angl. American Society for Testing and Materials)

EPFR - environmentálně persistentní volné radikály (z angl. Environmental persistent free radicals),

EU – Evropská Unie

FT-IR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (z angl. Fourier transform infrared spectroscopy)

GWP – potenciál globálního oteplování (z angl. Global Warming Potential)

ISO – Mezinárodní organizace pro standardizaci (z angl. International Organization for Standardization)

LCA – Analýza životního cyklu (z angl. Life Cycle Assessment)

NCBI – Národní centrum pro biotechnologické informace (z angl. National Centre for Biotechnology Information)

NIPU – polyuretan připravený bez isokyanátu (z angl. Non isocyanate polyurethane)

OECD – Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)

PLFA – Fosfolipidové mastné kyseliny (z angl. Phospholipid Fatty Acids)

SEM – Skenovací elektronové mikroskopie

SPE – Extrakce na pevné fázi (z angl. Solid phase extraction)

UV – Ultrafialové záření (z angl. Ultra violet)

1. Úvod

O plastech se hovoří od počátku 20. stol, kdy v roce 1907 Leo Baekeland vytvořil materiál bakelit, který se stal prvním masově vyráběným plastem a odstartoval tak éru plastů, ve které nyní žijeme (ACS.org, 1993). Plasty jsou v posledních desetiletích materiálem, který se stal díky svým vlastnostem a téměř nekonečné modifikovatelnosti nenahraditelným pro každodenní život nás všech a de facto pro každé průmyslové odvětví. Nicméně s tímto obrovským nástupem jejich užívání se plasty staly nejpálčivějším problémem odpadového hospodářství – kvůli jejich špatné rozložitelnosti a obecně velké odolnosti vůči vlivům okolního prostředí. Každoročně se produkce plastů zvyšuje a v roce 2019 celosvětová produkce plastů dosáhla 368 milionů tun a z toho jsou pouze 4 miliony tun plasty, které se klasifikují jako biodegradabilní nebo vytvořené z přírodních zdrojů (tzv. „bio-based“) – tedy cca 1 % (Nielsen et al., 2020). Evropská produkce plastů v roce 2019 dosáhla 57,9 milionů tun, meziročně od roku 2018 se nicméně jednalo o malý pokles z 61,8 milionů tun. Obecně je Evropská Unie s plastovou politikou a plastovým odpadem světovým lídrem – snižuje poptávku po plastových materiálech, snižuje export plastového odpadu, státy EU zvyšují míru recyklace a energetického využití. Nicméně v České republice je stále nejčastějším odbytištěm plastového odpadu skládkování (PlasticsEurope, 2020). Z celosvětového hlediska jsou plasty velkým problémem a je odhadováno, že dochází k recyklaci pouze zhruba 14 % plastového odpadu. Nejznámějším problémem spojeným s plastovým odpadem je zcela jistě znečištění oceánů, kterému je i ve vědecké komunitě věnována zdaleka největší pozornost. V posledních letech je skloňováno i téma mikroplastů – jejichž nejzkoumanějšími zástupci jsou produkty osobní péče a mikroplasty z textilních vláken (Nielsen et al., 2020).

Polyuretany jsou relativně populárním materiálem a v evropské poptávce jsou na 5. místě s 7,9 % ze všech poptávaných plastů. Jsou vysoce vyhledávanou surovinou napříč průmyslovými odvětvími – např. jako pěnové materiály do sedaček automobilů, matrací a polštářů, jako přídavek do postřiků a impregnací, jako vlákna pro výrobu oblečení, jako balící fólie, jako široké spektrum izolačních pěn, jako antikoroziční nátěry a postřiky pro lodě a celá řada dalších užití (Akindoyo, et al., 2016, PlasticsEurope, 2020). Zajímavou aplikací je použití v medicíně, kde díky dobré biokompatibilitě s lidskou tkání mohou být polyuretany používány např. jako aditivum do zubních výplní nebo při léčbě zlomenin (Alves et al., 2014).

Jednou z možností využití polyuretanů je výroba pěnových pachových ohradníků pro použití v zemědělské krajině, kde, pokud by se zajistila biodegradovatelnost materiálu, by se po skončení jejich životnosti mohly ponechat v půdním prostředí přirozenému rozkladu. Jedná se o jedno z vhodných využití biodegradovatelných plastů, které kvůli svým vlastnostem nemohou vstupovat do konvenčního toku nakládání s odpady a recyklace a jsou tak vhodné zejména pro specifické aplikace kupříkladu v zemědělství (mulčovací fólie) nebo medicíně (kapsule na léky) (Brodhagen et al., 2014, Shen et al., 2020).

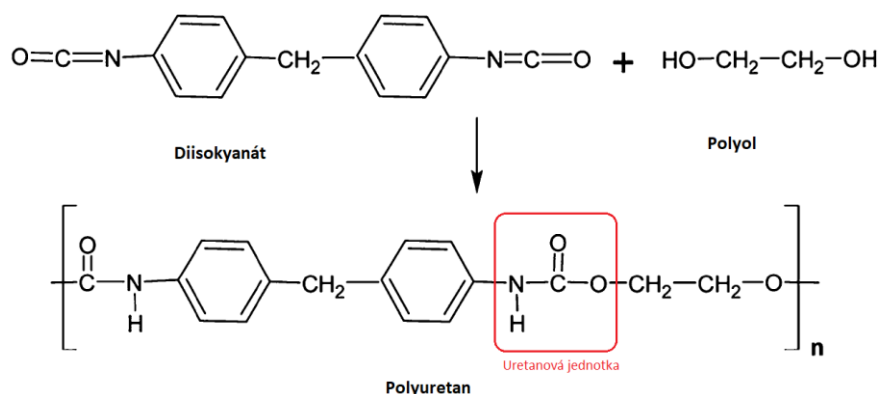
V půdním prostředí je složení a stav mikrobiální komunity klíčovým ukazatelem kvality půdy a introdukce plastů, potencionálních mikroplastů nebo látek, které mohou vznikat při rozkladu biodegradovatelných plastů, by mohla toto složení ovlivnit a mít tak negativní dopad na půdní vlastnosti a funkce (Zhang, B. et al., 2020). Vhodnou a častou užívanou metodou pro zjištění složení a charakterizaci půdního mikrobiálního společenstva bez nutnosti kultivace mikroorganismů je metoda PLFA – Analýza fosfolipidových mastných kyselin (Frostegård, et al., 2011). Byly pozorovány druhy půdních bakterií a hub, které používaly polyuretan jako svůj jediný zdroj uhlíku (Barratt et al., 2003, Shah et al., 2008a) a existuje tedy předpoklad, že půdní mikroorganismy se biodegradace polyuretanového pachového ohradníku budou účastnit.

2. Teoretická část

2.1. Polyuretany

Polyuretany (PURy) jsou skupinou polymerních materiálů, pro kterou je typická jejich značná multifunkčnost a velká škála využití napříč různými odvětvími průmyslu. Polyuretan poprvé syntetizoval německý vědec Otto Bayer v roce 1937 reakcí diisokyanátu a polyesterového diolu. Polyuretan ihned našel využití v celé škále aplikací zejména za druhé světové války – např. jako přídavek do impregnačních směsí, které chránily před korozí a bojovými plyny. Později během 50. let 20. století se začaly vyrábět i polyuretanové pěny, které ihned našly celou řadu využití a staly se jednou z nejčastěji užívaných forem tohoto polymeru. V dnešní době polyuretanové pěny tvoří více než 50 % celkové výroby polyuretanů (Akindoyo et al., 2016).

Výroba polyuretanů se od jejich objevení příliš nezměnila, jedná se o reakci diisokyanátu a libovolného polyolu za vzniku polyuretanu (viz obrázek č. 1). Do této základní reakce pak vstupuje velká řada aditiv, díky nimž pak výsledný materiál získává požadované specifické vlastnosti a které se pak na výsledné chemické podobě polyuretanu projeví ve formě funkčních skupin (Rahman et al., 2019).



Obrázek č. 1 – Základní schéma výroby polyuretanů (upraveno dle Rahman et al., 2019)

U isokyanátů se v současné době při výrobě polyuretanů využívají hlavně diisokyanáty s aromatickým jádrem, které jsou značně levnější surovinou oproti ostatním formám isokyanátů, ale s rizikem toho, že výsledný materiál může časem zažloutnout (Rahman et al., 2019). Při výrobě isokyanátů je používán prudce jedovatý plyn fosgen a samotné isokyanáty jsou taktéž velmi toxické – zejména pak dva z nejpoužívanějších isokyanátů (TDI a MDI viz tabulka č. 1) jsou vedeny v kategorii „CMR“ tedy látky karcinogenní, mutagenní a toxické pro reprodukci (Suryawanshi et al., 2019). Výzkum se výrobou environmentálně šetrných isokyanátů příliš nezabývá, nicméně existují i studie, ve kterých autoři syntetizovali isokyanáty z přírodních zdrojů. V roce 2008 připravili Çaylı et al., isokyanáty bromací triglyceridů ze sójového oleje, které následně nechali zreagovat s isokyanatanem stříbrným za vzniku isokyanátů. Jednalo se tehdy o první dokumentovaný isokyanát z přírodního zdroje. Další možností je nahrazení isokyanátů ve výrobě polyfunkčními cyklickými karbonáty. Jedná se o látky, které lze připravit i z přírodních olejů (např. lněného) a které při syntéze polyuretanů reagují s di- a polyaminy za vzniku PUR. Chemicky se jedná o heterocyklické sloučeniny s atomy kyslíku podobné komerčním látkám např. ethylenkarbonátu (Blattmann et al., 2014).

Polyoly, které jsou druhou vstupní surovinou při výrobě polyuretanů lze rozdělit dle chemických vazeb v jejich struktuře na dvě hlavní skupiny– i) polyestery a ii) polyethery. Použití jedné nebo druhé skupiny má vliv mimo jiné i na biodegradaci vlastnosti polyuretanu. Polyetherové polyuretany jsou zpravidla hůře biodegradovatelné (Darby a Kaplan, 1968). Další častou uvažovanou proměnnou při použití polyolů je jejich molekulární hmotnost – lehčí polyoly se používají pro syntézu tvrdších, tužších polyuretanů, zatímco těžší polyoly pro syntézu poddajnějších a pružnějších materiálů (Akinydoyo et al., 2016). Polyoly nejsou tak nebezpečné a toxické jako isokyanáty, ale při jejich výrobě se používají mj. epoxypropan a epoxyethan, což jsou látky jednak toxické a jednak pochází z fosilních zdrojů (Khatoon et al., 2021). Proto i v případě polyolů existují snahy o jejich environmentálně šetrnou výrobu a existuje řada studií, kde vědci připravili různé druhy polyolů z různých přírodních olejů – např. ze sojového oleje (Özşeker et al., 2019), slunečnicového oleje (Kahlerras et al., 2020) nebo palmového oleje (Marcovich et al., 2017). Tento trend se snažila objektivně zhodnotit nová LCA studie zaměřená právě na tyto druhy polyolů – konkrétně na polyoly z řepkového oleje. Ve studii vyšly řepkové polyoly, ve srovnání s petrochemicky připravenými polyoly, značně lépe co se týče GWP dopadů výroby jako takové, nicméně po započtení všech externalit výroby řepkových polyolů – např. degradace půdy, ekotoxicita pro půdní a vodní prostředí, eutrofizace a dalších, se řepkové polyoly tak jednoznačně jako lepší řešení nejeví (Fridrison et al., 2020).

V posledních letech je velká snaha o výrobu environmentálně šetrnějších polyuretanů. Výzkum se zaměřuje zejména na kombinaci výroby bez užití isokyanátu, vznikají tzv. NIPU (non isocyanate polyurethane) a s použitím polyolů z přírodních zdrojů. Pokud se zaměříme konkrétně na polyuretanové pěny, je tato výroba poněkud složitější, protože v klasické výrobě s isokyanáty vzniká oxid uhličitý, který dále způsobuje „napěnění“ materiálu a vznik polyuretanové pěny (Khatoon et al., 2021). Existují ale i alternativní přípravy environmentálně šetrných polyuretanových pěn. Němečtí vědci z univerzity Freiburg ve své studii navrhli všestranný proces výroby polyuretanových pěn na přírodní bázi; reakcí polyglycidových etherů trimethylolpropanu a ethoxylovaného trimethylpropanu s hexametyldiaminem v přítomnosti nadouvadla na bázi hydrofluorovaného uhlovodíku s obchodním názvem Solkane 365, které je nehořlavé a nemá vliv na ozónovou vrstvu (Mülhaupt et al., 2016).

Tabulka č. 1 – Nejčastěji používané polyoly a isokyanáty při výrobě polyuretanů
(upraveno dle Akindoyo et al., 2016 a Rahman et al., 2019)

Látka	Struktura
Isokyanát	
4,4'-Metylenbis(fenyl isokyanát), MDI	
Toluen 2,4-diisokyanát, TDI	
Isofron diisokyanát, IPDI	
4,4'-Metylenbis(cyklohexyl isokyanát), HMDI	
Hexametylen diisokyanát, HDI	
Polyol	
Polyether	$\text{H} - [\text{O} - \text{R} - \text{O} - \text{R}]_n - \text{O} - \text{R} - \text{OH}$
Polyester	
Polykarbonát	
Polyakrylát	
Polybutadien diol	

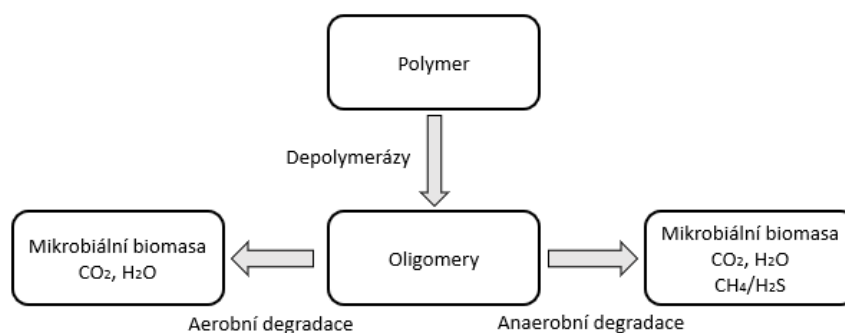
Nejčastěji užívané isokyanáty a polyoly jsou uvedeny v tabulce č. 1. Záměna těchto vstupních surovin má značný dopad jednak na vlastnosti výsledného materiálu a jednak na jeho biodegradovatelnost (Howard, 2002).

Užitím různých vstupních surovin lze ovlivnit ve výsledném polyuretanu podíl tzv. měkkých a tuhých segmentů. Tuhé segmenty vznikají na místech ve struktuře polyuretanu, kde se nachází isokyanát a dle jejich množství ve výsledném materiálu ovlivňují zejména odolnost vůči nárazu, tuhost, tvrdost nebo sílu v tahu. Měkké segmenty jsou pak spojeny s polyoly a vlastnostmi jako pružnost nebo zvýšenou mírou absorpce vody (Urgun-Demirtas, 2007). Vhodným spojováním a správným poměrem těchto segmentů pak vznikají polyuretanové pěny (Rahman et al., 2019).

2.1.1. Biodegradace plastů

Biodegradace plastů je jedním z možných řešení problému s plastovým odpadem. Jedná se o proces rozkladu plastových polymerů za účasti organismů, které pomocí enzymů štěpí složité makromolekuly na jednodušší a menší části, které se tím stanou náchylnější k další degradaci (Bhradwaj et al., 2012). Klíčovými organismy pro biodegradaci plastů jsou mikrobiální houby a bakterie, které se vyskytují v zásadě v každém prostředí, ve kterém se může vyskytnout i plastový odpad. Řada studií zkoumá biodegradaci plastů právě mikroorganismy, které lze získat izolací ze životního prostředí (Khan et al., 2017), koupit jako mikrobiální inokulum (Gautam et al., 2007) nebo lze zkoumat i vysoce specializované mikroorganismy např. izolací z půdy skládek plastového odpadu (Shah, A. A. et al., 2008a) nebo ze střevní mikroflóry larev hmyzu (Zhang, J. et al., 2020). Ve všech těchto studiích je pak právě analýza enzymatické aktivity a enzymů obecně jedním z důležitých závěrů. Konkrétní enzymy interagují se specifickými substráty, proto se dá v obecné rovině říct, že každý typ plastu degraduje jiný, pro něj specifický enzym. U plastů se pak nejčastěji zkoumají tzv. depolymerázy, které pomáhají štěpit makromolekuly polymerů (Bhradwaj et al., 2012).

Průběh biodegradace plastů lze pozorovat různými metodami – např. ztráta síly v tahu, mikroskopická pozorování pomocí skenovací elektronové mikroskopie (SEM), úbytek hmotnosti aj (Amobonye et al., 2021). Vybrané ukazatele biodegradace se vztahem k polyuretanu jsou podrobněji popsány v kapitole 2.2.1. Samotný biodegradací proces se dá rozdělit do několika postupných kroků. Biodeteriorace (změna fyzikálněchemických vlastností polymeru), biofragmentace (rozpad polymeru na menší fragmenty enzymatickým štěpením), asimilace mikroorganismy a v poslední fázi mineralizace tj., produkce anorganických produktů rozkladu – CO_2 , H_2O případně $\text{CH}_4/\text{H}_2\text{S}$ pokud biodegradace probíhala v anaerobním prostředí (Pathak, 2017).



Obrázek č. 2 – Schematické znázornění degradace polymerů v aerobním / anaerobním prostředí (upraveno dle Gu, 2003)

Biodeteriorace je prvním krokem biodegradace plastů a začíná momentem, kdy dojde k přichycení mikroorganismů na povrch plastu, kde dále žijí a používají polymer jako zdroj uhlíku (Amobonye et al., 2021). V případě bakterií pak často dochází na povrchu plastu k tvorbě biofilmu, který je dále vhodným prostředím pro život bakterií a pomáhá jim zůstat přichycené na povrchu materiálu (Pathak, 2017). V případě hub dochází k přichycení pomocí hyf, které mechanicky pronikají do plastu (Sánchez, 2020). Druhým krokem biodegradace je proces biofragmentace, při které dochází

k depolymerizaci plastu enzymaticky katalyzovaným štěpením. Tím je nejčastěji hydrolýza glykosidových, esterových nebo peptidových vazeb plastu (Amobonye et al., 2021).

Třetím krokem je asimilace, při které dochází k transportu menších, lehčích produktů štěpení z biofragmentace do cytoplazmy mikroorganismů. Transportní mechanismy mohou být jak aktivní tak pasivní a od sebe se liší v závislosti na druhu mikroorganismu a transportovaného produktu štěpení. Následuje proces mineralizace, při které vznikají anorganické produkty rozkladu biochemickými procesy uvnitř buněk mikroorganismů (Amobonye et al., 2021).

Proces biodegradace je při komerčním užití v procesech nakládání s odpady velmi zdoluhavý a nežádoucí trvá několik měsíců až let (Amobonye et al., 2021). Což dokládají i metodiky, které se biodegradací plastů zabývají např. EN 17033 – metodika zaměřená na polyetylenové mulčovací fólie vyhodnocuje biodegradabilitu až po 2 letech. Existuje proto snaha o výrobu více environmentálně šetrných plastů např. nahrazením vstupních surovin za netoxické (Mülhaupt et al., 2016) nebo založené na nefosilních zdrojích (Kahlerras et al., 2020) případně urychlení biodegradace přípravou plastů se specifickými aditivami -např. pro-oxidačními, které urychlují procesy degradace materiálu (Agamuthu et al., 2005).

2.1.2. Biodegradace polyuretanů

Biodegradace polyuretanů je komplexní proces, který vychází z obecných základních kroků biodegradace plastů popsaných v kapitole 2.1.1. Spolu s procesy biodegradace probíhají i procesy degradace fyzikálně-chemické, které mají taktéž důležitou roli hlavně během prvních stádií degradace, kdy napomáhají rozpadu polymeru na menší jednotky tzv. oligomery nebo jinak narušují stavbu polymeru a činí jej tak více náchylným k působení biodegradace. Mezi tyto procesy patří hlavně fotodegradace UV (ultra-fialovými) složkami slunečního záření, mechanická degradace, termální degradace a oxidativní degradace (Singh a Sharma, 2008). Další neméně důležitou složkou jsou faktory prostředí, ve kterém biodegradace probíhá s ohledem na složení a celkovou kondici mikrobiálního společenstva, které vyžaduje ke správnému fungování konkrétní podmínky. Jedná se zejména o parametry jako je vlhkost prostředí, teplota, přítomnost nebo naopak nepřítomnost kyslíku, pH nebo dostatek živin (Artham a Doble, 2008). Přítomnost kyslíku pro biodegradaci polyuretanových pěn se pak zdá být klíčová, např. tým Urgun-Demirtas et al., 2007 při biodegradčních pokusech na polyuretanové pěně v anaerobním prostředí nezaznamenal žádnou biodegradční aktivitu.

Pro biodegradaci polyuretanu je pak nejdůležitější proces enzymaticky katalyzované depolymerizace, při které dochází ke štěpení polymerů na jednotlivé mono- nebo dimery, příp. jiné dostatečně malé části, které mohou projít membránou mikroorganismů a být dále rozloženy intracelulárními enzymy a použity jako zdroj uhlíku (Shah et al., 2008b). Samotný materiál je pak různě odolný k biodegradaci na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Jednou z důležitých vlastností je krystalinita polymeru, kterou v případě polyuretanu ovlivňuje typ a množství použitých

polyolů a isokyanátů. Isokyanáty, především ty s aromatickým jádrem, tvoří ve výsledném polymeru oblasti s vyšší krystalinitou, tzv. tuhé segmenty. S vyšším podílem těchto tuhých segmentů klesá biodegradabilita materiálu (Mahajan a Gupta, 2015). Existuje pak celá řada fyzikálně-chemických faktorů, které ovlivňují biodegradabilitu. Mezi hlavní faktory patří; i) molekulární hmotnost a velikost molekul obecně, kdy těžší a větší polymery degradují hůře; ii) chemická struktura polymeru, tj. množství a typ funkčních skupin a vazeb, kde podle typu a umístění se dopad na degradaci může lišit; iii) aditiva, která se do polymerů mohou přidávat a jejichž efektem je větší odolnost vůči biodegradaci; iv) hydrofilicita povrchu materiálu, která je klíčová pro přístupnost materiálu pro mikroorganismy (Amobonye et al., 2021, Singh a Sharma, 2008).

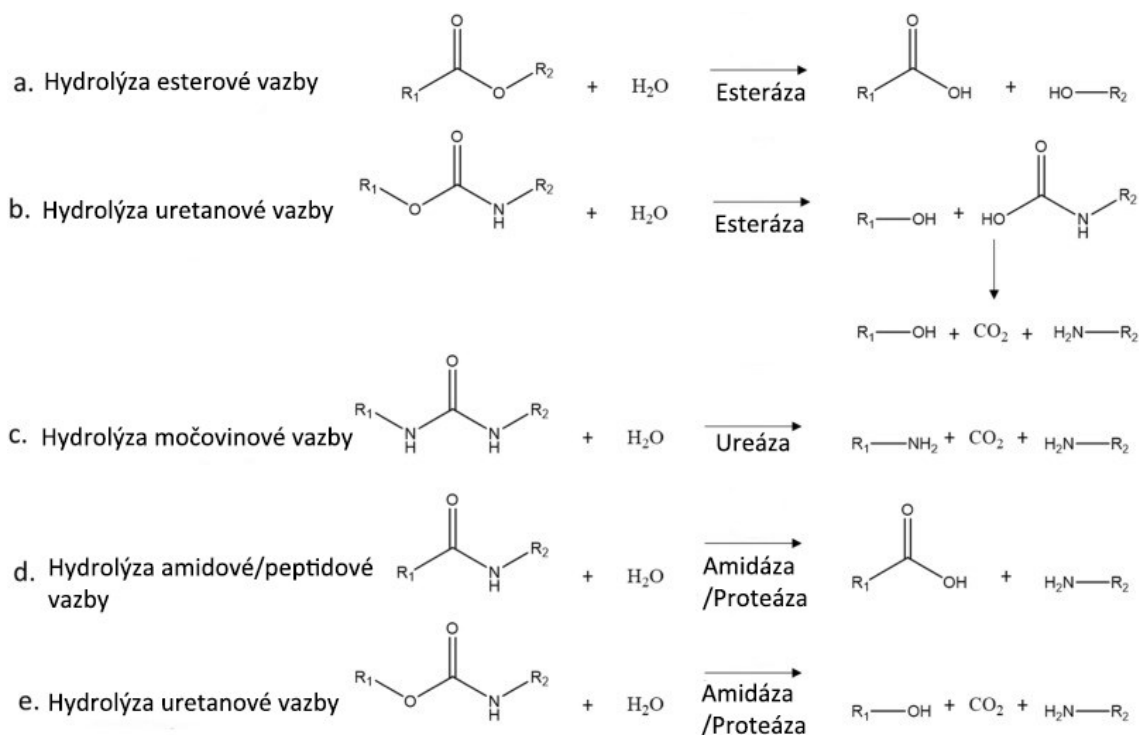
Chemická struktura, zejména pak složení vazeb v rámci polyuretanové jednotky, je klíčová pro biodegradaci polyuretanů. Polyuretany lze rozdělit na dvě hlavní skupiny, a to polyetherové PURy a polyesterové PURy. Oba typy vazeb lze mít i v různých poměrech zastoupené v rámci jednoho materiálu. Typ vytvořených vazeb závisí především na zvoleném vstupním polyolu (Mahajan a Gupta, 2015). Polyetherové PURy jsou všeobecně daleko hůře biodegradovatelné a to zejména z toho důvodu, že etherová vazba není tak náchylná k hydrolytickému štěpení jako vazba esterová (Gautam et al., 2007; Howard, 2002).

Dva hlavní mechanismy pro biodegradaci polyuretanů jsou i) biologická oxidace a ii) biologická hydrolýza. Oxidační mechanismus je spojován spíše s degradací polyetherových PUR konkrétně jejich měkkých segmentů. Součástí tohoto mechanismu jsou pak reaktivní formy kyslíku – kyslíkové radikály (Christenson et al., 2004), které se za běžných podmínek v půdním prostředí vyskytují výjimečně, nicméně v posledních letech s popularizací hnojení biouhlím se mohou vyskytovat i v polní půdě, která je biouhlím ošetřena. Biouhlí může obsahovat tzv. environmentálně persistentní volné radikály (EPFR), které mají podobu kov-radikál komplexních sloučenin a ty mohou v půdě pak zapříčinit vznik mj. i reaktivních forem kyslíku (Odinga et al., 2020). Nicméně oxidační mechanismus u polyesterových PUR nebyl příliš zkoumán, protože se u nich ve velké míře aplikuje převážně mechanismus hydrolytického štěpení (Nakajima-Kambe et al., 1999).

Loreda-Treviño et al. v roce 2012, ve své studii zmiňují, že velkou část štěpení manifestují enzymy, konkrétně depolymerázy. Ty se dají rozdělit na dva hlavní druhy: extracelulární a intracelulární. Extracelulární enzymy se účastní rozkladu na povrchu plastu, který narušují a štěpí a intracelulární enzymy se uplatňují uvnitř mikroorganismu, kdy už dochází k mineralizaci polymerních skupin. Po zapojení enzymu do štěpení proběhnou typicky dva kroky – v prvním kroku se enzym naváže na polymer a ve druhém kroku katalyzuje hydrolytické štěpení. Podmínkou pro úspěšné štěpení je přítomnost nějaké hydrolázy, ta v případě biodegradace polyuretanů může být ve formě proteázy, esterázy nebo ureázy (Loreda-Treviño et al., 2012).

Na obrázku č. 3 lze vidět typy vazeb a jejich štěpení za přítomnosti konkrétního enzymu. Nejčastěji při biodegradaci dochází k hydrolýze esterové vazby dle reakce (a), což je také typ, na který se zaměřuje většina studií, jelikož velká část studií zkoumá

právě polyesterové polyuretany viz Tabulka č. 2. Esteráza je nejčastěji zmiňovaným enzymem při biodegradaci polyuretanů, nicméně při degradaci se mohou uplatnit i další enzymy jako proteáza, amidáza nebo ureáza (Magnin et al., 2020). Oszagirogolu et al., 2012, zkoumali vliv tří enzymatických koktejlů na komerčně prodáváný polyuretan a laboratorně připravený polyuretan. Jako nejefektivnější směs se ve studii ukázala kombinace enzymů esterázy a proteázy, v jejímž prostředí po 70 dnech vykazoval komerčně prodáváný polyuretan největší degradaci. Spolupráci dvou enzymů zkoumali také Magnin et al., 2019b, kteří se zabývali degradací polyuretanu 50ti komerčně dostupnými enzymy – 47 esterázami a 3 amidázami. Polyuretan nechali po dobu 51 dní v přítomnosti enzymů případně jejich směsí. Na konci experimentu kombinace enzymů esterázy (E3567) a amidázy (E4143) vykazovala větší degradaci uretanových vazeb než vzorky, na které působily jednotlivé enzymy samostatně. Autoři se domnívají se, že při degradaci nejprve dojde ke štěpení makromolekul esterázou na menší molekuly, u kterých dále štěpí uretanové vazby amidáza.



Obrázek č. 3 – Místa štěpení polyuretanů v závislosti na typu enzymu a typu vazby (upraveno dle Magnin et al., 2020)

Studii, které se zabývají biodegradací polyuretanů, je velká řada. Nicméně, vzájemné porovnání studií je velmi složité, jelikož se testované polyuretany často liší vstupními surovinami pro jejich výrobu a nelze tak zajistit jejich srovnatelnost (Shah et al., 2008b). Vědecké práce by se daly rozdělit na dvě hlavní skupiny a to práce, které zkoumají biodegradaci za přítomnosti bakterií a práce, ve kterých biodegradace probíhá za přítomnosti mikroskopických hub. Gary Howard a jeho výzkumný tým, který se zabývá bakteriální biodegradací polyuretanů již od 90. let 20. století, v roce 2012 izoloval z půdy gramnegativní bakterii *Acinetobacter gernerii*, u které zaznamenal růst na čistém polyuretanu jako jediném zdroji uhlíku. Dále u ní pozoroval enzym, který se

funkčně podobal enzymu polyuretanáza tj. extracelulárnímu enzymu podobnému esteráze, který již dříve identifikoval u bakterií rodu *Pseudomonas* a díky kterému tento rod polyuretany degraduje. Aktivitu extracelulárních esteráz pak označuje jako klíčovou pro růst mikroorganismů na polyuretanech (Howard et al., 1999 & 2012). Tým pákistánských vědců identifikoval a izoloval z půdy již několik bakteriálních druhů, které se prokázaly jako schopné biodegradovat polyuretany. V roce 2013 identifikovali v půdě v oblasti dvou různých skládek odpadů dva odlišné druhy bakterií – *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa* (MZA-85). Podobně jako Howard et al. (1999 a 2012) pákistánští vědci pozorovali zvýšenou aktivitu esteráz. Během pokusu identifikovali i několik produktů rozpadů polyuretanu např. 1,4-butandiol nebo kyselinu adipovou, u kterých pozorovali jejich užití jako zdroje uhlíku pro další mineralizaci polyuretanu (Shah et al., 2013a & 2013b).

Biodegradace za přítomnosti hub je pravděpodobně známějším případem, jelikož jedna z prvních velkých studií na biodegradaci polyuretanů vůbec se zabývala právě jejich náchylností k degradaci houbami. V roce 1968 Darby a Kaplan připravili 100 různých polyuretanů a vystavili je působení šesti různých druhů hub. Tato studie popisuje jako jedna z prvních dnes již známá fakta – např. že polyetherové polyuretany jsou hůře biodegradovatelné než polyesterové nebo že polyuretany s menší molekulární hmotností jsou lépe degradovatelné (Darby a Kaplan, 1968). Co se týče půdních hub, dnes je již známa řada organismů, které jsou schopné biodegradovat polyuretany. Cosgrove a jeho kolegové v roce 2007 provedli *in situ* studii v zahradní půdě, do které umístili polyuretanové destičky. Po 5 měsících doby uložení v půdě provedli analýzu mikrobiálního společenstva z použitých destiček. Nejčastěji se na materiálu vyskytovaly rody *Alternaria*, *Geomyces* a *Nectria*. Dalším zjištěním bylo, že materiál ztratil až 95 % síly v tahu, což je jeden z často uváděných parametrů po proběhnutí biodegradaci materiálu (Cosgrove et al., 2007). Zafar et al., 2013 zkoumali náchylnost polyuretanů k biodegradaci za různých teplot v prostředí kompostu. Destičky z polyuretanu o velikosti 4x4 cm umístili do různých částí kompostu na dobu 12 týdnů při teplotách 25 °C, 45 °C a 50 °C. Po 12 týdnech ve vyšších teplotách byly na materiálu patrné povrchové praskliny a u všech teplot došlo u destiček ke značné ztrátě síly v tahu. Při teplotě 25 °C identifikovali autoři jako nejčastějšího zástupce z přítomných hub *Geomyces pannorum* u vyšších teplot pak dominovala *Scytalidium thermophilum* (Zafar et al., 2013). Výběr několika studií, které identifikovaly bakteriální nebo houbové druhy je uveden v tabulce č. 2. Z ní je patrné, že podstatně méně studií se zabývá degradací polyetherových polyuretanů díky jejich všeobecně dobře známé odolnosti vůči biodegradaci. V roce 2010 např. Matsumiya et al., 2010 identifikovala houbu *Alternaria sp.*, která degradovala polyetherový polyuretan a na základě vzniklých produktů štěpení se domnívá, že k degradaci dochází za pomoci enzymu ureázy.

Tabulka č. 2 – Vybraní zástupci půdních hub a bakterií se schopností degradovat polyuretany

Bakterie		
Organismus	Typ PUR	Studie
<i>Acinetobacter gernerii</i> P7	Polyester PUR (Impranil)	Howard et al., 2012
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> <i>Arthrobacter globiformis</i>	Nátěr z polyester PUR	El-Sayed et al., 1996
<i>Bacillus subtilis</i>	Termoplastický polyester PUR	Shah, Z. et al., 2013b
<i>Corynebacterium sp.</i>	Termoplastický polyester PUR	Shah, A. A. et al., 2008a
<i>Escherichia coli</i>	Termoplastický poly(ether-urea) PUR	Rafiemanzelat et al., 2013
<i>Micrococcus sp.</i>	Termoplastický polyester PUR	Shah, A. A. et al., 2008a
	Termoplastický poly(ether-urea) PUR	Rafiemanzelat et al., 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> strain MZA-85	Polyester PUR	Shah, Z. et al., 2013a
<i>Pseudomonas putida</i>	Polyester PUR (Impranil)	Peng et al., 2014
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PUR-diol	Mukhrejee et al., 2011
<i>Staphylococcus aureus</i>	Poly(ether-urea) PUR	Rafiemanzelat et al., 2013
Houby		
Organismus	Typ PUR	Studie
<i>Alternaria sp. strain 18-2</i>	Destičky z polyester PUR	Cosgrove et al., 2007
<i>Alternaria sp. strain PURDK2</i>	Polyether PUR pěna	Matsumiya et al., 2010
<i>Alternaria solani</i>	Termoplastický polyester PUR	Ibrahim et al., 2009
<i>Aspergillus sp. S45</i>	Termoplastický polyester PUR	Osman et al., 2017
<i>Aspergillus flavus</i>	Termoplastický polyester PUR	Mathur a Prasad, 2012
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Termoplastický polyester PUR	Khan et al., 2017
<i>Cladosporium asperulatum</i> <i>Cladosporium pseudocladosporioides</i> <i>Cladosporium tenuissimum</i>	Polyester PUR (Impranil) Polyether PUR pěna	Álvarez-Barragán et al., 2016
<i>Fusarium solani</i>	Destičky z polyester PUR	Zafar et al., 2013
<i>Geomyces pannorum</i>	Polyester PUR	Barratt et al., 2003, Cosgrove et al., 2007
<i>Nectria sp. strain BC-11</i>	Destičky z polyester PUR	Cosgrove et al., 2007
<i>Trichosporon moniliforme</i> <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Destičky z polyester PUR	Zafar et al., 2013

2.1.1.2 Kometabolismus

Poměrně neprozkoumanou oblastí biodegradace polyuretanů jsou procesy kometabolismu. Jedná se o proces, který se často vyskytuje u biodegradace různých i těžko rozložitelných syntetických látek, které v životním prostředí figurují jako polutanty. Souhrnně lze takové látky označit jako syntetické polutanty a řadí se mezi ně celá škála látek např. pesticidy, farmaka, polycyklické aromatické uhlovodíky, ftaláty a řada dalších (Bhatt et al., 2021). Kometabolismus by se stručně a z hlediska biodegradace organických polutantů dal popsat jako proces, během kterého dochází k degradaci polutantu na základě jeho strukturální podobnosti s jinou látkou. Nicméně během tohoto procesu z něho degradující organismus nemá žádný užitek (nedokáže degradovanou látku využít jako zdroj energie a živin) a často se může stát, že k degradaci nedojde zcela a proces se v určité fázi zastaví. Dále pak mohou při tomto procesu vznikat meziprodukty, které mohou být toxické nebo se dále hromadit v životním prostředí (Fischer a Majewsky, 2014). Rafiemanzelat et al., 2015 zkoumali degradaci polyuretanu v přítomnosti bakterie *Bacillus amyloliquefaciens*, M3, kterou izolovali z půdy. Ve své studii se zaměřili rovněž na kometabolismus a zkoumali degradaci i ve třech různých experimentálních podmínkách – v přítomnosti minerálního, mannitolového a živinového média. Z výsledků biodegradace vyplývá, že bakterie M3 je schopna využít testovaný polyuretan jakožto svůj jediný zdroj uhlíku – napovídají tomu výsledky z analýz úbytku hmotnosti, FT-IR, SEM a optické denzity. Největší úbytek hmotnosti zaznamenali vědci u vzorku, který byl pouze v minerálním médiu, až 44 %, zatímco u média se živinami to bylo pouze 34 % hmotnostního úbytku. Nicméně u vzorků, které v rámci přípravy prošly i sterilizací autoklávem se nejvyšší úbytek hmotnosti prokázal u živinového média 28 %. Z výsledků studie se tak dá usuzovat, že kometabolismus se v nějaké míře projevuje u sterilizovaných vzorků, nicméně u vzorků, které sterilizací neprošli pravděpodobně dochází ke spolupráci vícero organismů (Rafiemanzelat et al., 2015).

2.2. Metody určování biodegradability plastů v půdě

2.2.1. Ukazatele degradace materiálu

V biodegradačních experimentech se pro vyhodnocení proběhnuvší biodegradace na konkrétní materiál používá celá řada různých metod. Tou první a nejpřirozenější metodou je obyčejné pozorování materiálu po ukončení experimentu – v případě polyuretanů totiž dochází k jejich praskání případně zažloutnutí (Zafar et al., 2013).

Tento přístup lze pak zefektivnit použitím mikroskopických metod. V případě biodegradace plastů, se často užívají skenovací elektronové mikroskopy (SEM) mající široké využití. Běžně se používají například pro detekci změn na povrchu materiálu po ukončení biodegradace – vznik prasklin, děr a dalších útvarů, které mohou být další informací o míře proběhlé degradace. Fotografie z SEM mikroskopů bývají častým doplňkem biodegradačních studií (Zafar et al., 2013).

Populární metodou pro analýzu polyuretanu po biodegradačních testech je FT-IR neboli infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací. Jedná se o velmi často užívanou analytickou metodu, zejména proto, že se jedná o nedestruktivní metodu

a stejný vzorek lze pak podrobit dalším analýzám. Metoda v principu funguje tak, že vzorek je ozařován infračerveným zářením o různých frekvencích a vzniklé spektrum je pak pomocí matematické metody (Fourierovy transformace) přepočítáno. Specifické molekuly a vazby mají zcela konkrétní absorpční spektra a takto vzniká informace o přesném složení polymeru na molekulární úrovni (Magnin et al., 2020). Lze takto získat informace o tom, které vazby a části polymeru se během testu degradovali (Goméz et al., 2014, Peng et al., 2014). Nicméně tyto změny je u polyuretanů důležité korektně interpretovat vzhledem k povaze polyuretanu např. karbonylové vazby (C=O) se v polyuretanech nachází v několika molekulách – estery, uretany, močovina – a vlnové délky jsou si velmi podobné autoři se pak ve svých studiích v interpretaci výsledků mnohdy liší (Magnin et al., 2020).

Další častou analýzou v degradačních studiích je měření síly v tahu (Barratt et al., 2003; Cosgrove et al., 2007; Zafar et al., 2013). Jedná se o mechanický test, který určuje maximální možné napětí, které materiál nepoškodí. Síla v tahu je častý ukazatel odolnosti polymerů a v tomto případě se může jednat o nepřímé posouzení proběhlé degradace (Spontón et al., 2013). Cosgrove et al., 2007 použili ve své studii 4,5 x 0,5 cm dlouhé pásky z polyuretanu, které na pět měsíců umístili do půdy. Po skončení testu pak měřili sílu v tahu ukázalo se, že testovaný materiál ztratil až 95% síly v tahu ze své původní hodnoty. Tento výsledek autoři studie pokládají jako jednoznačný důkaz o degradaci materiálu, jelikož míra degradace je nepřímo úměrná síle v tahu.

Úbytek hmotnosti je další z analýz, která je často užívána k posouzení proběhlé biodegradace. Na rozdíl od předchozích metod je zde kladen důraz spíše na obecnou rovinu toho, jak úspěšná degradace byla nikoliv, na vlastnosti materiálu po skočení degradace. Vzorky polyuretanu jsou před započítáním testu zváženy a toto měření je opět provedeno po jeho skončení. Je velmi důležité ale tuto metodu nezobecňovat a vždy ji doplnit o další analýzu např. FT-IR, protože úbytek hmotnosti může být způsoben degradací plnidel, např. škrobu, a nikoliv degradací polyuretanu samotného (Amobonye et al., 2021). U těchto měření je dále také nutné materiál po skončení experimentu důkladně zbavit veškerých možných nečistot, případně vzniklého biofilmu (Magnin et al., 2020). Různé vědecké skupiny k tomuto kroku nicméně přistupují různě např. Spontón et al., 2013, ve své studii vzorky očistili v 50% roztoku etanolu a následně je nechali dva dny schnout ve vakuu. Osman et al., 2017, například své vzorky pouze omyli destilovanou vodou a rovněž je nechali schnout ve vakuu. Álvarez-Barragán et al., 2016, své vzorky polyuretanové pěny po dobu 18 hodin nechali v roztoku chlornanu sodného (0,88 %, w/v), aby měli jistotu zničení houbových mycelií. Vzorky následně několikrát promyli v destilované vodě a nechali schnout ve vakuu do konstantní hmotnosti. Ve své studii pak identifikovali až 65 % úbytek hmotnosti na testované polyuretanové pěně, která slouží jako komerční pěna pro matrace, houbou *Cladosporium tenuissimum*.

Další metodou pro informaci o obecné úspěšnosti biodegradace je měření vyvinutého oxidu uhličitého (CO₂). Mikroorganismy v rámci experimentů v aerobním prostředí mineralizují vzorky polymerů a vzniká CO₂. Porovnáním vůči kontrolnímu vzorku (bez

dodaného polymeru) lze pak přepočtem zjistit o kolik více CO₂ vzniklo ve vzorku s testovaným materiálem. Známou obdobou tohoto testu je tzv. Sturm test, který je standardizovanou metodou OECD 301B (Magnin et al., 2020). Pro test je nutné připravit láhev s minerálním roztokem a testovaným materiálem a k tomu adekvátní kontrolu bez testovaného materiálu. Aktivně vhaněný vzduch je nejdříve probubláním přes hydroxid draselný (KOH) zbaven CO₂ a poté, co projde testovaným vzorkem, je k záchytu vyvinutého CO₂ použit opět roztok KOH. V tomto nastavení je test ponechán po dobu 28 dní. Výsledné CO₂ se pak v tomto testu určí gravimetrickou metodou – vysrážením chloridem barnatým (Shah et al., 2016; Osman et al., 2017). Alternativou k tomuto testu, pokud jde o kvantifikaci degradace polyuretanu nikoliv ve vodném roztoku, ale například v půdě nebo kompostu jsou testy dle metodik ASTM – např. ASTM D5988-18 nebo ASTM D5511-02. Tyto metody pracují opět s CO₂ vznikajícího mineralizací polymeru, ten je poté zachytáván do láhve s KOH a následně kvantifikován zpětnou acidobazickou titrací (Goméz at al., 2014).

2.2.2. Normované metodiky

Pro testování biodegradability plastů existuje celá řada normovaných testů, které vydávají např. ISO, ASTM, OECD a další organizace. Z hlediska rozkladů plastů v půdním prostředí je vhodné zmínit konkrétně tyto standardy:

a) ISO 14855 - *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions.*

Jedná se o test, který se snaží kvantifikovat biodegradabilitu plastů v aerobním prostředí kompostu. Míra rozkladu plastu se posuzuje pomocí kvantifikace vyvíjeného CO₂ a stupně rozložení materiálu po konci testu.

b) ČSN EN 14046 - *Obaly – Hodnocení úplné aerobní degradace obalových materiálů při řízených podmínkách kompostování – Metoda analytického stanovení oxidu uhličitého.*

Jedná se o český ekvivalent výše uvedené normy. Kompostování v obou případech probíhá v nádobách o velikosti jednotek litru, aby bylo možné zároveň hodnotit respiraci pomocí záchytu vyprodukovaného CO₂. V takovém reakčním objemu dochází k vysokým tepelným ztrátám a reálný kompostovací proces tak není možné přesně nasimulovat. Vývin metabolického tepla je simulován umístěním nádob do termostatu s předem nastaveným režimem teploty. Vzhledem k cílům práce a požadavkům na vybavení laboratoře byla tato metoda vyhodnocena jako nevhodná.

c) EN 17033 - *Biodegradable mulch films for use in agriculture and horticulture.*

Jedná se o metodiku, která posuzuje biodegradabilitu mulčovacích fólií z plastových materiálů, které jsou určeny po skončení jejich životnosti k ponechání na poli či v půdě. Aby materiál vyhověl metodě, musí proběhnout >90 % rozklad testovaného materiálu do dvou let. Metodika je koncipovaná pro libovolné plastové materiály nicméně musí mít podobu tenkých mulčovacích fólií. Zkoumaný plastový materiál v této diplomové práci byl pěnového charakteru, a proto byla metodika vyhodnocena jako nevhodná.

d) OECD 301B – CO₂ evolution (Modified Sturm test).

Jedná se o metodiku, která posuzuje biodegradabilitu materiálu v prostředí minerálního roztoku. Pro test jsou nutné 2 až 5l láhve s minerálním roztokem pro testovaný materiál a mikrobiální inokulum. V testu se pracuje se zachycením vyvinutého CO₂ z biodegradace materiálu a test probíhá po dobu 28 dní. Metodika byla vzhledem k testu ve vodném prostředí vyhodnocena jako nevhodná pro užití v této diplomové práci.

e) ČSN EN 14045 - Obaly - Hodnocení rozpadu obalových materiálů pomocí prakticky zaměřených zkoušek při definovaných podmínkách kompostování.

Minimální velikost vzorku kompostu pro provedení testu podle této normy je 140 l. Během testu není hodnocena respirace vzorku a nejsou v metodice obsaženy ani jiné analytické koncovky. Rozklad materiálu se hodnotí pouze jako hmotnostní úbytek prosetím po konci 12týdenního rozpadu. Vzhledem k velikosti vzorku a absenci vhodné analytické koncovky byla tato metoda pro test v této diplomové práci vyhodnocena jako nevhodná.

f) ASTM D5988-03 - Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting.

Jedná se o metodu, u které je deklarováno, že je shodná s metodou ISO 17556, nicméně podle metodiky ISO nelze materiál proklamat za biodegradovatelný – metoda slouží pouze k posouzení materiálu nikoliv k proklamaci biodegradability. Ve standardu ASTM lze v případě dosažení 70% teoretické biodegradability po 6 měsících materiál proklamat za biodegradovatelný. Jinak se metody liší už jen v detailech.

Poslední zmíněný standard byl na základě literární rešerše a již dříve realizovaného pokusu (Tošovská, 2016) zvolen jako vhodná metoda pro použití v této práci. Metoda není omezena typem ani předpokládaným užitím plastu (tak jako metoda EN 17033) a je vhodná i pro laboratorní podmínky mikrokosmu. Oproti metodice ISO 14855 ji lze použít i pro půdu, a nikoliv pouze pro kompost nebo půdu s inokulem z kompostu. Jelikož je u materiálu PUR BIO10 předpokládaným využitím pachový ohradník v zemědělské krajině, jeví se metoda ASTM D5988-03 jako vhodná varianta. Tuto metodu zvolil i Goméz et al., 2014, pro posouzení biodegradability polyesterové PUR pěny ve třech různých prostředích – půdním, kompostu a v anaerobním prostředí. Pro test v půdě zvolil mix polní půdy, písku a pěstitelského substrátu. Po skončení testu pozoroval u polyuretanu připraveného z přírodních polyolů biodegradaci $11,2 \pm 4,3$ %, což bylo v porovnání s materiálem z petrochemické výroby signifikantně více. Tento materiál vykazoval v následných analýzách i největší strukturální degradaci.

Použitá norma ASTM D5988-03 byla po provedení experimentů, ale ještě před sepsáním této práce aktualizována na verzi ASTM D5988-18. Tato verze se však od původní liší pouze v detailu. Jako substrát pro degradační test slouží směs polní, lesní a luční půdy ve shodném poměru namísto původní směsi polní a lesní půdy.

2.3. Metody identifikace a stanovení mikroorganismů v biodegradačních studiích

Biodegradační studie polyuretanů nejčastěji používají pro analýzu mikrobiálních organismů metody zaměřené na práci s DNA organismů, které dokáží určit konkrétní organismus, který se v době biodegradace nacházel na testovaných materiálech. Tyto metody bývají ve studiích doplněny o pozorování biofilmu, příp. konkrétních organismů pomocí SEM a analýzu enzymatické aktivity (Khan et al., 2017, Rafiemanzelat et al., 2013, Zafar et al., 2013). Nejčastěji se pro tyto účely využívá sekvencí 16S rRNA, 18S rRNA nebo ITS. Tyto sekvence se používají, jelikož mají dobře definované oblasti pro taxonomické určení organismů a existují k nim dostupné „sekvenační knihovny“, které obsahují informace, o již vykázaných sekvencích, např. GenBank (Kirk et al., 2004).

Sekvence 16S rRNA se využívá zejména pro zástupce bakterií, u kterých lze takto rozlišit zástupce až na taxonomickou úroveň rodu u zcela libovolné bakterie. Genová sekvence 16S obsahuje přibližně 1550 páru bází (bp) a nejčastěji se porovnává celá nebo její menší část dlouhá 500 bp, která většinou postačí pro určení organismu a její analýza levnější a rychlejší (Clarridge J. E., 2004). Peng et al., 2014 pomocí této sekvence určili bakterii *Pseudomonas putida*, která byla schopna v polyuretanové disperzi Impranil degradovat a využívat polyuretan jako svůj jediný zdroj uhlíku. Existuje celá řada dalších studií, které používají sekvenci 16S rRNA pro identifikaci bakteriálních degradátorů polyuretanu např. Howard et al., 2012, Mukhrejee et al., 2011, Shah, Z. et al., 2013b, a další.

Sekvence 18S rRNA a ITS jsou ve studiích používány pro identifikaci hub. Sekvence 18S rRNA byla užívána v 90. letech minulého století, ale je postupně nahrazována sekvenováním regionů ITS, což jsou tzv. „Integral transcribed spacer“ regiony, které se nachází mezi jednotlivými geny – jedná se o nekódující části DNA. Tyto regiony se ukázali jako vhodnější pro přesnější určení až na úroveň taxonomického druhu. (Cuadros-Orellana et al., 2013). Osman et al., 2017, při své biodegradační studii polyuretanů v půdním prostředí skládky odpadů pomocí sekvenování 18S rRNA identifikovali houbu z rodu *Aspergillus*, kterou pracovně pojmenovali S45 – největší shodu má s houbou *Aspergillus fumigatus*. Nicméně daleko více studií užívá právě zmíněné segmenty ITS (Álvarez-Barragán et al., 2016, Barratt et al., 2003, Cosgrove et al., 2007, Magnin et al., 2019) – např. Zafar et al., 2013, tuto sekvenci použili ve své studii biodegradace polyuretanových destiček v prostředí kompostu při různých teplotách pro identifikování dvou organismů – *Candida ethanolica* a *Fusarium solani*.

Podpůrnou informací, která často doplňuje zmíněné genové metodiky je měření enzymatické aktivity (Khan et al., 2017, Peng et al., 2014). Jelikož enzymatická aktivita je častým jevem aktivní účasti organismů na biodegradaci je tato informace důležitá pro posouzení toho, jestli se zkoumaný organismus degradace aktivně účastnil (Mukhrejee et al., 2011).

Jednou z nejpoužívanějších metod v ekologických studiích pro kvantifikaci půdních mikroorganismů se v posledních 30 letech stala analýza fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) (Frostegård et al., 2011). Je tomu zejména proto, že mikrobiologické

studie často zahrnují kultivaci mikroorganismů, ale v případě půdních mikroorganismů lze kultivovat kolem 1 % bakterií a pouze 17 % hub a nelze tudíž hovořit o reprezentativním, reálném složení půdní mikrobiální komunity (Watzinger, 2015). Metoda analýzy PLFA nepotřebuje ke svému provedení izolaci ani kultivaci mikroorganismů z půdy. Principem metody je extrakce fosfolipidů z membrán mikroorganismů a následná saponifikace lipidů, která uvolní mastné kyseliny. Ty jsou v posledním kroku transesterifikací převedeny na methylestery těchto mastných kyselin a následně stanoveny plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (Zelles, 1999).

Tyto membránové mastné kyseliny se používají jako markery (ukazatele) pro konkrétní skupiny organismů zejména proto, že jsou obsaženy pouze v živých buňkách a po jejich smrti rychle degradují (Hill et al., 2000). Užití PLFA jako markerů má několik omezení, např. pro určení bakterií se používá několik druhů PLFA, ale pro houby pouze již zmíněná kyselina linolová, která se také vyskytuje v rostlinných membránách a může tak docházet ke zkreslení výsledků. Je proto vhodné kombinovat metodu se stanovením ergosterolu, který je specifickým markerem pro skupinu hub (Klamer & Bååth, 2004).

Některé cyklopropylové PLFA např. cy17:0 nebo cy19:0, které jsou markery pro skupinu gramnegativních bakterií, se v membránách objevují ve větší míře, pokud je mikrobiální společenstvo pod vlivem stresu – např. nízké pH, nízký obsah kyslíku, nedostatek vody nebo vysoká teplota. Analýza PLFA pak nemusí odrážet reálný stav společenstva (Leckie, 2005).

V environmentálních studiích jsou analýzy PLFA užívány spíše pro analýzu prostředí, ve kterém daná studie probíhá nebo pouze ve studiích, které prostředí jako takové zkoumají (Fichtner et al., 2014, García-Orenes et al., 2015, Lange et al., 2014) a existuje velmi málo studií, které by metodu PLFA použili pro analýzu biofilmu na materiálu. Nicméně Vinten et al., 2011 použili analýzu PLFA pro zkoumání biofilmu, který se vytvořil na hliněných cihlách v prostředí skotských potoků a analýza PLFA se prokázala jako dobrou volbou pro tento typ studie.

2.4. Vlastnosti půd z pohledu biodegradace polyuretanů

V půdním prostředí bylo identifikováno velké množství zástupců z řad hub a bakterií, které jsou schopné degradovat polyuretany viz tabulka č. 2. Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, environmentální vlivy hrají významnou roli jednak na schopnost mikroorganismů úspěšně biodegradovat přítomný materiál (Artham a Doble, 2008) a jednak jsou důležité i pro nezkrasené výsledky analýzy PLFA (Leckie, 2005). Důležitými faktory, které významně ovlivňují složení mikrobiální komunity, jsou mimo jiné: pH, dostupnost dusíku, půdní vlhkost a půdní zrnitost (Bååth a Anderson, 2003, Brockett, et al., 2012, Högberg et al., 2007, Lauber et al., 2008). Uvedené faktory mají různé vlivy na různé skupiny mikroorganismů. Zástupci bakterií jsou více náchylní na změny v pH a půdní zrnitosti než zástupci hub (Lauber et al., 2008).

Bååth a Anderson v roce 2003 provedli studii, ve které srovnávali složení mikrobiálního společenstva v půdách při různých hodnotách pH. Ve své studii měli k dispozici celkem 53 lesních půd v rozmezí pH 3 – 7,2. Ve svých výsledcích zjistili značnou lineární závislost ($R^2 = 0,708$) mezi půdním pH a respirací bakterií; v půdách s nejnižším pH bakteriální respirace dosahovala pouze kolem 10 % celkové respirace půdy a s rostoucím pH se lineárně zvyšovala. Podobné výsledky ukazuje i studie Högberg et al. (2007), ve které bylo provedeno srovnání tří lesních půd s rozdílnými hodnotami pH a autoři pozorovali rostoucí trend zastoupení bakteriálních PLFA s rostoucí hodnotou pH. Vliv pH na tvorbu enzymů houby *Aspergillus tubingensis* biodegradaci polyuretanů zkoumali Khan et al., 2017, kteří identifikovali jako vhodné rozpětí pH 5 až 7.

Další důležité půdní charakteristiky pro mikrobiální společenstva jsou půdní vlhkost a teplota. Brockett et al. v roce 2012 testovali 7 různých lesních půd a zkoumali mimo jiné vliv půdní vlhkosti na složení mikrobiálního společenstva. Na základě výsledků PLFA zjistil kladnou signifikantní korelaci půdní vlhkosti a celkové mikrobiální biomasy. Ve své studii dále srovnávali enzymatickou aktivitu vybraných enzymů včetně některých hydroláz, které pozitivně korelovaly s pH (Beta-1,4-xylosidáza, Beta-1,4-glukosidáza). Vliv teploty na půdní respiraci a růst bakterií a hub zkoumala Pietikäinen et al. (2004) ve dvou půdách – lesní a polní. Polní půda měla výrazně vyšší pH (pH = 7,8) než půda lesní (pH = 4,1). Pro obě společenstva ve studii se zdála být optimální teplota mezi 25 a 30°C, ale zatímco některé bakterie vykazovaly aktivitu dokonce až při 45°C, houby při teplotách nad 30°C přestaly být aktivní. Půdy mezi sebou nevykazovaly významné rozdíly. Zafar et al., 2013 zkoumali vliv teploty na biodegradaci polyesterových a polyetherových PUR destiček houbami v kompostu a půdě při různých teplotách (25°C, 45°C a 50°C) po dobu 12 týdnů. U polyesterových PUR destiček po 4 týdnech pozorovali v obou případech vizuální degradaci již při 25°C. U vyšších teplot dokonce pokrývalo povrch destiček houbové mycelium. Při testu síly v tahu po 12 týdnech autoři zaznamenali pokles vyšší než 75 %. U polyetherových destiček autoři nepozorovali žádné změny. Množství hub na polyuretanových destičkách se mezi prvním a čtvrtým týdnem mírně zvýšilo a pak zůstalo víceméně stejné.

Barratt et al., 2003 provedl studii zaměřenou na půdní kapacitu zadržování vody (WHC) a její vliv na biodegradaci polyesterového polyuretanu. Svou studii prováděli v zahradnickém substrátu s pH v rozmezí 5,5 – 6,0 a biodegradaci vyhodnocovali ztrátou síly v tahu po 44 dnech. Největší degradaci materiálu pozorovali v rozmezí 20–80 % WHC půdy s maximální ztrátou síly v tahu 60 % při 30 % WHC půdy. Dále vyhodnocovali množství hub a bakterií na povrchu polyuretanu. V případě bakterií nepozorovali žádný vztah mezi půdní WHC a množstvím bakterií. Maximální množství hub pozoroval při WHC 70 %.

3. Cíle a hypotézy

Cíle

- 1) Stanovit míru biodegradace polyuretanového materiálu PUR BIO 10 pomocí standardizované metody ASTM D5988-03.
- 2) Stanovit složení biomasy vybraných skupin mikroorganismů z biofilmu vytvořeného na povrchu materiálu během biodegradčního pokusu pomocí analýzy obsahu fosfolipidových mastných kyselin (PLFA)
- 3) Zjistit, jestli existuje rozdíl v biodegradaci mezi prostředími lesní a polní půdy.

Hypotézy

- 1) Vzhledem k vyššímu zastoupení hub v lesní půdě bude biodegradace PUR v lesní půdě probíhat s vyšší účinností než v půdě polní.
- 2) Vzhledem k očekávané účasti hub na biodegradaci PUR bude v biofilmu na povrchu materiálu naměřena větší biomasa hub než bakterií.

4. Metodika

4.1. Použité chemikálie a laboratorní technika

4.1.1. Chemikálie a materiály

Fosfátový pufr (50 mM KH ₂ PO ₄)	Merck, Německo
Methanol	Chromservis, ČR
Trichlormethan (chloroform)	Chromservis, ČR
Dusík	Linde, ČR
Aceton	Chromservis, ČR
Methylbenzen (toluen)	Chromservis, ČR
Hydroxid draselný	Lach-Ner, ČR
Hexan	Chromservis, ČR
Kyselina octová	Penta, ČR
Kyselina tridekanová	Sigma-Aldrich, Německo
Fenolftalein	Acros Organics, USA
Chlorid barnatý dihydrát	Lach-Ner, ČR
Kyselina chlorovodíková	Lach-Ner, ČR
Dihydrogenfosforečnan amonný	Lach-Ner, ČR
Tetraboritan sodný dekahydrát	Chemapol, ČR
Methyloranž	Lach-Ner, ČR
Biodegradovatelná polyuretanová pěna, PUR BIO10	Ústav makromolekulární chemie AVČR, ČR

4.1.2. Laboratorní technika

Analytická váha Extend	Sartorius, Německo
Vortex mixer ZX Classic VELP	Scientifica, Itálie
Centrifuga EBA 20	Hettich, Německo
SPE kolonka Lichlorut Si 60 No. 1.02021.0001	Merck, Německo
Krimpovací kleště	J.G. Finneran, USA
Digitální vodní lázeň WCB-6	Witeg, Německo
Lyofilizátor	Labio, ČR
Automatická byreta	Hirschmann, Německo
Pipeta	Eppendorf, Německo
Magnetická míchačka	IKA, Německo
Muflová pec LM 112.10	VEB Elektro, Německo
pH metr LAB 805	Schott Instruments, Německo
Sklenice Fido (500 ml) s těsněním	Bormioli Rocco, Itálie
Laboratorní termobox	

4.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě

Posouzení biodegradability proběhlo dle metody ASTM D5988-03 (ISO 17556), která je standardizovaným testem pro posouzení aerobní biodegradace plastových materiálů v půdním prostředí. Metoda je založena na mineralizaci testovaného materiálu působením půdního mikrobiálního společenstva až na oxid uhličitý, který je dále zachytáván do kádinek s hydroxidem draselným. Zpětnou acidobazickou titrací kyselinou chlorovodíkovou je pak zjištěn nezreagovaný hydroxid draselný. Mineralizace materiálu je následně vyjádřena jako kumulativní množství uvolněného

oxidu uhličitého za čas, po který je materiál vystaven působení půdního mikrobiálního společenstva. Nad rámec metodiky je před samotnou titrací stabilizován zachycený oxid uhličitý chloridem barnatým. Tento krok byl do metody přidán na základě zkušeností s touto metodikou, aby se zamezilo potenciálnímu podhodnocení výsledků (Tošovská, 2016).

Pět různých vzorků polní půdy a pět vzorků lesní půdy (smíšený les) bylo vždy ve dvou paralelách použito jako nosný substrát pro biodegradaci vybraného biodegradabilního vzorku PUR. Každý z těchto 20 vzorků je navíc zdvojen vzhledem k nutnosti porovnání s negativní kontrolou (samotný substrát bez přídavku PUR). Pracovalo se tedy vždy celkem se 40 vzorky v rámci každého experimentu.

Pro potřeby pokusu musela být původní metoda mírně modifikována. Vzhledem k nutnosti pracovat s velkým počtem vzorků byly použity nádoby o objemu 500 ml. Protože smyslem testu bylo porovnání vlivu polní a lesní půdy na biodegradaci vneseného polymeru, byla v tomto uspořádání vynechána varianta s celulózou (pozitivní kontrola).

V rámci diplomové práce proběhly dva biodegradační experimenty podle zmíněné metodiky. První experiment trval celkem 90 dní, druhý zrychlený experiment s litterbagy pak probíhal 32 dní. Během prvního experimentu byl v mikrokosmu testovaný PUR umístěn přímo do půdy, ale při následné analýze PLFA z biofilmu vzniklo podezření na zkreslení výsledků půdou, která ulpívá na fragmentech PUR. Proto byl uskutečněn druhý, zkrácený experiment, při kterém byl testovaný PUR uzavřen v litterbagu, aby nedocházelo k nežádoucí kontaminaci materiálu půdou. Litterbag byl vytvořen spájením sáčku 6 x 5 cm z nylonové tkaniny o velikosti ok 0,6mm, do kterého byl uzavřen materiál a konce spájeny k sobě. Finální podobu litterbagu lze vidět v příloze č.6.

Při vyhodnocování výsledků biodegradačního experimentu byl zvolen spojnicový graf, na kterém byla kumulativně zaznamenávána dosažená mineralizace za uplynulý čas (Pražanová, 2018). Jednotlivá měření jsou vždy průměrem z pěti různých půd daného typu, tj. lesní nebo polní půda a tato variabilita je na grafu znázorněna směrodatnou odchylkou.

Pro otestování nulové hypotézy, která předpokládá, že po skončení biodegradace existuje významný rozdíl mezi lesní a polní půdou byl proveden dvouvýběrový F-test pro rozptyl a následně dvouvýběrový t-test s rovností příp. nerovností rozptylů.

4.2.1. Charakteristika testovaného materiálu

Biodegradační test byl proveden s materiálem PUR BIO-10, který byl vyvinut na Ústavu makromolekulární chemie AV ČR Ing. Hynkem Benešem, PhD. a jeho týmem. Polyuretanová pěna byla syntetizována z polyester triolu, alifatického isokyanátu a polyethylenglykolu 400. Jako plnivo byl použit škrob, který byl obsažen z 28 % celkové hmotnosti polyuretanu. Pro pokus byla pak použita rozemletá pěna ve frakci 2 – 3,15 mm. Podrobnější rozkreslení struktur jednotlivých látek je uveden v přílohách (Příloha 1 a 2).

4.2.2. Analýza použitých půd

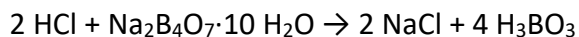
Ve Středočeském kraji bylo odebráno pět lesních (smíšený les) a pět polních půd, které byly dále zpracovány a analyzovány v laboratoři environmentální chemie Ústavu pro životní prostředí Univerzity Karlovy. Pro následné analýzy byla půda přeseťa přes kovové síto 6 mm. Vodní kapacita (WHC) půdy byla stanovena následujícím způsobem: K 25 mL přeseťe půdy umístěné do nálevky s filtračním papírem a zátkou bylo přidáno 50 mL vody. Takto připravené nálevky byly ponechány přes noc a druhý den se zbylá voda nechala hodinu vykapávat. Dále bylo stanoveno půdní pH následujícím způsobem: K 5 mL půdy bylo přidáno 25 mL deionizované vody a směs byla 60 minut třepána a 60 minut ponechána odstát. Následně bylo pH metrem změřeno pH suspenze. Ztráta žíháním byla stanovena po žíhání vysušené půdy v muflové peci při teplotě 550 °C po dobu 5 h.

4.2.3. Stanovení biodegradace

Biodegradační pokus probíhal za použití jednotlivých půd, do kterých byl přimíchán materiál PUR BIO-10 ve frakci 2 – 3,15 mm. Z každé půdy byly založeny 4 mikrokosmy – dva testovací a dvě kontroly bez přidaného polyuretanu.

Do uzavíratelných 0,5L sklenic Fido bylo odměřeno 150 mL prosáté půdy a naváženo přibližně přesně 100 mg testovaného materiálu. Negativní kontroly obsahovaly pouze čistou půdu a sloužily k posouzení bazální respirace půdy. Dále došlo k upravení půdní vlhkosti a množství dusíku pomocí roztoku dihydrogenfosforečnanu amonného o koncentraci 4,72 g/L dle pokynů použité metodiky. Následně byl materiál s půdou dostatečně promíchán a na povrch půdy byly umístěny dvě 25 mL kádinky – jedna s 10 mL destilovanou vodou pro zachování vnitřní vlhkosti a druhá s 7,5 mL 0,5 M hydroxidu draselného. Sklenice byly uzavřeny a umístěny do termoboxu bez přístupu světla s vnitřní teplotou 21 ± 2 °C.

Uvolněný oxid uhličitý byl zachytáván do roztoku hydroxidu draselného. Doba zachytávání CO₂ se během pokusu měnila s ohledem na aktivitu půdních organismů zhruba v týdenních intervalech. Před každou titrací proběhlo stanovení faktoru kyseliny titrací roztoku dekahydrátu tetraboritanu sodného s indikátorem methyloranž dle rovnice [1]:



[1]

Stanovení faktoru kyseliny proběhlo dle následujícího vztahu [2]:

$$f \text{HCl} = c_{\text{skutečná}} / c_{\text{teoretická}} = (k * m) / (M * V * c_{\text{teoretická}})$$

[2]

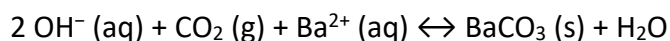
k ... stechiometrický koeficient (k = 2)

m ... navážka Na₂B₄O₇·10 H₂O (0,2 g)

M ... molární hmotnost Na₂B₄O₇·10 H₂O (381,38 g/mol)

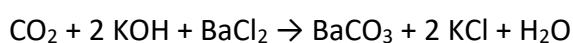
V ... spotřeba HCl (L)
c ... koncentrace HCl (0,25 mol/L)

Následně došlo k otevření všech sklenic a nad rámec metodiky bylo do všech kádinek s hydroxidem draselným ihned přidáno 3,5 mL roztoku chloridu barnatého o koncentraci 125 g/L, tím byla zajištěna stabilizace rozpuštěného oxidu uhličitého dle rovnice [3]:



[3]

V dalším kroku byla provedena zpětná acidobazická titrace 0,25 M kyselinou chlorovodíkovou s identifikátorem fenolftaleinem dle rovnice [4]:



[4]

Vyprodukovaný CO_2 byl pak pro stanovení časový úsek spočítán dle následujícího vztahu [5]:

$$m_{\text{CO}_2} (\text{g}) = k \cdot V \cdot c \cdot f \cdot M$$

[5]

k ... stechiometrický koeficient ($k = 0,5$)

V ... objem spotřebované HCl (L); spočítán jako $V_{\text{negativní kontrola}} - V_{\text{vzorek}}$

c ... koncentrace HCl (0,25 mol/L)

f ... faktor kyseliny

M ... molární hmotnost CO_2 (44 g/mol)

4.3. Stanovení obsahu fosfolipidových mastných kyselin

Analýza PLFA je metoda, která zkoumá přítomnost methylesterů mastných kyselin ve vzorku. Principem metody je z buněčných membrán a stěn mikroorganismů vyextrahovat fosfolipidy, z nichž se v dalším kroku uvolní mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou následně převedeny transesterifikací na methylestery, dojde k jejich detekci a stanovení za použití plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Na rozdíl od kultivačních metod je analýza PLFA vhodná pro kvantifikaci živé mikrobiální biomasy a umožňuje sledovat změny v mikrobiálních společenstvech v průběhu času.

Metodou byly analyzovány mikrobiální společenstva zachycená v biofilmu na testovaném polyuretanovém polymeru.

4.3.1. Extrakce lipidů

Do vypálené zkumavky bylo naváženo přibližně přesně 0,1 g vzorku lyofilizované polyuretanové pěny. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 mL fosfátového pufru (50 mM KH_2PO_4), 1,25 mL methanolu a 0,625 mL chloroformu. Poté byl vzorek vortexován po dobu jedné minuty a následně extrahován ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1

hodiny. Po skončení extrakce byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut na 3500 rpm. Vzniklý supernatant byl pomocí Pausterovy pipety odebrán do nové vypálené zkumavky a umístěn do tmy v pokojové teplotě. Ke vzorku bylo opět přidáno 1,25 mL methanolu a 0,625 mL chloroformu a vzorek byl vortexován po dobu 1 minuty a opět ponechán k extrakci za stejných podmínek. Po hodině byl vzorek opět centrifugován po dobu 5 minut na 3500 rpm a bylo provedeno odebrání supernatantu, který byl spojen s předchozím. Tento postup extrakce byl za stejných podmínek opakován ještě jednou.

Ke vzniklému supernatantu bylo přidáno 1,9 mL fosfátového pufru a 1,9 mL chloroformu a směs byla vortexována po dobu 1 minuty. Směs byla ponechána přes noc v lednici a druhý den byla provedena centrifugace po dobu 5 minut na 3500 rpm. Pasteurovou pipetou byla odebrána spodní chloroformová část obsahující lipidy a byla přenesena do nové vypálené vialky, která byla uzavřena víčkem se septem. K horní vodné fázi bylo přidáno 1,9 mL chloroformu, směs byla vortexována po dobu 1 minuty a následně centrifugována po dobu 5 minut na 3500 rpm. Chloroformová fáze byla odebrána a spojena s předchozí.

4.3.2. Frakcionace lipidů

Vzorek byl do sucha odpařen pod proudem dusíku, bylo k němu přidáno 300 μ L chloroformu a následně byl vortexován po dobu 30 sekund. Byla sestavena aparatura s SPE kolonkami Lichlorut Si 60. Kolonky byly nejprve promyty pomocí 1,5 mL chloroformu a ihned po protečení chloroformu byl aplikován vzorek. Do vialky bylo přidáno 150 μ L chloroformu a po krátkém (10 sekund) vortexu byl zbylý vzorek aplikován na kolonku. Po vsáknutí vzorku do náplně kolonky byla kolonka postupně vymývána – 2 mL chloroformu k vymytí neutrálních lipidů, 6 mL acetonu k vymytí frakce glykolipidů a nakonec 2 mL methanolu k vymytí fosfolipidů. Poslední fosfolipidová frakce byla jímána do nové vypálené vialky.

4.3.3. Transesterifikace

Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku. K odparku bylo přidáno 0,5 mL toluenu a 0,5 mL methanolu. Směs byla následně vortexována po dobu 1 minuty a ke vzorku byl následně přidán 1 mL čerstvě připraveného 0,2 M roztoku KOH v bezvodém methanolu. Poté by vzorek inkubován po dobu 15 minut ve vodní lázni o teplotě 37°C. Po skončení inkubace bylo ke vzorku přidáno 1,6 mL hexanu, 0,4 mL chloroformu, 0,3 mL 1 M kyseliny octové (která je uchovávána v lednici) a 2 mL čerstvě destilované vody. Tato směs byla vortexována po dobu 1 minuty. Následně byla provedena centrifugace po dobu 10 minut na 2500 rpm. Vzniklá horní fáze byla přenesena Pasteurovou pipetou do nové vypálené vialky a ke vzorku bylo opět přidáno 1,6 mL hexanu a 0,4 mL chloroformu. Směs byla opět vortexována (1 minuta) a centrifugována (2500 rpm, 10 minut). Vzniklá horní fáze byla opět odebrána a spojena s předchozí. Extrakce proběhla ještě jednou za stejných podmínek. Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a následně do vialky bylo přidáno 950 μ L hexanu a vzorek byl vortexován po dobu 30 sekund. Následně byl vzorek přenesen do krimpovací vialky a bylo k němu přidáno 50 μ L vnitřního standardu (C13:0 methyl tridekanoát v hexanu o konc. 200 ppm).

V zakrimpované vialce byl vzorek předán Laboratoři Environmentální biotechnologie AV ČR, která provedla stanovení na plynovém chromatografu s hmotnostní spektrometrií.

4.3.4. Vyhodnocení obsahu mastných kyselin

Skupiny mikroorganismů přítomné ve vzorku byly charakterizovány jako součet koncentrací mastných kyselin příslušejících jednotlivým skupinám (Šnajdr et al., 2008):

Houby: 18:2 ω 6,9

Gram-negativní bakterie (G–): 16:1 ω 7,16:1 ω 5, cy17:0, cy19:0, 18:1 ω 7

Gram-pozitivní bakterie (G+): i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0

Aktinobakterie: 10Me-16:0, 10Me-17:0, 10Me-18:0

Bakterie celkem: i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0

Celková mikrobiální biomasa: i14:0, i15:0, a15:0, 15:0, i16:0, 16:1 ω 9, 16:1 ω 7, 16:1 ω 5, 16:0, 10Me-16:0, i17:0, a17:0, cy17:0, 17:0, 10Me-17:0, 18:1 ω 7, 10Me-18:0, cy19:0, 18:2 ω 6,9, 18:1 ω 9

Při vyhodnocení výsledků PLFA byla použita data celkového zastoupení všech skupin, na kterých byla provedena jednofaktorová analýza variance (ANOVA). Pro srovnání skupin v rámci lesní nebo polní půdy byl použit Tukeyův post-hoc test. Pro porovnání specifických skupin organismů mezi polní a lesní půdou byl použit dvouvýběrový F-test pro rozptyl a následně dvouvýběrový t-test s rovností příp. nerovností rozptylů. Dále byl proveden výpočet poměru hub a bakterií, který byl podroben stejnému statistickému vyhodnocení.

4.4. Statistické zpracování dat

Pro zpracování dat byl použit program MS Excel 365 s analytickou nadstavbou VBA.

5. Výsledky

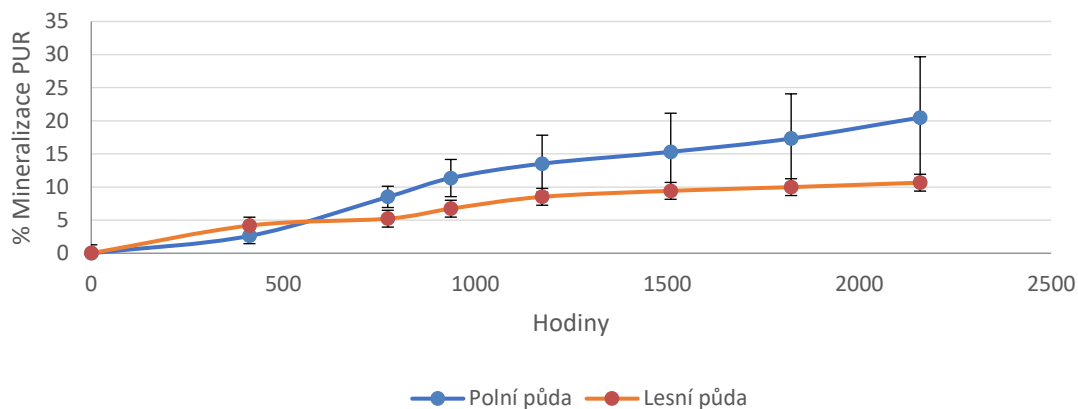
5.1. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě

Výsledky stanovení vybraných půdních charakteristik jsou uvedeny v tabulce č. 3. Výsledek prvního biodegradačního pokusu lze vidět na obrázku č. 4, který je křivkou biodegradace testovaného materiálu – jedná se o závislost mineralizace materiálu, která je vyjádřena kumulativním záchytem vyvinutého CO₂ v čase. Chybové úsečky v grafu značí směrodatnou odchylku v daný moment měření z pěti půd stejného druhu. Po skončení pokusu byla naměřena mineralizace materiálu v lesní půdě 10,65 ± 2,54 % a 20,48 ± 9,18 % v půdě polní. Výsledek z druhého pokusu je obdobnou křivkou vizualizován na obrázku č. 5. Po skončení druhého pokusu byla naměřena v lesní půdě míra rozložení materiálu 3,88 ± 3,42 % a v půdě polní 8,96 ± 1,79 %. Na obrázcích č. 6 a č. 7 je pak srovnána míra mineralizace testovaného materiálu ve stejný okamžik u obou proběhnuvších experimentů – 31. den po začátku. Jedná se tak s ohledem na mineralizaci o srovnání obou uskutečněných variant.

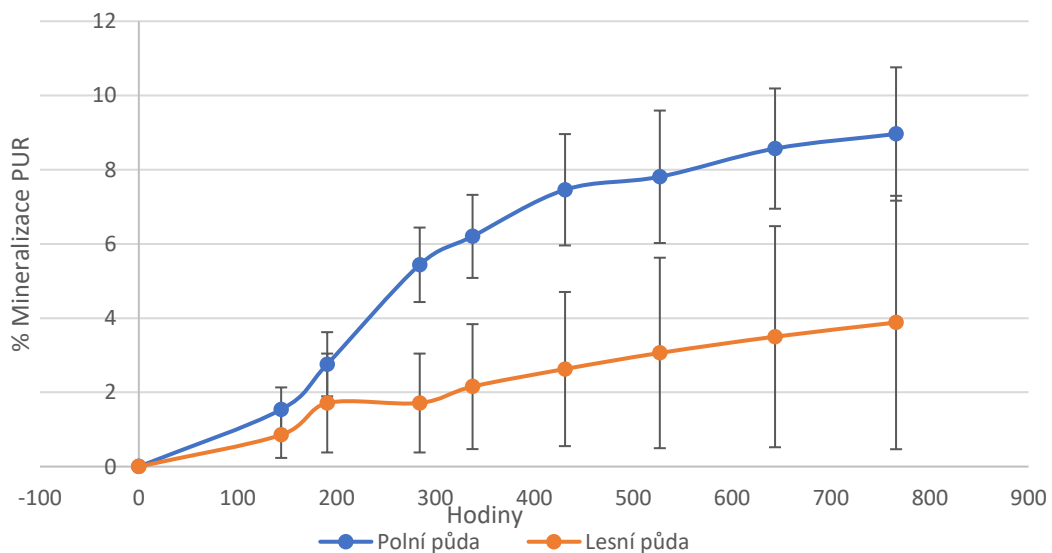
Tabulka č. 3 – Půdní charakteristiky testovaných půd

Lesní půda	pH	WHC	Ztráta žiháním %
Zvole	6,35 ± 0,50	42 ± 0	2,35
Bratřínov	5,5 ± 0,02	44,5 ± 2,12	5,25
Nesvačily	6,08 ± 0,12	37,5 ± 0,70	2,14
Sloup	5,36 ± 0,09	37 ± 4,24	3,65
Drahlovice	5,48 ± 0,18	41,5 ± 3,53	5,46

Polní půda	pH	WHC	Ztráta žiháním %
Zvole	6,83 ± 0,12	33,5 ± 0,70	1,67
Bratřínov	6,60 ± 0,11	37,5 ± 2,12	1,02
Nesvačily	6,95 ± 0,04	34,5 ± 0,71	1,54
Sloup	6,84 ± 0,07	35,5 ± 0,81	0,70
Leč	6,62 ± 0,04	34,5 ± 0,70	1,23



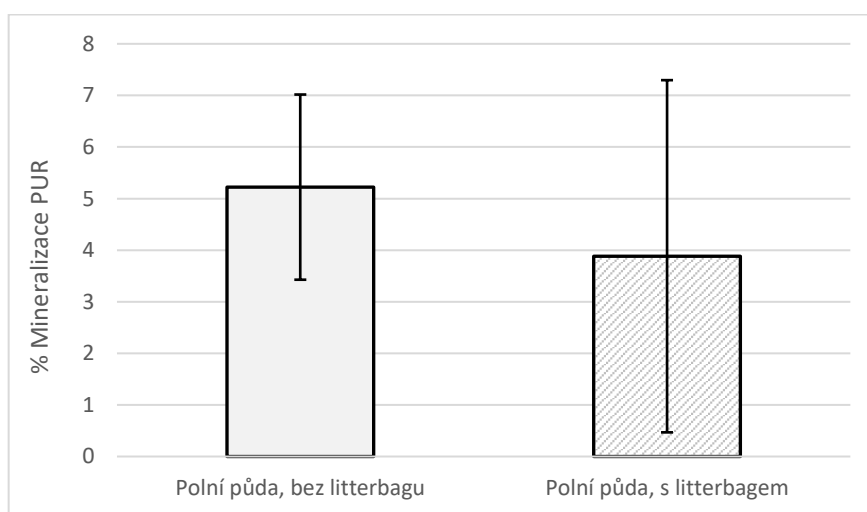
Obrázek č. 4 – Průběh mineralizace lehčené polyuretanové pěny BIO 10 v polní a lesní půdě během prvního pokusu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu).



Obrázek č. 5 - Průběh mineralizace lehčené polyuretanové pěny BIO 10 v polní a lesní půdě během druhého pokusu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu).



Obrázek č. 6 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 v lesní půdě po uplynutí 31 dní. Srovnání mezi dvěma uskutečněnými treatmenty – s použitím a bez použití litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem a nebyl statisticky signifikantní ($p > 0,05$).



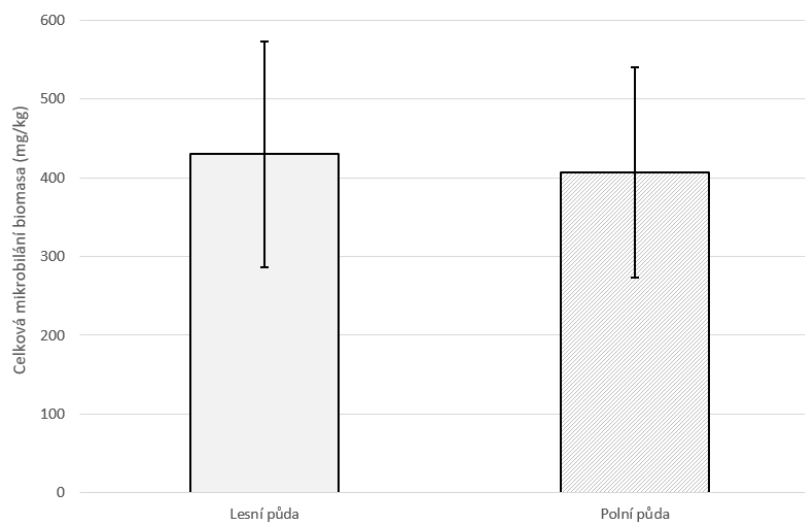
Obrázek č. 7 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 v polní půdě po uplynutí 31 dní. Srovnání mezi dvěma uskutečněnými treatmenty – s použitím a bez použití litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem a nebyl statisticky signifikantní ($p > 0,05$).

5.2. Výsledky stanovení fosfolipidových mastných kyselin

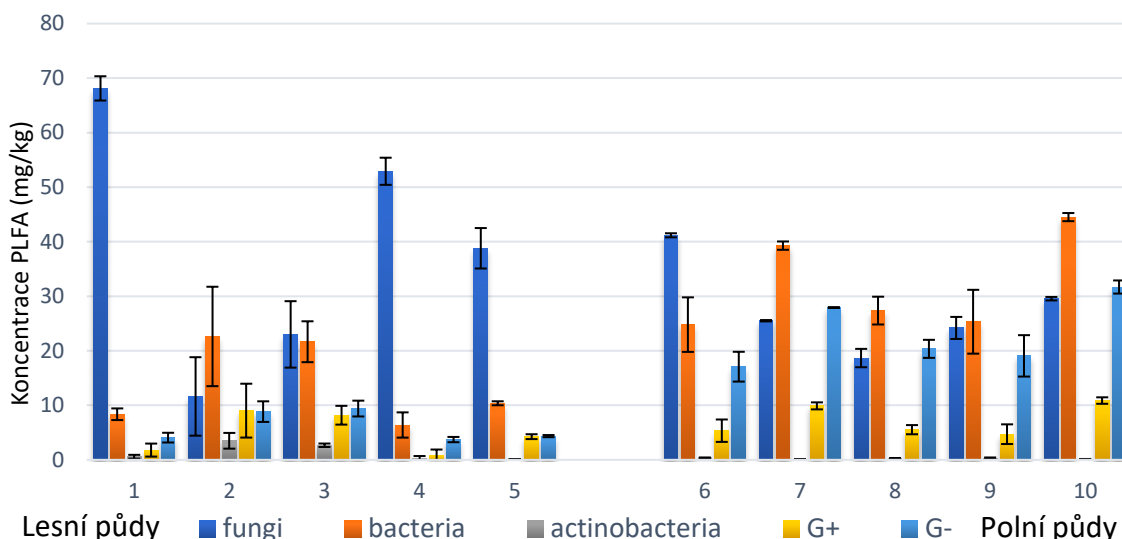
V obou provedených experimentech byla provedena analýza PLFA biofilmů, které vznikly na povrchu testovaného materiálu. V prvním experimentu, kdy byly vzorky polyuretanové pěny přimíchány přímo do půdy, bylo analýzou ANOVA zjištěno, že ve vzorcích PUR, které byly exponovány lesní půdě se nachází statisticky významně více

PLFA značící hubovou biomasu než ostatních skupin, nicméně při dalším testování bylo zjištěno, že mezi vzorky PUR z polní a lesní půdy v obsahu těchto PLFA není signifikantní rozdíl. Vzorky PUR z polní půdy obsahovaly signifikantně více PLFA značících bakterie než vzorky PUR z půdy lesní. Na obrázku č. 8 lze vidět celkovou mikrobiální biomasu biofilmů ve vzorcích z lesní a polní půdy. Chybovou úsečkou je znázorněna směrodatná odchylka z pěti měření pro vzorky z každého typu půdy, tj. 5 vzorků polní a 5 vzorků lesní půdy.

Zastoupení jednotlivých fosfolipidových mastných kyselin, které byly extrahovány ze vzorků a následně rozděleny do funkčních skupin organismů je znázorněno na obrázku č. 9. Chybovou úsečkou je znázorněna směrodatná odchylka ze dvou opakovaní měření v rámci analýzy PLFA.



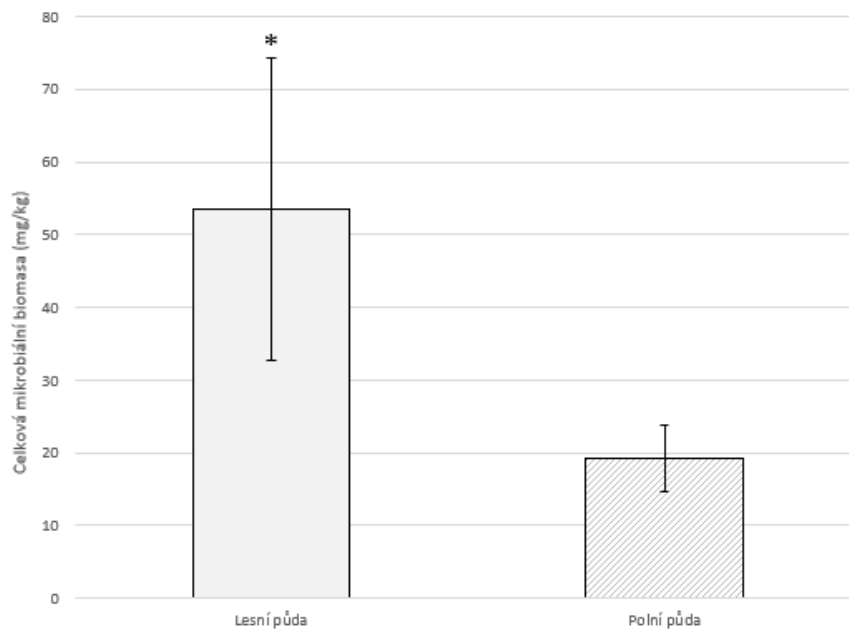
Obrázek č. 8 – Obsah celkové mikrobiální biomasy v biofilmech ze vzorků polyuretanu z lesní a polní půdy během prvního pokusu, kdy byl polyuretan přimíchán přímo do půdy. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z daného typu půdy).



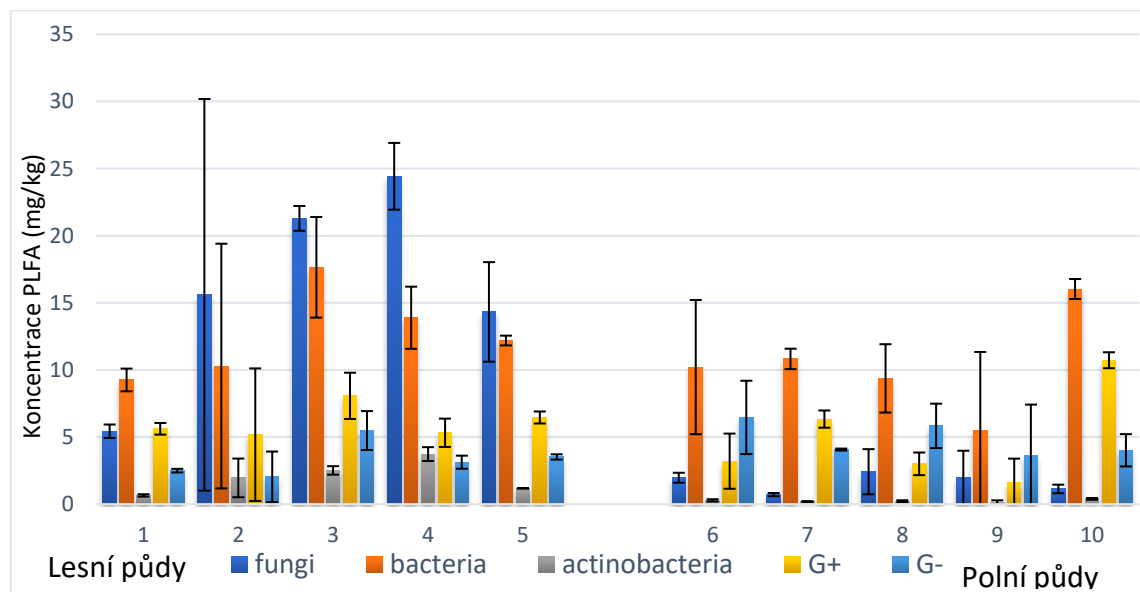
Obrázek č. 9 – Celkové koncentrace PLFA ze vzorků polyuretanu, rozdělené dle funkčních skupin mikroorganismů během prvního pokusu, kdy byl polyuretan přimíchán do půdy. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).

V druhém experimentu, kdy byly vzorky polyuretanové pěny umístěny do půdy uzavřené v litterbagu, bylo v rámci výsledků analýzou ANOVA zjištěno, že se ve vzorcích PUR, které byly exponovány lesní půdě není mezi obsahem PLFA charakteristických pro houby a bakterie významný rozdíl. U vzorků z polní půdy byl naměřen významně větší obsah biomasy bakterií oproti houbové biomase. Srovnáním vzorků z lesní půdy a polní půdy bylo zjištěno významně více houbové biomasy u vzorků z lesní půdy. Na obrázku č. 10 lze vidět obsah celkové mikrobiální biomasy biofilmů ve vzorcích z lesní a polní půdy. Chybovou úsečkou je znázorněna směrodatná odchylka z pěti měření pro vzorky z každého typu půdy, tj. 5 vzorků polní a 5 vzorků lesní půdy.

Zastoupení jednotlivých fosfolipidových mastných kyselin, které byly extrahovány ze vzorků a následně rozděleny do funkčních skupin organismů je znázorněno na obrázku č. 11. Chybovou úsečkou je znázorněna směrodatná odchylka ze dvou opakování měření v rámci analýzy PLFA.



Obrázek č. 10 – Obsah celkové mikrobiální biomasy v biofilmech ze vzorků polyuretanu z lesní a poľní půdy během druhého pokusu, kdy byl polyuretan v půdě uzavřen do litterbagu. Dvouvýběrovým t-testem bylo zjištěno, že soubory se statisticky signifikantně mezi sebou liší ($p < 0,05$). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z daného typu půdy).



Obrázek č. 11 – Celkové koncentrace PLFA ze vzorků polyuretanu, rozdělené dle funkčních skupin mikroorganismů během druhého pokusu, kdy byl polyuretan v půdě uzavřen v litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).

6. Diskuze

V diplomové práci byl testován materiál PUR BIO 10, který byl vybrán jakožto nejlépe degradující materiál z polyuretanových pěn řady „BIO“ připravených na ÚMCH AVČR pod vedením Ing. Hynka Beneše, Ph.D., které ve své práci použila Pražanová, 2018. Testovaný polyuretan byl ve formě pěny na polyester-polyetherové bázi, biodegradace polyuretanových pěn byla již dříve úspěšně zdokumentována, a to například zástupci hub *Cladosporium* a *Alternaria* (Álvarez-Barragán et al., 2016, Matsumiya et al., 2010). Předpokládaným využitím testovaného materiálu je pěnový nosič pro pachový ohradník v zemědělské krajině, který slouží k odstrašení zvěře. Vzhledem k tomuto využití byl pro diplomovou práci zvolen biodegradační test podle normy ASTM D5988-03, která je standardizovaným testem pro biodegradaci plastových materiálu v půdě, a která byla již v minulosti pro biodegradační studii na polyuretanové pěně použita (Goméz et al., 2014). Biodegradační pokus byl uskutečněn na dvou typech půdy – lesní a polní. Impuls pro porovnání degradace polyuretanu v lesní a polní půdě vznikl jednak na základě literární rešerše, kdy je zdokumentováno velké množství zástupců hub, kteří jsou zdatnými degradátory PUR (Cosgrove et al., 2007; Ibrahim et al., 2009; Mathur a Prasad, 2012 Osman et al., 2017) a jednak na základě výsledků bakalářské práce, která analýzou PLFA v polní půdě nezachytila téměř žádnou biomasu hub (Hušek, 2016). Byly uskutečněny dva biodegradační experimenty podle metodiky ASTM D5988-03 a v obou případech výsledky biodegradace byly vyšší u testovaných polních půd, a to i přes to, že ve druhém opakování biodegradačního testu s použitím litterbagů, byla v biofilmu na povrchu polyuretanu zjištěna vyšší biomasa hub než ostatních mikroorganismů.

V rámci experimentů bylo použito přibližně třetinové množství půdy a testovaného materiálu oproti doporučenému provedení dle užití metodiky. Bylo tak učiněno z důvodu neúměrného nárůstu potřeby místa a chemikálií. Tento fakt mohl mít vliv zejména na analýzu PLFA, kde pro možnou extrakci bylo možné použít pouze 0,1 g polyuretanu. Běžná hodnota navážky testovaného materiálu se pohybuje od 0,5 g (Quideau et al., 2016.). Z výsledků Pražanová, 2018 se materiál BIO 10, degradoval v prostředí polní půdy ze 42 % lze tedy usoudit, že nepříznivé výsledky biodegradace v této diplomové práci se netýkají materiálu samotného a jeho fyzikálně-chemických vlastností, ale spíše vlastností prostředí, ve kterých k degradaci docházelo.

Testované lesní půdy se pohybovaly v rozmezí pH 5,36 – 6,35, což je dle výsledků Högberg et al. (2007) oblast pH, ve které jsou již zástupci půdních hub v prostředí boreálních lesů na ústupu. Khan et al., 2017 zkoumali vliv pH na tvorbu enzymů esterázy, která je jedním z nejdůležitějších enzymů při biodegradaci polyuretanu (Amobonye et al., 2021) u houby *Aspergillus tubingensis*, pro tvorbu tohoto enzymu se ukázalo vhodné pH 7. Je tedy možné, že se houby při tomto pokusu nemohly z těchto důvodů biodegradace účastnit v plné míře. Abiotických faktorů, které mohly negativně ovlivnit biodegradaci, mohlo být při biodegradačních experimentech více. Vzhledem k průběhu experimentu se domnívám, že problém mohly způsobit zejména dva faktory – míra vlhkosti půdy a množství dostupného kyslíku. Vlhkost půdy a dostupnost kyslíku jsou důležitými ukazateli pro celkovou kondici mikrobiálního společenstva (Lauber et al., 2008). Dle metodiky byla půda nasycena na 70 % své WHC a dále byla dle metodiky

udržována přítomností kádinky s vodou v prostředí mikrokosmu. Nicméně během experimentu došlo několikrát k zalití a prokypření půdy, právě z obavy, že půda není dostatečně vlhká a v mikrokosmu by mohl být nedostatek kyslíku. Barratt et al., 2003 zkoumali biodegradaci polyuretanu při různých WHC a jejich výsledky ukazují na důležitost vztahu WHC, houbové biomasy a míru degradace. Dalším možným omezením během biodegradačních experimentů mohl být nedostatek kyslíku, zejména u lesních půd, které vzhledem k objemu vyplňovaly velkou část mikrokosmu a mohlo tak dojít k vyčerpání kyslíku v časovém úseku mezi jednotlivými měřeními, kdy byly mikrokosmy otevřeny. Tím mohlo dojít k inhibici biodegradace polyuretanové pěny, pro kterou je přítomnost kyslíku klíčová (Urgun-Demirtas et al., 2007).

Dalším velmi pravděpodobným důvodem nízké míry biodegradace může být vyšší podíl organického uhlíku v lesních půdách oproti půdám polním (Niemi & Vepsäläinen, 2005; Pietikäinen et al., 2004). Rozdíl v obsahu organických látek v testovaných půdách se projevil také vyššími hodnotami ztráty žíháním, které ukazují na větší zastoupení organické hmoty v půdě. Álvarez-Barragán et al., 2016 ve své studii pozorovali, že po třech týdnech bez jednoduše dostupného zdroje uhlíku nemusí dojít k růstu hub rodu *Cladosporium* do té míry, aby byly schopny degradovat polyuretan. Je tedy možné, zejména v druhém opakování biodegradačního experimentu, které trvalo 32 dní, že nedošlo k naplnění potenciálu lesní půdy degradovat polyuretany a mikroorganismy pouze zužitkovaly dostupný organický uhlík z půdy. Při dalším opakování biodegradačního experimentu by se pravděpodobně měla vhodněji zvolit velikost mikrokosmu, tak aby bylo možné použít dostatečné množství půdy a testovaného materiálu. Také by bylo vhodné se vyhnout zkráceným experimentům, které nemusí poskytnout úplné informace o schopnosti použité půdy biodegradovat testovaný materiál.

Ačkoliv je měření vyvinutého CO₂ často užívanou metodou v biodegradačních studiích pro posouzení biodegradace materiálu (Goméz et al., 2014, Osman et al., 2017 Shah et al., 2016) nikdy nebývá jako jediný ukazatel míry degradace a bývá často doplněna o další ukazatele, které mohou výsledky upřesnit – např. pozorování materiálu pomocí SEM (Barratt et al., 2003), změna síly v tahu (Urgun-Demirtas et al., 2007), analýza FT-IR (Peng et al., 2014) a další. Pro lepší pochopení a interpretaci výsledků v této práci – biodegradace na základě vyvinutého CO₂, by proto bylo vhodné uskutečnit ještě další analýzy a získat tak komplexnější informaci o míře biodegradace. Práci by vhodně doplnila zejména analýza FT-IR, která poskytuje informaci o tom, které vazby byly během biodegradace rozštěpeny (Magnin et al., 2020) a může tak poukázat na to, ve kterých částech polymeru došlo k největší degradaci. Tímto by se mohlo ukázat, že ačkoliv byla degradace dle naměřeného CO₂ nižší, došlo k degradaci důležitých vazeb v molekule polyuretanů, a nikoliv například k degradaci škrobu, kterého testovaný materiál obsahuje 28 %.

Biodegradační studie se v posledních letech při identifikaci a kvantifikaci degradujících organismů spoléhají prakticky pouze na sekvenční metody (Cosgrove et al., 2007, Howard et al., 2012, Magnin et al., 2019), které jsou ale vhodnější spíše pro identifikaci

konkrétních mikroorganismů než celého společenstva. V diplomové práci byla pro identifikaci mikrobiálního společenstva biofilmu použita metoda PLFA, která se v ekologických studiích používá spíše pro kvantifikaci mikroorganismů v půdním prostředí (Frostegård et al., 2011). Tato metoda pro analýzu biofilmu na povrchu polyuretanu dle mně dostupných literárních zdrojů nebyla použita, i když např. pro analýzu biofilmu na povrchu cihel ji úspěšně použili Vinten et al., 2011. Z výsledků prvního biodegradačního experimentu se zdá, že docházelo ke zkreslení výsledků analýzy PLFA půdou, která ulpěla na testovaném materiálu a byla také spolu s biofilmem extrahována. Proto byl při druhém opakování testu použit litterbag, aby tomuto zkreslení zabránilo. Výsledky PLFA v druhém opakování experimentu pak zřejmě odrážejí realističtější skladbu mikrobiálního společenstva biofilmu a lze z nich usoudit, že biofilm na povrchu materiálu byl tvořen zejména houbami. Dle Leckie, 2005 mohou abiotické stresy jako již zmiňovaný nízký obsah kyslíku nebo vody zkreslit výsledky analýzy PLFA, je proto nutné i tyto výsledky opatrně interpretovat.

Nicméně jestli se houby skutečně účastnily biodegradace PUR nelze z těchto výsledků soudit, jelikož metoda PLFA je pouze odrazem biomasy a tuto informaci není schopna poskytnout. Pro lepší posouzení biomasy hub by bylo možné použít i měření ergosterolu, který je specifickým markerem pro přítomnost hub (Klamer & Bååth, 2004). Pro další posouzení účasti hub na biodegradaci by bylo vhodné rozšířit analýzu o pozorování pomocí SEM, které by pomohlo lépe identifikovat vzniklý biofilm a identifikovat např. houbové hyfy (Khan et al., 2017). Další vhodnou metodou, která by mohla být ukazatelem aktivní biodegradace, je měření enzymatické aktivity. Vzhledem k chemické struktuře použitého polyuretanu, který je na polyester-polyurethanové bázi by se měla biodegradace účastnit esteráza (Amobonye et al., 2021). Aktivita esterázy při biodegradaci polyuretanů je dobře zdokumentována, ale často je zkoumaným organismem bakterie a testovaný materiál je pouze polyester-PUR (Howard et al., 2012 nebo Peng et al., 2014). Nicméně Álvarez-Barragán et al., 2016 zaznamenali aktivitu esterázy i u biodegradace polyether-PUR pěn houbami *Cladosporium*. Měření aktivity esterázy by tedy mohlo být vhodným doplňkem pro tento typ biodegradačního testu.

7. Závěr

Byly uskutečněny dva testy biodegradability materiálu PUR BIO 10, který byl vybrán jako nejlépe degradující materiál v práci Pražanová, 2018. Testy byly provedeny v laboratorních mikrokosmech dle metodiky ASTM D5988-03 pro dvě půdní prostředí – lesní a polní. Nad rámec metodiky byl před titrací stabilizován zachycený oxid uhličitý chloridem barnatým, aby se zamezilo potenciálnímu podhodnocení výsledků (Tošovská, 2016). V prvním testu byl materiál umístěn přímo do půdy a po 4 měsících byl mineralizován z $10,65 \pm 2,54$ % v lesní půdě a z $20,48 \pm 9,18$ % v půdě polní. Test byl ukončen a byla provedena analýza PLFA z biofilmů polyuretanové pěny za účelem zjištění participujících skupin mikroorganismů na biodegradaci polyuretanu. Výsledky z analýzy PLFA, ale neukázaly signifikantní rozdíl mezi složením mikrobiálního společenstva na biofilmu PUR z půdy lesní a z půdy polní. Na základě tohoto výsledku vzniklo podezření na zkreslení výsledků analýzy PLFA půdou, která ulpěla na testovaných fragmentech polyuretanu.

Test byl proto zopakován a testovaný materiál byl umístěn do litterbahu, který měl zabránit přímému styku testovaného materiálu s půdou a tím případnému zkreslení výsledků. V druhém, zkráceném testu biodegradability došlo po 31 dnech k mineralizaci materiálu z $3,88 \pm 3,42$ % v lesní půdě a $8,96 \pm 1,79$ % v půdě polní. Po ukončení testu proběhla analýza PLFA, ze které bylo zjištěno, že vzorky lesní půdy obsahují signifikantně více mastných kyselin charakteristických pro celkovou mikrobiální biomasu (t-test, $p < 0,05$) a stejně tak lesní půda obsahovala signifikantně více mastných kyselin typických pro houbovou biomasu (t-test, $p < 0,05$).

Z výsledků obou experimentů je patrné, že rozdíl v biodegradaci lesní a polní půdy je velmi malý. Navzdory tomu, že bylo v biofilmu materiálu z lesní půdy v druhém opakování biodegradačnímu experimentu naměřeno významně více hub a došlo tak k potvrzení druhé hypotézy, nedocházelo k větší biodegradaci polyuretanu měřené vývinem CO_2 . První hypotéza se tedy nepotvrdila.

8. Zdroje

- ACS.org, 1993. Leo Hendrick Baekeland and the Invention of Bakelite. [cit. 10.8.2020] dostupné z: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/bakelite.html>
- Agamuthu, P. a Faizura, PN., 2005. Biodegradability of degradable plastic waste. *Waste Management & Research*, 2005, 23 (2), pp. 95-100
- Alves, P. et al., 2014. Biomedical polyurethane-based materials. [cit. 10.8.2020] dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/235348389_Biomedical_Polyurethane-Based_Materials
- Álvarez-Barragán, J. et al., 2016. Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (17) pp. 5225 – 5235
- Amobonye, A. et al., 2021. Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of the Total Environment*, 2021, 759, 143536
- Akindoyo, J. O. et al., 2016. Polyurethane types, synthesis and applications – a review. *Royal society of chemistry advances*, 2016, 6, 114453
- Artham, T. & Doble, M. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular bioscience*, 2008, pp. 14-24.
- Barratt, S. R. et al., 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, pp. 78–85
- Bååth, E. & Anderson, T. H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 (7), pp. 955-963
- Bhatt, P. et al., 2021. New insights into the degradation of synthetic pollutants in contaminated environments. *Chemosphere*, 2021, 268, 128827
- Blattmann, H. et al., 2014. Isocyanate- and Phosgene-Free Routes to Polyfunctional Cyclic Carbonates and Green Polyurethanes by Fixation of Carbon Dioxide. *Macromolecular rapid communications*, 2014, 35(14), pp. 1238-1254
- Brockett, B. et al., 2012. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 44 (1) pp. 9-20

- Brodhagen, M. et al., 2014. Biodegradable plastic agricultural mulches and key features of microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2015) 99:1039–1056
- Christenson, E. M. et al., 2004. Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: In vivo studies. *Journal of Biomedical Materials research*, 2004, 69A (3), pp. 407-416
- Clarridge, J. E, 2004. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004, 17 (4), pp. 840-862
- Cosgrove, L. et al., 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73 (18) pp. 5817-5824.
- Cuadros-Orellana, S. et al., 2013. Assessment of Fungal Diversity in the Environment using Metagenomics: a Decade in Review. *Fungal Genomics & Biology*, 2013, 03 (02)
- Çaylı, G. et al., 2008. Biobased polyisocyanates from plant oil triglycerides: Synthesis, polymerization, and characterization. *Applied Polymer Science*, 2008, 109 (5), pp. 2948-2955
- Darby, R.T. & Kaplan, M., 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied microbiology*, 16(6), pp.900–905.
- El-Sayed et al., 1996. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 37 (1–2), pp. 69-79
- Fichtner, A. et al., 2014. Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology Biochemistry*, 70, 79–87.
- Fischer, K. a Majewsky, M., 2014. Cometabolic degradation of organic wastewater micropollutants by activated sludge and sludge-inherent microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98, pp. 6583-6597
- Fridrishone, A. et al., 2020. Life Cycle Assessment of vegetable oil based polyols for polyurethane production. *Journal for Cleaner Production*, 2020, 266, 121403
- Frostegård, Å., Tunlid, A. & Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(8), pp.1621–1625.
- García-Orenes, F. et al., 2015. Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem. *Agricultural Water Management* 149, 115–122.
- Gautam, R., Bassi, A. S. & Yanful, E.K., 2007. A Review of Biodegradation of Synthetic Plastic and Foams. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(2), pp.85–108.

- Goméz, E. F. et al., 2014. Biodegradability of crude glycerol-based polyurethane foams during composting, anaerobic digestion and soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 2014, 102, pp. 195-203
- Gu, J.D., 2003. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(2), pp.69-91
- Hill, G.T. et al., 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15(1), pp.25–36.
- Howard, G. T. et al., 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 43, pp. 7-12
- Howard, Gary T., 2002. Biodegradaton of polyurethane: a review. *Internatonal Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, 49.4: 245-252.
- Howard, G. T. et al., 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 2012, 23, pp. 561-573
- Högberg, M. N. et al., 2007. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 2007, 150, pp. 590–601
- Hušek, Pavel. Diverzita půdních mikroorganismů ve vztahu k biodegradaci polymerů. Praha, 2016. Bakalářská práce. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí*
- Ibrahim, N. I. et al., 2009. Polyester-polyurethane biodegradation by *Alternaria solani*, isolated from Northern Jordan. *Advances in Environmental Biology*, 2009, Vol. 2, pp. 162-170.
- Kahlerras, Z. et al., 2020. Elaboration and Characterization of Polyurethane Foams Based on Renewably Sourced Polyols. *Journal of Polymers and The Environment*, 2020
- Khatoon, H. et al., 2021. A review on the production, properties and applications of non-isocyanate polyurethane: A greener perspective. *Progress in Organic Coatings*, 2021, 154, 106124
- Kirk, J.L. et al., 2004. Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of Microbiological Methods*, 58(2), pp.169–188.
- Klamer, M. & Bååth, E., 2004. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36 (1), pp. 57-65
- Khan, S. et al., 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 2017, 225, pp. 469-480

- Lange, M. et al., 2014. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS ONE* 9, e96182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096182>
- Lauber, C. L. et al., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (9), pp. 2407-2415
- Leckie, S. E., 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*, 2005, 220 (1-3), pp. 88-106
- Loredo-Treviño, A. et al., 2012. Microbial Enzymes Involved in Polyurethane Biodegradation: A Review. *Journal of Polymers and the Environment*, 20(1), pp.258–265.
- Magnin, A. et al., 2020. Evaluation of biological degradation of polyurethanes. *Biotechnology Advances*, 2020, 39, 107457
- Magnin, A. et al., 2019. Isolation and characterization of different promising fungi for biological waste management of polyurethanes. *Microbial Biotechnology*, 2019, 12 (3), pp. 544 – 555
- Magnin, A. et al., 2019b. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Management*, 2019, 85, pp. 141-150
- Mahajan, N. & Gupta, P., 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *Royal society of chemistry advances*, 2015, 5, pp. 41839-41854
- Mathur, G. & Prasad, R., 2012. Degradation of Polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) Isolated from Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167, pp. 1595–1602
- Matsumiya, Y. et al., 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp.1946–1953.
- Marcovich, N. E. et al., 2017. Open cell semi-rigid polyurethane foams synthesized using palm oil-based bio-polyol. *Industrial crops and products*, 2017, 102, pp. 88-96
- Mukhrejee, K. et al., 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation*, 2011, 22, pp. 377 - 388
- Mülhaupt, R. et al., 2016. Flexible and Bio-Based Nonisocyanate Polyurethane (NIPU) Foams. *Macromoleculural materials and Engineering*, 2016, 301(8), pp. 944-952
- Nakajima-Kambe, T. et al., 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1999, 51, pp. 134-140

- Nielsen, T. D. et al., 2020. Politics and the plastic crisis: a review throughout the plastic life cycle. *Energy and Environment*, 2020, 9 (1), e360
- Niemi, R. M. & Vepsäläinen, M. 2005. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60 (2), pp. 195-205
- Özşeker, A. et al., 2019. Intrinsically Flame Retardant Polyurethane Prepared with Epoxidized Soybean Oil and Vinylphosphonic Acid. *Croatia chemica acta*, 91(4), 589–597
- Odinga et al., 2020. Occurrence, formation, environmental fate and risks of environmentally persistent free radicals in biochars. *Environmental International*, 134, 2020, 105172
- Osman, M. et al., 2018. Degradation of Polyester Polyurethane by *Aspergillus* sp. Strain S45 Isolated from Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018, 26, pp.301–310
- Ozsagiroglu, E. et al., 2012. Biodegradation and Characterization Studies of Different Kinds of Polyurethanes with Several Enzyme Solutions. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2012, 21 (6), pp. 1777 - 1782
- Pathak, V. N., 2017. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017, 4 (15)
- Peng, Y. H. et al., 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(16)
- Pietikäinen, J. et al., 2004. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52, pp. 49–58
- PlasticsEurope, 2020. Plastics – the Facts 2020: An analysis of European plastic production, demand and waste data. [cit. 4.5.2021] dostupné z: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/4312-plastics-facts-2020>
- Pražanová, Kateřina. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě a následná analýza produktů rozkladu. Praha, 2018. Diplomová práce. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí.*
- Quideau, S. A. et al., 2016. Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. *Journal of Visualized Experiments*, 2016, 114, 1–9.
- Rafiemanzelat, F. et al., 2013. Synthesis of new poly(ether–urethane–urea)s based on amino acid cyclopeptide and PEG: study of their environmental degradation. *Amino Acids*, 2013, 44, pp. 449-459

- Rafiemanzelat, F. et al., 2015. Study of Biological Degradation of New Poly(Ether-Urethane-Urea)s Containing Cyclopeptide Moiety and PEG by *Bacillus amyloliquefaciens* Isolated from Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177, pp. 842-860
- Rahman M.M., Rabbani M.M. & Saha J.K., 2019. Polyurethane and Its Derivatives. *Functional Polymers*, pp. 1-16.
- Sánchez, C., 2020. Fungal potential for the degradation of petroleum-based polymers: An overview of macro- and microplastics biodegradation. *Biotechnology Advances*, 2020, 40, 107501
- Shah, A. A., et al., 2008a. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Annals of Microbiology*, 58 (3) 381-386
- Shah, A.A. et al., 2008b. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), pp.246–265.
- Shah, Z. et al., 2013a. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GCeMS, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 77, pp. 114-122
- Shah, Z. et al., 2013b. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*, 2013, 24(6), pp.865-77
- Shah, Z. et al., 2016. Degradation of polyester polyurethane by an indigenously developed consortium of *Pseudomonas* and *Bacillus* species isolated from soil. *Polymer Degradation and Stability*, 2016, 134, pp. 349-356
- Shen, M. et al., 2020. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution Volume 263, Part A, August 2020*, 114469
- Singh, B. & Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93 (3), pp. 561-584
- Spontón, M. et al., 2013. Biodegradation study by *Pseudomonas* sp. of flexible polyurethane foams derived from castor oil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 85, pp. 85 - 94
- Suryawanshi et al., 2019. Advances in synthesis of non-isocyanate polyurethanes. *Polymer bulletin*, 2019, 76, pp. 3233-3246
- Šnajdr, J. et al., 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2068–2075.

Tošovská, Kateřina. Stanovení biologické rozložitelnosti nových typů lehčených polyurethanů. Praha, 2016. Bakalářská práce. *Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí.*

Urgun-Demirtas, M. et al., 2007. Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions. *Polymer Degradation and Stability*, 92(8), pp.1599–1610.

Vinten, A. J. A. et al., 2011. Comparison of microbial community assays for the assessment of stream biofilm ecology. *Journal of Microbiological Methods*, 85 (3), pp. 190-198

Watzinger, A., 2015. Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86, pp. 98–107.

Zafar, U. et al., 2013. Fungal Communities Associated with the Biodegradation of Polyester Polyurethane Buried under Compost at Different Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, 79 (23), pp. 7313-7324

Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils*, 1999, 29, pp.111–129

Zhang, B. et al., 2020. Microplastics in soils: a review of possible sources, analytical methods and ecological impacts. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology Volume 95, Issue 8, August 2020*, pp. 2052-2068

Zhang, J. et al., 2020. Biodegradation of polyethylene microplastic particles by the fungus *Aspergillus flavus* from the guts of wax moth *Galleria mellonella*. *Science of the Total Environment*, 2020, 704, 135931

9. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Struktura použitého polyuretanu BIO 10

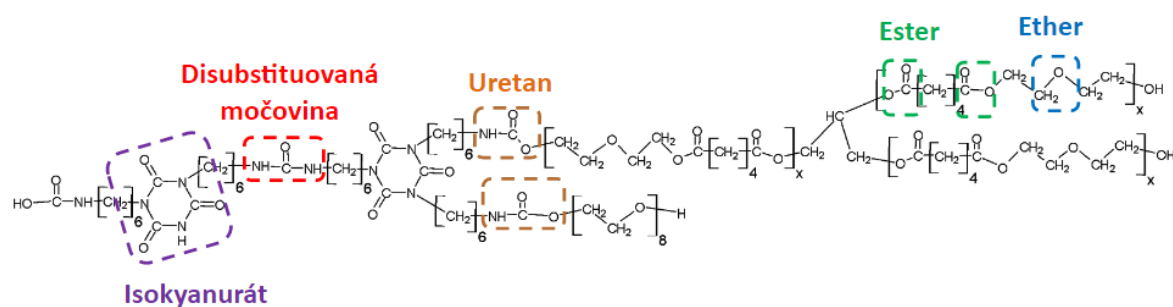
Příloha 2: Látky použité pro výrobu testovaného polyuretanu BIO 10

Příloha 3: Mapa míst ze kterých byly odebrány půdy

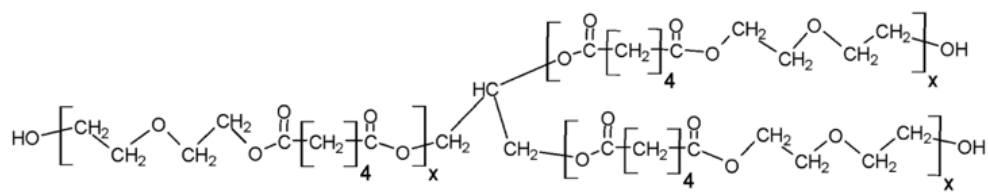
Příloha 3: Vizuální srovnání použité lesní a polní půdy

Příloha 4: Použité sklenice - mikrokosmy po vyjmutí z termoboxu před začátkem titrace

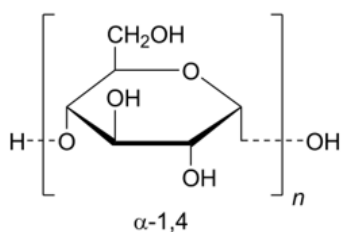
Příloha 5: Litterbag s polyuretanem použitý v pokusu



Příloha č. 1: Struktura použitého polyuretanu BIO 10 (Ing. Hynek Beneš, PhD.)

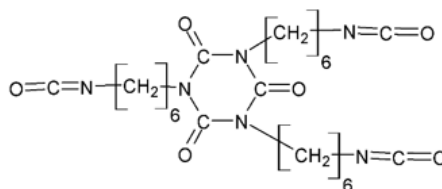


POLYESTER TRIOL

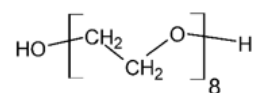


α -1,4
 $2 < n < 20$

ŠKROB

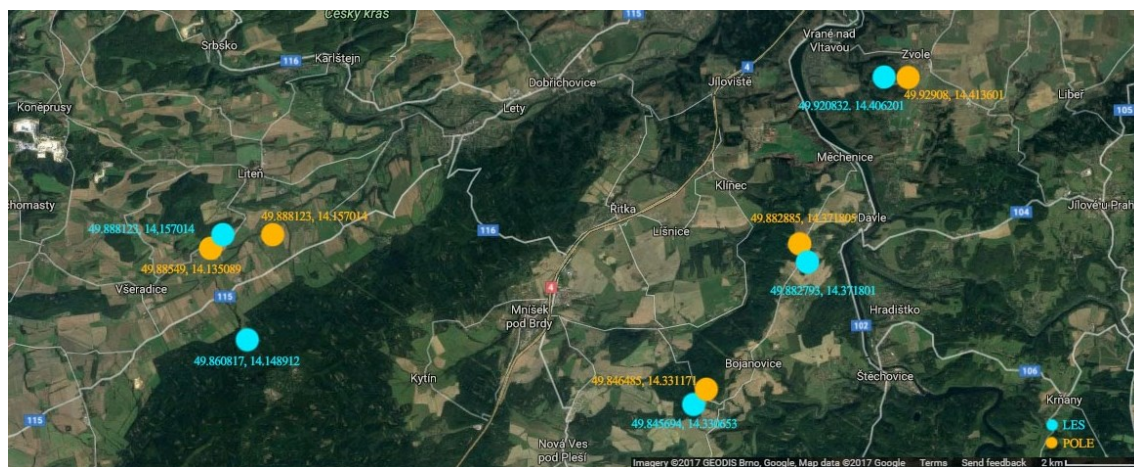


ISOKYANÁT



PEG 400

Příloha č. 2: Látky použité pro výrobu testovaného polyuretanu BIO 10 (Ing. Hynek Beneš, Ph.D.)



Příloha č. 3: Mapa míst, ze kterých byly odebrány půdy



Příloha 4: Vizuální srovnání použité lesní a polní půdy



Příloha 5: Použité sklenice – mikrokosmy po vyjmutí z termoboxu před začátkem titrace



Příloha 6: Litterbag s polyuretanem před a po použití v pokusu