

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Kateřina Valešová

Biodegradace nového typu polyuretanu při použití různých půdních substrátů

Biodegradation of a new type of polyurethane using various soil substrates

Diplomová práce

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

Praha, 2022

Prohlášení:

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

V Praze, 21. 4. 2022

.....

podpis

Poděkování:

Děkuji především skvělé školitelce RNDr. Petře Innemanové, Ph.D. za nekonečnou ochotu a podporu při sepisování diplomové práce a za pomoc při zprostředkování laboratorních analýz. Děkuji za všechny provedené kontroly, konzultace a cenné rady, které mě směřovaly dál ke zdárnému konci.

Děkuji Mgr. Kamile Šrédlové za možnost jí asistovat a přihlížet při testování ekotoxicity na Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Děkuji Ing. Hynku Benešovi, Ph.D z Ústavu makromolekulární chemie AV ČR, že jsem mohla nahlédnout do vědecké sféry a částečně se účastnit výzkumu. Děkuji za všechny přínosné konzultace. Filipu Křivohlavému děkuji za všechny milé asistence v půdní laboratoři Ústavu pro životní prostředí PŘF UK.

Děkuji své rodině, bez které by tato práce jistě nevznikla. V neposlední řadě a neméně důležitě děkuji zejména všem spřízněným duším, všem bytostem lidským, nelidským i zvířecím, které se kolem mě vyskytovaly a našla jsem v nich oporu během dopisování této práce.

DĚKUJI.

Obsah

Abstrakt	5
Abstract	6
Seznam použitých zkratk	7
1 Úvod	8
2 Teoretická část	9
2.1 Polyuretan.....	9
2.1.1 Biodegradabilní polyuretan	10
2.1.2 Využití katalyzátorů při výrobě biodegradovatelných polyuretanů.....	11
2.1.3 Proces biodegradace polyuretanu	11
2.2 Metody stanovení míry biodegradace	13
2.2.1 Přehled používaných standardizovaných metodik.....	14
2.3 Testování ekotoxicity	16
2.3.1 Přehled testů ekotoxicity použitých pro hodnocení polyuretanu.....	16
2.3.2 Test ekotoxicity s bakterií <i>Vibrio fischeri</i>	18
2.3.3 Ekotoxicita polyuretanu	19
2.3.4 Ekotoxické účinky cínu a dibutylcínu dilaurátu	20
2.4 Analýza PLFA	21
3 Cíle práce a hypotézy	24
4 Metodika	25
4.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení.....	25
4.1.1 Použité chemikálie.....	25
4.1.2 Použité přístroje a ostatní vybavení	25
4.2 Biodegradace polyuretanu	26
4.2.1 Charakteristika půdních vlastností	26
4.2.2 Charakteristika testovaného materiálu.....	27
4.2.3 Stanovení stupně biodegradace PUR	28

4.3	Stanovení ekotoxicity v půdách po biodegradaci PUR.....	30
4.3.1	Stanovení ekotoxicity pomocí testu s <i>Vibrio fischeri</i>	31
4.3.2	Zkrácený test biodegradace ve standardizované půdě s vyšším obsahem PUR a organocínovým katalyzátorem	32
4.3.3	Stanovení ekotoxicity vzorků po zkráceném testu biodegradace pomocí bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	33
4.4	Analýza PLFA	33
4.5	Statistické zpracování dat	34
5	Výsledky a diskuze	35
5.1	Biodegradace polyuretanu.....	35
5.2	Test ekotoxicity	39
5.2.1	Ekotoxicita výluhů vzorků dlouhodobé biodegradace	39
5.2.2	Ekotoxicita výluhů vzorků zkráceného testu biodegradace	40
5.3	Analýza PLFA	42
6	Závěr	45
7	Použité zdroje a literatura	46
8	Přílohy	54

Abstrakt

Nově vyvinutý, plně alifatický polyuretan (PUR) pro aplikace v zemědělství byl vystaven aerobní biodegradaci v půdě (ASTM D5988-18) a modifikací této metody také ve standardizované půdě, která je běžně používaná pro ekotoxikologické testy. Biodegradabilita byla posuzována měřením uvolněného CO₂ během mineralizace testovaného materiálu. PUR v přírodní půdě (dle D5988-18) dosáhl 43 ± 15,0% mineralizace a ve standardizované půdě 28 ± 9,9%. Oba typy půd splnily kritéria validity (rozklad celulózy >70%). Výluhy z obou typů půd s obsahem PUR (a výluhy pozitivních kontrol obsahující celulózu a negativních kontrol obsahující pouze půdu) byly po půlroční biodegradaci testovány na ekotoxicitu pomocí mořské bakterie *Vibrio fischeri*. Biotest byl proveden z důvodu podezření toxického působení dibutylcín dilaurátu, který byl použit při výrobě PUR jako katalyzátor. Navíc byl proveden zkrácený test biodegradace ve dvou variantách (s vyšším obsahem PUR a tomu odpovídající množství čistého katalyzátoru) ve standardizované půdě a výluhy byly poté opět testovány na ekotoxicitu. Žádný výluh neprokázal ekotoxické účinky. Biotest byl doplněn analýzou PLFA pro zjištění případného vlivu PUR na mikrobiální diverzitu (oproti kontrolám). Ani v tomto případě nebyl zjištěn negativní účinek polyuretanu na půdní mikrobiotu.

Klíčová slova: polyuretanová pěna, biodegradabilní plast, různé půdní substráty, ekotoxicita, DBTDL, fosfolipidové mastné kyseliny

Abstract

Newly developed fully aliphatic polyurethane (PUR) for agriculture applications was exposed to aerobic biodegradation in soil (ASTM D5988-18) and in modification of this method also in standardized soil which is commonly used for ecotoxicological tests. Biodegradability was assessed by measuring released CO₂ during the mineralization of the test material. PUR in the natural soil (according to D5988-18) reached 43 ± 15,0% mineralization and in the standardized soil 28 ± 9,9 %. Leachates of both types of soils containing PUR (and leachates of positive controls containing cellulose and negative controls containing pure soil) were tested for ecotoxicity with a marine bacteria *Vibrio fischeri* after the half-year biodegradation test. The biotest was performed because of the suspicion of toxic effect of dibutyltin dilaurate, which was used as a catalyst within the PUR production. Furthermore, a reduced biodegradation experiment in two variants was carried out (with higher amount of PUR and a corresponding amount of the pure catalyst) in the standardized soil and then the leachates were tested for the ecotoxicity as well. None of the leachates showed ecotoxic effects. A PLFA analysis was performed in addition to the biotest to examine a potential impact of PUR on a microbial diversity (compared to the controls). Even in this case, no negative effect of polyurethane on the soil microbiota was found.

Key words: polyurethane foam, biodegradable plastic, different soil substrate, ecotoxicity, DBTDL, phospholipid fatty acid

Seznam použitých zkratek

ASTM	Americká společnost pro testování a materiály
DBTDL	dibutylcín dilaurát ($C_{32}H_{64}O_4Sn$)
DIN	Německý ústav pro průmyslovou normalizaci (z něm. Deutsches Institut für Normung)
EC50	efektivní koncentrace (koncentrace, kdy je pozorovaný efekt viditelný u 50 % testovaných jedinců)
FTIR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (z angl. Fourier Transform Infrared)
HD-PE	vysokohustotní polyethylen (z angl. High Density Polyethylene)
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci (z angl. International Organization for Standardization)
LD-PE	nízkohustotní polyethylen (z angl. Low Density Polyethylene)
MBÚ AV ČR	Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky v Praze
MŽP	Ministerstvo životního prostředí České republiky
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. Organisation for Economic Co-operation and Development)
PET	polyethylentereftalát
PLA	kyselina polyléčná (z angl. Polylactic Acid)
PLFA	fosfolipidové mastné kyseliny (z angl. Phospholipid Fatty Acid)
PNEC	předpokládaná koncentrace nezpůsobující žádný účinek (z angl. Predicted No-Effect Concentration)
PP	polypropylen
PUR	polyuretan
PVC	polyvinylchlorid
SEM	skenovací elektronový mikroskop
TBT	tributylcín
UNI	italská standardizační organizace (z ital. Nazionale Italiano di Unificazione)
UV	ultrafialové záření (z angl. Ultra Violet)
ÚMCH AV ČR	Ústav makromolekulární chemie Akademie věd České republiky v Praze
WHC	retenční vodní kapacita půdy (z angl. Water holding capacity)

1 Úvod

Ročně se po celém světě vyprodukuje zhruba 300 miliónů tun plastového materiálu (Zalasiewicz et al., 2016). V roce 2020 dosáhla světová produkce plastů 367 miliónů tun (PlasticsEurope, 2021). Většina materiálů je designována k dlouhodobému používání, aby odolávaly okolním podmínkám – biotickým i abiotickým faktorům (UV degradace, enzymatická degradace, eroze či abraze) (Magnin et al., 2020). I tak je ale zhruba polovina plastových výrobků využita pouze jednorázově, zejména plastové obaly (UNEP, 2018). Většina plastového odpadu (60 %) se navíc kumuluje na skládkách nebo končí v přírodních ekosystémech. Pouze malá část dosud vyprodukovaného plastového odpadu byla řádně likvidována spalováním (12 %) nebo recyklací (9 %) (Geyer et al., 2017). Plastové znečištění se dokonce stalo ukazatelem geologického období nazývané Antropocén (Zalasiewicz et al., 2016). Pokud chceme předejít znečištění životního prostředí, jednou z možností je vytvářet materiály úmyslně biodegradovatelné pro ty výrobky, které mohou uniknout do otevřeného prostředí (Wei et al., 2020).

Je celkem prokázané, že se z plastů (včetně polyuretanů) uvolňují toxické látky, či toxikanty vznikají přímo během degradace. Stejně tak masivní produkce plastových výrobků spojená s čerpáním fosilních zdrojů a následné neadekvátní nakládání s plastovým odpadem vyúsťují v úniky znečišťujících látek do životního prostředí. Tyto látky pak mohou ohrožovat různé organismy v něm žijící, včetně člověka (Azoulay et al., 2019; Magnin et al., 2020). Proto je důležité, aby meziprodukty i finální produkty (bio)degradace nevykazovaly žádné ekotoxikologické riziko pro případ, že by materiál skončil jako odpad v životním prostředí (Trhlíková et al., 2021).

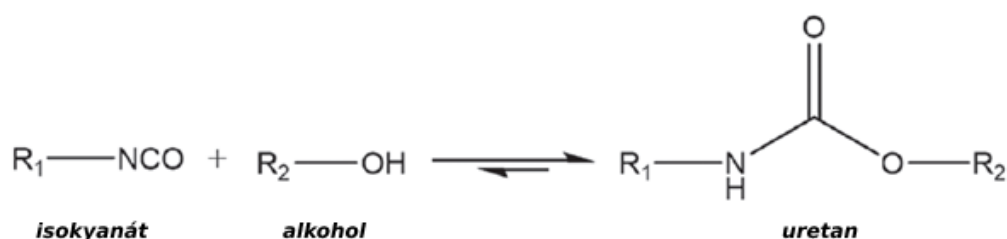
Cílem této práce je částečně sloučit postupy testování biodegradability a ekotoxicity podle příslušných standardizovaných norem. A to tak, že substrát použitý při měření biodegradace se použije i jako výluhová matrice pro potřeby testování ekotoxicity. A tím pádem zjednodušit celý proces posuzování nových materiálů. Pro laboratorní testy byl zvolen nový typ lehčeného polyuretanu vyvinutého pro aplikace v zemědělství a lesnictví (pachové ohradníky). Modifikovaný test biodegradace byl doplněn o variantu se standardizovanou půdou, která je vhodným médiem pro navazující test ekotoxicity, který byl proveden pomocí testovacího organismu *Vibrio fischeri*.

2 Teoretická část

2.1 Polyuretan

Polyuretan je 6. nejvyužívanější typ plastů všestranného použití. Tvoří 7,8 % produkce plastů v Evropské unii (předstihují ho PP, LD-PE, HD-PE, PVC a PET). Je využíván zejména jako izolační materiál ve stavebnictví a automobilovém průmyslu (pneumatiky, nárazníky), v elektroprůmyslu (lednice a další elektronická zařízení) a mnoho dalších využití nachází i v domácnostech (matrace, gumové výrobky, nábytek) nebo jako adhezivní nátěry apod. (Khan et al., 2017).

Polyuretan je polymer vznikající většinou reakcí polyolů (vícesytné alkoholy) a polyisokyanátů (Seymour & Kauffman, 1992; Furtwengler et al., 2018), nicméně v rámci struktur polyuretanu je velká variabilita (Cregut et al., 2013). Reakce vzniku je znázorněna na Obr. 1. Polyoly tvoří tzv. měkké segmenty a isokyanáty tvoří tzv. tvrdé segmenty struktury PUR. Nejčastěji používané polyoly dělíme na polyesterové (nejvyužívanější je např. kyselina olejová, kyselina adipová nebo diethylen glykol) a polyetherové (glycerin, polypropylen glykol nebo polypropylen) (Darby & Kaplan, 1968). Při výrobě se používají nadouvadla (voda, hexan atd.) a různé katalyzátory či aditiva, aby se dosáhlo požadované struktury a mechanických vlastností (Furtwengler et al., 2018; Skleničková et al., 2020). PUR můžeme v podstatě považovat za obří molekulu, která je díky vnitřnímu zesíťování méně rozpustná a tepelně odolná (Seymour & Kauffman, 1992; Liu et al., 2021). Polyuretan patří do základní skupiny reaktoplastů (vedle termoplastů). To znamená, že jej můžeme tavit, ale nelze ho opětovně formovat do libovolného tvaru, jelikož se ničí jeho struktura (PlasticsEurope, 2020). Právě kvůli povaze reaktoplastu a vnitřnímu zesíťování dochází k nedostatečné recyklaci polyuretanu. Využití biodegradovatelnosti materiálu různými mikroorganismy a enzymy se jeví jako jedna z alternativ k běžné recyklaci. V tomto případě se PUR může využít i jako zdroj uhlíku pro nové biotechnologie (Wierckx et al., 2015).



Obr. 1. Schéma vzniku uretanu reakcí isokyanátu a polyolu (převzato a upraveno z Furtwengler et al., 2018).

2.1.1 Biodegradabilní polyuretan

S ohledem na množství produkovaného PUR odpadu je nutné s tímto odpadem náležitě nakládat a vyvíjet nové metody jeho zpracování i nové recyklační strategie včetně biorecyklace (Schmidt et al., 2017; Liu et al., 2021). Biologická recyklace PUR je v souladu s myšlenkou, jak redukovat velké množství odpadu a plastového znečištění (Cregut et al., 2013; Magnin et al., 2019). Zejména v tom případě, kdy se stále velká část (60 %) plastového odpadu ukládá na skládky nebo přímo uniká do volné přírody (Geyer et al., 2017), kde se rozpadá na menší částice tzv. makroplasty (>5 mm), mikroplasty (<5 mm) či nanoplasty (cca 10 nm) (Zalasiewicz et al., 2016). Zcela biodegradabilní verze plastů by mohly eliminovat výskyt všech zmíněných malých frakcí v životním prostředí (Artham & Doble, 2008; Filiciotto & Rothenberg, 2021). Právě v podobě mikroplastů byl výskyt polyuretanu zdokumentován i v mořském znečištění (Frère et al., 2016; da Rocha et al., 2021).

Je nasnadě vytvářet nové biodegradabilní materiály, které by pomohly řešit akumulaci polyuretanového odpadu (Cregut et al., 2013; Khan et al., 2017). Avšak kvůli vysoké komplexitě struktury polyuretanu zatím nebyla žádná účinná biodegradace na minimální vhodnou úroveň zdokumentovaná. Stále jsou zde mezery a rozdíly v technických i vědeckých přístupech (Liu et al., 2021). Zatímco biodegradace kompaktního PUR je zkoumána celkem detailně, biodegradace PUR pěn je probádána mnohem méně (Trhlíková et al., 2021).

Plasty na biologické bázi (bioplasty), ne však biodegradabilní, mají často stejnou strukturu jako ty na ropné bázi (Filiciotto & Rothenberg, 2021, Kjeldsen et al., n/a). Je důležité rozlišovat pojmy bioplast a biodegradabilní plast, protože materiály na biologické bázi nejsou vždy biodegradabilní. Zároveň některé plasty na ropné bázi mohou podléhat biodegradaci (Fernandes et al., 2020). Během biodegradace dochází k asimilaci (využití vzniklých monomerů/jednoduchých organických látek a jejich zabudování do biomasy mikroorganismů) a k mineralizaci materiálu (rozklad na jednoduché anorganické látky – CO₂, H₂O, CH₄) (Skleničková et al., 2020). Asimilace a mineralizace jsou klíčové procesy vedoucí k celkovému vymizení materiálu, kdy se eliminuje akumulace v prostředí a vznik perzistujících mikroplastů (Artham & Doble, 2008; Skleničková et al., 2021a). Se vznikem mikroplastů se pojí různá rizika, např. uvolňování či sorpce kontaminantů, ohrožení zdraví člověka a jiných organismů včetně akumulace v potravním řetězci (Rai et al., 2021).

Biodegradabilní PUR nachází uplatnění v zemědělských a lesních aplikacích jako pachové ohradníky, nosiče organických látek či sorbenty pesticidů a v mnoha dalších biotechnologiích využívající pórovitou strukturu materiálu. V těchto souvislostech se mnohdy nepočítá s následným

odstraněním materiálu a jeho zneškodněním mimo místo použití. Nýbrž může být ponechán na místě, kde se v ideálním případě činností mikroorganismů a působením abiotických faktorů rozloží, integruje do půdy a stane se součástí uhlíkového cyklu. V tomto případě je ale nutné zároveň zajistit nezávadnost samotného materiálu i jeho rozkladných produktů, aby se zamezilo případné kontaminaci okolí a nezůstávaly v půdě škodlivé substance (Kyrikou & Briassoulis, 2007; Guerrini et al., 2017; Beneš et al., 2020; Shen et al., 2020). Fritz (2005) výrazně doporučuje kombinaci testů pro stanovení biodegradability a pro stanovení ekotoxicity v případě biodegradovatelných materiálů.

2.1.2 Využití katalyzátorů při výrobě biodegradovatelných polyuretanů

Z dostupné literatury vyplývá, že je při výrobě PUR využíváno široké spektrum katalyzátorů. Katalyzátory se používají například ke zvýšení reaktivity během výroby PUR či k dosažení kýžené struktury. Často to bývají kovové sloučeniny, konkrétně organokovové katalyzátory obsahující cín, olovo, zinek nebo jejich kombinace. Dále se běžně používá např. diethyl-toluendiamin (DETDA) (Smith, 1988). Nicméně tyto sloučeniny vykazují různou míru toxicity (Gantrade, 2019), kterou je v případě biodegradabilních polymerů potřeba vyloučit (Kapanen, 2012; Cregut et al., 2013).

Akay a kol. (2021) použil oktoát cínatý $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ – organickou sloučeninu cínu jako katalyzátor při výrobě biodegradabilního PUR na biologické bázi (celulóza z lufy válcovité *Luffa cylindrica*). Výsledný materiál je prezentován jako netoxický. Beneš a kol. (2020) použil ve vývoji alifatické polyuretanové pěny dibutylcín dilaurát. Szpiżyk a kol. (2021) využil trimethylamin (TEA) jako katalyzátor při zhotovení biodegradabilního PUR.

2.1.3 Proces biodegradace polyuretanu

Khan a kol. (2017) popisuje biodegradaci PUR ve třech krocích. Obecně se snižuje pevnost a pružnost materiálu a dochází k jeho rozpadu. Prvním krokem je přichycení bakterií a hub k povrchu materiálu. Druhým krokem je růst mycelia, případně biofilmu a třetím krokem je sekrece enzymů. Aktivita enzymů, stejně tak i mechanická síla vycházející z růstu hyf, směřuje ve výslednou biodegradaci polyuretanu. Dochází tak současně k chemické i fyzikální degradaci. Postupně se zvyšuje drsnost povrchu, objevují se praskliny, které umožňují další průnik mikroorganismů a enzymů do materiálu díky většímu kontaktu s povrchem (Cregut et al., 2013). Důležité jsou během celého procesu podmínky prostředí – dostupnost uhlíkového zdroje, vlhkost, pH, teplota či výkyvy teplot, charakter půdy, přítomnost kyslíku a slunečního záření, bez kterých

by samotná biodegradace probíhala jen velmi těžko. Tyto faktory totiž hlavně v počátku iniciují fragmentaci materiálu a tím pádem zlepšují přístup mikroorganismům. PUR může sloužit jako jediný zdroj uhlíku (Howard, 2011; Ibrahim et al., 2011; Álvarez-Barragán et al., 2016; Beneš et al., 2020) i jako jediný zdroj dusíku (zejména pro houby). Pro většinu bakterií je PUR jako jediný zdroj dusíku limitující, a proto zastavuje nebo snižuje míru degradace (Cregut et al., 2013; Beneš et al., 2020). Velký objem materiálu může znemožňovat přístup enzymů do vnitřních struktur polyuretanu a degradace pak probíhá pomaleji (Schmidt et al., 2017).

Mimo aktivitu organismů a abiotických faktorů je důležitá i samotná struktura degradovaného polyuretanu (Urgun-Demirtas et al., 2007; Briassoulis & Degli-Innocenti, 2017; Skleničková et al., 2020). Polyuretanové pěny jsou obecně díky obsahu aromatických (isokyanátových) částí a hojně zesíťované struktuře hůře přístupné pro mikroorganismy (Cregut et al., 2013). Zároveň esterové vazby (měkké segmenty) jsou náchylnější k degradaci než isokyanátové části (tvrdé segmenty) (Trhlíková et al., 2021). Obdobně polyesterové polyuretany jsou náchylnější k napadení mikroorganismy, tím pádem lépe biodegradovatelné než ty na polyetherové bázi (Darby & Kaplan 1968; Skleničková et al., 2020). Někdy jsou při výrobě materiálu přidávána aditiva pro urychlení biodegradace či fragmentace, může jím být např. škrob (Artham & Doble, 2008).

Často se v případě biodegradace polyuretanu zmiňují houby rodu *Aspergillus spp.* a *Cladosporium spp.*, kdy biodegradace dosahuje vysoké úrovně (Ibrahim et al., 2011; Liu et al., 2021). Ve studii Álvarez-Barragán a kol. (2016) dosáhla biodegradace PUR s *Cladosporium pseudocladosporioides* až 87 % po 14 dnech kultivace v minerálním médiu, kdy byl PUR jako jediný zdroj uhlíku. Další hojně zmiňované rody mikroorganismů v souvislosti s biodegradací jsou *Fusarium solani* a *Pseudomonas spp.* (Howard, 2011; Ibrahim et al., 2011; Liu et al., 2021). Dle dostupných zdrojů probíhá rozklad PUR pomocí hub daleko efektivněji než bakteriální degradace (Cregut et al., 2013; Beneš et al., 2020; Liu et al., 2021; Skleničková et al., 2021a; Trhlíková et al., 2021).

Enzymatická biodegradace je u PUR pěn velmi málo prozkoumaná (Skleničková et al., 2020). Biodegradace probíhá hydrolýzou esterových vazeb (Khan et al., 2017; Schmidt et al., 2017) pomocí enzymů esterázy (Magnin et al., 2019), zatímco uretanové vazby spíše vzdorují enzymatické hydrolýze a štěpí se složitěji v porovnání s esterovou vazbou (Schmidt et al., 2017; Liu et al., 2021). Nicméně i některé esterázy byly popsány jako schopné hydrolyzovat uretanovou vazbu. Další enzymy zapojené do degradace PUR jsou amidázy, proteázy, lakázy, peroxidázy (Kemoná & Piotrowska, 2016; Magnin et al., 2019; Skleničková et al., 2020) a ve studii Loredó-Treviño a kol. (2011) se ureáza ukázala jako nejefektivnější. Nicméně enzymatický rozklad

nebyl ještě plně objasněn. Analytická praktická literatura chybí téměř úplně, neboť dosud byla biodegradace zkoumána spíše jen s mikroorganismy (Magnin et al., 2021).

2.2 Metody stanovení míry biodegradace

Klíčovým nástrojem k posuzování biodegradovatelnosti plastů jsou standardizované metody. Umožňují opakovatelnost měření a porovnatelnost testovaných materiálů mezi sebou a zároveň sjednocují používanou terminologii v této oblasti. Standardizované metody většinou neurčují hranici, kdy se materiál dá nazvat jako „biodegradovatelný“. Slouží pouze jako měřicí a posuzovací nástroj k určení stupně biodegradace testovaného materiálu (Briassoulis & Degli-Innocenti, 2017). Současně mohou být dobrým vodítkem pro vývoj nových materiálů, kdy se výrobci budou snažit vytvořit materiál degradující za psaných podmínek. Rizikem ovšem zůstává, že v reálných podmínkách se materiál bude degradovat jiným způsobem než v laboratorních podmínkách a v tomto ohledu mohou být normy zavádějící (Kjeldsen et al., n/a).

Existuje několik způsobů hodnocení míry biodegradace. Řadí se sem ztráta mechanických vlastností (pevnost v tahu a tlaku), vizuální posouzení, analýza rozkladných produktů, úbytek hmotnosti, nebo jak je zmíněno ve většině norem – měření mineralizace (založeno na principu zachytávání uvolněných plynů během procesů biodegradace – respirometrie). Pozorování změn mechanických vlastností vyžaduje velké množství testovaného materiálu a z výsledků je špatně odvoditelná míra degradace z důvodu rozdílných charakteristik materiálů. Ztráta mechanických vlastností je kruciólní zejména v počáteční fázi rozkladu. Vizuální posuzování je velice subjektivní záležitost, a proto by měly být používány speciální softwarové programy k tomu určené a vhodné analytické nástroje (např. SEM) (Kjeldsen et al., n/a). Analýza rozkladných produktů se provádí nejčastěji pomocí chromatografie (gelová, kapalinová či plynová) v kombinaci s hmotnostním spektrometrem nebo pomocí nukleární magnetické rezonance. Spolu s tím se často analyzují i strukturální změny (pomocí FTIR) (Skleničková et al., 2020). Úbytek hmotnosti se nepovažuje za zcela vhodnou metodu posuzování biodegradace (Liu et al., 2021). Zkreslují se tak výsledky kvůli náchylnosti k mechanické erozi materiálu za vzniku mikroplastů (Magnin et al., 2021). Například Wang a kol. (2008) ve své studii provedl experiment založený na posuzování rozdílu hmotnosti materiálu před a po zahrabání v půdě. Ovšem testování muselo být ukončeno z důvodu velké eroze testovaného materiálu. Bylo nemožné z plastového materiálu odstranit půdu a následně vyhodnotit míru degradace.

Všechny výše zmíněné metody ovšem neposkytují informace o rozsahu mineralizace (van der Zee, 2005). Jen málo studií se zabývá přímo testováním mineralizace materiálu (Pražanová, 2018). Měření množství uvolněných plynů neposkytuje informace o osudu látek, které nejsou přeměňovány na oxid uhličitý (případně methan v anaerobních podmínkách). Navíc pokud dojde náhodně nebo nedopatřením k anaerobii, možný vzniklý methan není započítán do rozsahu biodegradace, měří-li se jen CO₂ (Kjeldsen et al., n/a). Na druhou stranu měření mineralizace je klíčové k posouzení biodegradace, jak již bylo zmíněno v předešlé kapitole 2.1.1.

2.2.1 Přehled používaných standardizovaných metodik

Následující výčet uvádí standardizované metodiky pro stanovení biodegradovatelnosti plastového materiálu v půdní matrici za aerobních podmínek.

ASTM D5988-18 – Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials in soil.

Princip metody je založen na měření množství uvolněného oxidu uhličitého. Metoda je určena pro všechny typy plastů, který neinhibují společenstva hub a bakterií zastoupené v používané půdě. Validity testu je dosaženo, pokud se referenční materiál (pozitivní kontrola) rozloží ≥ 70 % během 6 měsíců, což je doporučená doba trvání pokusu. Zároveň množství uvolněného CO₂ v negativní kontrole musí být v rozmezí do 20 % od průměru hodnot v plató fázi nebo na konci testu. Tato metoda je ekvivalentem k ISO 17556.

ISO 17556 – Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved.

Princip metodiky je opět založen na měření vyprodukovaného oxidu uhličitého nebo na měření biochemické spotřeby kyslíku (BSK) v uzavřeném respirometru. Validita testu je podobná jako u předchozí normy – množství uvolněného CO₂ nebo BSK z negativní kontroly musí být v rozmezí do 20 % od průměru hodnot v plató fázi nebo na konci testu. Zároveň musí být dodržena minimální míra degradace referenčního materiálu během 6 měsíců, která je v tomto případě stanovena na ≥ 60 %. V případě, že by biodegradace probíhala obstojně ke konci měření, je možné pokus prodloužit až na 24 měsíců. Metodika je ekvivalentem pro ASTM D5988.

NF U52-001 – Biodegradable materials for use in agriculture and horticulture – Mulching products – Requirements and test methods.

Francouzská norma, která mimo stanovení biodegradovatelnosti určuje i kritéria pro biodegradovatelné materiály. V jejích přílohách je postup i pro hodnocení biodegradace ve vodním prostředí a kompostu. Míra degradace je určována na základě vizuálního posuzování. Maximální doba testu je 6 měsíců. Validita je splněna, pokud standardní odchylka paralel je <20 % a rozložení referenčního materiálu je ≥70 %. Test je vesměs určen jen pro materiály s plánovaným užitím v zemědělství a zahradnictví (hlavně mulčovací fólie). Není specifikována teplota, za které by mělo měření probíhat, což může vyústit ve velké rozdíly v dosažené biodegradaci (Kjeldsen et al., n/a).

I přes to, že je tato norma stále aktuální a lze ji využívat pro testování, nedávno byla vyvinuta nová norma EN 17033 (Plastics – Biodegradable mulch films for use in agriculture and horticulture – Requirements and test methods) po vzoru ISO 17556, která by měla NF U52-001 nahrazovat (Fernandes et al., 2020).

UNI 11462 – Plastic materials biodegradable in soil – Types, requirements and test methods. Italská norma určená k hodnocení biodegradability a ekotoxicity polymerů a plastů používaných v zemědělství a zahradnictví. Současně (stejně jako NF 052-001) určuje i bezpečnostní kritéria pro životní prostředí pro materiály, které lze označit jako „biodegradovatelný“ (biodegradovatelnost alespoň 90 % během 24 měsíců a nesmí obsahovat žádné těžké kovy, ani vykazovat žádné ekotoxikologické efekty). Princip metody je založen na měření uvolněného CO₂. Během testu je požadováno zajištění neustálého proudění vzduchu. Kritéria validity jsou – rozklad referenčního materiálu ≥60 % po třech měsících testu a standardní odchylka mezi paralely musí být <10 %. Maximální doba pokusu jsou tři měsíce. Metoda je alternativou k ISO 17556 (Briassoulis & Degli-Innocenti, 2017).

OECD Test No. 304A: Inherent Biodegradability in Soil.

V této metodě je vyžadován materiál označený uhlíkem ¹⁴C. Principem je zachytávání ¹⁴CO₂ a podle množství ¹⁴C se určuje míra degradace (mineralizace) materiálu. K tomu je potřeba kapalinový scintilační detektor, který zaznamenává ionizující záření. Test je modelován na 64 dní. Metoda byla osvojena již v roce 1981.

OECD Test No. 307: Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil.

Test je založen na stejném principu jako předchozí metoda (OECD 304A), ale je možné použít i jiné izotopy (např. ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P). Vzhledem k tomu, že je metoda z roku 2002, jsou vyžadovány i novější přístupy v analýze (např. plynová a kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem). Test by neměl přesáhnout dobu trvání 120 dnů.

2.3 Testování ekotoxicity

Ekotoxikologické biotesty slouží k posouzení míry a druhu potenciálních toxických účinků (směsi) látek na žijící organismy v životním prostředí. Výstupy mohou být různé a používají se k hodnocení možného rizika v životním prostředí vyvolané oněmi látkami. Smyslem biotestů je určit, zda testované látky v environmentálních koncentracích (koncentrace, ve které se látka nachází nebo vstupuje do životního prostředí) nebudou mít negativní vliv na fungování ekosystémů, případně pomoci určit jejich bezpečnou koncentraci v životním prostředí (PNEC). Základní rozdělení dle typu matrice zahrnuje biotesty terestrické, akvatické a testy sedimentů. Akvatické testy se řadí mezi nejrozšířenější z hlediska používání a zároveň se tak mohou testovat i vodné výluhy z pevných matric (Hoffman et al., 2003; Kočí & Mocová, 2009). Při použití přírodní matrice (půdy) je důležité rozlišit případnou toxicitu půdy od toxicity sledovaného materiálu (potažmo jeho rozkladných produktů) či chemikálií (Fritz, 2005).

Česká republika přejímá normy vycházející z předpisů Evropské unie, které jsou pro ČR závazné. Zároveň jsou v platnosti normy, které plynou z členství v organizacích OECD a ISO. Ale je možné používat metodiky i od zahraničních agentur vyspělých států jako ASTM (USA), EPA (USA), AFNOR (Francie), DIN (Německo) atd. (Fritz, 2005; Dvořák, 2009).

Je-li polyuretan rozkládán mikroorganismy, mohou se z něj uvolňovat toxické degradační produkty. Z dlouhodobého hlediska je proto klíčové posoudit jeho biodostupnost pro (mikro)organismy v životním prostředí (Skleničková et al., 2020).

2.3.1 Přehled testů ekotoxicity použitých pro hodnocení polyuretanu

Následující tabulka (Tab. 1) udává přehled biotestů, které byly použity v různých studiích pro testování ekotoxicity polyuretanů. Z dostupné a nastudované literatury se stanovení biodegradaci PUR a následnému testování ekotoxicity věnuje jen málo studií.

Tab. 1. Přehled testů ekotoxicity použité pro testování polyuretanu.

testovací organismus	typ polyuretanu	uspořádání experimentu	norma/metoda	zdroj
sladkovodní korýš <i>Thamnocephalus platyurus</i>	Poly(-ether) uretanové pěny s přidavkem bio-polyolů v různých poměrech (AS, AC, CMC-Na, HEC, WPG†)*	výluhový test v horké vodě (8 hod); akutní toxicita (mortalita, 24 hod)	Thamnotoxkit F™	David et al., 2010; Vojtová et al., 2007
sladkovodní korýš <i>Daphnia magna</i>	plně alifatické polyester-ether PUR pěny s přidavkem HEC*, škrobu a bez škrobu	Vodný výluh podle EN 12457-1 (72 hod); akutní toxicita (inhibice pohyblivosti, 48 hodin)	ISO 6341	Skleničková et al., 2021a
sladkovodní zelená řasa <i>Desmodesmus subspicatus</i>		Vodný výluh podle EN 12457-1 (72 hod); akutní toxicita (inhibice růstu, 72 hodin)	ISO 8692	Skleničková et al., 2021a
bakterie <i>Escherichia coli</i>		Vodný výluh podle EN 12457-1 (72 hod); akutní toxicita (počet kolonií tvořících jednotek, 24 hodin)	vyhláška č. 409/2005 Sb.	Skleničková et al., 2021a
mořská bakterie <i>Vibrio fischeri</i>	PLA-poly(-ester) uretan	suspenze z kompostu během a po skončení biodegradace PUR; akutní toxicita Flash test (inhibice bioluminiscence, 30 sek)	ISO 21338 (BioTox™)	Tuominen et al., 2002
	polyuretan na bázi polykaprolaktonu a škrobu	suspenze z kompostu a vermikulitu po biodegradaci PUR; akutní toxicita Flash test (inhibice bioluminiscence, 30 sek)	BioTox™	Degli-Innocenti et al., 2001
vyšší rostliny <i>Lepidium sativum</i> (řeřicha setá), <i>Raphanus sativus</i> (ředkev setá), <i>Hordeum vulgare</i> (ječmen setý)	PLA-poly(-ester) uretan	médium pro růst rostlin v poměru 1:1 (kompost s PUR během a po skončení biodegradace a komerční zahradnický substrát); klíčení, vizuální růst a gravimetrické měření (14 dnů)	OECD test č. 208	Tuominen et al., 2002

* AS (acetylovaný škrob), AC (acetylcelulóza), CMC-Na (sodná sůl karboxymethylcelulózy), HEC (2-hydroxyetylcelulóza), WPG (pšeničný protein/gluten)

† WPG byl použit jen ve studii David a kol. (2010)

2.3.2 Test ekotoxicity s bakterií *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri je mořská luminiscenční bakterie. Bakterii se dostalo nové vědecké pojmenování *Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk et al., 2007), nicméně v řadě studií a metodik je stále používán starší název (Kapanen, 2012; Abbas et al., 2018; Skleničková et al., 2020). Metoda testování s využitím této bakterie našla uplatnění v mnoha odvětví testování toxicity (lékařské, environmentální, průmyslové, zemědělské aplikace a mnoho dalších) (Abbas et al., 2018). V řadě ekotoxikologických testů je hodnocena jako jeden z nejcitlivějších organismů pro sledování akutní toxicity (Jos et al. 2005; Dvořák, 2009; Abbas et al., 2018). I když se test s *Vibrio f.* přirozeně řadí mezi akvatické testy, velmi dobře se uplatňuje i pro výluhy pevných materiálů a zemin (Abbas et al., 2018). Navíc *Vibrio f.* patří mezi destruenty, kteří jsou v přírodě zodpovědní za rozklad organických látek (Kočí & Mocová, 2009), což je pro náš účel testování velmi přínosné. Bakteriální testy jsou schopné reagovat i na slabé toxické účinky, neboť se negativní účinek nemusí projevit jen mortalitou, ale i narušením metabolismu např. cytotoxicky (Fritz, 2005; Dvořák, 2009).

Zjišťování ekotoxicity s bakterií *Vibrio fischeri* funguje na principu měření inhibice bioluminiscence. Nejčastěji se jako výsledek ekotoxicity udává hodnota EC50, která je vyžadována normami. Metoda je zakotvena v několika standardizovaných normách, např. ISO 11348 nebo ISO 21338. Test bývá proveden rychle (během několika málo hodin) i s přípravou ředících řad. Samotné měření toxicity probíhá 15 až 30 minut. V případě Flash testu, který byl vyvinut zejména pro kalné vzorky, měření probíhá pouhých 30 vteřin (Degli-Innocenti et al., 2001; Tuominen et al., 2002). Další výhodou je, že se bakterie před testem nemusí dlouze kultivovat, pouze se reaktivují aktivačním roztokem. Metoda je celkově jednoduchá na provedení a bakterie jsou snadno dostupné v již hotových testovacích setech (pod názvy Microtox, LUMISTox nebo ToxAlert) (Hubálek, 2008). Navíc není potřeba žádného speciálního vybavení laboratoře kromě luminometru, případně centrifugy. Tím se řadí mezi nejméně cenově náročné, proveditelné testy (Dvořák, 2009).

Dvořák (2009) ve své práci výslovně zmiňuje vhodnost použití Microtox testu „pro kontrolu vstupních surovin pro biotechnologické procesy a sledování procesů probíhajících při biodegradaci toxikantů přítomných v životním prostředí“. Pro všechny výše zmíněné výhody jsme použili ekotoxický test s *Vibrio fischeri* i v této práci.

2.3.3 Ekotoxicita polyuretanu

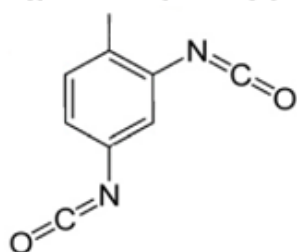
Některé studie ukazují, že je možné navrhnout biodegradabilní PUR pěny, které nejsou rizikem pro životní prostředí. Biodegradabilní PUR je vhodný zejména v případě nechtěného úniku do otevřeného prostředí nebo i když se s ponecháním PUR v přírodním ekosystému počítá (Trhlíková et al., 2021). Obecně biodegradovatelné polymery nevykazují významné ekotoxické efekty nebo jen výjimečně. I přesto se vybízí při testování biodegradability otestovat i jejich ekotoxicitu (Fritz, 2005). Kdyby se případná toxicita projevila v půdě již po zavedení polymeru do praxe, bylo by obtížné či přímo nemožné odstranit z půdy rezidua plastů nebo toxické látky. Zatímco biodegradabilita polymerů je studována hojně a mnoho studií se jí zabývá, ekotoxicitou se zabírají jen velmi vzácně (Kapanen, 2012).

Aromatické isokyanáty používané při výrobě PUR představují potenciální riziko toxicity. Nicméně jsou to právě aromatické isokyanáty, které se k výrobě polyuretanových pěn používají ve většině případů (Trhlíková et al., 2021). Jmenovitě 4,4'-difenylnmethan diisokyanát (MDI) a 2,4'-toluen diisokyanát (TDI) nebo jejich rozkladné produkty 4,4'-methyldianilin (MDA), 2,4'-toluendiamin (TDA) nebo p-toluensulfonyl isokyanát mohou být nebezpečné pro životní prostředí i pro zdraví člověka (toxické, dráždivé a potenciálně karcinogenní) (van Minnen et al., 2005; Kapanen, 2012; Cregut et al., 2013). Jejich struktury jsou zobrazeny na Obr. 2. MDA je přímo spojován s inhibicí enzymové aktivity (Skleničková et al., 2020). Tyto látky se mohou uvolňovat zejména během biodegradace (Cregut et al., 2013). MDA bylo vysledováno ve studii Degli-Innocenti a kol. (2001) jako rozkladný produkt PUR ve vermikulitu; ale v kompostu, kde byl biodegradován stejný PUR, již analyzován nebyl. Naopak studie Tuominen a kol. (2002) popisuje biodegradaci polyuretanu (kompostování) obsahující 1,6-hexamethylen diisokyanátu (HMDI), který byl použit při jeho výrobě. PUR obsahující tuto látku vykazoval ekotoxicitu během i po skončení biodegradace. V této studii byly testovány i samotné chemikálie (pomocí *Vibrio fischeri*), které se použily pro výrobu PUR a nejvíce toxické se projevily HMDI a 1,4-butan diisokyanát (BDI). Avšak polyuretan obsahující BDI nevykazoval žádnou toxicitu v testech během i po skončení biodegradace v kompostu. Výroba plně alifatických PUR pěn (bez použití aromatických látek), které jsou i lépe biodegradovatelné, je prozatím současnou výzvou chemiků. Nedávno vyvinuté PUR pěny nejsou dostatečně testovány na ekotoxicitu (Skleničková et al., 2020).

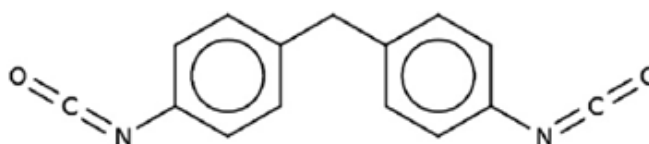
Ve studii Skleničkové a kol. (2021a) se plně alifatická PUR pěna ukázala jako mírně toxická při testování s vodním korýšem *Daphnia magna* (nicméně to mohlo souviset s ucpáním filtrace rozpuštěnými škroby jež byly použity při výrobě PUR). Nízkou toxicitu PUR pěna vykazovala při

testování s řasou *Desmodesmus subspicatus*. Naopak ve studii Skleničková a kol. (2021b) plně alifatická PUR pěna nevykazovala žádný ekotoxikologický efekt v aktivovaném čistírenském kalu. Studie Davida a kol. (2010) neprokázala žádné ekotoxikologické efekty PUR pěny během testu ve studené vodě za použití toxkitu Thamnotoxkit FTM se sladkovodním korýšem. Vojtová a kol. (2007) upozorňuje, že polyuretanová pěna může vypouštět ekotoxikologické substance v teplých vodách (testováno Thamnotoxkit FTM). Fritz a kol. (2001) testoval několik biodegradabilních polymerů včetně PLA-uretanu (po kompostování) různými testy ekotoxicity (tři testy s rostlinami, dva s řasami, s *Daphnia sp.* a luminiscenční bakterií). Výsledek prezentoval jako průměr všech testů, kdy PLA-uretan nevykazoval žádnou toxicitu.

nejpoužívanější látky pro výrobu PUR

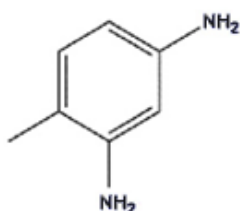


2,4'toluen diisokyanát

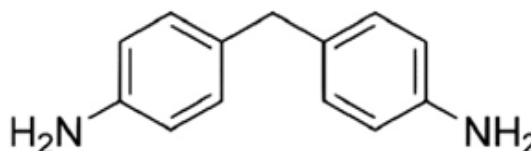


4,4'difenylmethan diisokyanát

rozkladné produkty pocházející z biodegradace PUR



2,4'toluendiamin



4,4'methylendianilin

Obr. 2. Struktury nepoužívanějších chemikálií pro výrobu polyuretanu a jejich rozkladné produkty (převzato a upraveno dle Cregut et al., 2013).

2.3.4 Ekotoxické účinky cínu a dibutylcínu dilaurátu

Cín se vyskytuje v anorganických i organických sloučeninách v oxidačních číslech +2 a +4. Ve vodním prostředí je čtyřmocný cín stabilnější (Rüdel, 2003). Zatímco anorganické sloučeniny a elementární cín je považován za relativně netoxický, organocín působí v různých formách toxicity (neurotoxicita, imunotoxicita, reprotoxicita atd.) při akutní i chronické expozici (Dopp & Rettenmeier, 2013). Známý je například případ hormonální disrupce u vodních plžů. Marinní znečištění tributylcínem (TBT) vedlo k vývoji imposexu (Matthiessen & Gibbs, 1998). Později se

ukázalo, že i trifenylcín (TPT) má zřejmě podobné disruptivní účinky jako TBT (Rüdel, 2003). Organocínové sloučeniny byly později uznány jako persistentní polutanty (endokrinní disruptory) a jejich používání bylo zakázáno Evropskou unií v roce 2003 (Dopp & Rettenmeier, 2013). Biodostupnost, která úzce souvisí s ekotoxicitou, v půdním prostředí závisí na interakcích mezi půdou, biotou a prostředím. Největší vliv na mobilitu a dostupnost toxických kovů v půdě má pH a redox potenciál (Tlustoš et al., n/a). Anorganický cín je obecně málo biodostupný, většinou se uvolňuje jen malé množství iontů z čistého cínu a jeho slitin. Organické cínové sloučeniny jsou nejlépe dostupné v neutrálním a mírně alkalickém prostředí. Jejich dostupnost ale velmi ovlivňuje množství rozpuštěného organického uhlíku (DOC) a rozpuštěné organické hmoty (DOM) (Rüdel, 2003).

Dibutylcín dilaurát (DBTDL) s chemickým vzorcem $C_{32}H_{64}O_4Sn$ je v bezpečnostních listech klasifikován jako žíravá a korozivní látka, dráždivá, nebezpečná pro zdraví i životní prostředí. Je vedena jako látka způsobující akutní riziko pro vodní prostředí (značena jako regulovaný mořský polutant), s rizikem dlouhodobého účinku ve vodním prostředí (látka perzistentní povahy). Je doporučeno se vyhnout jeho uvolňování do životního prostředí (Borchers, 2017). DBTDL pravděpodobně vykazuje nízkou mobilitu a v životním prostředí může perzistovat díky své nízké rozpustnosti ve vodě (ThermoFisher Scientific, 2021). Obsah cínu ve sloučenině odpovídá 18,2-18,9 % (Borchers, 2019).

DBTDL se používá při výrobě PUR jako aditivum k inhibici mikrobiální degradace nebo jako katalyzátor (Cregut et al., 2013; Dopp & Rettenmeier, 2013). Dále nachází uplatnění i jako pesticid nebo biocidní látka (ThermoFisher Scientific, 2021).

2.4 Analýza PLFA

Půdní mikrobiální společenstva a půdní prostředí je složitý a komplexní ekosystém, kde jsou společenstva nezbytná pro správné fungování a naplňování funkcí půdy. Zajišťují koloběh prvků, rozvíjí sktrukturu půdy. Změny v mikrobiální diverzitě a mikrobiální aktivita jsou dobrým ukazatelem pro stav a zdraví půdy (Kaur et al., 2005; Bécaert & Deschênes, 2006). Kapanen (2012) doporučuje měřit změnu diverzity mikroorganismů v půdě spolu s biotesty pro lepší pochopení a vysvětlení vlivů studovaných materiálů na životní prostředí. Vzhledem k tomu, že je někdy složité oddělit toxické účinky média (půda, kompost, sediment apod.) a testovaného materiálu či látky, je na místě použít všechny dostupné metody pro vyloučení falešně pozitivních/negativních výsledků

ekotoxicity. Francisco a kol. (2022) hodnotí analýzu PLFA jako vhodnou k ekotoxikologickému posuzování. Skleničková a kol. (2021b) aplikovala změnu mikrobiální diverzity jako ukazatel ekotoxikologického působení.

PLFA analýza je jednou z nejpoužívanějších metod pro měření mikrobiální biomasy a diverzity v půdě a dalších environmentálních matric včetně těch kontaminovaných. Metoda je založena na sledování tzv. biomarkerů. Biomarkery jsou různé ukazatele v relativně konstantním zastoupení v biomase, specifické pro určitou skupinu organismů (Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003). V PLFA analýze jsou jako biomarkery využívány fosfolipidové mastné kyseliny nacházející se v membránách mikroorganismů. Charakteristické druhy fosfolipidových mastných kyselin jsou analyzovány a následně se rozlišují dle určitých skupin mikroorganismů. Jedná se o kvantitativní i kvalitativní náhled na mikrobiotu (Kaur et al., 2005). Díky specifičnosti některých PLFA můžeme vysledovat i jednotlivé rody (Pelz et al., 2001; Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003). Na druhou stranu některé PLFA jsou identické pro vícero skupin organismů, a to může být zavádějící (Zelles, 1999). Například mastné kyseliny se značením 15:0, 16:0 a 18:1 ω 7 se nacházejí v membránách jak bakterií, tak i hub (Tornberg et al., 2003). S ohledem na tuto skutečnost by měla být interpretace dat prováděna s opatrností, jelikož výskyt mastných kyselin nemusí být přímočarý a může být zaměnitelný v rámci ekologických skupin (Frostegård et al., 2011). PLFA analýza zjišťuje obsah živoucí biomasy v matrici, jelikož PLFA rychle degradují po buněčné smrti (Findlay, 1996; Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003). Nicméně i zde by se měla uplatňovat zvýšená pozornost při interpretaci dat, jelikož v testované matrici mohou být toxikanty, které zabraňují nebo zpomalují degradaci PLFA. Analýza PLFA je rychlá, levná, jednoduchá a citlivá k zaznamenání změn diverzity mikrobiálních společenstev v půdě (Frostegård et al., 2011). V modifikaci dle Buyer a Sasser (2012) může být metoda využita i při analyzování velkého množství vzorků. PLFA analýzu lze využít k charakterizaci kontaminovaného prostředí, případně ke sledování průběhu bioremediací. Podle schématu a poměru určitých PLFA se dá odvodit i fyziologický stav či stres půdní bioty (Piotrowska-Seget & Mrozik, 2003; Kaur et al., 2005). Další velkou výhodou oproti jiným metodám je zejména to, že odpadá nutnost kultivace a PLFA se získávají přímo z testované matrice (Zelles, 1999; Kaur et al., 2005). Tím se odstraní problém s kultivovatelností mikroorganismů v laboratoři, která se pohybuje kolem 1 % (Basu et al., 2015; Watzinger, 2015).

Průběh analýzy je složen z několika kroků. Prvním krokem je extrakce PLFA z matrice pomocí organických rozpouštědel. Často je využívána metoda podle Bligh a Dyer (1959), která byla postupem času modifikována různými autory (Zelles et al., 1992; Zelles, 1999; Frostegård et al.,

2011). Následuje separace lipidů za využití extrakce na pevnou fázi (SPE). Použití různých kolonek v rámci SPE se liší podle užití metody separace (Kaur et al., 2005). Třetím krokem je methylace fosfolipidů (navázání methylové skupiny). Posledním analytickým krokem je analýza (separace a kvantifikace) methylesterových mastných kyselin (FAME) pomocí plynové chromatografie (Zelles, 1999; Francisco et al., 2022), například se zapojením hmotnostního spektrometru (Šnajdr et al., 2011; Watzinger, 2015). Množství analyzovaných PLFA se různí v závislosti na robustnosti zvolené metodiky zejména pro extrakci a separaci (Kaur et al., 2005).

Jedním z dalších přístupů pro hodnocení změny biodiverzity mikrobiálních společenstev je metoda založena na analýze nukleových kyselin – ribozomální RNA či sekvence DNA (Piotrowska-Seget & Mroziak, 2003). Postupem času je touto metodou PLFA analýza nahrazována. Nicméně analýza mastných kyselin má stále své výhody, a proto se obě metody v praxi spíše doplňují (Frostegård et al., 2011).

3 Cíle práce a hypotézy

Cílem práce je provést test biologické rozložitelnosti nového typu lehčeného polyuretanu (PUR) určeného pro využití v zemědělské krajině. V rámci aplikovaného výzkumu jsou na pracovišti Zpracování polymerních materiálů ÚMCH AV ČR průběžně vyvíjeny biodegradabilní polymery pro výrobu ekologicky příznivých pachových ohradníků. V případě biodegradabilních PUR je využíván organocínový katalyzátor, jehož případné účinky na životní prostředí nejsou příliš prozkoumány. Z tohoto důvodu bude standardní test biologické rozložitelnosti doplněn testem ekotoxicity s bioluminiscenční bakterií *Vibrio fischeri*. Test biodegradability bude probíhat dvojím způsobem: i) přesně podle normy ASTM D5988-18 a ii) s částečnou modifikací postupu, kdy na rozdíl od směsi polní, lesní a luční půdy (dle normy) bude použita standardizovaná půda určená pro testy ekotoxicity. Tato půda bude obohacena výluhem z půdy přírodní a dotovaná živinami dle instrukcí normy. Pokud takto modifikovaný test biodegradability splní kritéria validity, bude možné provést navazující test ekotoxicity, který může být v případě použití náhodně odebrané přírodní půdy zatížen chybou a metodu pak není možné standardizovat.

cíle práce:

- 1) Provést experiment na stanovení míry biodegradace polyuretanu dle ASTM normy D5988-18 v přírodní a standardizované půdě;
- 2) provést test ekotoxicity s mořskou bioluminiscenční bakterií *Vibrio fischeri* s výluhy půd po skončení stanovení míry biodegradace; z důvodu podezření na možnou toxicitu vyvolanou používaným organocínovým katalyzátorem při výrobě PUR;
- 3) provést analýzu obsahu fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) v půdách po ukončení testu biologické rozložitelnosti pro porovnání mikrobiálního osídlení použitých půd a zjištění případného vlivu organocínového katalyzátoru na mikrobiální diverzitu v půdě.

hypotézy:

- 1) PUR se bude v přírodní půdě rozkládat efektivněji díky vyššímu mikrobiálnímu osídlení;
- 2) test se standardizovanou půdou bude validní dle limitů normy ASTM D5988-18 pro stanovení míry biodegradace a bude tak získána vhodná matrice pro navazující test ekotoxicity;
- 3) v porovnání s kontrolními vzorky (půda bez přídavku PUR – negativní kontrola a půda s přídavkem celulózy – pozitivní kontrola) bude pozorována inhibice luminiscence bakterie *Vibrio fischeri* u půdy zatížené rozkládajícím se polyuretanem.

4 Metodika

4.1 Použité chemikálie a přístrojové vybavení

4.1.1 Použité chemikálie

Dibutylcín dilaurát	Sigma-Aldrich, USA
Dihydrogenfosforečnan amonný ((NH ₄)H ₂ PO ₄)	Lach-ner, ČR
Ethanol	
Fenolftalein	Acros organics, Belgie
Hydroxid draselný	Penta s.r.o., ČR
Chlorid barnatý dihydrát	Penta s.r.o., ČR
Chlorid sodný	Sigma-Aldrich, USA
Kyselina chlorovodíková 35% p.a.	Penta s.r.o., ČR
Methyloranž	Lach-ner, ČR
Reaktivační roztok pro bakterie LCK 487	Hach Lange, Německo
Tetraboritan sodný dekahydrát	Penta s.r.o., ČR
Vazelína	Carl Roth, Německo

4.1.2 Použité přístroje a ostatní vybavení

Akvaristický písek	Zbyněk Lhota, ČR
Alobal	
Analytické váhy Entris	Sartorius, Německo
Automatická pipeta 10ml	Eppendorf, Německo
Automatická pipeta 200μl	Transferpette, Německo
Automatické pipety 1ml, 5 ml	Biohit, Finsko
Biodegradovatelné polyuretanové pěny, PUR-A	Ústav makromolekulární chemie AV ČR
Celulóza Technocel 2500	CFF, Německo
Centrifugační zkumavky, 15ml	Guangzhou Jet Bio-Filtration, Čína
CHNS/O analyzátor FlashSmart	Thermo Fisher Scientific, USA
Digitální byreta	Hirschmann Laborgeräte, Německo
Elektrický vaříč	Rukov, ČSR

Exsikátor	SIMAX, ČR
Filtrační papír	VWR International, USA
Indikátorové pH papírky	Lach-ner, ČR
Kovová síta s oky 2 mm	
Kultivační destičky, 96 jamek	SPL Life Sciences, Korea
Laboratorní nádobí	
Luminiscenční bakterie LCK 487	Hach Lange, Německo
Luminometr Glomax explorer	Promega, USA
Muflová pec typ LM 112.10	VEB Elektro, Německo
Orbitální třepačka MS2 Minishaker	IKA, Německo
Oscilační mlýn MM400	Retsch, Německo
Pasteurovy pipety	Eppendorf, Německo
pH metr LAB 850	Schott Instruments, Německo
Pipetové destičky Diamond D200 200µl	Gilson, USA
Přesné váhy EWB 620-2M	Kern, Německo
Safe-Lock Tubes, 2 ml	Eppendorf, Německo
Sušárna	Binder, Německo
Špičky na pipety	Eppendorf, Německo
Termobox LBT 168	Zanussi, Itálie
Třepačka laboratorní LT 3	Kavalier, ČR
Uhlonové síto 130T	SILK & PROGRESS, ČR
Uzavíratelné těsnící sklenice 2l FIDO	Bormoli Rocco, Itálie

4.2 Biodegradace polyuretanu

4.2.1 Charakteristika půdních vlastností

Před započítáním pokusu bylo nutné stanovit vlastnosti půdy dle požadavků normy ASTM D5988-18. Podle zmíněné normy byla namíchána přírodní půda ze 3 různých lokací (lesní, polní a luční půda) z oblasti Sedlčansko, začátkem května roku 2020. Všechny půdy byly bez předchozí aplikace pesticidů, lokality mezi sebou nebyly vzdáleny více než 3 km a půda byla vždy odebírána z vrchní vrstvy. Po odebrání byly půdy sušeny na vzduchu cca 14 dní v laboratorních podmínkách. Dále byly

přesety přes kovové síto s velikostí ok pod 2 mm a všechny tři půdy byly smíchány dohromady ve stejném poměru a následně homogenizovány. Část půdy se uchovala do lednice pro potřebu dalších analýz. Druhý typ půdy, který byl v pokusu použit, nám poskytl Ústav makromolekulární chemie v Praze. Jednalo se o standardizovanou, hlinitopísčitou půdu, která je běžně používaná při terestrických testech ekotoxicity.

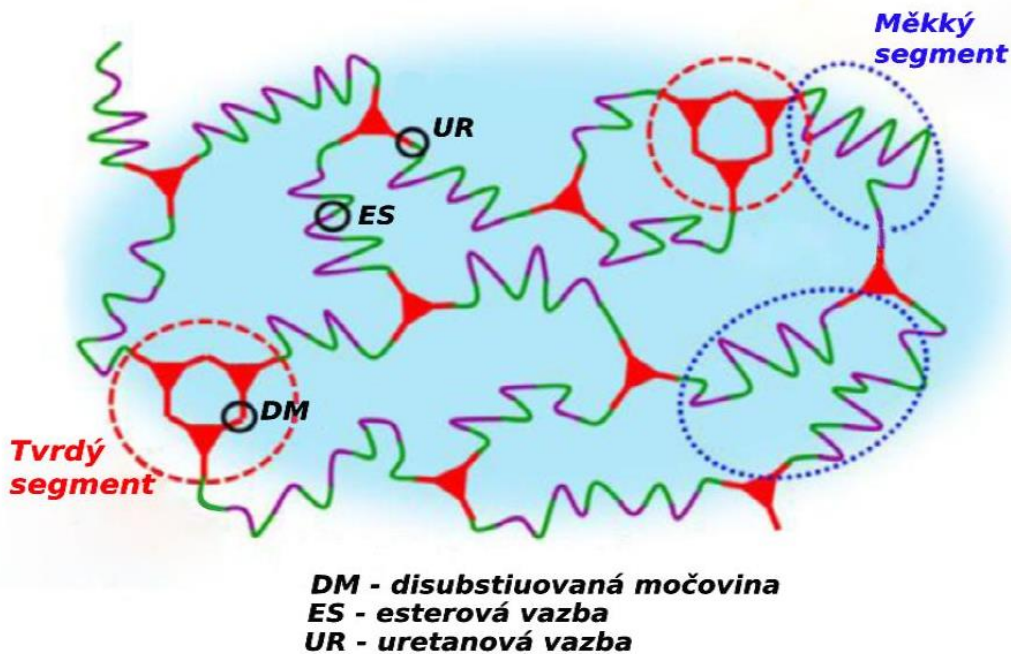
Veškerá měření zaměřená na charakteristiku obou půd vždy probíhala ve třech opakování. Analýzy byly prováděny v půdní laboratoři Ústavu pro životní prostředí Univerzity Karlovy.

Hodnota pH byla měřena následovně – do sklenic bylo naváženo 10 g půdy a přidáno 50 mL deionizované vody. Sklenice byla umístěna po dobu 1 hodiny na třepačku, poté se nechala suspenze 24 hodin odstát. Suspenze byla filtrována pomocí filtračního papíru a dále byl roztok měřen pH metrem. Celkové množství organického uhlíku a dusíku bylo změřeno pomocí CHNS/O analyzátoru po předchozím drcení půdy v oscilačním mlýně. Z výsledků se odečetl i celkový obsah dusíku. Sušina se stanovila z přibližně 10 g půdy umístěné po dobu 24 hodin v sušárně při teplotě 105 °C. Z vysušené půdy se zároveň stanovila ztráta žíháním. Vysušená půda se umístila do muflové pece na 5 hodin při teplotě 550 °C. Maximální vodní kapacita (WHC) byla změřena podle metodiky Harding & Ross (1964). Do nálevek umístěných ve stojanu byla umístěna tkanina a ústí nálevky bylo utěsněno. Do každé nálevky bylo umístěno 25 gramů půdy a dolito 50 mL vody. Po 24 hodinách bylo ústí nálevky uvolněno a přebytečná voda se nechala vykapat po dobu 3 hodin. Poté byla v půdě z nálevky stanovena sušina. Výsledná WHC byla vypočtena jako průměrná hodnota ze 3 paralelních měření.

4.2.2 Charakteristika testovaného materiálu

Plně alifatický polyuretan ve formě měkké pěny s vysoce porózní strukturou (otevřené buňky tvořily 94 % z celku) a s velkými rozměry pórů (700 μm) byl vyroben za účelem aplikace v zemědělství (např. jako pachové ohradníky). Materiál obsahoval 56 % měkkých segmentů (tvořené polyoly) a 44 % tvrdých segmentů (tvořené isokyanáty). Pro výrobu byly použity chemikálie trimer hexamethylendiisokyanátu a poly(diethylenglykoladipát)diol, voda posloužila jako nadouvadlo. Jako katalyzátor byl používán dibutylcín dilaurát. Výsledně se podařilo získat polymer s pracovním názvem PUR-A se zesíťovanou strukturou, kde je hlavní „páteř“ tvořena esterovou a uretanovou vazbou a disubstituovanou močovinou. Molekula je tvořena převážně vodíkem (52 %), uhlíkem (33 %), kyslíkem (12 %) a dusíkem (3 %). Struktura je zobrazena na Obr. 3. Pro potřeby pokusu byl PUR namlet na frakci 0,5-0,8 mm (náhled v Příloze 1).

Jako pozitivní kontrola byla využita celulóza s délkou vláken 2500 μm .



Obr. 3. *Struktura použitého PUR (převzato a upraveno dle Trhlíková et al., 2021).*

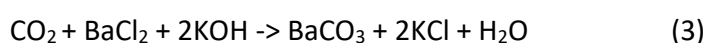
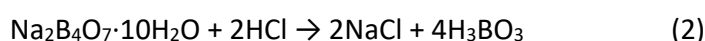
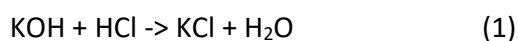
4.2.3 Stanovení stupně biodegradace PUR

Biologický rozklad testovaného PUR byl stanoven jako stupeň mineralizace podle ASTM normy D5988-18. Tato norma popisuje metodu pro stanovení aerobní biodegradace plastového materiálu v půdě. Metoda je založena na principu zachytávání oxidu uhličitého produkovaného mikroorganismy do kádinky s roztokem KOH. Z množství uvolněného CO_2 je odvozena míra degradace testovaného materiálu.

Do skleněných, uzavíratelných lahví s gumovým těsněním o objemu 2 litry bylo vždy naváženo 300 g připravené půdy. Do nádob pozitivní kontroly bylo navíc přidáno 300 mg celulózy a do nádob s testovaným vzorkem bylo přidáno 300 mg PUR pěny. Negativní kontrola obsahovala pouze půdu. Celý pokus probíhal ve dvou variantách – se standardizovanou a přírodní půdou (směs 3 různých půd dle podmínek použité normy). Porovnání průběhu testu s půdou dle normy a se standardizovanou půdou mělo význam pro navazující testy ekotoxicity. Pro každý typ půdy byla připravena negativní i pozitivní kontrola a varianta s testovaným PUR. Pracovalo se ve třech opakováních. Obě půdy byly oživeny výluhem, který byl připraven ze 150 g čerstvé půdy

s přidavkem kompostu a 1 L destilované vody. Suspenze byla hodinu promíchávána a po ustálení bylo z vrchu pipetou odebíráno stejné množství výluhu do každé sklenice. Potřebná vlhkost byla zajištěna přidavkem destilované vody podle požadavků normy, stejně tak množství dusíku pomocí roztoku dihydrogenfosforečnanu amonného (0,25 g do každé nádoby). Do všech lahví byla umístěna titrační baňka s 50 mL vody pro zachování vlhkosti a kádinka s 20 mL roztoku 0,5M KOH. Hrdla lahví byla namazána vazelínou pro zajištění plynotěsnosti. Sklenice byly hermeticky uzavřeny a uloženy v termoboxu při teplotě 21 °C (± 2 °C) bez přístupu světla. Pokus probíhal přibližně šest měsíců od 25. května 2020 do 3. prosince 2020. Vzhled pokusu je k nahlédnutí v přílohách (Příloha 2 a 3).

V průběhu tohoto období byly kádinky s roztokem KOH pravidelně vyjímány a množství zachyceného CO₂ stanovováno titrací HCl (0,25M) do barevného přechodu fenolftaleinu (rovnice 1). Faktor HCl byl průběžně stanovován pomocí titrace roztoku tetraboritanu sodného na indikátor methylooranž (rovnice 2). Nad rámec metodiky normy byl před každou titrací roztoku KOH do kádinky přidáno 10 mL roztoku chloridu barnatého (125 g/L), aby se zamezilo úniku CO₂ během titrování (rovnice 3). Vycházelo se z poznatků bakalářské práce Kateřiny Tošovské (2016). Sklenice po dobu titrace zůstávaly vždy otevřené, aby došlo k důkladnému prokysličení prostředí. Kádinky byly po titraci vždy pečlivě vymyty a znovunaplňeny roztokem KOH. Poté byly vráceny zpět do sklenic.



V prvních třech týdnech pokusu docházelo k titraci v rozmezí dvou až pěti dnů, po měsíci přibližně každých 7 až 10 dní a v závěrečné fázi pokusu každých 14 dní. Půdy ve sklenicích byly podle potřeby zvlhčovány a promíchávány. Dne 30. září 2020 (128. den pokusu) došlo k doplnění živin, dusíku a fosforu, pomocí roztoku (NH₄)H₂PO₄ dle doporučení normy (opět v množství 0,25 g do každé nádoby).

Výpočet faktoru kyseliny HCl (dle rovnice 2):

$$f = C_{\text{real}}/C_{\text{teor}} = (k \cdot m) / (M \cdot V \cdot C_{\text{teor}})$$

C_{teor} koncentrace HCl = 0,25 mol/L

k stechiometrický koeficient, k = 2

m navážka $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $m = 0,2 \text{ g}$

M molární hmotnost $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $M = 381,38 \text{ g/mol}$

V objem spotřebované HCl [L]

Výpočet vyprodukovaného CO_2 (dle rovnice 3):

$$m_{\text{CO}_2} [\text{mg}] = k \cdot V \cdot c \cdot f \cdot M$$

k stechiometrický koeficient, $k = 0,5$

V spotřeba HCl [mL], $V = V_{\text{negativní kontrola}} - V_{\text{půda se vzorkem}}$

c koncentrace HCl, $c = 0,25 \text{ mol/L}$

f faktor kyseliny

M molární hmotnost CO_2 , $M = 44 \text{ g/mol}$

Výpočet očekávaného CO_2 :

$$m_{\text{CO}_2\text{exp}} = (M_{\text{CO}_2} \cdot Y) / M_C$$

M_{CO_2} molární hmotnost CO_2 , $M = 44 \text{ g/mol}$

M_C molární hmotnost C, $M = 12 \text{ g/mol}$

Y přepočet uhlíku, $Y = w/100 \cdot m_{\text{vzorek}}$

w podíl uhlíku v molekule, $w = \% \text{ C}$, $w_{\text{PUR}} = 33$, $w_{\text{celulóza}} = 44,47$

m_{vzorek} hmotnost navážky vzorku v půdě [mg]

Výpočet biodegradace vzorku [%]:

$$x [\%] = m_{\text{CO}_2} / m_{\text{CO}_2\text{exp}} \cdot 100$$

4.3 Stanovení ekotoxicity v půdách po biodegradaci PUR

Při výrobě biodegradovatelných PUR je využíván organocínový katalyzátor dibutylcín dilaurát. Jeho případný negativní vliv na životní prostředí po biodegradaci polyuretanového materiálu v přírodním prostředí byl posuzován na základě testů ekotoxicity. Jako výchozí byl zvolen test s citlivou mořskou bakterií *Vibrio Fischeri* (ISO 11348-2). Pokud by byla zjištěna inhibice tohoto organismu, pokračovalo by testování ekotoxicity na vyšších trofických úrovních. V opačném

případě bylo plánováno stanovení obsahu fosfolipidových mastných kyselin (PLFA) jako ukazatele změny mikrobiální diverzity.

Základní testování proběhlo s vodnými výluhy všech variant půd z dlouhodobého testu biodegradace – tedy 18 vzorků. Koncentrace testovaného materiálu v zemině je dána normou ASTM D5988-18, tedy 300 mg PUR v 300 g půdy. Směs polní, lesní a luční půdy, která je touto normou vyžadována, může zkreslovat výsledky stanovení ekotoxicity, protože není nijak standardizována. Z tohoto důvodu probíhal paralelní test biodegradace i v půdě standardizované, určené pro testy ekotoxicity. S ohledem na průběžné výsledky pokusu byl ještě nad rámec naplánovaných cílů práce uskutečněn zkrácený test biodegradace ve standardizované půdě. Do půdy bylo v tomto případě nadávkováno pětinasobné množství PUR pěny (oproti dlouhodobému testu) ve frakci 0,5-0,8 mm nebo čistého organocínového katalyzátoru v množství odpovídající použitému PUR.

4.3.1 Stanovení ekotoxicity pomocí testu s *Vibrio fischeri*

Získání vodných výluhů se provádělo v souladu s Metodickým pokynem k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů (MŽP, 2002). Výluhy byly získány z půd po ukončení dlouhodobého, resp. zkráceného testu biodegradace. Nejdříve byla stanovena sušina půdy, aby mohl být přibližně přesně nadávkován poměr 1:10 (sušina : voda). Získaná suspenze byla umístěna na třepačku po dobu 24 hodin a poté se nechala hodinu sedimentovat. Následně byla suspenze filtrována přes filtrační papír s velikostí ok 5-10 μm . Vzorky byly uchovány v lednici přes noc při teplotě 5 °C.

Dne 18. prosince 2020 byly vzorky analyzovány v laboratoři environmentální biotechnologie Mikrobiologického ústavu AV ČR. Ekotoxicita se zjišťovala pomocí mořské bakterie *Vibrio fischeri* dle příslušné normy ISO 11348-2. Nejprve se orientačně zjistila hodnota pH pomocí lakmusových papírků, aby se hodnota pH pohybovala v rozmezí vyhovujícím pro použité bakterie. Vzorky byly připraveny na orientační měření, kdy jednotlivé vzorky neměly opakování, ale byly připraveny ve třech ředěních (2x, 5x a 10x ředěné vzorky) a vzorky neředěné. Ředěné vzorky byly zředěny 2% roztokem NaCl, neředěný vzorek obsahoval čistou sůl v požadované koncentraci. Před měřením byly vzorky odstředěny v centrifuze (při otáčkách 10 000 RPM/10 min), aby došlo k oddělení usazenin, které by mohly rušit odečítání luminiscence. Následně bylo do 96-jamkové destičky napipetováno 100 μL připravených roztoků vzorků, kontroly obsahovaly pouze čistý 2% roztok NaCl. Byla provedena aktivace mražených bakterií LCK 487 podle příslušného protokolu přidáním solného roztoku a připravený zásobní bakteriální roztok byl připojen k luminometru. S pomocí

luminometru Glomax byla měřena inhibice luminiscence v čase nula (čas dávkování roztoku s bakteriemi přístrojem), dále pak v intervalu 15 a 30 minut.

Po zhodnocení výsledků orientačního měření bylo provedeno druhé přesné měření s neředěnými výluhy vzorků. V tomto případě měření probíhalo ve třech opakováních na vzorek.

4.3.2 Zkrácený test biodegradace ve standardizované půdě s vyšším obsahem PUR a organocínovým katalyzátorem

Pro druhé kolo testování ekotoxicity ve vyšších dávkách PUR a s použitím čistého katalyzátoru byla navržena zkrácená verze biodegradačního pokusu bez průběžného měření respirace. Pro tyto účely byla použita již jen standardizovaná půda. Předchozí experiment potvrdil, že i ve standardizované půdě dochází k určitému stupni biodegradace, který by měl být dostatečný pro následné posouzení ekotoxicity produktů. Pracovalo se záměrně s vyššími dávkami PUR pěny a tomu odpovídající množství katalyzátoru, aby následně mohla být vyloučena ekotoxicita při vyšším obsahu degradované PUR pěny v půdě.

Do kádinek se navážilo 300 g standardizované půdy. Vzorky byly inokulovány výluhem z čerstvé půdy (150 g půdy na 1 litr vody, 1 hodina míchání a po ustálení se odebíral výluh z vrchu) do požadované vlhkosti dle ASTM normy D5988-18, aby byly nastoleny podmínky srovnatelné se vzorky pocházející z předchozího stanovení stupně biodegradace. Stejně tak byly doplněny živiny roztokem dihydrogenfosforečnanu amonného (0,25 g soli na kádinku). Obsah cínu v testovaném PUR byl stanoven komerční laboratoří firmy Dekonta, a.s. Navážka čistého katalyzátoru do vzorků zemín byla spočítána tak, aby obsah cínu odpovídal výše zmíněnému dávkování PUR pěny. Jako kontrola sloužily vzorky standardizované zeminy bez přídavku PUR či katalyzátoru. Pracovalo se vždy ve třech opakováních. Do varianty s PUR pěnou bylo naváženo 1,5 g PUR materiálu ve frakci 0,5-0,8 mm, což odpovídalo pětinasobku původní navážky při předchozím testu biodegradovatelnosti. Do varianty s katalyzátorem bylo napipetováno 9,13 μ L dibutylcín dilaurátu. Vše bylo pečlivě promícháno a kádinky byly ponechány přikryté alobalem při laboratorní teplotě (viz Příloha 4). Biodegradace PUR a expozice vzorků půdy čistému katalyzátoru probíhala po dobu 37 dní. V průběhu pokusu byly kádinky promíchávány přibližně 2x až 3x do týdne a vždy se doplnila vlhkost rozprašovačem. Velké agregáty hlíny byly drceny mezi prsty v rukavicích, aby se zmírnila možnost vzniku anaerobních podmínek. Pro stanovení ekotoxicity byl dále aplikován test s *Vibrio fischeri*.

4.3.3 Stanovení ekotoxicity vzorků po zkráceném testu biodegradace pomocí bakterie *Vibrio fischeri*

Pro druhé kolo testování ekotoxicity byly použity výluhy ze standardizované půdy zkráceného pokusu biodegradace s vyšším obsahem PUR a organocínového katalyzátoru (viz kapitola 4.3.2).

Dne 7. prosince 2021 byla stanovena sušina půd ve všech kádinkách, aby mohl být získán vodný výluh pro potřeby biotestu s mořskou bakterií *Vibrio fischeri*. Test ekotoxicity proběhl na MBÚ v Praze dne 9. prosince 2021. Byl dodržen stejný postup i podmínky testování, které jsou popsány v kapitole 4.3.1.

4.4 Analýza PLFA

Fosfolipidové mastné kyseliny byly stanoveny ze všech vzorků půd pocházející z dlouhodobého testu biodegradace – tedy 18 vzorků. Vzorky půd byly odebrány po skončení stanovení biodegradovatelnosti (prosinec 2020) a uloženy v mrazáku (při teplotě -18 °C) do doby analýzy. Analýza PLFA byla provedena zaměstnanci MBÚ v Praze v dubnu 2021.

Analýzované mastné kyseliny odpovídaly následujícím skupinám mikroorganismů (Šnajdr et al., 2008; Němeček et al., 2014; Stránská, 2019).

Houby: 18:2 ω 6,9

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

Gramnegativní bakterie: 16:1 ω 7, 18:1 ω 7, 16:1 ω 5, cy17:0, cy19:0

Grampozitivní bakterie: i14:0, i15:0, a15:0, i16:0, i17:0, a17:0

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

4.5 Statistické zpracování dat

Pro statistické zpracování dat byl využit program Microsoft Excel 365 a statistický nástroj ANOVA (analýza rozptylu) a post-hoc Tukeyho test.

5 Výsledky a diskuze

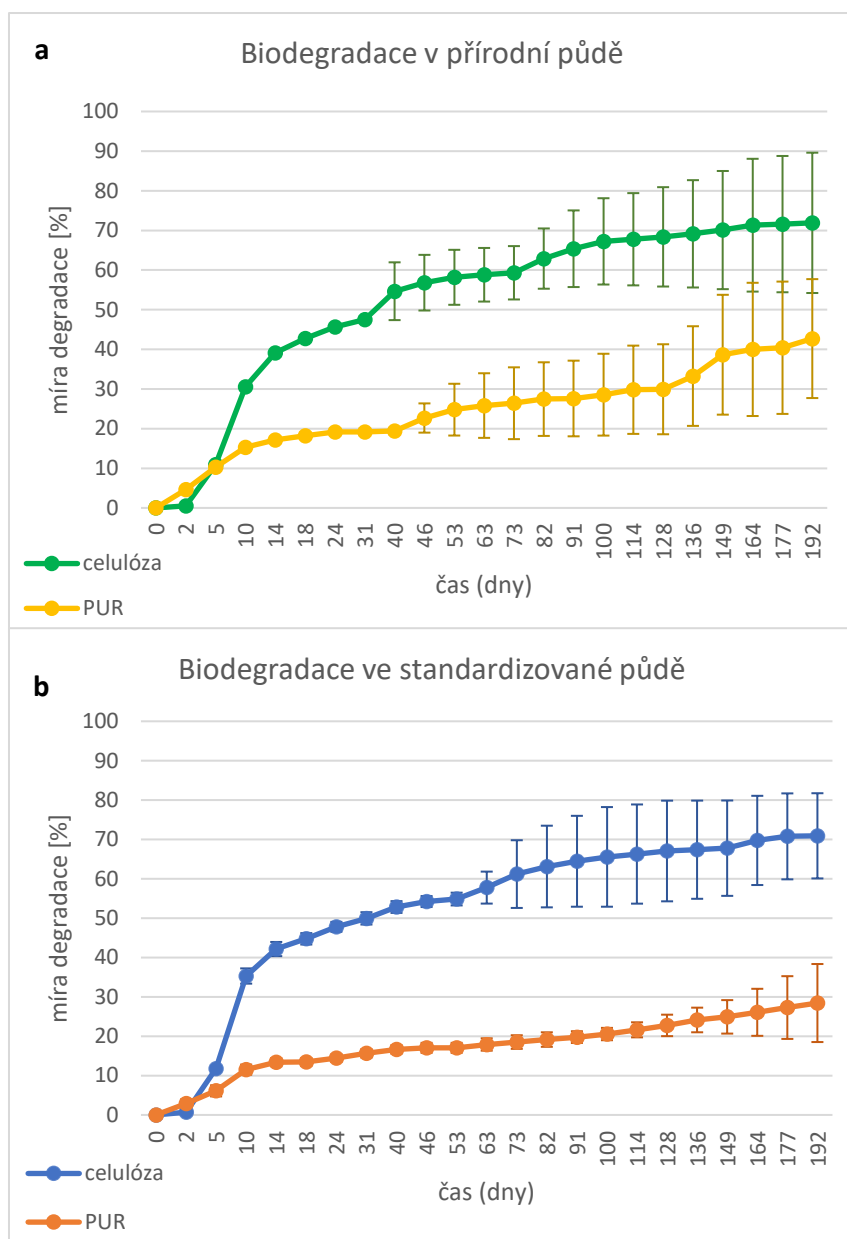
5.1 Biodegradace polyuretanu

Naměřené hodnoty parametrů půdy, které jsou vyžadovány použitou normou, jsou zobrazeny v Tab. 2. Hodnoty jsou uvedeny včetně směrodatných odchylek (SD). Na Obr. 4 je znázorněn průběh biodegradace v čase pro jednotlivé typy použitých půd ve dvou grafech. Obr. 5 znázorňuje průběh mineralizace v obou typech půd současně pro jejich lepší vzájemné porovnání. Validita testu byla dle použité normy ASTM D5988-18 splněna v případě obou typů půd.

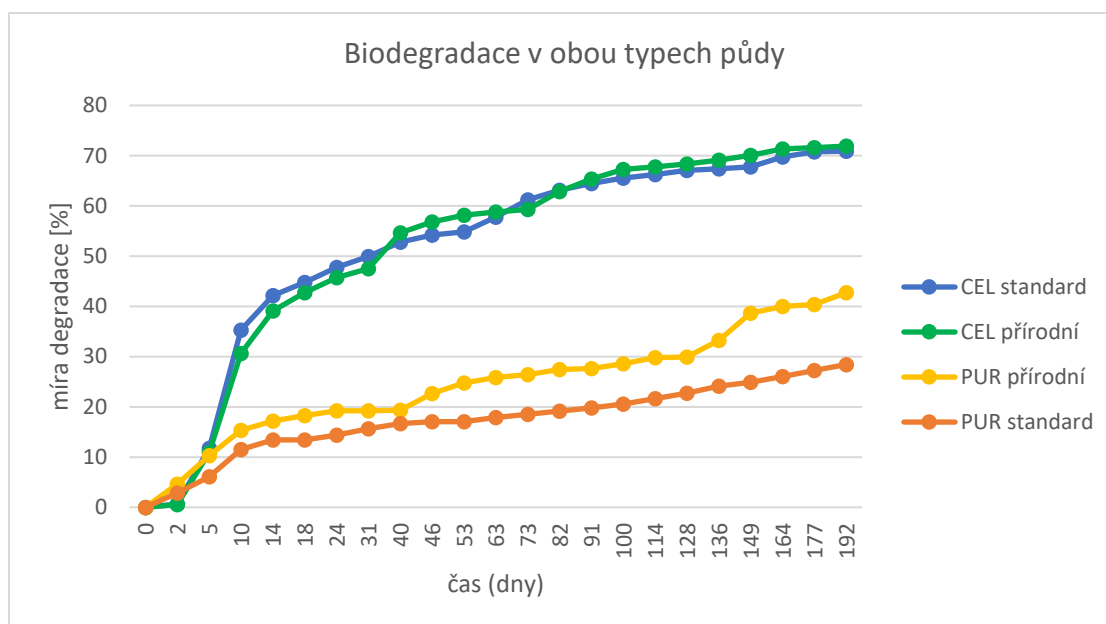
Tab. 2. Charakteristika půdních vlastností před zahájením pokusu biodegradace.

měřený parametr	naměřená hodnota \pm SD	
	přírodní půda	standardizovaná půda
pH	6,4 \pm 0,1	6,3 \pm 0,1
obsah sušiny	85,7 \pm 0,4 %	99,0 \pm 0,2 %
WHC	37,1 \pm 2,3 %	26,9 \pm 0,5 %
C:N	13,0 \pm 0,7	14,7 \pm 0,2
obsah celkového uhlíku	2,58 \pm 0,2 %	0,63 \pm 0,1 %
obsah celkového dusíku	0,20 \pm 0,1 %	0,04 \pm 0,0 %
ztráta žíháním	6,7 \pm 0,1 %	2,0 \pm 0,1 %

Z tabulky (Tab. 2) lze usoudit, že standardizovaná půda je chudší na živiny, obsahuje méně uhlíku i dusíku. Obsahuje zároveň i méně organické hmoty, která se stanovuje ztrátou žíháním (Nowak et al., 2011). Což souvisí s nižší retenční vodní kapacitou půdy (WHC) (Šantrůčková et al., 2015).



Obr. 4. Průběh biodegradace v přírodní (graf a) a standardizované půdě (graf b). Průběh mineralizace je funkcí času. Mineralizace polyuretanu v přírodní půdě dosáhla $43 \pm 15,0\%$ a celulóza (pozitivní kontrola) byla mineralizována ze $72 \pm 17,7\%$. Mineralizace polyuretanu ve standardizované půdě dosáhla $28 \pm 9,9\%$ a celulóza (pozitivní kontrola) byla zmineralizována ze $71 \pm 10,8\%$. Chybové úsečky znázorňují směrodatné odchylky ze 3 paralel jednotlivých měření.



Obr. 5. Průběh biodegradace v obou typech půd v čase. Rozdíl degradace PUR v přírodní a standardizované půdě není statisticky významný (ANOVA, $p > 0,05$).

CEL = celulóza, standard = standardizovaná půda.

Podle Obr. 5 rozklad celulózy jak v přírodní, tak i ve standardizované půdě vykazuje podobný průběh, ale průběh degradace PUR se různí v jednotlivých typech půdy. Rech a kol. (2020) spojuje vyšší biodegradabilitu s vyšším obsahem mikrobiální biomasy. Tato skutečnost by se mohla aplikovat i na náš případ a potvrzuje ji analýza PLFA (Obr. 6). V přírodní půdě bylo zjištěno řádově větší množství PLFA než v půdě standardizované. Obsah mikrobioty obecně souvisí s obsahem a dostupností organické hmoty v půdě (Šantrůčková et al., 2015). Přestože mineralizace polyuretanu vykazuje rozdíl s ohledem na typ použité půdy, celulóza nikoli. Briassoulis & Mistriotis (2018) ve své studii s pěti různými typy půd zmiňují, že typ půdy má z hlediska míry rozkladu vliv spíše na materiály, které jsou hůře rozkladné než na materiály, které se rozkládají lehce a často se používají jako pozitivní kontroly. Což by odpovídalo i našemu měření.

Průběh degradace PUR v přírodní půdě vykazuje dva výkyvy (po 40. a 128. dnu), kdežto degradace PUR ve standardizované půdě probíhala kontinuálně stejnou rychlostí po 10. dnu degradace. Výkyv v případě PUR v přírodní půdě po 128. dnu biodegradace je možné vysvětlit tím, že ten den byl do nádob přidán roztok $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ jako hnojivo. Průběh degradace PUR ve standardizované půdě přidání hnojiva nijak neovlivnilo. Můžeme tedy vyloučit limitaci živinami. Stejně tak v případě celulózy v obou typech půdy. Rychlý průběh degradace v prvních 10 dnech může být způsoben tím, že mikroorganismy nejdříve napadají lehce rozložitelné, jednoduché vazby (Nowak et al., 2011). Výkyv po 31. dnu v případě celulózy v přírodní půdě byl zřejmě zapříčiněn zvlhčením půdy

téhož dne, které ovlivňuje aktivitu půdní mikrobioty (Accinelli et al., 2010). Nárůst mineralizace PUR v přírodní půdě po 40. dnu pokusu vychází pouze z jedné paralely, kde byla kádinka s KOH více nasycena než ostatní dvě paralely. Tai a kol. (2019) vysvětluje, že v jejich studii nebylo dosaženo 100% biodegradace v případě pozitivní kontroly (škrob), protože některá frakce škrobu se přeměnila pouze na di- a monosacharidy či jiné nízkomolekulární látky místo CO₂. Podle de Wilde (2013) může část materiálu, nepřeměněného na CO₂, zůstat ve formě metabolitů.

Gómez a kol. (2014) použil pro stanovení biodegradability stejnou normu (ASTM D5988), ovšem při vyšší teplotě (27 ± 1 °C). V jejich případě testovali biodegradabilní PUR na ropné a na biologické bázi. PUR na biologické bázi (surový glycerol) dosáhl 11,2 ± 4,3 % rozkladu, PUR na ropné bázi 1,7 ± 1,4 % a pozitivní kontrola (celulóza) 65,4 ± 6,0 % mineralizace po 320 dnech biodegradace, což nesplňuje podmínky validity pro danou normu (rozklad celulózy >70 % během 6 měsíců). V pozdější studii (Gómez & Michel, 2013) bylo v případě pozitivní kontroly (celulózy) dosaženo 74,2 ± 4,5 % mineralizace během 660 dnů. Tai a kol. (2019) testovala dva druhy PUR s různým přidavkem škrobu dle totožné normy. PUR s obsahem 48 % škrobu dosáhl mineralizace 72,5 % během 180 dní. PUR s nižším obsahem škrobu (16 %) dosáhl 26,7 % degradace. Pozitivní kontrola (škrob s vysokým obsahem amylozy) dosáhla 86% degradace za stejnou dobu.

I přesto, že vybraná metoda na posouzení biodegradace byla blízká polním podmínkám (Tai et al., 2019), lze předpokládat, že v reálném prostředí se rozklad bude lišit díky rozdílným vlivům mnoha činitelů (Fernandes et al., 2020; Kjeldsen et al., n/a). Rozdíl může vytvořit např. odlišný typ půdy, přístup světla, vlhkost a další abiotické i biotické faktory (Briassoulis & Degli-Innocenti, 2017). Rech a kol. (2020) uvádí, že čím větší úrodnost půdy, tím větší množství půdní mikroflóry, která se může podílet na biodegradaci. Například písečná půda neposkytovala vhodné prostředí pro biodegradaci ve studii Rech a kol. (2020) – biodegradace polyhydroxybutyrátu (PHB) ve třech rozdílných typech půdy. I výkyvy teplot, které jsou v našich zeměpisných šířkách zapříčiněné střídáním ročních období a které použitá norma nepokrývá, by mohly ovlivnit biodegradaci. Vliv UV záření, které také není zahrnuto v normě ASTM D5988, by biodegradaci nejspíš podpořilo (Skleničková et al., 2020). Potenciál biodegradace v reálných ekosystémech se tedy bude zřejmě lišit dle geografické polohy a ročního období (Fernandes et al., 2020). Podle výsledků studie Nowak a kol. (2011) míra biodegradace záleží i na obsahu organické hmoty. Půdy, které disponovaly vyšším obsahem organické hmoty, poskytovaly vhodnější prostředí pro rychlejší degradaci. Tento fakt se shoduje s výsledky stanovení biodegradability (Obr. 5), kdy přírodní půda obsahovala vyšší množství organické hmoty (Tab. 2). Szpiżyk a kol. (2021) vystavil biodegradabilní PUR půdní biodegradaci ve

dvou formách (drcený a ve tvaru krychle). Drcený PUR dosáhl nižší míry biodegradace, čehož by se dalo zúročit v příštích výzkumech biodegradability.

5.2 Test ekotoxicity

5.2.1 Ekotoxicita výluhů vzorků dlouhodobé biodegradace

Výluhy obou typů půd a všech variant z dlouhodobého testu biodegradace se ukázaly jako netoxické. Během orientačního i během přesného měření nebyla zaznamenána relativní inhibice vůči kontrole (respektive inhibice luminiscence je v rámci chyby měření). Tabulka číslo 3 shrnuje výsledky měření neředěných vzorků během přesného měření. Kontroly (čistý roztok NaCl) ve svých paralelách vykazovaly nízkou vzájemnou odlišnost a luminiscenční faktor se blížil 1 (luminiscence se v kontrolách nezvyšuje ani nesnižuje ve sledovaných časech).

Tab. 3. *Inhibice luminiscence mořské bakterie Vibrio fischeri při testování ekotoxicity neředěných výluhů zemin po biodegradačním testu. Luminiscenční faktor v čase 15 minut se rovnal $0,93 \pm 0,04$ a v čase 30 minut byl roven $0,90 \pm 0,04$. Chyba měření v čase 15 minut byla 4,63 % a v čase 30 minut 4,45 %. Záporné hodnoty znamenají nárůst bioluminiscence. Testované vzorky byly ve 3 paralelách.*

PŘ = přírodní půda; STAND = standardizovaná půda; PUR = půda obsahující PUR; celulóza = půda obsahující celulózu; negativní kontrola = čistá půda; SD = směrodatná odchylka

testovaný vzorek	inhibice luminiscence v časových intervalech [%] \pm SD	
	15 minut	30 minut
PŘ PUR	$-9,42 \pm 3,7$	$-7,28 \pm 3,7$
PŘ celulóza	$-11,05 \pm 5,1$	$-7,63 \pm 6,4$
PŘ negativní kontrola	$-12,82 \pm 3,5$	$-10,11 \pm 3,1$
STAND PUR	$3,00 \pm 0,8$	$1,30 \pm 2,3$
STAND celulóza	$-6,29 \pm 6,0$	$-5,84 \pm 4,7$
STAND negativní kontrola	$-6,76 \pm 2,5$	$-6,94 \pm 3,2$

Ve všech vzorcích až na jednu výjimku (STAND PUR) lze pozorovat stimulaci luminiscence. Inhibice v případě standardizované půdy s přídatkem PUR se sice pohybuje v kladných hodnotách, ale v mezích chyby měření, tudíž nelze potvrdit zvýšení ekotoxicity. Nicméně kladné hodnoty mohou souviset s nižším obsahem organické hmoty ve standardizované půdě (Tab. 2), tedy s vyšší biodostupností a vyšším potenciálem ekotoxicity (Rüdel, 2003).

5.2.2 Ekotoxicita výluhů vzorků zkráceného testu biodegradace

Všechny vodné výluhy získané ze zkráceného testu biodegradace ve standardizované půdě s vyšším obsahem PUR (resp. katalyzátoru) nevykazovaly inhibici luminiscence v čase 15 minut ani 30 minut. Výsledky měření neřaděných vzorků jsou shrnuty v Tab. 4.

Tab. 4. *Inhibice luminiscence při testování ekotoxicity zrychlené biodegradace ve standardizované půdě s mořskou bakterií *Vibrio fischeri*. Luminiscenční faktor v čase 15 minut byl roven $0,94 \pm 0,03$ a v čase 30 minut $0,98 \pm 0,04$. Chyba měření v čase 15 minut odpovídala 3,67 % a v čase 30 minut byla 3,99 %. Záporné hodnoty znamenají nárůst bioluminiscence. Každý vzorek měl 4 paralely. PUR = půda obsahující PUR; katalyzátor = půda obsahující čistý organocínový katalyzátor; negativní kontrola = čistá standardizovaná půda; slepý vzorek = čistá destilovaná voda; SD = směrodatná odchylka*

testovaný vzorek	inhibice luminiscence v časových intervalech [%] \pm SD	
	15 minut	30 minut
PUR	$-7,55 \pm 1,8$	$-5,85 \pm 1,0$
katalyzátor	$-16,83 \pm 1,2$	$-14,12 \pm 0,8$
negativní kontrola	$-12,48 \pm 0,4$	$-10,98 \pm 0,2$
slepý vzorek	$-2,45 \pm 1,2$	$-0,70 \pm 1,7$

Z výše uvedených výsledků (Tab. 3) lze tedy konstatovat, že biodegradace PUR nevyvolává ekotoxické účinky na vybranou bakterii *Vibrio fischeri* ani při vyšší koncentraci PUR v půdě (Tab. 4). Pro úplné vyloučení ekotoxikologického působení by však bylo zapotřebí provést další biotesty s organismy na různých trofických úrovních a poskládat tak vhodnou baterii testů (Vojtová et al., 2007; Kapanen, 2012). Například terestrický test s vyššími rostlinami (OECD test č. 208), půdními členovci či žížaly a roupicemi (ASTM E1676) a akvatický test se zelenou řasou. Kromě akutních biotestů by bylo vhodné zařadit i chronický test (např. OECD test č. 222 – reprodukční test s žížalami). Nebo následovat českou normu ČSN ISO 15799 (Kvalita půdy – Návod pro ekotoxikologickou charakterizaci půd a půdních materiálů), která uvádí příklady a doporučení ohledně biotestů a jejich provedení.

Pro lepší pochopení potenciální ekotoxicity polyuretanu by bylo vhodnější odebírat vzorky půd průběžně během degradace pro zjištění průběhu/vývoje toxicity v čase. Bylo by tak možné analyzovat i samotné degradační produkty (Kapanen, 2012) jako tomu bylo např. ve studiích Degli-Innocenti a kol. (2001) a Tuominen a kol. (2002). Tuominen a kol. (2002) popisuje toxicitu během kompostování různých druhů polyuretanů v různých časových intervalech. Uvádí, že největší

toxicita byla v průběhu kompostování, ale v průběhu času se snížila. Jako toxický se ukázal jen jeden PUR s přísávkem 1,6-hexamethylen diisokyanátu (HMDI). Nejvyšší inhibice luminiscence *Vibrio f.* byla zaznamenána po 33 dnech kompostování při použití Flash testu. Dále byly vzorky posuzovány pomocí testů s vyššími rostlinami (ředkev, ječmen a řeřicha), kdy se k půdnímu substrátu přidal kompost s obsahem testovaného PUR. Nicméně Tuominen a kol. (2002) vysvětluje, že toxicita HMDI není evidentní a působí nejspíš nepřímá toxicky. V našem případě ovšem průběžné odebírání vzorků nebylo možné z důvodu narušení měření míry biodegradace, respektive respirace. V pokračovacích výzkumech by proto bylo vhodné mít paralelní pokus k biodegradaci pokusu a z něj odebírat vzorky průběžně pro potřeby testování ekotoxicity.

V bezpečnostních listech pro dibutylcín dilaurát byla stanovena hodnota EC50 po 30 minutách měření pomocí Microtox testu (*Vibrio fischeri*), EC50 = 0,576 mg/L (ThermoFisher Scientific, 2021). V našem případě jsme v přepočtu v rámci zkráceného pokusu biodegradace pracovali s koncentrací 3,19 mg/L DBTDL ve vodném výluhu. Avšak k takové koncentraci by došlo pouze teoreticky v ideálním případě, kdy by půda byla dokonale homogenizována po přísávku DBTDL, následně by odběr půdy byl proveden rovnoměrně a testovaná substance by přešla 100% do vodného výluhu po skončení pokusu biodegradace. Tyto podmínky v našem případě nebyly nijak zaručeny a tím pádem spočítaná hodnota koncentrace je pouze maximální teoretická. Porovnáním získaných výsledků se stanovenou hodnotou EC50 lze usoudit, že výluhy zřejmě neobsahovaly tak vysoké koncentrace DBTDL, neboť vzorky nevykazovaly inhibici luminiscence (Tab. 4). Zároveň je nutno brát v úvahu, že zkrácený test biodegradace je podstatně kratší (37 dní) než půlroční standardizovaný test, tudíž výsledky nejsou úplně porovnatelné. Dle výsledků je pravděpodobné, že rozklad PUR nezpůsobuje ekotoxický efekt, protože se inhibice neprojevila ani v případě vzorků obsahující čistý katalyzátor. Zároveň je ale možné, že se případné toxické účinky projeví až po delším čase. Proto by bylo v budoucím výzkumu vhodné biodegradaci s vyšším množstvím PUR (resp. katalyzátoru) ve standardizované půdě zopakovat se stejnou dobou trvání pokusu (půl roku).

Podle mého nejlepšího svědomí a nastudované dostupné literatury existuje jen velmi málo studií spojující testy biodegradability a následné ekotoxikologické testy polyuretanu. Jedním z důvodů může být i skutečnost, že biodegradace PUR je zkoumána v rámci mnoha studií s různými mikroorganismy (bakterie, houby) (Howard, 2011; Ibrahim et al., 2011; Cregut et al., 2013; Álvarez-Barragán et al., 2016; Beneš et al., 2020; Liu et al., 2021; Skleničková et al., 2021a). Pokud se v těchto pokusech biodegradability neobjevuje inhibice či úbytek biomasy testovacího organismu, pak není vážný důvod obávat se, že je polymer toxický. Dále předpokládám, že výrobci

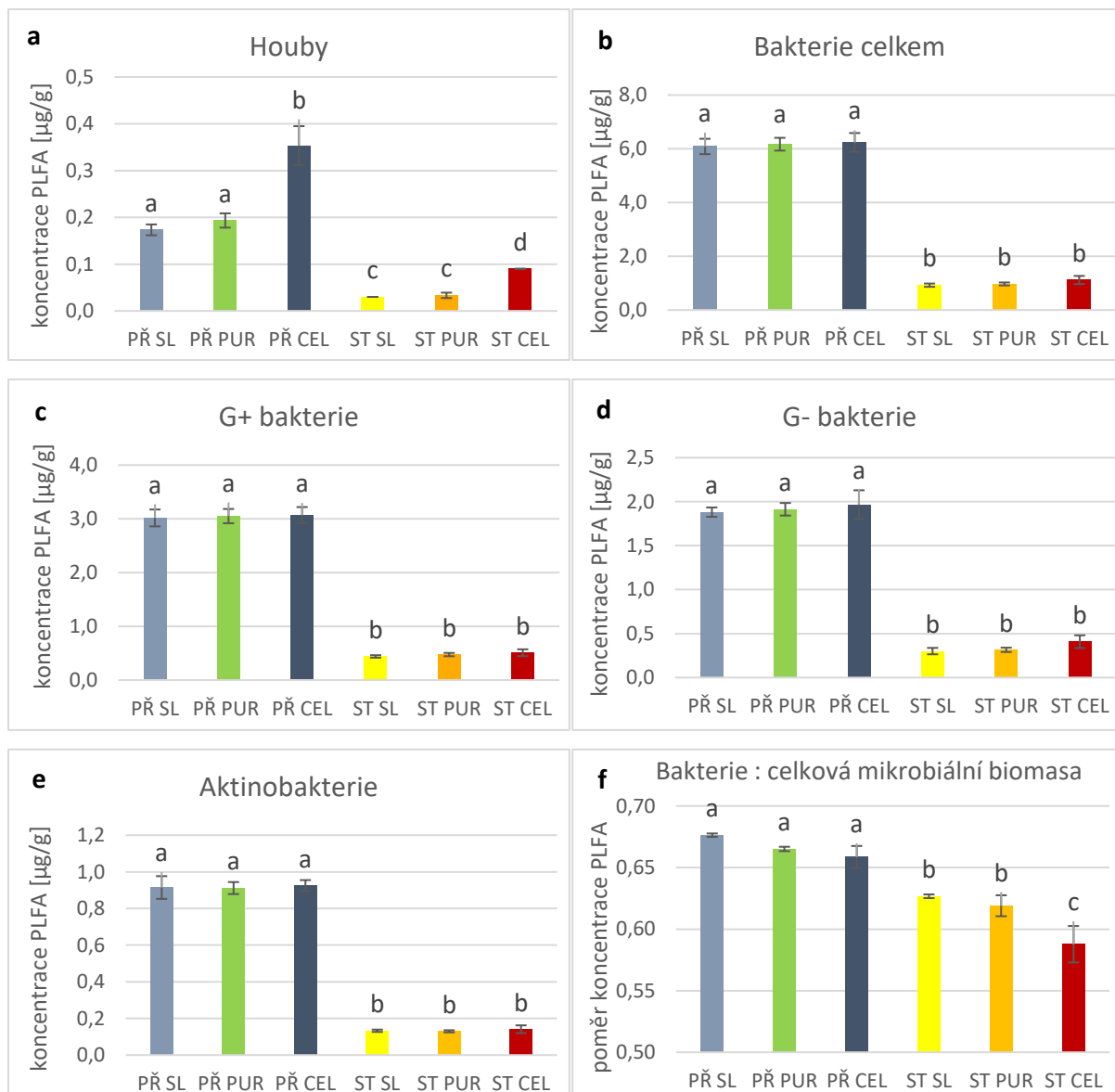
a vědci vyvíjí materiály cíleně netoxicky, mají-li se v konečném důsledku podrobit biologickému rozkladu.

Ve studii da Silva a kol. (2010) testovaly PUR vyvinutý pro biomedicínské účely na toxicitu pomocí sítnicových buněk. PUR byl vyroben taktéž s použitím DBTDL jako katalyzátoru. Výsledky dokazovaly, že materiál není cytotoxický.

Za zmínku stojí, že organické materiály v půdě mohou být i přínosné. Mezi pozitivní efekt můžeme zařadit zlepšování struktury půdy (s tím souvisí lepší zadržování vody) a tím nepřímo zlepšovat i její chemické vlastnosti (uvolňování a udržení živin) nebo pozitivně ovlivnit přítomnost žádané půdní mikrobioty (Fritz, 2005; Skleničková et al., 2021b). Proto by další výzkumy mohly cílit na posuzování pozitivních přínosů polyuretanu (zvláště po předchozím vyloučení ekotoxicity a pro materiály vyvinuté pro aplikaci v zemědělství, kdy se počítá s jejich následným zapojením do půdy).

5.3 Analýza PLFA

Výsledky PLFA analýzy jsou shrnuty v následujících grafech na Obr. 6. Grafy zobrazují hlavní skupiny mikroorganismů měřené v rámci PLFA analýzy a poměr bakteriální a celkové mikrobiální biomasy.



Obr. 6. Grafy (a-e) zobrazují koncentraci měřených PLFA v půdě rozdělené podle hlavních skupin mikroorganismů. Poslední graf (f) zobrazuje poměr bakteriální biomasy ku celkové biomase mikroorganismů dle specifických PLFA. Písmena označují statisticky signifikantní rozdíly (ANOVA, Tukey post-hoc test, $p < 0,05$). Chybové úsečky zobrazují směrodatnou odchylku (3 paralely). PŘ = přírodní půda, ST = standardizovaná půda, SL = slepý vzorek (negativní kontrola), CEL = celulóza.

Obsah houbové biomasy (graf a) byl statisticky významně vyšší v pozitivních kontrolách (celulóza). V nádobách byla plíseň spatřena okem již v prvních třech dnech degradace (viz Příloha 3). Zatímco ve studii Briassoulis & Mistriotis (2018) nebyla plíseň v rámci biodegradace celulózy vizuálně spatřena ani v jedné z pěti různých typů půd. Nutno zmínit, že mastná kyselina 18:2 ω 6,9 definující houbovou biomasu se nenachází výlučně jen v houbové biomase (Frostegård et al., 2011) a zároveň není jediná. Vedle PLFA 18:2 ω 6,9 se v houbové biomase objevuje ještě mastná kyselina

16:0 a 18:1 ω 9 (Klamer & Bååth, 2004). Pro detailnější zkoumání se v řadě studií uplatňuje stanovení houbové biomasy pomocí analýzy ergosterolu (Šnajdr et al., 2008; Watzinger, 2015; Nurika et al., 2018), který je až na drobné výjimky obsažen výlučně jen v houbových membránách (Wallander et al., 2013). Nicméně Klamer & Bååth (2004) uvádí, že PLFA 18:2 ω 6,9 je stejně dobrý ukazatel houbové biomasy jako ergosterol. Zároveň stojí za povšimnutí, že i přes řadu studií, které uvádí, že polyuretan je lépe degradován houbami (Cregut et al., 2013; Beneš et al., 2020; Liu et al., 2021; Skleničková et al., 2021a; Trhlíková et al., 2021), obsah houbové biomasy je řádově nižší než bakteriální. Gunawan a kol. (2020) uvádí, že houby jsou schopné přežít na povrchu PUR, ale nejsou schopné žít v konzorciu ostatních mikroorganismů. Bakterie považuje za možné konkurenty hub.

Z grafů (a-e) je zřejmé, že obsah mikrobiální biomasy ve standardizované půdě je statisticky významně nižší než v půdě přírodní. Tato skutečnost podporuje fakt, že koncentrace mikrobiální biomasy úzce souvisí s mírou biodegradace (Rech et al., 2020). Zároveň je patrné, že nádoby s obsahem PUR nevykazují nižší množství mikroflóry v půdě oproti slepým vzorkům obsahující pouze půdu. Což v souladu s provedeným biotestem podporuje hypotézu, že biodegradace PUR nevykazuje toxické účinky na půdní mikrobiotu.

Z grafu f lze vyčíst, že i přesto, že poměry (bakterie : celková mikrobiální biomasa) jsou v přírodní a ve standardizované půdě statisticky rozdílné, neliší se nijak extrémně. Z toho lze vyvodit, že rozklad PUR zřejmě probíhá obdobně v obou půdách, ale ve standardizované půdě v menší míře právě kvůli menšímu množství mikrobioty (grafy a-e).

Nemáme k dispozici vstupní data ze začátku biodegradčního pokusu, proto výsledky nelze srovnávat v čase. Nicméně to nebylo ani cílem práce. PLFA analýzu považujeme za doplňkový prostředek, který nám pomohl vysvětlit průběh biodegradace a poskytuje určité srovnání negativní kontroly a půdy s testovaným vzorkem (celulóza/PUR) z pohledu potenciální toxicity polyuretanu.

6 Závěr

Biodegradabilní plasty a proces biorecyklace, kdy se do odstranění materiálu zapojují vhodné mikroorganismy nebo enzymy, jsou jednou z možností jak eliminovat narůstající plastový odpad včetně polyuretanového. Biodegradabilní plasty nachází uplatnění v zemědělství, kdy se počítá s ponecháním materiálu v půdní matrici. Je proto důležité ověřit nezávadnost pro přírodní ekosystém před zavedením materiálu do praxe. Stanovení biodegradability a ekotoxicity nově vyvinutých biodegradabilních polymerů současně je více než vhodné.

Pro testování biodegradability polyuretanu v půdě při aerobních podmínkách byla použita norma ASTM D5988-18. Byly využity dva půdní substráty – přírodní půda (směs lesní, luční a polní půdy; která odpovídá požadavkům zmíněné normy) a standardizovaná půda, kterou lze použít i pro testy ekotoxicity. PUR v přírodní půdě dosáhl vyšší míry mineralizace ($43 \pm 15,0\%$) než v půdě standardizované ($28 \pm 9,9\%$). Nižší míra biodegradace PUR ve standardizované půdě zřejmě souvisí s nižším obsahem organické hmoty a nižším obsahem půdní mikrobioty. Výsledky PLFA analýzy prokázaly řádově nižší koncentraci půdní mikrobioty ve standardizované půdě oproti půdě přírodní.

Výluhy z obou typů půd po biodegradačním pokusu nevykazovaly inhibici testovacího organismu v rámci ekotoxikologického testu s mořskou bakterií *Vibrio fischeri* (ISO 11348-2). Inhibice bioluminiscence nebyla zaznamenána ani v případě výluhů vzorků pocházející ze zkráceného testu biodegradace ve standardizované půdě s vyšším obsahem PUR a odpovídajícímu množství organocínového katalyzátoru (dibutylcín dilaurát).

Testování biodegradability a ekotoxicity současně se osvědčilo při použití standardizované půdy. Půda splnila kritéria validity (rozklad pozitivní kontroly $>70\%$) dle použité normy (ASTM D5988-18). Nebyly pozorovány tak velké odchylky napříč paralelami a půda vykazovala stabilnější průběh během celého měření.

7 Použité zdroje a literatura

Accinelli C., Saccà M. L., Mencarelli M., Vicari A., 2012. Deterioration of bioplastic carrier bags in the environment and assessment of a new recycling alternative. *Chemosphere*. 89(2), 136-143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.028>

Akay O., Altinkok C., Acik G., Yuce H., Ege G. K., 2021. A bio-based and non-toxic polyurethane film derived from *Luffa cylindrica* cellulose and L-Lysine diisocyanate ethyl ester. *European Polymer Journal*. 161, 110856. <https://doi.org/10.1016/J.EURPOLYMJ.2021.110856>

Álvarez-Barragán J., Domínguez-Malfavón L., Vargas-Suárez M., González-Hernández R., Aguilar-Osorio G., Loza-Tavera H., 2016. Biodegradative activities of selected environmental fungi on a polyester polyurethane varnish and polyether polyurethane foams. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17), 5225–5235. <https://doi.org/10.1128/AEM.01344-16>

Artham T., Doble M., 2008. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular Bioscience*. 8(1), 14–24. <https://doi.org/10.1002/mabi.200700106>

Azoulay D., Villa P., Arellano Y., Gordon M., Moon D., Miller K., Thompson K., 2019. Plastic & Health: the hidden costs of a plastic planet. *Center for International Environmental Law*. 12-19.

Basu S., Bose C., Ojha N., Das N., Das J., Pal M., Khurana S., 2015. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 11(4), 182-184.

Beneš H., Vlčková V., Paruzel A., Trhlíková O., Chalupa J., Kanizsová L., Skleničková K., Halecký M., 2020. Multifunctional and fully aliphatic biodegradable polyurethane foam as porous biomass carrier for biofiltration. *Polymer Degradation and Stability*. 176. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109156>

Bécaert V., Deschênes L., 2006. Using Soil Health to Assess Ecotoxicological Impacts of Pollutants on Soil Microflora. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. 188:127-148

Bláha V., Dvořák V., n/a. Problematika ekotoxikologických testů. *EMPLA AG, Hradec Králové*.

Borchers, 2017. Dibutyltin Dilaurate – safety data sheets.

Borchers, 2019. Dibutyltin Dilaurate [online]. Cit. 15.3.2022. Dostupné z: <https://www.borchers.com/wp-content/uploads/2019/01/Dibutyltin-Dilaurate.pdf>

Briassoulis D., Degli-Innocenti F., 2017. Standards for Soil Biodegradable Plastics. In: Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture (Malinconico M., 2017). *Green Chemistry and Sustainable Technology*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54130-2_6

Briassoulis D., Mistriotis A., 2018. Key parameters in testing biodegradation of bio-based materials in soil. *Chemosphere*. 207, 18-26. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.024>

Buyer J. S., Sasser M., 2012. High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils. *Applied Soil Ecology*. 61, 127-130. <https://doi.org/10.1016/J.APSOIL.2012.06.005>

Cregut M., Bedas M., Durand M. J., Thouand G., 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnology Advances*. 31(8), 1634-1647. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.011>

- Darby R. T., Kaplan A. M., 1968. Fungal Susceptibility of Polyurethanes. *Applied microbiology*. 16(6). <https://journals.asm.org/journal/am>
- David J., Vojtová L., Bednařík K., Kučerík J., Vávrová M., Jančář J., 2010. Development of novel environmental friendly polyurethane foams. *Environmental Chemistry Letters*. 8:381-385. <https://doi.org/10.1007/s10311-009-0236-8>
- Degli-Innocenti F., Bellia G., Tosin M., Kapanen A., Itävaara M., 2001. Detection of toxicity released by biodegradable plastics after composting in activated vermiculite. *Polymer Degradation and Stability*. 73(1), 101-106. [https://doi.org/10.1016/S0141-3910\(01\)00075-1](https://doi.org/10.1016/S0141-3910(01)00075-1)
- Dopp E., Rettenmeier A. W., 2013. Tin, Toxicity. In: Encyclopedia of Metalloproteins (pp. 2235-2239). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-1533-6_118
- Fernandes M., Salvador A., Alves M. M., Vicente A. A., 2020. Factors affecting polyhydroxyalkanoates biodegradation in soil. *Polymer Degradation and Stability*. 182. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2020.109408>
- Filiciotto L., Rothenberg, G., 2021. Biodegradable Plastics: Standards, Policies, and Impacts. *ChemSusChem*. 14, 56–72. <https://doi.org/10.1002/cssc.202002044>
- Findlay R. H., 1996. The use of phospholipid fatty acid to determine microbial community structure. *Molecular microbial ecology manual*. 4.1.4: 1-17.
- Francisco R., Duarte T., Chelinho S., Maleita C. M. N., Braga M. E. M., Cunha M. J., Abrantes I., de Sousa H. C., Sousa J. P., Morais P. V., 2022. Effects of a bionematicide 1,4-naphthoquinone solution on soil microbial community assessed by PLFA: Tracing toxicity indicators. *Applied Soil Ecology*. 174. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104417>
- Frère L., Paul-Pont I., Moreau J., Soudant P., Lambert C., Huvet A., Rinnert E., 2016. A semi-automated Raman micro-spectroscopy method for morphological and chemical characterizations of microplastic litter. *Marine Pollution Bulletin*. 113(1–2), 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.10.051>
- Fritz J., Link U., Braun R., 2001. Environmental impacts of biobased/biodegradable packaging. *Starch*. 53, 105–109.
- Fritz J., 2005. Ecotoxicological aspects in the biodegradation process of polymers. In: Handbook of biodegradable polymers (Bastioli C., 2005). *Rapra Technology Limited*.
- Frostegård Å., Tunlid A., Bååth E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 43(8), 1621-1625. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.11.021>
- Furtwengler P., Boumbimba R. M., Avérous L., 2018. Elaboration and Characterization of Advanced Biobased Polyurethane Foams Presenting Anisotropic Behavior. *Macromolecular Materials and Engineering*. 303, 1700501.
- Gantrade, 2019. DETDA: A Liquid that Delivers the Hard and Tough [online]. Cit. 1.4.2022. Dostupné z: <https://www.gantrade.com/blog/detda-a-liquid-that-delivers-the-hard-and-tough>
- Geyer R., Jambeck J. R., Law K. L., 2017. Production, use, and fate of all plastics ever made. *Science Advances*. 3.

- Gómez E. F., Luo X., Li C., Michel F. C., Li Y., 2014. Biodegradability of crude glycerol-based polyurethane foams during composting, anaerobic digestion and soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*. 102(1), 195-203. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.008>
- Gómez E. F., Michel F. C., 2013. Biodegradability of conventional and bio-based plastics and natural fiber composites during composting, anaerobic digestion and long-term soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*. 98(12), 2583-2591. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2013.09.018>
- Guerrini S., Borreani G., Voojjs H., 2017. Biodegradable Materials in Agriculture: Case Histories and Perspectives. In: Malinconico M., 2017. Soil Degradable Bioplastics for a Sustainable Modern Agriculture. *Green Chemistry and Sustainable Technology*. https://doi.org/10.1007/978-3-662-54130-2_3
- Gunawan N. R., Tessman M., Schreiman A. C., Simkovsky R., Samoylov A. A., Neelakantan N. K., Bemis T. A., Burkart M. D., Pomeroy R. S., Mayfield S. P.; 2020. Rapid biodegradation of renewable polyurethane foams with identification of associated microorganisms and decomposition products. *Bioresource Technology Reports*. 11. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100513>
- Harding D. E., Ross D. J., 1964. Some factors in low-temperature storage influencing the mineralisable-nitrogen of soils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 15(12), 829-834.
- Hoffman D. J., Rattner B. A., Burton G. A., Cairns J., 2003. Handbook of ecotoxicology, 2nd edition. Lewis Publishers, New York. Dostupné z: <http://www.ilakes.org/ch/book/Handbook.of.Ecotoxicology.2nd.ed.2003.pdf>
- Howard G. T., 2011. Microbial biodegradation of polyurethane. *Polyurethane Biodegradation*. pp. 371-394. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23789-8_14
- Hubálek T., 2008. Ekotoxikologické hodnocení kontaminovaných vod a půd a aplikace testů ekotoxicity pro bioremediace. *Disertační práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí*.
- Ibrahim I. N., Maraqa A., Hameed K. M., Saadoun I. M., Maswadeh H. M., 2011. Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. *Turkish Journal of Biology*. 35(5), 551-557. <https://doi.org/10.3906/biy-0901-9>
- Jos A., Repetto G., Ríos J. C., del Peso A., Salguero M., Hazen M. J., Molero M. L., Fernández-Freire P., Pérez-Martín J. M., Labrador V., Cameán A., 2005. Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquatic Toxicology*. 71(2), 183-192. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.11.004>
- Kapanen A., 2012. Ecotoxicity assessment of biodegradable plastics and sewage sludge in compost and in soil. *Disertační práce. University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry*.
- Kaur A., Chaudhary A., Kaur A., Choudhary R., Kaushik R., 2005. Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current science*. 89 (7).
- Kemona A., Piotrowska M., 2016. Microorganisms potentially useful in the management of polyurethane foam waste. *Infrastructure and Ecology of Rural Areas*. 2(4), 1297-1308. <https://doi.org/10.14597/infraeco.2016.4.2.095>

Khan S., Nadir S., Shah Z. U., Shah A. A., Karunarathna S. C., Xu J., Khan A., Munir S., Hasan F., 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*. 225, 469-480. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.012>

Kjeldsen A., Price M., Lilley C., Guzniczak E., n/a. *A Review of Standards for Biodegradable Plastics*. Dostupné z: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/817684/review-standards-for-biodegradable-plastics-IBioIC.pdf

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*. 36(1), 57-65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.019>

Kočí V., Mocová K., 2009. *Ekotoxikologie pro chemiky*. VŠCHT Praha. Dostupné z: http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_isbn-978-80-7080-699-9/pages-img/obalka-1.html ISBN 978-80-7080-699-9.

Kyrikou I., Briassoulis D., 2007. Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review. *Journal of Polymers and the Environment*. 15(2), 125-150. <https://doi.org/10.1007/S10924-007-0053-8>

Liu J., He J., Xue R., Xu B., Qian X., Xin F., Blank L. M., Zhou J., Wei R., Dong W., Jiang M., 2021. Biodegradation and up-cycling of polyurethanes: Progress, challenges, and prospects. *Biotechnology Advances*. 48, 107730.

Loredo-Treviño A., García G., Velasco-Téllez A., Rodríguez-Herrera R., Aguilar C. N., 2011. Polyurethane as substrate for fungal strains. *Advances in Bioscience and Biotechnology*. 2(2), 52-58. <https://doi.org/10.4236/abb.2011.22009>

Magnin A., Entzmann L., Pollet E., Avérous L.; 2021. Breakthrough in polyurethane bio-recycling: An efficient laccase-mediated system for the degradation of different types of polyurethanes. *Waste Management*. 132, 23-30. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2021.07.011>

Magnin A., Pollet E., Perrin R., Ullmann C., Persillon C., Phalip V., Avérous L., 2019. Enzymatic recycling of thermoplastic polyurethanes: Synergistic effect of an esterase and an amidase and recovery of building blocks. *Waste Management*. 85, 141-150. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2018.12.024>

Matthiessen P., Gibbs P. E., 1998. Critical appraisal of the evidence for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 17(1).

Ministerstvo životního prostředí, 2002. Metodický pokyn odboru odpadů Ministerstva životního prostředí k hodnocení vyluhovatelnosti odpadů. *Věstník Ministerstva životního prostředí*, ročník XII, částka 12. [https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/C5DA8E0290CB5D66C1256FAF00436B51/\\$file/Vestnik%2012.pdf](https://www.mzp.cz/web/edice.nsf/C5DA8E0290CB5D66C1256FAF00436B51/$file/Vestnik%2012.pdf)

van Minnen B., Stegenga B., van Leeuwen M. B. M., van Kooten T. G., Bos R. R. M., 2005. A long-term in vitro biocompatibility study of a biodegradable polyurethane and its degradation products. *Journal of Biomedical Materials Research – Part A*. 76(2), 377-385. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30531>

Němeček J., Lhotský O., Cajthaml T., 2014. Nanoscale zero-valent iron application for in situ reduction of hexavalent chromium and its effects on indigenous microorganism populations. *Science of the Total Environment*. 485-486(1), 739-747. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.105>

Nowak B., Pajak J., Drozd-Bratkowicz M., Rymarz G., 2011. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 65(6), 757-767. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.04.007>

Pelz O., Chatzinotas A., Zarda-Hess A., Abraham W.R., Zeyer J., 2001. Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria using ¹³C-incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. *FEMS Microbiology Ecology*. 38, 123-131.

Piotrowska-Seget Z., Mroziak A., 2003. Signature Lipid Biomarker (SLB) Analysis in Determining Changes in Community Structure of Soil Microorganisms. *Polish Journal of Environmental Studies*. 12(6).

PlasticsEurope, 2020. Plastics – the Facts 2020. *An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Dostupné z: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2020/>

PlasticsEurope, 2021. Plastics – the Facts 2021. *An analysis of European plastics production, demand and waste data*. Dostupné z: <https://plasticseurope.org/knowledge-hub/plastics-the-facts-2021/>

Pražanová K., 2018. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě a následná analýza produktů rozkladu. *Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí*.

da Rocha C. F. O., Martinez S. T., Campos V. P., da Rocha G. O., de Andrade J. B., 2021. Microplastic pollution in Southern Atlantic marine waters: Review of current trends, sources, and perspectives. *Science of the Total Environment*. 782. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146541>

Rüdel H., 2003. Case study: Bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 56(1), 180-189. [https://doi.org/10.1016/S0147-6513\(03\)00061-7](https://doi.org/10.1016/S0147-6513(03)00061-7)

Seymour R. B., Kauffman G. B., 1992. Polyurethanes: A Class of Modern Versatile Materials. *Journal of Chemical Education*. 69(11).

Shen M., Song B., Zeng G., Zhang Y., Huang W., Wen X., Tang W., 2020. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution*. 263. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114469>

Schmidt J., Wei R., Oeser T., Silva L. A. D. e. S., Breite D., Schulze A., Zimmermann W., 2017. Degradation of polyester polyurethane by bacterial polyester hydrolases. *Polymers*. 9(2), 65. <https://doi.org/10.3390/polym9020065>

Smith S. B., 1988. US4748192. *United States Patent*.

Skleničková K., Abbrent S., Halecký M., Kočí V., Beneš H., 2020. Biodegradability and ecotoxicity of polyurethane foams: A review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. <https://doi.org/10.1080/10643389.2020.1818496>

Skleničková K., Pečenka M., Říhová Ambrožová J., Abbrent S., Vlčková V., Beneš H., Halecký M., 2021b. Influence of biodegradable polyurethane foam on biocoenosis and sludge activity in reactors simulating low-load wastewater treatments. *Journal of Water Process Engineering*. 44, 102455. <https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102455>

Skleničková K., Vlčková V., Abbrent S., Bujok S., Paruzel A., Kanizsová L., Trhlíková O., Říhová Ambrožová J., Halecký M., Beneš H., 2021a. Open-Cell Aliphatic Polyurethane Foams with High Content of Polysaccharides: Structure, Degradation, and Ecotoxicity. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*. 9(17), 6023-6032. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.1c01173>

Szpiżyk M., Lubczak R., Lubczak J., 2021. The biodegradable cellulose-derived polyol and polyurethane foam. *Polymer Testing*. 100. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2021.107250>

Stránská Š., 2019. Využití analýzy fosfolipidových mastných kyselin při studiu biosušení. *Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Ústav pro životní prostředí.*

Šantrůčková H., Malý S., Cienčila E., 2015. Povodně a sucho – krajina jako základ řešení 2. Organická hmota a vodní retenční kapacita půd. *Živa*. 2, 2015. Dostupné z: <https://ziva.avcr.cz/files/ziva/pdf/povodne-a-sucho-krajina-jako-zaklad-reseni-2-organ.pdf>

Šnajdr J., Cajthaml T., Valášková V., Merhautová V., Petránková M., Spetz P., Leppänen K., Baldrian P., 2011. Transformation of *Quercus petraea* litter: Successive changes in litter chemistry are reflected in differential enzyme activity and changes in the microbial community composition. *FEMS Microbiology Ecology*. 75(2), 291–303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00999.x>

Šnajdr J., Valášková V., Merhautová V., Herinková J., Cajthaml T., Baldrian P., 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. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2008.01.015>

Tai N. L., Adhikari R., Shanks R., Adhikari B., 2019. Aerobic biodegradation of starch-polyurethane flexible films under soil burial condition: Changes in physical structure and chemical composition. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 145. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104793>

ThermoFisher Scientific, 2021. Dibutyltin dilaurate – safety data sheets. Dostupné z: <https://www.fishersci.com/store/msds?partNumber=AC382690050&productDescription=DIBUTYL TIN+DILAUROATE%2C+94+5GR&vendorId=VN00032119&countryCode=US&language=en>

Tlustoš P., Száková J., Šichorová K., Pavlíková D., Balík J., n/a. Rizika kovů v půdě v agroekosystémech v ČR. *Vědecký výbor fytoosanitární a životního prostředí*. Dostupné z: http://www.phytoosanitary.org/projekty/2007/VVF_08_2007.pdf

Tornberg K., Baath E., Olsson S., 2003. Fungal growth and effects of different wood decomposing fungi on the indigenous bacterial community of polluted and unpolluted soils. *Biology and Fertility of Soils*. 37, 190-197.

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

Trhlíková O., Vlčková V., Abbrent S., Valešová K., Kanizsová L., Skleničková K., Paruzel A., Bujok S., Walterová Z., Innemanová P., Halecký M., Beneš H., 2021. Microbial and abiotic degradation of

fully aliphatic polyurethane foam suitable for biotechnologies. *Polymer Degradation and Stability*. 194, 109764. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2021.109764>

UNEP (United Nations Environment Programme), 2018. Single-use plastics: A Roadmap for Sustainability. *Rev. ed., pp. vi; 6.* Dostupné z: https://wedocs.unep.org/bitstream/handle/20.500.11822/25496/singleUsePlastic_sustainability.pdf

Urbanczyk H., Ast J. C., Higgins M. J., Carson J., Dunlap P. V., 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 57, 2823-2829.

Urgun-Demirtas M., Singh D., Pagilla K., 2007. Laboratory investigation of biodegradability of a polyurethane foam under anaerobic conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 92(8), 1599-1610. <https://doi.org/10.1016/j.polymdegradstab.2007.04.013>

Vojtová L., Vávrová M., Bebnařík K., Šucman E., David J., Jančář J., 2007. Preparation and ecotoxicity assessment of new biodegradable polyurethane foams. *Journal of Environmental Science and Health*. 42, 677-683. <https://doi.org/10.1080/10934520701244482>

Wang H. J., Rong M. Z., Zhang M. Q., Hu J., Chen H. W., Czigány T., 2008. Biodegradable foam plastics based on castor oil. *Biomacromolecules*. 9(2), 615-623. <https://doi.org/10.1021/bm7009152>

Wallander H., Ekblad A., Godbold D. L., Johnson D., Bahr A., Baldrian P., Björk R. G., Kieliszewska-Rokicka B., Kjøller R., Kraigher H., Plassard C., Rudawska M., 2013. Evaluation of methods to estimate production, biomass and turnover of ectomycorrhizal mycelium in forests soils – A review. *Soil Biology and Biochemistry*. 57, 1034-1047. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2012.08.027>

Watzinger A., 2015. Microbial phospholipid biomarkers and stable isotope methods help reveal soil functions. *Soil Biology and Biochemistry*. 86, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2015.03.019>

Wei R., Tiso T., Bertling J., O'Connor K., Blank L. M., Bornscheuer U. T., 2020. Possibilities and limitations of biotechnological plastic degradation and recycling. *Nature Catalysis*. 3, 867-871. <https://doi.org/10.1038/s41929-020-00521-w>

Wierckx N., Prieto M. A., Pomposiello P., de Lorenzo V., O'Connor K., Blank L. M., 2015. Plastic waste as a novel substrate for industrial biotechnology. *Microbial Biotechnology*. 8(6), 900-903. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12312>

de Wilde B., 2013. Biodegradation Testing Protocols. In: Degradable Polymers and Materials: Principles and Practice. *ACS Publications*.

Zalasiewicz J., Waters C. N., Ivar do Sul J. A., Corcoran P. L., Barnosky A. D., Cearreta A., Edgeworth M., Gałuszka A., Jeandel C., Leinfelder R., McNeill J. R., Steffen W., Summerhayes C., Wagreich M., Williams M., Wolfe A. P., Yonan, Y., 2016. The geological cycle of plastics and their use as a stratigraphic indicator of the Anthropocene. *Anthropocene*. 13, 4-17. <https://doi.org/10.1016/J.ANCENE.2016.01.002>

van der Zee M., 2005. Biodegradation of polymers – Mechanisms and evaluation methods. In: Handbook of Biodegradable Polymers (Bastioli C., 2005). *Rapra Technology Limited*.

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

Zelles L., Bai Q.Y., Beck T., Beese F., 1992. Signature fatty-acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 24, 317-323.

8 Přílohy

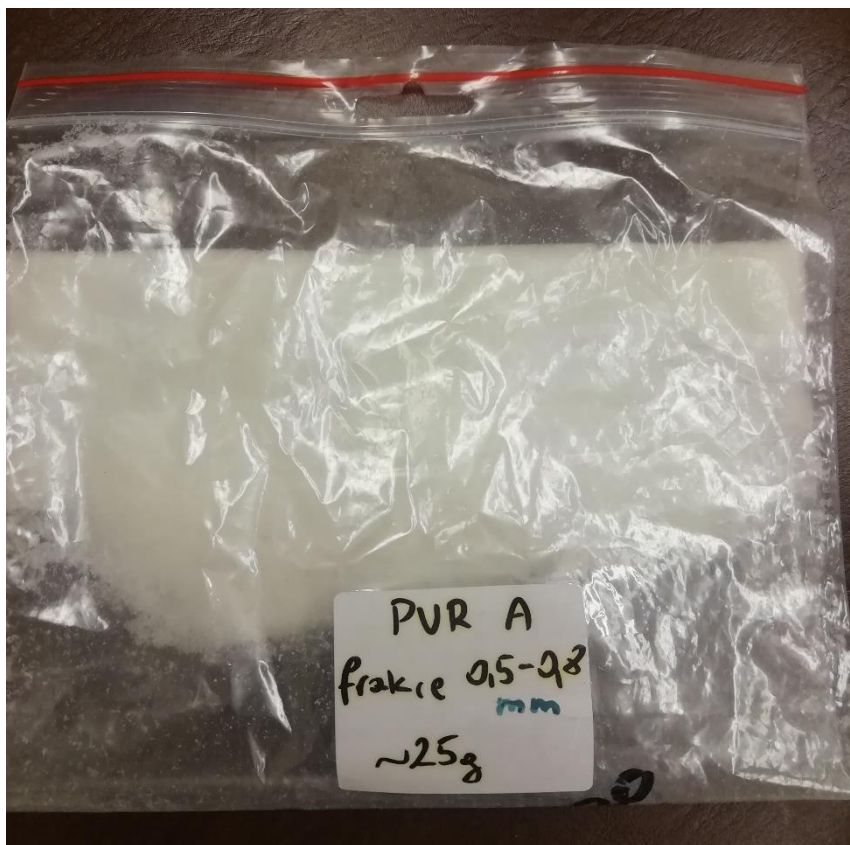
Seznam příloh:

Příloha 1. Vzhled PUR pěny namleté na frakci 0,5-0,8 mm.

Příloha 2. Vzhled pokusu dlouhodobé biodegradace v termoboxu.

Příloha 3. Vyskytnuvší se plíseň po prvních dnech dlouhodobé biodegradace v nádobách s pozitivní kontrolou (celulóza).

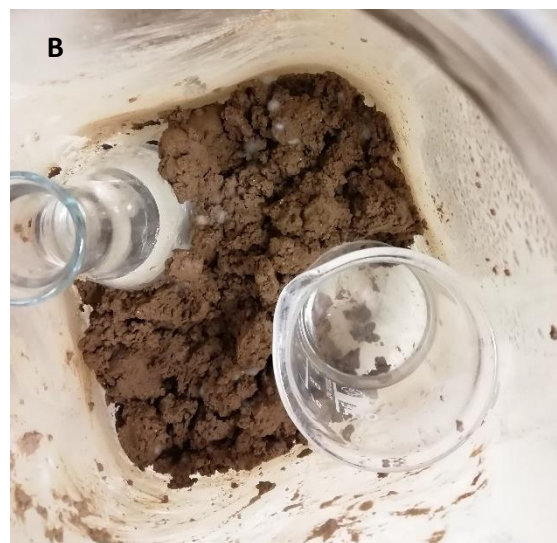
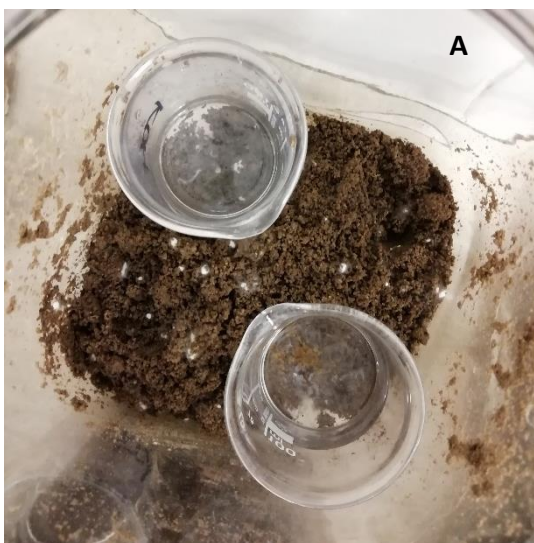
Příloha 4. Vzhled zkráceného testu biodegradace se standardizovanou půdou.



Příloha 1. Vzhled PUR pěny namleté na frakci 0,5-0,8 mm.



Příloha 2. Vzhled pokusu dlouhodobé biodegradace v termoboxu.



Příloha 3. Vyskytnuvší se plíseň po prvních dnech dlouhodobé biodegradace v nádobách s pozitivní kontrolou (celulóza) v přírodní (fotografie A) a ve standardizované půdě (fotografie B).



Příloha 4. Vzhled zkráceného testu biodegradace se standardizovanou půdou.