

Vliv aditiv na biodegradaci PLA ve vodném prostředí

Bc. Eva Moudrá

Diplomová práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Moudrá**
Osobní číslo: **T19398**
Studijní program: **N0712A030001 Environmentální inženýrství**
Studijní obor: **Environmentální inženýrství**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Vliv aditiv na biodegradaci PLA ve vodném prostředí**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma se zaměřením na biodegradaci kyseliny polymléčné (PLA) v aerobním vodném prostředí.
2. V experimentální části proveďte testy biologické rozložitelnosti PLA ve vodném prostředí.
3. Naměřená a vypočtená data zpracujte a dosažené výsledky kriticky zhodnotte.

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

Seznam doporučené literatury:

1. Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.
2. Chemické listy: Chemical Papers (Prague). Praha: Průmyslové vydavatelství, 1951-. ISSN 0009-2770. 1x měsíčně.
3. Vodní hospodářství: Water management : Voda – ovzduší – půda – odpady. Praha: Vodní hospodářství, 1951-. ISSN 1211-0760. 1x měsíčně.
4. Pitter P., Chudoba J.: Biodegradability of organic substance in the aquatic environment, 1990, USA, ISBN 0-8493-5131-6.

Vedoucí diplomové práce: **doc. Ing. Markéta Julinová, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání diplomové práce: **14. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 12. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Kyselina polyléčná (PLA) je polymerní materiál, který v současné době hraje klíčovou roli při budování udržitelné bioekonomiky. Znalost biologické degradace PLA je zásadní pro zpracování plastových odpadů a zmírnění vážné energetické krize. V diplomové práci je shrnuta problematika a mechanismy týkající se biodegradabilních polymerů, také uvedena normovaná metoda stanovení biologické rozložitelnosti neplovoucích plastových materiálů v mořské sedimentární oblasti a zmíněny další existující metody stanovení biologické rozložitelnosti polymerních materiálů v různém prostředí. K charakterizaci PLA vzorků z hlediska jejich biologického rozkladu ve vodném aerobním prostředí byla použita zkušební metoda dle mezinárodní normy ISO 19679 a aplikovaná na říční sedimentární oblast. Nejprve byla provedena volba vhodného zkušebního média a následně proběhla optimalizace jeho dávkování pomocí screeningových testů. Zkušební sestava slepého stanovení byla spuštěna s normovaným objemovým poměrem voda : sediment mezi 3 : 1 až 5 : 1. Na základě zvoleného objemového poměru zkušebního média 5 : 1, který se prokázal jako nejvhodnější, byla určena testovací hmotnost studovaných vzorků. Zkušební i referenční materiály byly testovány o hmotnosti 20 mg na 102 ml říční vody a sedimentu. Ze získaných výsledků vyplynulo, že plnidla MAPEG a L101 měli významný vliv na biotický i abiotický rozklad testovaných PLA materiálů. Nicméně přesnost měření nebyla uspokojivá a zkouška si žádá další testy pro zlepšení metodiky.

Klíčová slova: biodegradace, kyselina polyléčná, vodné aerobní prostředí, říční sediment, biologická spotřeba kyslíku.

ABSTRACT

Polylactic acid (PLA) is a polymeric material that currently plays a key role in building a sustainable bioeconomy. Knowledge of the biological degradation of PLA is essential for the treatment of plastic waste and the mitigation of a serious energy crisis. The diploma thesis summarizes the problems and mechanisms related to biodegradable polymers, also presents a standardized method for determining the biodegradability of non-floating plastic

materials in the marine sedimentary region and mentions other existing methods for determining the biodegradability of polymeric materials in various environments. To characterize PLA samples from the point of view of their biodegradation in an aqueous aerobic environment, a test method according to the international standard ISO 19679 was used and applied to the river sedimentary area. First, a suitable test medium was selected and then its dosage was optimized using screening tests. The blank test set-up was run with a standardized water : sediment volume ratio between 3 : 1 to 5 : 1. Based on the selected test medium volume ratio of 5 : 1, which proved to be the most suitable, the test weight of the studied samples was determined. Test and reference materials were tested weighing 20 mg per 102 ml of river water and sediment. The obtained results showed that MAPEG and L101 fillers had a significant effect on the biotic and abiotic decomposition of the tested PLA materials. However, the accuracy of the measurements was not satisfactory and the test requires further tests to improve the methodology.

Key words: biodegradation, polylactic acid, aqueous aerobic environment, river sediment, biological oxygen demand.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych nejprve ráda poděkovala vedoucí diplomové práce doc. Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za její ochotu, odborné vedení a užitečné rady při zpracování.

Mé poděkování také patří Ing. Dagmar Šašinkové, za vstřícnou pomoc v laboratoři při realizaci experimentální části práce.

Na závěr děkuji svým rodičům a rodině za jejich velkou podporu a pomoc po celou dobu studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 BIODEGRADACE	13
1.1 PRŮBĚH BIODEGRADACE	13
1.2 VLIV PROSTŘEDÍ NA BIODEGRADACI	14
1.3 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI.....	14
2 BIODEGRADOVATELNÉ SYNTETICKÉ POLYMERY	16
2.1 BIODEGRADABILNÍ POLYESTERY	16
2.2 KYSELINA POLYMLÉČNÁ	16
2.3 MECHANISMY DEGRADACE PLA.....	18
2.3.1 Abiotická degradace.....	18
2.3.2 Biotická degradace	20
3 STANDARDIZOVANÉ METODY SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU	23
3.1 ZKOUŠKY BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI PLASTŮ	24
3.2 ZKOUŠKY POTENCIONÁLNÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI	26
4 MEZINÁRODNÍ NORMA ISO 19679	27
5 CÍLE PRÁCE	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	32
6 VÝROBA VZORKŮ	33
6.1 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE A JEJICH VLASTNOSTI.....	33
6.2 PROCES ZPRACOVÁNÍ	34
7 STANOVENÍ HYDROLÝZY	36
7.1 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A JEJICH PŘÍPRAVA.....	36
7.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	36
7.3 POSTUP ZKOUŠKY	36
7.4 VYHODNOCENÍ.....	38
8 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI	40
8.1 ZKUŠEBNÍ MÉDIUM - PŘÍPRAVA	40
8.2 ZKUŠEBNÍ A REFERENČNÍ MATERIÁL	41
8.3 PŘÍSTROJE A POMŮCKY.....	42
8.4 POSTUP ZKOUŠKY	42
8.4.1 Screeningová zkouška	44
8.4.2 Zkušební test	45
8.4.3 Modifikovaný Zahn-Wellens test.....	46

8.5	VÝPOČET BIOLOGICKÉHO ROZKLADU	47
9	VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST	51
9.1	STANOVENÍ HYDROLÝZY	51
9.2	STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI.....	56
9.2.1	Screeningová zkouška	57
9.2.2	Zkušební test	58
9.2.3	Modifikovaný Zahn-Wellens test.....	71
	ZÁVĚR	76
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	77
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	83
	SEZNAM OBRÁZKŮ	84
	SEZNAM TABULEK.....	87
	SEZNAM PŘÍLOH.....	88

ÚVOD

V posledních několika letech nabývá stále většího významu využívání biologicky rozložitelných plastů. Povědomí o problému s plastovým odpadem a jeho dopadu na životní prostředí, vzbudilo nový zájem o postupně se rozšiřující oblast biologicky rozložitelných materiálů, které významně nezatěžují životní prostředí.

S cílem překonat ekologické problémy spojené s plastovým odpadem, byly provedeny rozsáhlé studie biopolymerů. Za jeden z nejatraktivnějších biologicky odbouratelných materiálů, díky svému termoplastickému chování, kompatibilitě a dobré zpracovatelnosti, je považována kyselina polymléčná (PLA). Ta je slibnou alternativou běžných polymerů pro některé konkrétní aplikace. Kromě toho lze PLA plně získat z obnovitelných zdrojů. Plasty vyráběné z přírodních zdrojů vynikají schopností rozkladu v přírodě. Oproti konvenčním polymerním materiálům, mají ale zhoršené vlastnosti. Z toho důvodu vzniká potřeba je nějakým způsobem upravovat, a to zejména při jejich použití v náročnějších aplikacích. Mezi jeden ze způsobů úpravy vlastností těchto materiálů patří příprava jejich směsí.¹

Abychom pochopili, co je nezbytné pro příslušné mechanismy a biodegradaci takových materiálů, vyžaduje to porozumění interakcím mezi materiály, mikroorganismy a souvisejících biochemických změn. V přirozeném prostředí probíhá degradace PLA hydrolytickým, nebo enzymatickým štěpením esterových vazeb na nízkomolekulární oligomery a monomery, což umožňuje asimilaci mikroorganismy.² Na základě dlouhodobých studií je známo, že PLA prokazuje dobrou biologickou odbouratelnost v půdě, aktivovaném kalu nebo kompostu, ale podstatně méně zpráv máme o biologické odbouratelnosti PLA v řekách nebo moři. Pro-aerobní biodegradaci plastových materiálů na rozhraní mořské vody a sedimentu, existuje normovaný postup v podobě metody ISO 19679. Objasnění mechanismu biologického odbourávání, vede ke snížení dopadu plastového odpadu na oceány.³ Avšak je třeba vzít v úvahu, že jedním z významných zdrojů výskytu těchto materiálů v mořích jsou řeky, a pro říční prostředí normované stanovení biologického rozkladu na rozhraní vody a sedimentu neexistuje. Z tohoto důvodu byla zmíněná ISO norma modifikována a aplikovaná k posouzení biologické rozložitelnosti čistého PLA a dalších šesti směsí PLA s různou koncentrací aditiv v říční sedimentární oblasti, dle stanovení biologické spotřeby kyslíku (BSK).

I. TEORETICKÁ ČÁST

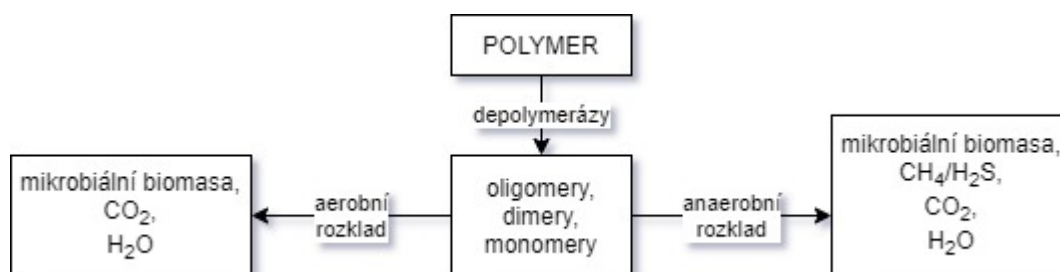
1 BIODEGRADACE

Proces biodegradace umožňuje biologické odbourávání organických látek. K přeměně materiálu v menší komplex produktů dochází pomocí enzymatického působení živých mikroorganismů.⁴ Mikroorganismy rozkladem materiálu získávají některé biogenní prvky, které jim slouží jako zdroj energie potřebný pro svůj růst. Schopnost biologického rozkladu je ovlivňována zejména různými faktory a vlivy prostředí.⁵

1.1 Průběh biodegradace

Biodegradace probíhá ve dvou fázích. Nejdříve začíná depolymerace makromolekuly polymeru, která je postupně štěpena na oligomery, dimery a monomery pomocí extracelulárních enzymů. Během tohoto procesu dochází k sekvenčnímu štěpení na koncových monomerních jednotkách anebo ke štěpení vnitřních vazeb polymerních řetězců. Jakmile je polymer rozštěpen na dostatečně malé oligomerní fragmenty, dochází k jejich transportu do buňky a začíná druhá fáze biodegradačního procesu, a tou je mineralizace. V buňkách jsou oligomerní fragmenty postupně mineralizovány pomocí intracelulárních enzymů a dochází k jejich energetickému využití.⁴

Podmínky prostředí určují, jakým způsobem bude k degradaci docházet. V případě, je-li k dispozici kyslík, dochází k biologickému rozkladu pomocí aerobních mikroorganismů. Naproti tomu v podmínkách anoxických či anaerobních se jedná o fakultativní nebo striktní anaeroby (obrázek 1). Mnohem více energie poskytují aerobní procesy, protože kyslík je efektivnějším akceptorem elektronů než např. oxid uhličitý.⁶



Obrázek 1: Schéma procesu biodegradace.

Kompletní mineralizace nastává, když je původní polymer zcela přeměněn na plynné produkty a minerály. Jelikož je ale část uhlíku začleněna do mikrobiální biomasy a humusu, tak nastává velmi zřídka.⁴

1.2 Vliv prostředí na biodegradaci

Aktivita a přežívání mikroorganismů v prostředí je ovlivněna řadou faktorů, mezi které patří například obsah živin, dostupnost kyslíku, teplota a pH prostředí. Tyto parametry mají zásadní vliv na průběh biodegradace.⁶

Živiny

Pro růst mikroorganismů je nezbytný zdroj uhlíku a energie, ale také i jiné prvky a akceptory elektronů. Kyslík je akceptorem vodíku a elektronů pro aerobní mikroorganismy, zatímco pro anaerobní druhy to může být CO₂, nitrát, sulfát, organické sloučeniny nebo železité ionty. Některé mikroorganismy vyžadují navíc specifické růstové faktory: především aminokyseliny, také vitamíny rozpustné v tucích, vitamíny skupiny B nebo jiné organické molekuly, zejména s obsahem dusíku či fosforu. Jestliže je těchto látek v prostředí nedostatek, omezuje to růst mikroorganismů a rychlost biodegradace uhlíkaté organické látky se snižuje.⁶

Dostupnost kyslíku

Průběh biodegradace je mnohem rychlejší v aerobním prostředí, než v anaerobním. Do nevýhod anaerobní biodegradace spadá relativně dlouhá doba aklimatizace mikroorganismů k využívání určitého materiálu, také pomalý průběh transformace a možné hromadění organických produktů, které mohou být rozloženy pouze aerobně.⁶

Teplota a pH prostředí

Biodegradace obecně probíhá lépe při vyšších teplotách. Dalším parametrem ovlivňující její průběh je hodnota pH, která má vliv na rozpustnost látek v prostředí. Většina biologicky rozkladných reakcí probíhá v neutrálním prostředí, ale mohou také probíhat i v širokém rozmezí pH, zvláště tehdy, když se biologického rozkladu účastní více druhů mikroorganismů.⁶

1.3 Faktory ovlivňující biodegradaci

Mechanismus biologického rozkladu je mimo environmentální faktory také úzce ovlivňován chemickými a fyzikálními vlastnostmi daného materiálu. Při biodegradčních procesech záleží nejen na molekulové hmotnosti polymeru, ale i na dalších důležitých faktorech, jako je jeho konfigurace, krystalinita, pohyblivost polymerních řetězců, specifický povrch i vlastnosti různých přísad, využívaných při výrobě materiálů a další.⁶

Molekulová hmotnost, konfigurace řetězce

Biodegradabilita makromolekuly závisí na její velikosti a větvení polymerního řetězce. Zvýšením molekulové hmotnosti biologický rozklad klesá. Lineární polymery bývají ve většině případů více náchylnější k mikroorganismům než ty rozvětvené, protože enzymy působí specificky vůči chemické struktuře a konfiguraci řetězce. U makromolekul, které jsou tvořeny opakujícími se jednotkami monomerů, probíhá rozklad od konce polymeru postupně po řetězci. Produkty degradace jsou poté tvořeny odštěpenými nízkomolekulárními fragmenty.⁷

Krystalinita a pohyblivost polymerních řetězců

Kontrolním faktorem pro biodegradaci polymerů je pohyblivost neboli mobilita jejich řetězců. Jedná se o specifickou schopnost segmentů řetězce dočasně uniknout na určitou vzdálenost od „začleněného krystalu“. Pohyblivost řetězců také úzce souvisí s krystalinitou. Z toho vyplývá, že řetězce polymerů jsou vysoce mobilní v amorfních částech polymeru, kde enzymová degradace probíhá rychleji než v oblastech krystalických. Struktury krystalických částí polymeru oproti amorfním, zabraňují v prostupu O_2 a H_2O , čímž omezují průběh rozkladu.⁷

Specifický povrch

Pro biodegradabilní polymery jsou specifické dva různé erozní mechanismy. Rozlišujeme povrchovou a také celkovou neboli homogenní erozi. Při povrchové erozi polymerů je v důsledku špatného pronikání vody do polymeru narušena pouze jeho povrchová struktura. Během celkové eroze jsou degradovány části v celém průřezu polymeru, jelikož je umožněno snadnější pronikání vody do polymeru.⁸

Aditiva

Zásadní vliv na biodegradaci materiálů mohou mít aditiva a modifikátory (např. změkčovadla, plnidla, pigmenty, aj.). Používáním těchto přísad dochází ke zlepšení mechanických i fyzikálních vlastností polymerních materiálů. V současné době je vývoj vysoce účinných aditiv rozšiřován o nové požadavky na zpracování, podmínky použití a také jsou více řešeny otázky týkající dopadu odpadních polymerních materiálů na životní prostředí. Hlavním účelem avšak stále zůstává zachování požadovaných polymerních vlastností.⁹

2 BIODEGRADOVATELNÉ SYNTETICKÉ POLYMERY

Odpadní plasty se stávají velkou zátěží pro životní prostředí, tudíž se někteří výrobci snaží přijít s novými výrobními technologiemi polymerních materiálů, které by byly méně zatěžující pro prostředí. V environmentu pak takové materiály podléhají biologické rozložitelnosti a řadíme je mezi biodegradabilní polymery.⁵ Mohou to být polymerní materiály vyráběné čistě z biomasy, nebo modifikované syntetické polymery u kterých se při jejich výrobě přimíchávají různá aditiva (např. prooxidanty), jež konečnému materiálu zajišťují biologickou rozložitelnost, které by samotný polymer nebyl schopen dosáhnout.¹⁰

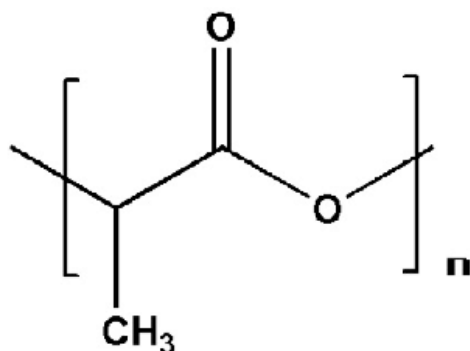
Charakteristickou vlastností biodegradabilních polymerů je jejich schopnost podléhat rozkladu vlivem mikroorganismů v daných podmínkách aerobního nebo anaerobního prostředí, jako je např. půda, odpadní voda, kompost nebo sediment. Materiály, které jsou rozloženy pouze částečně, nebo se rozloží jen jejich aditivum, nelze označit za biodegradabilní. Nároky na ekologicky šetrné nakládání s odpadem obalových materiálů neustále narůstají, proto i spotřeba biologicky rozložitelných polymerů v posledních letech výrazně narůstá.⁵

2.1 Biodegradabilní polyestery

Do skupiny polyesterů patří všechny polymery obsahující esterové vazby v hlavním polymerním řetězci. Tyto vazby jsou spojovány strukturními jednotkami, jejichž chemické složení se může značně lišit. Polyestery se tak stávají rozmanitou skupinou, která zahrnuje vše od nestálých biomedicínských maticí až po tekuté krystaly, vlákna a tepelně odolné materiály. Řadíme je mezi odbouratelné polymery, jelikož esterové vazby jsou hydrolyticky štěpitelné. V praxi podléhají degradaci jen alifatické polyestery s relativně krátkými methylovými segmenty mezi esterovými vazbami. Při štěpení řetězce dochází ke vzniku koncových karboxylových skupin, které následně zvyšují rychlost další hydrolyzy, díky jejich kyselému charakteru.¹¹

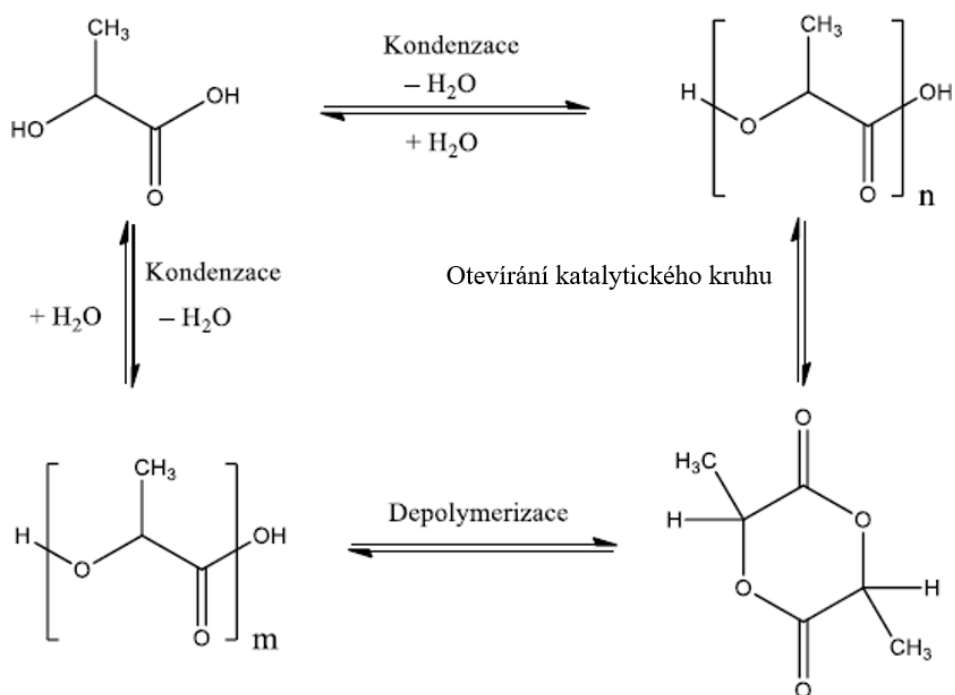
2.2 Kyselina polymléčná

V současné době patří kyselina polymléčná (obrázek 2) mezi perspektivní biologicky rozložitelné polymery (biopolymery) s velkým potenciálem vývoje do budoucna. Tento alifatický polyester má výborné fyzikální a mechanické vlastnosti, proto je velice snadno srovnatelný s komoditními polymery na bázi ropy. Avšak na rozdíl od těchto polymerů se PLA vyjímá svou výrobou z obnovitelných zdrojů a schopností se biologicky rozkládat. Svými přínosnými vlastnostmi tak postupně nahrazuje klasické polymery v celé škále aplikací.¹²

Obrázek 2: Strukturální vzorec PLA.¹³

Možnosti syntézy PLA

Monomerem PLA je kyselina mléčná, kterou lze získat z obnovitelných zdrojů, fermentací glukózy a glykogenu. Díky asymetrickému atomu uhlíku má kyselina mléčná dvě opticky aktivní formy, ze kterých lze PLA nejčastěji syntetizovat dvěma hlavními způsoby (obrázek 3).¹ Syntézu lze provést přímou polykondenzací kyseliny mléčné, při které vzniká produkt kyseliny polymléčné, nebo je zahájena polymerace otevíráním kruhu laktidu, kde je cyklický diester kyseliny mléčné polymerován na polylaktid. Získané produkty, tzn. kyselina polymléčná a polylaktid, jsou chemicky identické. Označují se jednotnou zkratkou PLA.¹²

Obrázek 3: Způsoby syntézy PLA.¹⁴

Aplikace PLA

Dříve byla aplikace PLA, pro její vysoké výrobní náklady a relativně nízkou molekulovou hmotnost, omezena zejména na biomedicínský sektor. Postupně se ale objevují nové techniky, které nám umožňují ekonomickou výrobu vysokomolekulární PLA s relativně dobrými mechanickými, tepelnými a zpracovatelskými vlastnostmi, které přinesli větší rozmanitost ve využívání PLA.¹⁵ Na základě těchto vlastností, vykazuje zmíněný biopolymer obrovský potenciál pro aplikace v mnoha oblastech. V současné době se velmi používá k výrobě biologicky rozložitelných vláken, plastů a lékařských materiálů, které lze zpracovat až na následné široké spektrum produktů, jako jsou např. zemědělské fólie, obalové materiály, oděvy a biomedicínské pomocné prostředky.¹ Omezující nevýhodou pro jejich využívání je vyšší cena v porovnání např. s polyetyleny. S cílem snížit náklady na materiál, byly navrženy směsi polyesterů a plniv. Nejčastěji používána plnidla jsou odvozena od rozšířených přírodních materiálů, jako je např. škrob, který snižuje hydrofobicitu, zlepšuje termické vlastnosti a zvyšuje propustnost pro vodu a plyny ve směsi s PLA. Často využívanými anorganickými aditivy pro PLA jsou silikáty nebo uhličitan vápenatý, které zlepšují její fyzikální a mechanické vlastnosti a zvyšují rychlost biodegradace.⁹

2.3 Mechanismy degradace PLA

Degradaci polymeru můžeme charakterizovat jako proces vyvolávající změny ve vlastnostech materiálu v důsledku chemických, fyzikálních nebo biologických reakcí, které vedou ke štěpení vazby a k následným chemickým transformacím. Z toho vyplývá, že vyvolávají změny ve vlastnostech polymeru v důsledku biotických a / nebo abiotických procesů. Takové změny zahrnují štěpení vazby, chemickou transformaci a tvorbu nových funkčních skupin.²

2.3.1 Abiotická degradace

Abiotická degradace polymerů je způsobena změnou fyzikálních nebo chemických vlastností, které vznikají v důsledku působení abiotických faktorů, jako je světlo, teplota, voda, vzduch a mechanické síly. Dělíme ji na foto, termickou, mechanickou a chemickou degradaci.¹⁶

Fotodegradace

Fotodegradace je proces vyvolávající rozklad polymerů vlivem reakcí zprostředkovaných volnými radikály iniciovaných slunečním zářením. Fotodegradovaný materiál obvykle podléhá vysokoenergetickému ultrafialovému (UV) záření UV- B a středně energetickému UV- A záření.¹⁶

V biodegradabilních polyesterech jsou fotosenzitivní karbonylové skupiny, které způsobují citlivost k fotodegradaci. Může tím dojít k náhodnému štěpení hlavních polymerních řetězců a jejich zpřístupnění molekulám vody i mikroorganismům. To vede až ke ztrátě mechanických vlastností daného polyesteru.¹⁶ Bylo prokázáno, že fotodegradace čisté PLA probíhá prostřednictvím určitého mechanismu, který vysvětluje štěpení řetězce poklesem molekulových hmotností. Mezi další mechanismus fotodegradace patří síťování uvnitř polymeru, které je způsobené rekombinací volných radikálů. Síťování způsobí ztrátu tažnosti polymeru a ten se tak stává velmi křehkým.¹⁷ Janorkar a kol. studovali vliv UV záření na povrchové vlastnosti PLA filmů. Během 12ti hodinové doby expozice došlo ke značnému poklesu molekulové hmotnosti, ale nebyla prokázána žádná změna povrchové hydrofilnosti. V jejich práci byl PLA film po vystavení UV záření popsán za znatelně křehký.¹⁸

Tepelná degradace

Tepelnou degradaci lze charakterizovat jako rozpad polymerů v důsledku energetického vstupu vyplývajícího ze zvýšené teploty. V momentě, kdy polymer absorbuje dostatečné množství tepla k překonání energetické bariéry, mohou degradované polymerní řetězce tvořit radikály a podílet se na reakci s kyslíkem a tvorbě hydroperoxidů.¹⁶

Tepelná degradace PLA je způsobena náhodnou štěpnou reakcí hlavního řetězce, stejně jako oxidační degradací, depolymerací a transesterifikačními reakcemi. Kromě toho, tepelnou degradaci PLA zvyšují reaktivní koncové skupiny, nezreagovaný výchozí monomer, zbytkový katalyzátor a další nečistoty.¹⁹

Mechanická degradace

Při mechanické degradaci dochází k rozpadu polymerů v důsledku působení vnějších faktorů. V environmentálním prostředí jsou to např. dešťové srážky a oděr polymerů o kameny či písky způsobené vlnami. Mechanické faktory během průběhu degradace nejsou považovány za dominantní, nýbrž přispívají k ostatním abiotickým faktorům.¹⁶ Ve studii Upadhy-

yho a kol. sledovali mechanickou degradaci PLA materiálu v simulovaném mořském prostředí po dobu 30ti dnů. Při vysoké rychlosti zatěžování PLA v tahu byla ověřena dostatečná lomová odolnost materiálu a také prokázány jeho dobré mechanické vlastnosti. Ze závěrů jejich práce tak vyplývá, že testované PLA environmentální mechanické degradaci nepodléhá.²⁰

Chemická degradace - hydrolýza

Chemická degradace patří mezi první degradační krok, který způsobí otevření kostry polymeru a zpřístupnění specifických míst pro navázání enzymů. Při hydrolýze dochází k uvolňování polymerního řetězce štěpením hydrolytických vazeb.¹⁶ O charakteru chemické degradace může vypovídat i chemická struktura polymeru např. typy vazeb a reaktivita, postranní řetězce, přítomnost heteroatomů, molekulová hmotnost atp.²¹

Mezi důležitý chemický faktor ovlivňující degradaci polymerů ve vodním prostředí patří hodnota pH.¹⁶ U polyesterů probíhá hydrolýza nejlépe v bazickém prostředí, což je dáno možností nukleofilního ataku hydrolyzovaných karbonylových skupin. Z výsledků studie Junga a kol., kteří se zabývali hydrolýzou PLA vyplývá, že je polymer rychleji hydrolyzován za silných bazických podmínek (pH = 13) než silně kyselých (pH = 1), a velmi nízkou rozložitelnost vykazuje za neutrálních, středně bazických a středně kyselých podmínek.²² Další z důležitých vlastností ovlivňující hydrolytické chování polymerů je teplota prostředí. Obecně rychlost hydrolytické degradace PLA roste s teplotou. Teploty nad teplotou skelného přechodu (T_g) PLA 55 - 62 °C s vysokou relativní vlhkostí (> 60 %), zajišťují rychlý hydrolytický rozklad materiálu.¹⁵

2.3.2 Biotická degradace

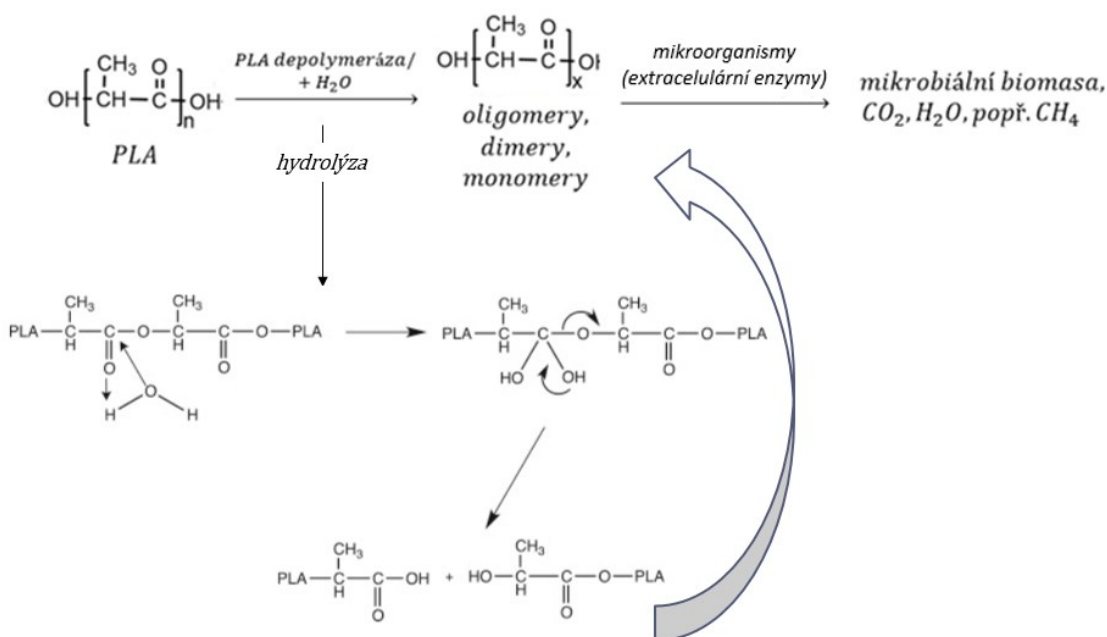
Biotická degradace představuje rozklad polymeru v důsledku působení mikroorganismů. Tomuto procesu může předcházet degradace abiotická, při které vznikají produkty s nízkou molekulovou hmotností. Povrch polymeru je poškozen a objevují se trhliny či póry, což urychluje následné biodegradační procesy. Některé polymerní materiály lze za určitých podmínek prostředí mineralizovat až na konečné produkty biologického rozkladu.¹⁶

Biochemické procesy při degradaci PLA

Biochemické procesy rozkladu PLA (obrázek 4) jsou iniciovány zejména chemickou hydrolýzou a následnou biodegradací mikroorganismy v přirozeném prostředí. Vlivem chemické hydrolýzy postupně dochází k rozkladu řetězce na oligomery s nižší molekulovou hmotností.

Při poklesu přibližně pod 10 000 g/mol se proces degradace stává závislý na přítomnosti mikroorganismů degradující PLA. Tyto mikroorganismy nejprve vylučují extracelulární depolymerázu, která napadá intramolekulární esterové vazby a dochází tak k produkci oligomerů, dimerů a monomerů. Vzniklé sloučeniny s nízkou molekulovou hmotností vstupují do mikrobiálních membrán, kde jsou pomocí extracelulárních enzymů rozloženy na, oxid uhličitý, vodu popřípadě metan v anaerobních podmínkách.¹

V životním prostředí je poločas rozpadu PLA stanoven v rozmezí šesti měsíců až dvou let v závislosti na tvaru a velikosti výrobku, molekulové hmotnosti polymeru, poměru isomerů a také na faktorech prostředí jako je pH, teplota, vlhkost, kyslík atd.¹



Obrázek 4: Schéma biochemických procesů při degradaci PLA.

Mikroorganismy degradující PLA

Při enzymatickém rozkladu polymerů, dochází k přichycení mikroorganismů na povrch materiálu a následuje kolonizace exponovaného povrchu.²³ Ve studiích zaměřených na mikrobiální enzymy potencionálně zapojených do degradace PLA byly identifikovány např. enzym serinproteáza nebo proteináza K.²¹ U následujících druhů bakterií, byl v rámci dlouhodobých studií potvrzen vliv na degradabilitu PLA: *Amycolatopsis sp.* (půda), *Amycolatopsis sp.* (půda), *Bacillus licheniformis* (půda), *Bortetella petrii* (půda) a další. Také některé houby jako jsou např. *Thermomyces lanuginosus* (půda/kompost), *Aspergillus fumigatus*

(půda/kompost), *Fennellomyces linderi* (půda), *Verticillium* sp. (kompost), *Aspergillus ustus* (kompostovatelná půda) mají vliv na rozkladné biologické procesy PLA.²⁴

Biologický rozklad PLA v různých prostředích

Rozkladné procesy polymeru a výskyt dominantních skupin mikroorganismů jsou určeny zejména podmínkami prostředí. Za účelem zkoumání biologické rozložitelnosti PLA v různém prostředí, byly provedeny rozsáhlé studie. V tabulce 1 je uveden přehled degradace PLA v kompostu, půdě a inokulu z komunální čistírny odpadních vod za různých podmínek. Z výsledků testování bylo zjištěno, že PLA při dostatečné vlhkosti a vysoké teplotě nejlépe podléhá biologickému rozkladu v kompostu, také i kvůli jeho dobré mikrobiální rozmanitosti.²⁴ V poslední době je předmětem velkého zájmu vstup plastů do mořského prostředí. Avšak v současné literatuře prozatím není mnoho informací o biologickém rozkladu PLA v tomto prostředí.²⁴

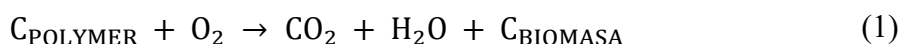
Tabulka 1: Biologická rozložitelnost PLA (fólie) v různých typech prostředí.²⁴

Typ prostředí	Podmínky	Hodnotící kritérium	Biologická odbouratelnost [%]	Doba biologické rozložitelnosti [den]
Kompost	58 °C	Produkce CO ₂	13	60
Kompost	58 °C, 70% vlhkost, pH = 8,5	Produkce CO ₂	84	58
Kompost	55 °C, 70% vlhkost	Produkce CO ₂	70	28
Půda	30% vlhkost	Ztráta hmotnosti	10	98
Půda pozn.: granulovaná forma PLA	30% vlhkost	Ztráta hmotnosti	14	28
Inokulum z komunální čistírny odpadních vod	25 °C, aerobní	Ztráta hmotnosti	39	28

3 STANDARDIZOVANÉ METODY SLEDOVÁNÍ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU

Mezinárodní organizace pro normalizaci vyvinula různé zkušební metody, pro stanovení biologické rozložitelnosti plastů. Jednotlivé ISO normy se liší s ohledem na mikrobiální oživení, koncentraci zkoušeného materiálu a dobu trvání zkoušky.²⁵ V následujících podkapitolách je uveden přehled používaných ISO norem pro sledování biologického rozkladu plastů.

Za aerobních podmínek lze biodegradační proces vyjádřit níže uvedeným zjednodušeným reakčním schématem (rovnice 1).



Podobně jako u každé chemické reakce je možné monitorovat biologickou degradaci sledováním spotřeby reaktantů nebo vzniku produktů. Mezi nejpoužívanější způsoby vyjádření biologické degradace patří metody měření spotřeby O_2 nebo množství vyvinutého CO_2 .²³

Vizuální pozorování

K popisu viditelných změn degradace polymerních materiálů, lze požit vyhodnocení stupně zdrsnění povrchu, tvorby otvorů nebo trhlin, změny barvy, defragmentace nebo tvorby biofilmů na povrchu materiálu. Tyto změny nejsou prokazatelným důkazem přítomného procesu biodegradace, avšak hodnocení parametru vizuálních změn lze použít jako první předpoklad jakéhokoli mikrobiálního zásahu.²

Mezi moderní způsoby pozorování povrchové morfologie polymerních materiálů po biologickém rozkladu patří například skenovací elektronová mikroskopie (SEM) nebo mikroskopie atomových sil. Také k vyhodnocení biologické degradace lze použít řadu technik, jako je např. infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FTIR), spektroskopie nukleární magnetické rezonance nebo diferenciální skenovací kalorimetrie.²

Měření úbytku hmotnosti

Při metodě měření je stanoven hmotnostní úbytek zkušebních polymerních materiálů např. v podobě filmů nebo tyčinek. Pro jemně rozptýlené vzorky práškových polymerů, můžeme pokles hmotnosti určit pomocí vhodné separační nebo extrakční techniky. Tato standartní

zkušební metoda je používána zejména pro simulační a terénní testy degradace, avšak ani zde není získán přímý důkaz biologického rozkladu.²

Produkce CO₂ / spotřeba O₂

Průběh aerobního biologického rozkladu lze sledovat na základě změn složení plynné fáze (obsah CO₂, O₂), které probíhají v důsledku mikrobiálních pochodů v uzavřených testovacích podmínkách. Stanovení těchto základních biologických ukazatelů je normováno standardními postupy pomocí českých i mezinárodních norem v závislosti na typu prostředí.²⁶

Dle uvedeného postupu v normách ISO 14852 a ISO 17556, lze stanovení produkovaného CO₂ sledovat kontinuálním stripováním testovacího systému vzduchem, který je zbaven vzdušného CO₂. Kde produkovaný CO₂ je unášen v proudu nosného vzduchu, pohlcen v roztoku NaOH a následně acidimetricky stanoven (vodní, půdní a kompostovací testy). Postup stanovení pro O₂ dle norem ISO 17556 a ISO 14851, spočívá ve sledování změn tlaku plynné fáze pomocí vhodného typu respirometru.²⁶

Kvůli značné pracnosti a omezené testovací kapacitě standardních postupů, jsou stále častěji využívány alternativní instrumentální metody stanovení aktuálního obsahu CO₂ a O₂, mezi které patří např. přímá analýza plynu v headspace plynovou chromatografií nebo infračervenou spektroskopií (pro vodní i půdní testy). Výhodou plynové chromatografie je, že umožňuje souběžné stanovení obsahu O₂ i CO₂.²⁶

Při sledování průběhu biorozkladu lze také využít automatizované konduktometrické metody, které spočívají ve stanovení produkovaného CO₂ v kombinaci s paralelním měřením BSK v uzavřeném respirometru (vodní i půdní test). Často jsou také využívány automatické analyzátory typu Micro-Oxymax (Columbus inst., USA) s infračervenou analýzou CO₂ a analýzou O₂ elektrochemickým nebo paramagnetickým analyzátozem.²⁶

3.1 Zkoušky biologické rozložitelnosti plastů

Mimo mezinárodní normu ISO 19679, která se zabývá stanovením aerobní biodegradace neplovoucích plastových materiálů na rozhraní mořské vody a sedimentu pomocí analýzy vyvinutého oxidu uhličitého v uzavřeném systému, můžeme proces biologické rozložitelnosti plastů sledovat v různých mikrobiálních prostředích a pomocí určitých typů testovacích metod, které jsou níže zmíněny.

ISO 18830 - Plasty – Stanovení aerobní biodegradace neplovoucích plastových materiálů na rozhraní mořské vody a sedimentu – Metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.²⁷

U zkoušky je sledován parametr BSK. Zkušební metoda simuluje přírodní stanoviště nacházející se v mořské sedimentární oblasti.²⁷

ISO 14851 - Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů ve vodném prostředí – Metoda stanovení spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru.²⁸

Za laboratorních podmínek je zkoušený materiál ve vodném prostředí vystaven inokulu z aktivovaného kalu. Metoda spočívá v měření BSK.²⁸

Zkouška je aplikovatelná na materiály, jako jsou přírodní a syntetické polymery, kopolymery nebo jejich směsi, vodou rozpustné polymery. Také na plastové materiály, které mohou obsahovat přísady (např. změkčovadla, barviva nebo jiné sloučeniny).²⁸

ISO 14852 - Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů ve vodném prostředí – Metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého.²⁹

Zkoušený materiál je za aerobních a mezofilních podmínek vystaven inokulu z aktivovaného kalu, půdy nebo zralého kompostu. Metoda je založena na měření biogenně vyvinutého oxidu uhličitého.²⁹ Za stanovených podmínek je použitelná pro stejné materiály jako v ISO 14851.

ISO 14855-2 - Stanovení konečné aerobní biologické rozložitelnosti plastů za řízených podmínek kompostování – Metoda stanovení uvolněného oxidu uhličitého – Část 2: Gravimetrické stanovení uvolněného oxidu uhličitého v laboratorním měřítku.³⁰

Zkušební metoda navrhuje úpravu vlhkosti, teploty a provzdušňování v kompostovacím zařízení pro optimální rychlost biodegradace. Zkouška je za stanovených podmínek použitelná pro stejné materiály jako v ISO 14851.³⁰

ISO 17556 - Stanovení úplné aerobní biodegradability materiálů z plastů v půdě měřením spotřeby kyslíku v respirometru nebo měřením množství uvolněného oxidu uhličitého.³¹

Metoda je speciálně navržena tak, aby poskytla optimální stupeň biodegradace úpravou vlhkosti testované půdy. Zkouška je za stanovených podmínek použitelná pro stejné materiály jako v ISO 14851.³¹

3.2 Zkoušky potenciaální biologické rozložitelnosti

ISO 9887 - Jakost vod – Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodném prostředí – Semikontinuální metoda s aktivovaným kalem (SCAS test).³²

Zkušební metoda spočívá ve stanovení konečné biologické degradace sledováním rozpuštěného organického uhlíku.³²

Metoda je aplikovatelná pro organické látky, které jsou dle podmínek zkoušky rozpustné v použitých koncentracích a výrazně se nesorbují v aktivovaném kalu a na povrchu skla. Dle zvolených koncentrací v souladu se zkouškou, nesmí daná organická látka působit inhibičně na mikroorganismy inokula.³²

ISO 9888 - Jakost vod – Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodném prostředí – Statická zkouška (Zahn-Wellensův test).³³

Zahn-Wellensův test popisuje statickou aerobní vodní zkoušku s použitím standartních podmínek. U této metody se porovnává naměřená hodnota rozpuštěného organického uhlíku na začátku zkoušky s konečnou hodnotou na jejím konci.³⁴ Normovaná metoda je za stanovených podmínek použitelná pro stejné materiály jako v ISO 14851.

4 MEZINÁRODNÍ NORMA ISO 19679

Mezinárodní norma ISO 19679 se zabývá stanovením aerobní biodegradace neplovoucích plastových materiálů na rozhraní mořské vody a sedimentu. Navrhovaná zkušební metoda spočívá v analýze vyvinutého oxidu uhličitého v uzavřeném systému. Měření aerobní biodegradace lze také získat sledováním biologické spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru podle ISO 18830.³⁵

Podstata zkoušky

Zkušební médium zahrnuje pevnou a kapalnou fázi. Pevnou fázi tvoří mořský písčité sediment a kapalnou fází je mořská voda. Zkušební materiál je umístěn na rozhraní sedimentu a vody, tak abychom simulovali podmínky pro objekt v životním prostředí, který se potopil a dosáhl dna. Tento proces probíhá v uzavřeném systému. Zkušební sestava musí zahrnovat alespoň tři biometrické láhve pro zkušební materiál, tři láhve pro slepé stanovení a tři láhve pro referenční materiál. Pro účely screeningových testů lze v každém případě použít namísto tří biometrických láhví jen dvě.³⁵

Inkubace je vedena v temnu nebo rozptýleném světle v uzavřeném termostatickém zařízení. Po dobu testování je udržována konstantní teplota v rozsahu 15 °C - 25 °C s přesností ± 2 °C. Je potřeba brát v úvahu, že data jsou získávány pro teplotu, která se může lišit od skutečných podmínek v životním prostředí.³⁵ Výsledkem zkoušky je maximální úroveň biodegradace, která se stanoví pomocí vhodné analytické metody vyvíjeného CO₂ nebo spotřebovaného O₂.

Příprava zkušebního média

V normované metodě je využíváno médium mořské vody a písčitého sedimentu. Mořskou vodu lze odebrat přírodní, nebo si ji v laboratoři připravit umělou dle normovaného postupu. Je taky možné mořskou vodu i sediment odebrat z dobře fungujícího mořského akvária. Vzorky vody a sedimentu se povrchově odebírají pomocí lopatky do uzavíratelných nádob. Během jejich transportu do laboratoře jsou udržovány při nízké teplotě (přibližně 4 °C). Lze je spotřebovat do čtyř týdnů po provedeném odběru.³⁵

V sedimentu a přírodní mořské vodě je doporučeno změřit obsah celkového organického uhlíku (TOC). Hodnota TOC v sedimentu by se měla pohybovat v rozmezí 0,1 % až 2 %.³⁵

Předkondicionační fáze

Na sediment lze aplikovat předběžnou oxidaci, aby se snížil obsah organických látek a respirace v pozadí. Sediment s vodou lze aerovat vzduchem, popřípadě je možné využít i jemného míchání (max. 20 r/min až 30 r/min).³⁵

Příprava zkušebního a referenčního materiálu

Vzorek zkušebního materiálu by měl být ideálně ve formě filmu, který je vystřižen do tvaru disku. Forma a tvar je velice důležitá, protože může ovlivnit jeho biologickou rozložitelnost, a pokud jsou porovnány různé druhy plastů, měly by se přednostně použít podobné tvary a tloušťky jednotlivých polymerních vzorků.³⁵

Disky musí mít menší průměr než biometrické láhve, aby mohly být snadno položeny na jejich dno. Koncentrace zkušebního materiálu se má pohybovat nejméně od 100 mg/l mořské vody plus sedimentu. Je doporučeno použít 150 mg až 300 mg zkušebního materiálu na litr mořské vody plus sedimentu.³⁵

Za referenční materiál je dle metody doporučeno použít bezpopelové celulózové filtry. Pokud je to možné, měla by být jejich forma, hmotnost a velikost srovnatelná se zkušebním materiálem. V případě zavedení negativní kontroly lze použít biologicky nerozložitelný polymer (např. polyetylen) ve stejné formě jako zkušební materiál.³⁵

Provedení zkoušky

V typickém případě se použije biometrická láhev o objemu 250 ml, do níž se naváží 30 g mokrého sedimentu a nadávkuje 70 ml vody. Zkušební sestava by měla být spuštěna s objemovým poměrem voda : sediment mezi 3 : 1 až 5 : 1.³⁵

Platnost zkoušky

Zkoušku považujeme za platnou, jestliže:

- je stupeň biodegradace u referenčního materiálu větší než 60 % po 180 dnech;
- uvolněný CO₂ u slepého stanovení nepřesahuje 3,5 mg CO₂ na gram mokrého sedimentu po 6 měsících;
- množství vyvinutého CO₂ ze tří slepých stanovení je na konci zkoušky v průměrném rozmezí do 20 %;

- rozdíl mezi procentuální biodegradací referenčního materiálu v jednotlivých biome-
trických láhvích je na konci zkoušky v průměru menší než 20 %.³⁵

Výše zmíněná zkušební metoda se řídí stejným principem pro měření biodegradace jako normovaná zkušební metoda ISO 17556, která popisuje stanovení biodegradace plastů v půdě. Tato metoda doporučuje větší baňky do objemu 4 l a také vyšší hmotnost testovaných materiálů až do 2000 mg. Půda je navíc porézní médium, které v porovnání s vodou umožňuje snadnější difúzi kyslíku. Proto je zřejmé, že ISO 19679 ukládá zkušební metodě určitá omezení, která mohou snížit účinnost a přesnost měření. Z tohoto důvodu ve studii Brissoulise a kol.³⁶, kteří sledovali aerobní biodegradaci plastů v mořském sedimentárním prostředí pomocí analýzy vyvinutého oxidu uhličitého, byly navrženy změny metody v použití větších bioreaktorů i vyšších hmotností vzorků. Testování spustili s bioreaktory o objemu 4 l, které obsahovaly 170 g mokrého sedimentu a 400 ml přírodní mořské vody. Hmotnost zkušebních materiálů byla zvolena tak, aby v každém bioreaktoru bylo zastoupení 300 mg organického uhlíku ve vzorku.³⁶

Jejich první experiment byl proveden bez míchání vodní hladiny, tak jak je uvedeno v normě. Výsledky zkoušky ukázaly, že testované materiály byly biologicky odbourány různými rychlostmi, avšak jejich přesnost měření nebyla uspokojivá. Naměřená data vykazovala vysokou variabilitu, která vyplynula z velkých intervalů spolehlivosti pozorovaných ve fázi plató. Zkouška pro tento experiment nesplnila kritéria doporučených normou ISO 19679, protože měřený stupeň biodegradace referenčního materiálu nepřesáhl po půl roce 60 % a rozdíl mezi procentuální biodegradací tohoto materiálu ve třech bioreaktorech překročil na konci zkoušky 20 %.³⁶

Aby Brissoulis a kol. předešli vzniklým problémům z prvního experimentu, zavedli ve druhém experimentu míchání vodní hladiny speciálně navrženými plovoucími magnetickými míchadly tak, aby nedošlo k narušení vrstvy sedimentu. Míchání mělo simulovat pohyb mořské vody a zvýšit tak přenos kyslíku do sedimentu. Test prokázal značné zlepšení přesnosti metody, protože byla snížena variabilita výsledků a zlepšena reprodukovatelnost dat. Také byl dosažen 90% stupeň biodegradace u referenčního materiálu za 200 dní. Bylo tak prokázáno, že míchání vodní hladiny během zkoušky usnadňuje přenos kyslíku na rozhraní voda/sediment, a že navrhované změny zlepšují přesnost a reprodukovatelnost stanovení.³⁶

Poměrně nedávno vyvinuté standardní zkušební metody určené k simulačnímu chování biodegradace plastů v mořském prostředí jsou mimo ISO 19679 a ISO 18830 (sublitorální

zóna), dostupné ještě další dvě normy určené pro jiné typy mořského prostředí. Norma ISO 22404 určuje biodegradaci v písčitém sedimentu (přílivová zóna) a metoda ASTM-D6691 stanovuje biodegradaci ve sloupci mořské vody (pelagická zóna). Tyto normy používají podobné měřicí techniky se zkušebními metodami, které jsou určeny pro stanovení biodegradace plastů nejen v půdě (ISO 17556) ale i ve sladké vodě (ISO 14852). Ale vzhledem k absenci standardizovaných podmínek pro aerobní hodnocení biodegradace v říční sedimentární oblasti, nejsou v dostupné literatuře zatím žádné vědecké práce, které by se zabývaly touto problematikou.³⁶

5 CÍLE PRÁCE

Mezi podstatný zdroj výskytu plastového materiálu v mořském prostředí patří říční přítoky, kterými se do moří a oceánů dostává naprostá většina tohoto materiálu. Jelikož v mezinárodních normalizačních postupech je metoda stanovení biologického rozkladu plastů charakterizována pouze pro stanovení v mořském sedimentárním prostředí, byla v rámci této práce zkušební metodika mezinárodní normy ISO 19679 aplikovaná na říční sedimentární oblast. Cílem je posoudit stanovení aerobní biodegradace neplovoucích polymerních materiálů na rozhraní říční vody a sedimentu, pomocí kvantitativní metody biologické spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Následně zvolenou metodiku otestovat na reálných vzorcích kyseliny polymléčné a dalších šesti modifikovaných směsí PLA s různým procentuálním zastoupením aditiv.

Z údajů uvedených v mezinárodní normě ISO 19679 vyplývá nutnost určit optimální objemový poměr zkušebního média v biometrické láhvi. Zároveň zvolit odpovídající hmotnost zkušebního a referenčního materiálu.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 VÝROBA VZORKŮ

6.1 Použité chemikálie a jejich vlastnosti

PLA

- kyselina polymléčná (firma: Nature works)
- $\rho = 1,21 \text{ g/cm}^3$
- $T_m = 150 - 160 \text{ }^\circ\text{C}$
- $T_g = 60 - 68 \text{ }^\circ\text{C}$
- biopolymer³⁷

MAPEG (M)

- poly (ethylenglykol) methyl ether methakrylát (firma: Sigma-Aldrich)
- chemický vzorec: $\text{H}_2\text{C}=\text{CCH}_3\text{CO}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{CH}_3$
- $M_w = 500 \text{ g/mol}$
- $\rho = 1,08 \text{ g/cm}^3$
- $T_m = 1 - 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- změkčovadlo³⁸

L101 (L)

- 2,5-dimethyl-2,5-di-(tert-butylperoxy) hexan (firma: Sigma-Aldrich)
- chemický vzorec: $\text{C}_{16}\text{H}_{34}\text{O}_4$
- $M_w = 290,44 \text{ g/mol}$
- $\rho = 0,877 \text{ g/cm}^3$
- radikálový iniciátor³⁹

TS-530 (T)

- Cab-O-Sil TS-530 (firma: Cabot)
- $\rho = 2,2 - 2,3 \text{ g/cm}^3$
- nanoplnivo - pyrogenní silika
- pyrogenní oxid křemičitý, upravený Hexamethyldisilazanem

6.2 Proces zpracování

Při přípravě jednotlivých vzorků, bylo mimo čistého PLA, namícháno také 6 modifikovaných směsí PLA s různou koncentrací aditiv. Vzorky byly připravené v přístroji Thermo Scientific HAAKE Minilab II Micro Compounder (obrázek 5). Jedná se o dvoušnekový kónický extruder se zpětným kanálem, který funguje na procesu vytlačování.

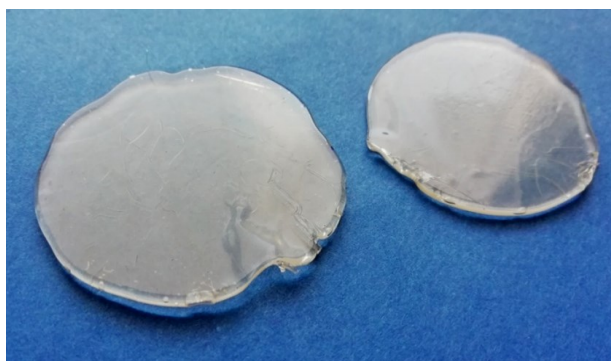


Obrázek 5: Thermo Scientific HAAKE Minilab II Micro Compounder.

Přístroj Thermo Scientific HAAKE Minilab II Micro Compounder s dusíkovým médiem byl vždy při přípravě vzorků vytemperován na teplotu 200 °C a nastaven na 100 otáček/min. Samotné dávkování komponentů proběhlo vrchním plněním pomocí vestavěné dutiny, do které byla celková navážka směsi přidána po částech. Čas plnění trval maximálně do 5ti minut a poté byla směs dalších 5 minut promíchávána uvnitř uzavřeného přístroje. Těsně před ukončením cyklu byl počet otáček dvoušnekového kónického extruderu snížen na 50/min a následně byla směs vytlačena a přemístěna do studeného lisu, který jednotlivé vzorky vylišoval do nepravidelných kulovitých tvarů (obrázek 6).

Vzorky byly dále zpracovány na přehřátém hydraulickém lise při teplotě 200 °C, kde byly lisovány do formy o rozměrech (12,5 x 12,5 x 0,01) cm. Při procesu lisování byla na spodní vyhřátou lisovací desku umístěna ochranná fólie s formou. Vzorek byl vložen do středu formy, opět překryt ochrannou fólií a vrchní lisovací deska lisu byla dotažena. Doba lisu při teplotě 200 °C byla 2,5 minuty, a poté následoval 10minutový proces chlazení v chladičím lise, kde teplota klesla na 40 °C. Pro vytvoření jedné fólie činila navážka vzorku s 30%

přebytkem 2,5 g. Takto vylisované vzorky (obrázek 7) o průměrné tloušťce 0,1 mm byly připraveny k následujícím testům abiotické a biotické degradace.



Obrázek 6: Vzorky po studeném lisování.



Obrázek 7: Vzorek vylisované fólie.

V níže uvedené tabulce 2 je detailní přehled celkem 7mi vyrobených vzorků PLA s různým procentuálním zastoupením aditiv ve směsi.

Tabulka 2: Procentuální zastoupení aditiv ve směsi s PLA vztažené na celkovou navážku.

Číslo vzorku	Název směsi	PLA [%]	M [%]	L [%]	T [%]
I	PLA	100	0	0	0
II	PLA + T 5 %	95	0	0	5
III	PLA + M 20 %	80	20	0	0
IV	PLA + M 20 % + L 0,5 %	79,5	20	0,5	0
V	PLA + M + L + T 2,5 %	77	20	0,5	2,5
VI	PLA + M + L + T 5 %	74,5	20	0,5	5
VII	PLA + M + L + T 10 %	69,5	20	0,5	10

7 STANOVENÍ HYDROLÝZY

Pro studium hydrolytického rozkladu byly použity vzorky PLA připravené dle postupu uvedeného v kapitole 6. Vzorky byly nastříhány na zkušební tělíska o rozměru cca 1x1 cm.

7.1 Chemikálie, roztoky a jejich příprava

Destilovaná voda

Pro přípravu veškerých roztoků a jednotlivých ředění byla použita destilovaná voda připravená v laboratoři pomocí zařízení Aqua osmotic 02.

Fosfátový pufr

Pro abiotickou hydrolyzu testovaných vzorků byl připraven 0,1 M fosfátový pufr. Navážka 27,205 g KH_2PO_4 byla kvantitativně převedena do odměrné láhve a doplněna destilovanou vodou do objemu 2 l. Roztok byl zneutralizován pomocí 3M roztoku NaOH na $\text{pH} = 7$. Pro potlačení mikrobiálního růstu bylo do roztoku přidáno 4,023 g NaN_3 .

7.2 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy ABJ-NM/ABS-N, Kern
- komorový termostat
- pH metr inoLab pH/ION 7, WTW
- magnetické míchadlo Heidolph
- 29 skleněných láhví ($V = 100 \text{ ml}$) Fisherbrand™
- Shimadzu TOC LCSH, Shimadzu corporation
- infračervený spektrometr Nicolet Is10, Thermo scientific
- běžné laboratorní sklo a vybavení

7.3 Postup zkoušky

Do všech skleněných láhví o objemu 100 ml bylo dávkováno po 50 ml fosfátového pufru připraveného dle kapitoly 7.1. Nastříhané fólie testovaných materiálů po hmotnosti cca 50 mg (tabulka 3), byly od každého vzorku vloženy do čtyř láhví. Inkubace nachystané

zkušební sestavy (obrázek 8) proběhla v komorovém termostatu s vytemperovanou teplotou na 25 °C.

Tabulka 3: Test hydrolýzy - hmotnost testovaných materiálů ve skleněných láhvích.

Vzorek	Číslo láhve	Hmotnost vzorku [mg]	Vzorek	Číslo měření	Hmotnost vzorku [mg]
PLA	1	56,13	PLA + T 5 %	1	51,10
	2	47,68		2	48,52
	3	49,50		3	48,80
	4	52,21		4	50,23
PLA + M 20 %	1	50,01	PLA + M 20 % + L 0,5%	1	54,01
	2	50,67		2	50,22
	3	53,08		3	53,66
	4	53,64		4	51,12
PLA + M + L + T 2,5%	1	49,97	PLA + M + L + T 5%	1	55,09
	2	50,47		2	54,69
	3	53,88		3	53,49
	4	53,20		4	50,10
PLA + M + L + T 10%	1	50,53	FOSFÁTOVÝ PUFŘ	1	-
	2	53,99			
	3	52,65			
	4	51,21			

Přibližně v dvouměsíčních časových intervalech, bylo vždy z prvních tří skleněných lahví od každého vzorku, odebráno po 7 ml kapalného vzorku. Pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC LCSH byl v kapalně fázi stanoven obsah celkového uhlíku (TC). Po každém odběru kapalných vzorků bylo stejné množství (7 ml) připraveného fosfátového pufru pipetováno zpět do skleněných lahví, aby byl po celou dobu stanovení udržen objem 50 ml v každé láhvi. Vzniklý faktor ředění byl následně zohledněn ve výpočtech stupně hydrolýzy (DH). Během analýzy byl také sledován obsah TC ve fosfátovém pufru, který byl taktéž zohledněn ve výpočtech DH.

Souběžně byl po prvním měsíci testu z každé čtvrté láhve odebrán vzorek fólie pro vizuální pozorování a záznam změn ve struktuře zkoušených vzorků pomocí FTIR. Druhý odběr pevného vzorku byl proveden s tříměsíčním odstupem od prvního odběru a třetí odběr až s čtyřměsíčním odstupem od odběru druhého. Test hydrolýzy byl ukončen po 8mi měsících a stanoven hmotnostní úbytek zkušebních materiálů z prvních třech skleněných lahví.



Obrázek 8: Test hydrolyzy - zkušební sestava.

Stanovení TC

Na základě výsledků v pracích Michaely Bartuňkové a Radima Holinky,^{40,41} kteří sledovali hydrolytický rozklad PLA materiálu na ústavě inženýrství ochrany životního prostředí ve Zlíně, bylo učiněno rozhodnutí, že v odebraných kapalných vzorcích bude stanoven jen TC namísto celkového stanovení TOC, protože naměřené hodnoty anorganického uhlíku v kapalném vzorku byly na úrovni hodnot destilované vody a pohybovaly se okolo 0,5 mg/l. Kvůli tomuto usnesení nedocházelo během stanovení TC k velké spotřebě kapalného vzorku ve srovnání s celkovou analýzou TOC a v průběhu testu tak nevznikaly velké objemové změny.

TC vyjadřuje celkové množství uhlíku obsaženého v testovaném vodném vzorku. Během jeho stanovení dochází ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem o teplotě 680 °C v proudu kyslíku k oxidaci veškerého uhlíku obsaženého v kapalném vzorku. Vzniklý CO₂, který vzniká po oxidaci, je veden na infračervený detektor, kde absorpcí záření vhodné vlnové délky vzniká signál ve formě píku. Zaznamenaná plocha píku je přímo úměrná koncentraci TC v testovaném vzorku.⁴²

7.4 Vyhodnocení

Na základě parametru ukazující množství organických látek přítomných v daném kapalném vzorku, byl stanoven stupeň hydrolyzy pomocí následující rovnice 2.

$$DH = \frac{c_{TC} \cdot V}{m_{fólie} \cdot w_C} \cdot 100 \quad (2)$$

Kde:

DH	stupeň hydrolýzy [%];
c_{TC}	koncentrace TC obsaženého v kapalně fázi po hydrolýze [mg/l];
V	celkový objem kapalně fáze ve skleněné láhvi (tj. 50 ml) [l];
$m_{fólie}$	hmotnost vzorku polyesteru použitého při hydrolýze [mg];
w_C	procentuální zastoupení uhlíku ve zkušebních materiálech [%].

8 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI

8.1 Zkušební médium - příprava

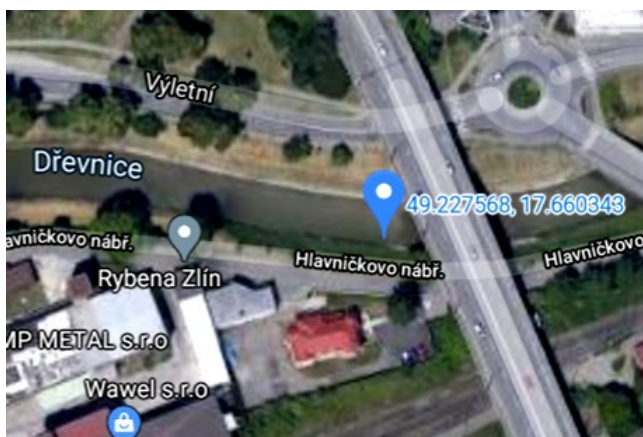
Říční voda a sediment

Vzorky říční vody byly odebírány přímo do plastové uzavíratelné nádoby z těsné hloubky nad sedimentem. Vzhledem k tomu, že v normě není blíže specifikována hloubka pro odběr sedimentu, byla pomocí lopatky odebrána horní vrstva. Odběr byl proveden cca 2 cm do hloubky a převeden do skleněné odběrové nádoby. Zkušební médium (říční voda/sediment) bylo během přepravy do laboratoře udržováno v nízkých teplotách a vždy v tentýž, nebo následující den po odebrání zpracováno dle doporučení uvedeném v normě. Před samotným testováním bylo přibližně 24 hodin provzdušňováno vzduchem.

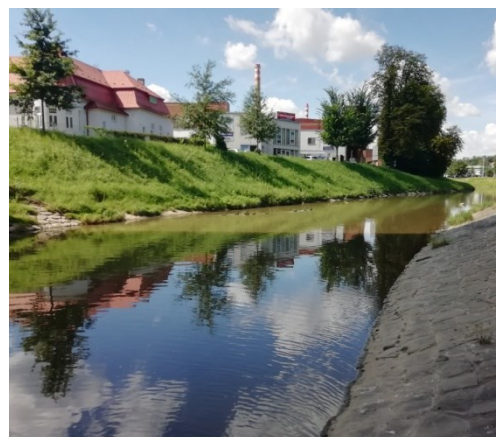
Po aeraci byla říční voda oddělena od sedimentu prostřednictvím sedimentační metody. Následně byla ze sedimentu odstraněna přebytečná voda pomocí filtračního papíru stočeného do hrubého trychtýře. Po ukončení filtrace, byl sediment připraven k testování jako tzv. mokrá sediment.

Odběrová místa

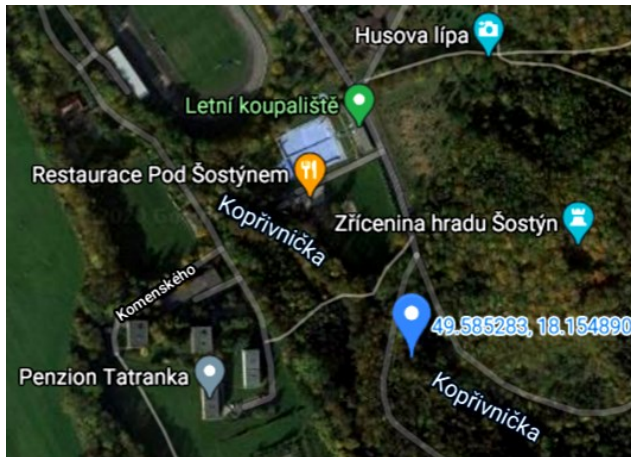
Odběry biologického materiálu byly provedeny na třech místech. První se uskutečnil z řeky Dřevnice ve Zlíně (obrázky 9 a 10), druhý u pramene řeky Kopřivničky v Kopřivnici (obrázky 11 a 12) a poslední, třetí odběr, byl odebrán níže od druhého odběru; přibližně 1 km po proudu řeky Kopřivničky (obrázky 13 a 14). Během transportu do laboratoře byly vzorky zkušebního média udržovány v chladných podmínkách.



Obrázek 9: Mapa odběrového místa 1. Řeka Dřevnice, Zlín.⁴³



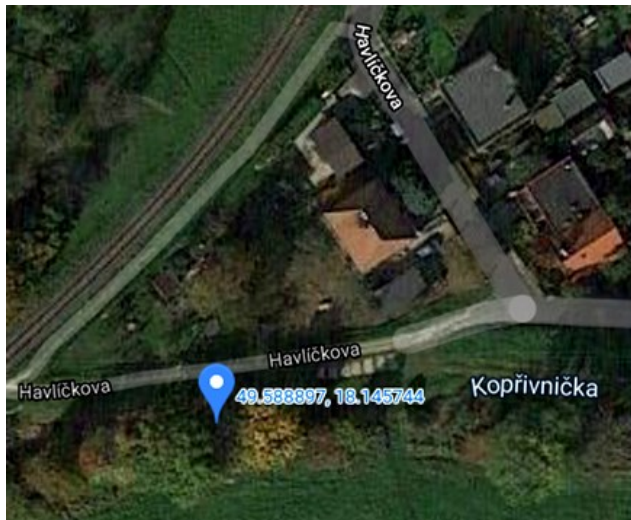
Obrázek 10: Odběrové místo 1 - řeka Dřevnice, Zlín.



Obrázek 11: Mapa odběrového místa 2. Pramen řeky Kopřivničky, Kopřivnice.⁴⁴



Obrázek 12: Odběrové místo 2 - pramen řeky Kopřivničky, Kopřivnice.



Obrázek 13: Mapa odběrového místa 3. Řeka Kopřivnička, Kopřivnice.⁴⁵



Obrázek 14: Odběrové místo 3 - Řeka Kopřivnička, Kopřivnice.

8.2 Zkušební a referenční materiál

Zkušební materiál

Byly použity polymerní vzorky (viz tabulka 2) ve formě fólií o tloušťce 0,1 mm a nastříhány na disky o přibližné hmotnosti 20 mg a průměru 1,2 - 1,4 cm. Hmotnost zkušebního materiálu byla zvolena podle popsaného postupu v mezinárodní normě ISO 19679.

Mezi zkušební materiál byl zařazen i kapalný vzorek ve formě směsi plnidel o přibližné hmotnosti 10 mg M + 10 mg L. Směs plnidel byla vážena na inertním materiálu (keramický

kamínek). Toto řešení bylo zvoleno s ohledem na kapacitní možnosti přístroje Oxi-Top®Control. Limitovaný počet biometrických lahví již neumožňoval stanovení biologického rozkladu jednotlivých aditiv samostatně.

Referenční materiál

Za referenční materiál byl použit celulóзовý filtrační papír značky MUNKTELL (ISO 19679). Podle postupu ve zkušební metodě, byla zvolena přibližná hmotnost vzorku 20 mg ve formě disku o průměru 1,9 cm. Před začátkem testování byly disky referenčního materiálu proprány v destilované vodě o teplotě 100 °C a poté sušeny v sušárně při teplotě 105 °C do konstantní hmotnosti.

8.3 Přístroje a pomůcky

- analytické váhy ABJ-NM/ABS-N, Kern
- sušárna UM 200 MEMMERT, Nordiska
- vzduchové pumpy JK-AP9500, Atman a ELITE 800, Hagen
- 30 biometrické láhve ($V = 250$ ml) Fisherbrand™
- uzavřený respirometrický systém OxiTop®Control, WTW
- termostat TS 606-G/4-i, WTW
- infračervený spektrometr Nicolet Is10, Thermo scientific
- rastrovací elektronový mikroskop Phenom Pro X vybavený sadou Pro Suite, Phenom-World BV
- fluorescenční mikroskop Olympus BX53, software: cellSens
- běžné laboratorní sklo a vybavení

8.4 Postup zkoušky

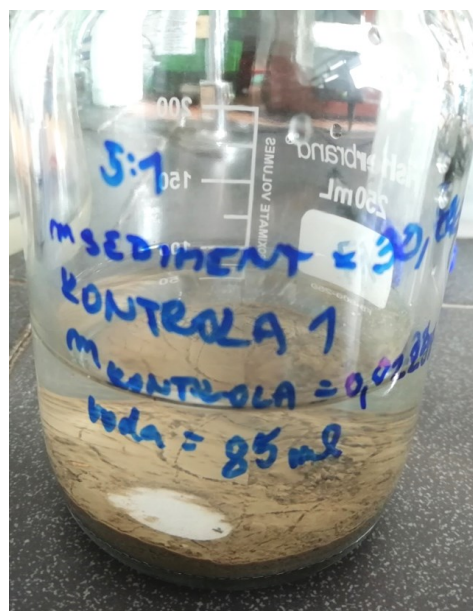
Hlavním cílem screeningové zkoušky před spuštěním zkušebního testu bylo stanovit optimální poměr mezi kapalnou a pevnou fází tak, aby biologická spotřeba kyslíku byla detekovatelná pomocí přístroje OxiTop®Control. Testovací sestava se zkušebním médiem byla spuštěna ve třech objemových poměrech voda : sediment – 3 : 1, 4 : 1 a 5 : 1. Do biometric-

kých láhví o objemu 250 ml bylo vždy naváženo přibližně 30 g mokrého sedimentu a v závislosti na výše zmíněných poměrech byl zvolen příslušný objem říční vody a následně pipetován na vrstvu sedimentu. Prvně byla provedena slepá stanovení s různými poměry zkušebního média, později se zařadila i stanovení kontrolní, u nichž byly připravené disky referenčního materiálu vkládány na rozhraní voda/sediment (obrázek 16).

V případě zkušebního testu, v rámci kterého již byl sledován biologický rozklad testovaných PLA materiálů, byla sestava spuštěna ve vybraném optimálním poměru voda : sediment dle screeningové zkoušky – 5 : 1. Do biometrických láhví o objemu 250 ml bylo naváženo přibližně 30 g mokrého sedimentu a pipetováno 85 ml říční vody. Připravené disky zkušebních materiálů (7 vzorků), vzorek kapalné směsi plnidel M + L navážené na inertním nosiči v podobě keramického kamínku a disky referenčního materiálu, byly vloženy do biometrických láhví na rozhraní sediment/voda. Zkušební sestava (obrázek 15) obsahovala 3 biometrické láhve od každého vzorku, dále 3 kontrolní stanovení a 3 slepá stanovení.



Obrázek 15: Zkušební sestava uzavřeného systému OxiTop®Control.



Obrázek 16: Detail rozhraní sediment/voda s diskem referenčního materiálu.

Do každého adaptéru byla vložena gumová epruvetka naplněná ze 2/3 Spherasorbem a upevněná na měřicí hlavici OxiTop®Control. Spherasorb je natronové vápno s indikátorem pro absorpci oxidu uhličitého (firma: Intersurgical). Poté byly hlavice OxiTop®Control spárovány se zařízením kontroleru pro záznam dat biologické spotřeby kyslíku v závislosti na časovém úseku.

Inkubace připravených sestav byla vedena v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C a každé dva měsíce bylo zahájeno 20minutové provzdušňování vodné fáze vzduchem a zároveň proběhla i výměna Spherasorbu. Během celého procesu biodegradace byla průběžně monitorována biologická spotřeba kyslíku.

8.4.1 Screeningová zkouška

Test č. 1

První odběr zkušebního média se uskutečnil 15. 7. 2020 z řeky Dřevnice ve Zlíně. Na zkušební médium byla aplikovaná 24hodinová aerace vzduchem a následně proběhla screeningová zkouška, která byla zahájena 16. 7. 2020 a ukončena 12. 8. 2020.

Testy byly spuštěny ve třech objemových poměrech voda : sediment – 3:1, 4:1 a 5:1. Pozn.: 30 g říčního sedimentu odpovídalo přibližnému objemu 16 ml. Inkubace připravených sestav byla spuštěna v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C.

Test č. 2

Druhý odběr zkušebního média se uskutečnil 10. 8. 2020 u pramene řeky Kopřivničky v Kopřivnici. Na zkušební médium byla aplikovaná 24hodinová aerace vzduchem a následně proběhla screeningová zkouška, která byla zahájena 12. 8. 2020 a ukončena 11. 9. 2020.

Testy byly spuštěny ve třech objemových poměrech voda : sediment – 3:1, 4:1 a 5:1. Pozn.: 30 g říčního sedimentu odpovídalo přibližnému objemu 19 ml. Inkubace připravených sestav byla spuštěna v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C.

Test č. 3

Třetí odběr zkušebního média se uskutečnil 23. 8. 2020 z řeky Kopřivničky v Kopřivnici. Na zkušební médium byla aplikovaná 24hodinová aerace vzduchem a následně proběhla screeningová zkouška, která byla zahájena 26. 8. 2020 a ukončena 25. 9. 2020.

Testy byly spuštěny v jednom objemovém poměru voda : sediment viz tabulka 4. Pozn.: 30 g říčního sedimentu odpovídalo přibližnému objemu 19 ml. Inkubace připravených sestav byla spuštěna v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C.

Tabulka 4: Screeningová zkouška odběrového místa 3.

Stanovení	Číslo měření	Zkušební médium	Říční voda [ml]	Říční sediment [g]	Referenční materiál [mg]
Slepé	1	Objemový poměr 5:1	95	30,142	-
	2			30,035	
	3			30,031	
Referenční	1			30,160	20,88
	2			30,145	20,15
	3			30,029	21,33

8.4.2 Zkušební test

Odběr zkušební média se uskutečnil 4. 10. 2020 z řeky Kopřivničky v Kopřivnici. Na zkušební médium byla aplikovaná 24hodinová aerace vzduchem a následně proběhl zkušební test s referenčním a zkušebním materiálem (tabulka 5), který byl zahájen 6. 10. 2020.

Testy byly spuštěny v jednom objemovém poměru voda : sediment – 5 : 1. Pozn.: 30 g říčního sedimentu odpovídalo přibližnému objemu 17 ml, tzn. 85 ml vody : 17 ml sedimentu.

Tabulka 5: Zkušební test – navážky sedimentu a testovaných materiálů.

Vzorek	Číslo měření	Říční sediment [g]	Zkušební materiál [mg]	Vzorek	Číslo měření	Říční sediment [g]	Zkušební materiál [mg]
SLEPÝ	1	30,054	-	REFERENČNÍ	1	30,072	22,38
	2	30,042			2	30,029	21,12
	3	30,020			3	30,054	21,96
PLA	1	30,043	22,01	PLA + T 5 %	1	30,003	20,02
	2	30,053	21,88		2	30,076	20,74
	3	30,003	22,88		3	30,041	20,68
PLA + M 20 %	1	30,072	21,89	PLA + M 20 % + L 0,5%	1	30,009	21,31
	2	30,057	20,56		2	30,072	22,31
	3	30,007	20,85		3	30,041	21,45
PLA + M + L + T 2,5%	1	30,022	22,29	PLA + M + L + T 5%	1	30,014	20,84
	2	30,045	22,26		2	30,070	22,17
	3	30,064	22,14		3	30,027	22,65
PLA + M + L + T 10%	1	30,027	22,42	M + L	1	30,007	10,03 + 10,15
	2	30,045	21,51		2	30,034	11,96 + 9,69
	3	30,055	20,75		3	30,050	12,13 + 12,66

Inkubace připravených sestav byla spuštěna v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C. Sestava (vodná fáze) byla každé dva měsíce provzdušněna vzduchem na 20 minut a zároveň proběhla výměna Spherasorbu. Během celého procesu biodegradace byla průběžně monitorována biologická spotřeba kyslíku.

8.4.3 Modifikovaný Zahn-Wellens test

Biologická rozložitelnost zkoumaných vzorků v říční sedimentární oblasti, byla hodnocena také podle metodiky založené na modifikovaném testu Zahn-Wellense. Daná metoda umožňuje hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí.

Test byl spuštěn za účelem hodnocení pevných vzorků v průběhu biologického rozkladu, aniž by byl narušen souběžný test na BSK v uzavřeném respirometru. Pro Zahn-Wellens test byly vytvořeny identické podmínky dle zkušebního testu. Sestava obsahovala 4 uzavřené biometrické láhve od každého zkušebního materiálu (tabulka 6).

Tabulka 6: Modifikovaný Zahn-Wellens test - navážky sedimentu a testovaných materiálů

Vzorek	Číslo měření	Říční sediment [g]	Zkušební materiál [mg]	Vzorek	Číslo měření	Říční sediment [g]	Zkušební materiál [mg]
PLA	1	30,074	21,79	PLA + T 5 %	1	30,039	20,25
	2	30,018	22,22		2	30,030	20,42
	3	30,053	22,93		3	30,054	22,21
	4	30,007	22,82		4	30,068	22,13
PLA + M 20 %	1	30,067	21,67	PLA + M 20 % + L 0,5%	1	30,011	20,23
	2	30,030	21,59		2	30,063	20,73
	3	30,004	21,16		3	30,058	22,51
	4	30,065	21,86		4	30,046	22,31
PLA + M + L + T 2,5 %	1	30,003	22,43	PLA + M + L + T 5 %	1	30,021	21,11
	2	30,048	21,13		2	30,016	22,24
	3	30,006	20,96		3	30,017	20,67
	4	30,015	20,12		4	30,001	21,64
PLA + M + L + T 10 %	1	30,039	20,84				
	2	30,048	21,83				
	3	30,015	22,36				
	4	30,077	21,51				

Inkubace připravených sestav byla spuštěna v temnu, v uzavřeném termostatickém zařízení s konstantní teplotou 25 ± 1 °C. Sestava (vodná fáze) byla každé dva měsíce provzdušněna vzduchem na 20 minut. Během půlročního procesu biologického rozkladu byly průběžně monitorovány aktuální koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnoty pH ve vodném médiu, měřeny změny ve struktuře zkoušených pevných vzorků pomocí FTIR a zaznamenány jejich hmotnostní úbytky s celkovým vizuálním hodnocením.

8.5 Výpočet biologického rozkladu

Procento biologického rozkladu dle TSK

Substrátová biologická spotřeba kyslíku referenčního a zkušebního materiálu byla vyjádřena odečtením průměrných hodnot biologické spotřeby kyslíku slepého stanovení od hodnot biologické spotřeby kyslíku testovaných vzorků v každém časovém intervalu, a poté vydělena aktuální koncentrací testovaného vzorku v biometrické láhvi. Získaná hodnota substrátové BSK je uváděna v jednotkách mg spotřebovaného kyslíku na mg testovaného vzorku.

Procento biologického rozkladu bylo vyjádřeno podílem hodnot substrátové BSK a specifické teoretické spotřeby kyslíku (TSK), jehož výpočet je vyjádřen následující rovnicí 3.

$$D_{\text{TSK}} = \frac{\text{BSK}_{\text{VZ}} - \text{BSK}_{\text{SS}}}{\text{TSK} \cdot c_{\text{VZ}}} \cdot 100 \quad (3)$$

Kde

D_{TSK} je procento biologického rozkladu dle TSK [%];

BSK_{VZ} naměřená biologická spotřeba kyslíku testovaného vzorku v čase t [mg/l];

BSK_{SS} naměřená biologická spotřeba kyslíku slepého stanovení v čase t [mg/l];

TSK teoretická spotřeba kyslíku testovaného vzorku [mg/mg];

c_{VZ} aktuální koncentrace testovaného vzorku v biometrické láhvi [mg/l].

Specifická TSK potřebná na úplnou oxidaci organické sloučeniny byla vypočtená z molekulového vzorce dle níže uvedené rovnice 4:

$$TSK = \frac{16 \left[2C + \frac{1}{2}(H - Cl - 3N) + 3S + \frac{5}{2}P + \frac{1}{2}Na - O \right]}{Mr} \quad (4)$$

Kde

TSK je teoretická spotřeba kyslíku [mg/mg];

Mr relativní molekulová hmotnost kontrolní sloučeniny;

C, H, Cl, N, S, P, Na, O relativní molekulové hmotnosti prvků zastoupených v kontrolní sloučenině.

Výpočet hmotnostního úbytku

$$m = \frac{m_2}{m_1} \cdot 100 \quad (5)$$

Kde

m hmotnostní úbytek [%]

m₁ počáteční hmotnost zkušebního tělíska [mg]

m₂ hmotnost zkušebního tělíska na konci testu [mg]

SEM – Skenovací elektronová mikroskopie

Po 164 dnech stanovení biologické degradace byly odebrány dvě série vzorků zkušebních materiálů na analýzu SEM. U první odebrané série vzorků, byl jejich povrch jemně očištěn pomocí destilované vody a papírové utěrky, tak aby nedošlo k mechanickému poškození. Po vytažení vzorků ze zkušebního média u druhé série, nebylo provedeno jejich očištění. Následovalo sušení všech odebraných vzorků po dobu tří dnů v exsikátoru nad silikagelem při teplotě 25 ± 1 °C. Poté byly vzorky nastříhány do optimálního tvaru (čtvereček o rozměru 50 x 50 mm) a analyzovány na rastrovacím elektronovém mikroskopu Phenom Pro X vybavený sadou Pro Suite; Phenom-World BV.

Pomocí metody SEM dopadají elektrony na pozorovaný preparát a interakcí s hmotou vyráží ze vzorku elektrony. Excitované elektrony jsou poté pomocí vhodného potenciálu přitahovány na detektory, které vytváří signál upravený pro zpracování v zobrazovacím systému. Zobrazovacím systémem může být obrazovka, na níž se vytváří příslušný obraz rastrováním

elektronového paprsku po snímané ploše. Výsledným obrazem je snímek zachycující povrchovou morfologii sledovaného preparátu.⁴⁶

FM – Fluorescenční mikroskopie

Po 164 dnech stanovení biologické degradace byla odebrána série vzorků zkušebních materiálů na analýzu FM. Hned po jejich odběru byly vzorky opláchnuty, položeny na podložní sklíčko a barveny roztokem fluorescenční barvy po dobu 30ti sekund. Tento indikační roztok obsahoval 1 ml destilované vody; 1,5 μ l roztoku A a 1,5 μ l roztoku B. Roztok A a B zahrnoval kombinaci barviva SYTO®9 a propidium jodidu. Barvivo SYTO®9 se váže na bakteriální membránu, načež dochází k označení živých i neživých mikroorganismů. Propidium jodid je vázáno na DNA mikroorganismu, ovšem daný mikroorganismus musí mít porušenou membránu, přes kterou může proniknout a navázat se. Proto barvivo propidium jodid je indikátorem pouze mrtvých mikroorganismů, díky jejich porušené membráně. Při navázání barviv SYTO®9 i propidium jodidu na mrtvé mikroorganismy, dochází ke snížení fluorescence SYTO®9, kvůli působení propidium jodidu. Proto mikroorganismy označené barvivem SYTO®9 jsou označovány za živé a propidium jodidem za mrtvé.

Použitý indikační roztok byl po obarvení analyzovaného vzorku odsán. K odstranění nepřichyceného barviva byl vzorek 1 x propláchnut destilovanou vodou a následně mikroskopován na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX53. Dodáním energie pomocí světla o určité vlnové délce dochází k excitaci barviv, což způsobí jejich fluorescenci. SYTO®9 má excitační maximum při 480 nm a propidium jodid při 490 nm. Tyto vlnové délky byly dosaženy použitím filtru 3 pro excitaci barviva SYTO®9 a filtru 5 pro excitaci barviva propidium jodidu. Pro vyhodnocení dat v podobě snímků, byl využit software: cellSens.

FTIR – Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací

FTIR patří mezi spektroskopickou metodu, která je založena na absorpci infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž proběhnou změny rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Výsledné infračervené spektrum je funkční závislostí energie vyjádřené v jednotkách absorbance nebo procentech transmitance na vlnové délce dopadajícího záření.⁴⁷

Během hydrolytického stanovení a stanovení biologické rozložitelnosti zkušebních materiálů, byly průběžně odebírány vzorky na analýzu FTIR. Při každém odběru byl povrch jednotlivých vzorků jemně očištěn pomocí destilované vody a papírové utěrky s opatrností k mechanickému poškození. Následně proběhlo sušení vzorků v exsikátoru nad silikagelem při teplotě 25 ± 1 °C do konstantní hmotnosti (doba sušení cca 7 dní). Vzorky byly analyzovány na infračerveném spektrometr Nicolet Is10, Thermo scientific s ATR nadstavcem a diamantovým krystalem a měřeny vždy na třech místech.

Pro experiment byla využita konkrétní technika zeslabeného úplného odrazu neboli metoda ATR. Podstatou této metody je jednoduchý či vícenásobný odraz záření na fázovém rozhraní měřeného vzorku a měřícího krystalu s dostatečně vysokým indexem lomu. Ve vzorku, který je v dokonalém kontaktu s měřícím ATR krystalem, vzniká při úplném odrazu na rozhraní opticky hustšího prostředí (ATR hranol) s prostředím opticky řidším (vzorek) zeslabující se absorpční (evanescentní) vlna, která klesá exponenciálně se vzdáleností od rozhraní (řádově v μm).⁴⁷

9 VÝSLEDKOVÁ A DISKUSNÍ ČÁST

Bylo provedeno stanovení aerobní biodegradace neplovoucích polymerních PLA materiálů na rozhraní vody a sedimentu, pomocí kvantitativní metody biologické spotřeby kyslíku. Postup byl realizován dle mezinárodní normy ISO 19679 a aplikován na říční sedimentární oblast.

9.1 Stanovení hydrolyzy

Souběžně se stanovením aerobní biodegradace byl spuštěn test na abiotickou degradaci zkušebních materiálů.

Počátek testu: 14. 8. 2020	3. odběr: 2. 12. 2020
1. odběr: 15. 9. 2020	4. odběr: 3. 2. 2021
2. odběr: 16. 10. 2020	5. odběr: 6. 4. 2021

Pomocí elementární analýzy (Automatic Elementar Analyzer CHNS, Thermo Fisher Scientific Inc.) bylo ve zkušebních PLA materiálech stanoveno procentuální zastoupení uhlíku, potřebného pro konečné vyhodnocení stupně hydrolyzy. Níže jsou uvedeny naměřené hodnoty pro jednotlivé materiály.

- I. PLA: $(50,11 \pm 0,01) \%$
- II. PLA + T 5 %: $(51,13 \pm 0,01) \%$
- III. PLA + M 20 %: $(49,24 \pm 0,10) \%$
- IV. PLA + M 20 % + L 0,5 %: $(51,25 \pm 0,04) \%$
- V. PLA + M + L + T 2,5 %: $(50,61 \pm 0,04) \%$
- VI. PLA + M + L + T 5 %: $(50,28 \pm 0,02) \%$
- VII. PLA + M + L + T 10 %: $(49,13 \pm 0,01) \%$

V průběhu stanovení byla sestava láhví označená čísly 1, 2 a 3 určena k monitorování hodnot TC v kapalných vzorcích (tabulka 7) a z naměřených dat byly vypočteny jednotlivé stupně hydrolyzy, které jsou uvedeny v tabulce 8. Po ukončení testu (5. odběr – 273 dnů) byly pevné zkušební materiály z těchto 3 sestav odebrány, vysušeny do konstantní hmotnosti a stanoveny jejich konečné hmotnostní úbytky (tabulka 9).

Souběžná láhev číslo 4, byla určena k níže uvedeným analýzám pro sledování abiotické degradace – hydrolyzy. U průběžně odebraných pevných zkušebních vzorků z této láhve, bylo po vysušení do konstantní hmotnosti provedeno vizuální pozorování a následně pořizeny záznamy změn v jejich struktuře pomocí FTIR.

Tabulka 7: Stanovení hydrolyzy – naměřené hodnoty TC v kapalném vzorku.

Vzorek	Číslo láhve	TC [mg/l]				
		1. odběr (32 dnů)	2. odběr (63 dnů)	3. odběr (110 dnů)	4. odběr (176 dnů)	5. odběr (273 dnů)
PLA	1	6,75	7,20	7,66	8,03	9,39
	2	6,52	8,03	11,73	9,63	10,68
	3	5,58	7,00	9,92	8,73	9,84
PLA + T 5 %	1	5,23	7,24	8,19	9,28	10,04
	2	7,18	7,88	8,14	8,63	9,73
	3	6,97	7,80	8,92	8,74	10,33
PLA + M 20 %	1	61,50	70,62	75,40	79,55	83,75
	2	62,37	71,26	76,57	80,26	84,23
	3	65,26	74,46	79,99	83,06	87,08
PLA + M 20 % + L 0,5 %	1	40,46	67,21	71,77	75,21	80,61
	2	67,60	77,56	82,96	87,91	92,07
	3	60,37	70,51	72,82	81,10	82,92
PLA + M + L + T 2,5 %	1	74,16	78,20	80,99	83,70	87,71
	2	68,95	77,92	80,24	82,79	86,45
	3	76,28	83,20	84,99	93,14	91,19
PLA + M + L + T 5 %	1	69,81	81,34	83,11	85,63	89,12
	2	73,74	80,75	82,03	83,84	87,16
	3	70,66	78,97	81,08	81,64	84,86
PLA + M + L + T 10 %	1	67,24	75,02	77,23	78,58	82,22
	2	71,70	81,05	83,24	85,44	88,89
	3	71,21	79,84	81,13	83,68	88,60

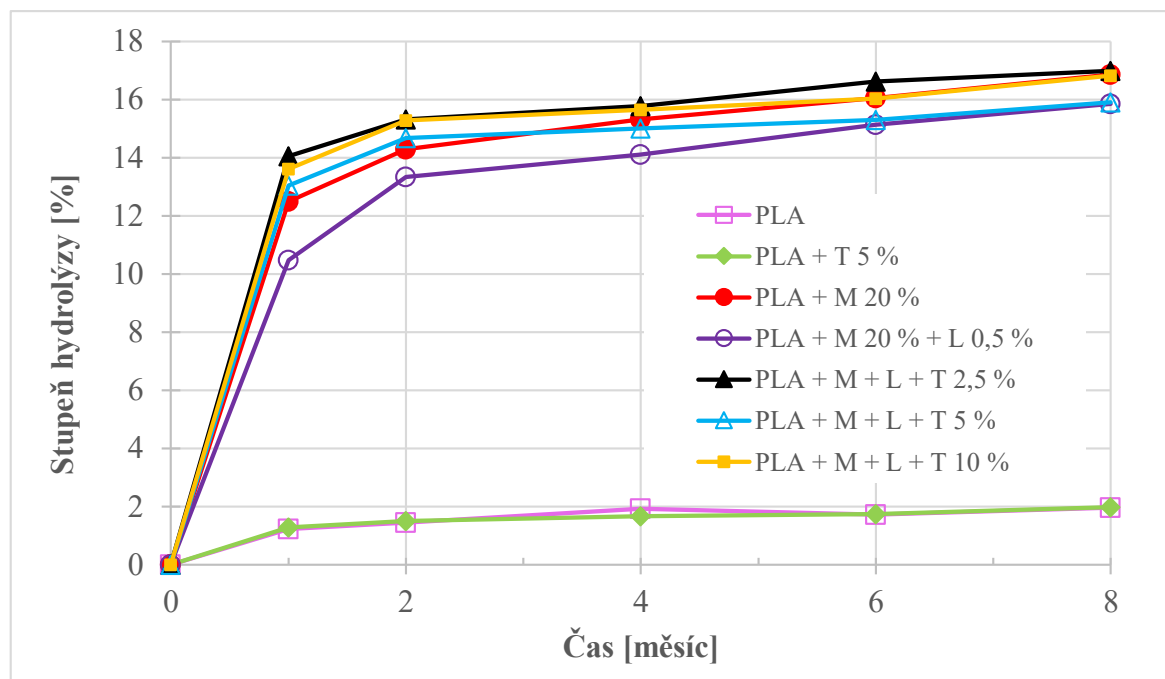
Tabulka 8: Stanovení hydrolýzy – stanovený stupeň hydrolýzy u zkušebních materiálů (průměr ± směrodatná odchylka).

Vzorek	Číslo láhve	STUPEŇ HYDROLÝZY [%]				
		1. odběr (32 dnů)	2. odběr (63 dnů)	3. odběr (110 dnů)	4. odběr (176 dnů)	5. odběr (273 dnů)
PLA	1	1,2	1,3	1,4	1,4	1,7
	2	1,4	1,7	2,5	2,0	2,2
	3	1,1	1,4	2,0	1,8	2,0
	Průměr:	1,2 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,0 ± 0,4	1,7 ± 0,2	2,0 ± 0,2
PLA + T 5 %	1	1,0	1,4	1,6	1,8	1,9
	2	1,4	1,6	1,6	1,7	2,0
	3	1,4	1,6	1,8	1,8	2,1
	Průměr:	1,3 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0	2,0 ± 0
PLA + M 20 %	1	12,5	14,3	15,3	16,2	17,0
	2	12,5	14,3	15,3	16,1	16,9
	3	12,5	14,2	15,3	15,9	16,7
	Průměr:	12,5 ± 0	14,3 ± 0	15,3 ± 0	16,1 ± 0,1	16,1 ± 0,1
PLA + M 20 % + L 0,5 %	1	7,3	12,1	13,0	13,6	14,6
	2	13,1	15,1	16,1	17,1	17,9
	3	11,0	12,8	13,2	14,7	15,1
	Průměr:	10,5 ± 2,4	13,3 ± 1,3	14,1 ± 1,4	15,1 ± 1,5	15,9 ± 1,5
PLA + M + L + T 2,5 %	1	14,7	15,5	16,0	16,5	17,3
	2	13,5	15,3	15,7	16,2	16,9
	3	14,0	15,3	15,6	17,1	15,1
	Průměr:	14,1 ± 0,5	15,4 ± 0,1	15,8 ± 0,2	16,6 ± 0,4	16,4 ± 1,0
PLA + M + L + T 5 %	1	12,6	14,7	15,0	15,5	16,1
	2	13,4	14,7	14,9	15,2	15,9
	3	13,1	14,7	15,1	15,2	15,8
	Průměr:	13,0 ± 0,3	14,7 ± 0	15,0 ± 0,1	15,3 ± 0,1	15,9 ± 0,1
PLA + M + L + T 10 %	1	13,5	15,1	15,6	15,8	16,6
	2	13,5	15,3	15,7	16,1	16,8
	3	13,8	15,4	15,7	16,2	17,1
	Průměr:	13,6 ± 0,1	15,3 ± 0,1	15,7 ± 0	16,0 ± 0,2	16,8 ± 0,2

Tabulka 9: Stanovení hydrolýzy – procentuální hmotnostní úbytek zkušebních materiálů po 273 dnech (5. odběr).

Vzorek	Číslo měření	Počáteční hmotnost [mg]	Koncová hmotnost [mg]	HMOTNOSTNÍ ÚBYTEK [%]	Průměr ± směrodatná odchylka
PLA	1	56,13	56,09	0,07	0,07 ± 0,01
	2	47,68	47,65	0,06	
	3	49,50	49,46	0,08	
PLA + T 5 %	1	51,10	50,38	1,41	1,45 ± 0,03
	2	48,52	47,81	1,46	
	3	48,80	48,08	1,48	
PLA + M 20 %	1	50,01	42,12	15,78	16,01 ± 0,17
	2	50,67	42,52	16,08	
	3	53,08	44,50	16,16	
PLA + M 20 % + L 0,5 %	1	54,01	45,83	15,15	15,28 ± 0,10
	2	50,22	42,52	15,33	
	3	53,66	45,41	15,38	
PLA + M + L + T 2,5 %	1	49,97	41,41	17,13	17,28 ± 0,16
	2	50,47	41,64	17,50	
	3	53,88	44,61	17,21	
PLA + M + L + T 5 %	1	55,09	47,50	13,78	13,98 ± 0,02
	2	54,69	46,93	14,190	
	3	53,49	46,01	13,98	
PLA + M + L + T 10 %	1	50,53	42,99	14,92	14,76 ± 0,12
	2	53,99	46,05	14,71	
	3	52,65	44,94	14,64	

Přehled výsledků z abiotické degradace – hydrolýzy, byl vyjádřen pomocí grafické závislosti vyhodnocených stupňů hydrolýzy na časovém úseku (obrázek 17).



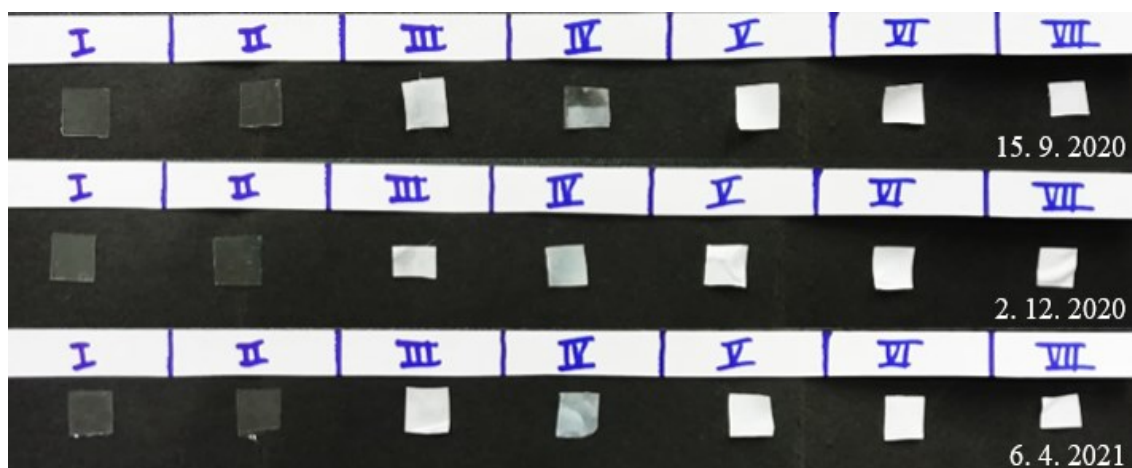
Obrázek 17: Průběh abiotické degradace zkušebních materiálů – stupeň hydrolýzy.

Ze získaných výsledků vyplývá, že inkubační teplota 25 °C je příliš nízká na hydrolytický rozklad PLA materiálu a je zde předpoklad, že došlo pouze k uvolnění celkového uhlíku z přítomných aditiv (M a L) obsažených ve směsi a nejedná se tak o samotnou hydrolýzu PLA.

U PLA a směsi PLA + T 5 %, byl zaznamenán 2% stupeň hydrolýzy po 8mi měsících. Z pořádaného záznamu průběžného vizuálního pozorování (obrázek 18) lze říci, že u těchto dvou zmíněných vzorků nedošlo k žádné viditelné změně materiálu a také u nich byly naměřeny i nejnižší procentuální hmotnostní úbytky. U ostatních zkušebních materiálů (PLA + M 20 %; PLA + M 20 % + L 0,5 %; PLA + M + L + T 2,5 %; PLA + M + L + T 5 % a PLA + M + L + T 10 %) byla zaregistrována vizuální změna barvy materiálu už při prvním odběru. Po uvolnění aditiv se z průhledných materiálů staly neprůhledné s mléčným zabarvením a nejvyšší procentuální hmotnostní úbytek byl naměřen u směsi PLA + M + L + T 2,5 %. Po 8 měsících byly u těchto pěti zmíněných zkušebních materiálů zaznamenány stupně hydrolýzy od 16 - 17 %, což převážně odpovídá přibližnému obsahu celkového uhlíku v aditivech M a L ve směsích s PLA. Výrazný nárůst hydrolytického stupně můžeme vidět do prvních dvou měsíců, během kterých došlo k většinovému uvolnění aditiv, poté je sledovaný

stupeň už téměř konstantní a lze dedukovat, že abiotický rozklad (hydrolyza) samotného PLA neprobíhá.

Procentuální hmotnostní úbytek PLA materiálu byl po 273 dnech abiotické degradace téměř nulový. Podle získaných procentuálních dat hmotnostních úbytků u jednotlivých materiálů (tabulka 9) i na základě posouzeného hydrolytického rozkladu lze usoudit, že získané hmotnostní úbytky u jednotlivých zkušebních materiálů, odpovídají pouze hmotnostem uvolněných aditiv ze směsí s PLA při abiotické degradaci.



Obrázek 18: Stanovení hydrolyzy – průběžné vizuální pozorování abioticky degradovaných zkušebních materiálů.

Pro detailní informace o průběžném degradačním mechanismu zkušebních materiálů v podobě změn ve struktuře, byla využita technika FTIR. V zaznamenaných spektrech, která jsou doložena v příloze (obrázky 46, 48, 50, 52, 54, 56 a 58), byly identifikovány určité změny ve struktuře materiálů. Sledovaný specifický pík typický pro esterovou vazbu PLA je detekován při hodnotě vlnočtu 1750 cm^{-1} . Během stanovení došlo u jednotlivých zkušebních materiálů k jeho mírnému poklesu, to naznačuje, že dochází k částečné degradaci této vazby, což odpovídá detekovanému 2% stupni zaznamenané hydrolyzy u PLA materiálu.

9.2 Stanovení biologické rozložitelnosti

Test na aerobní biologickou rozložitelnost zkušebních materiálů trval celkem 164 dní. Pro jednotlivé PLA materiály byla vypočtena TSK, potřebná ke konečnému vyhodnocení stupně biodegradace. Níže jsou uvedeny vypočítané hodnoty vyjádřené v mg kyslíku na mg zkušebního materiálu.

- I. PLA: 1,333 mg/mg
- II. PLA + T 5 %: 1,266 mg/mg
- III. PLA + M 20 %: 1,444 mg/mg
- IV. PLA + M 20 % + L 0,5 %: 1,449 mg/mg
- V. PLA + M + L + T 2,5 %: 1,417 mg/mg
- VI. PLA + M + L + T 5 %: 1,383 mg/mg
- VII. PLA + M + L + T 10 %: 1,317 mg/mg
- VIII. M + L: 2,186 mg/mg
- IX. Celulóza (referenční materiál): 1,032 mg/mg

9.2.1 Screeningová zkouška

Při výběru zkušebního média byla v rámci screeningových testů biologického rozkladu na rozhraní sediment / voda, zvolena tři odběrová místa – u pramene a cca 1 km od pramene z řeky Koprivničky, a dále z řeky Dřevnice. Zkušební médium bylo vybíráno s předpokladem dobrého mikrobiálního oživení a s ohledem na vhodný obsah uhlíku v sedimentu, který je normován v rozmezí 0,1 - 2 %.

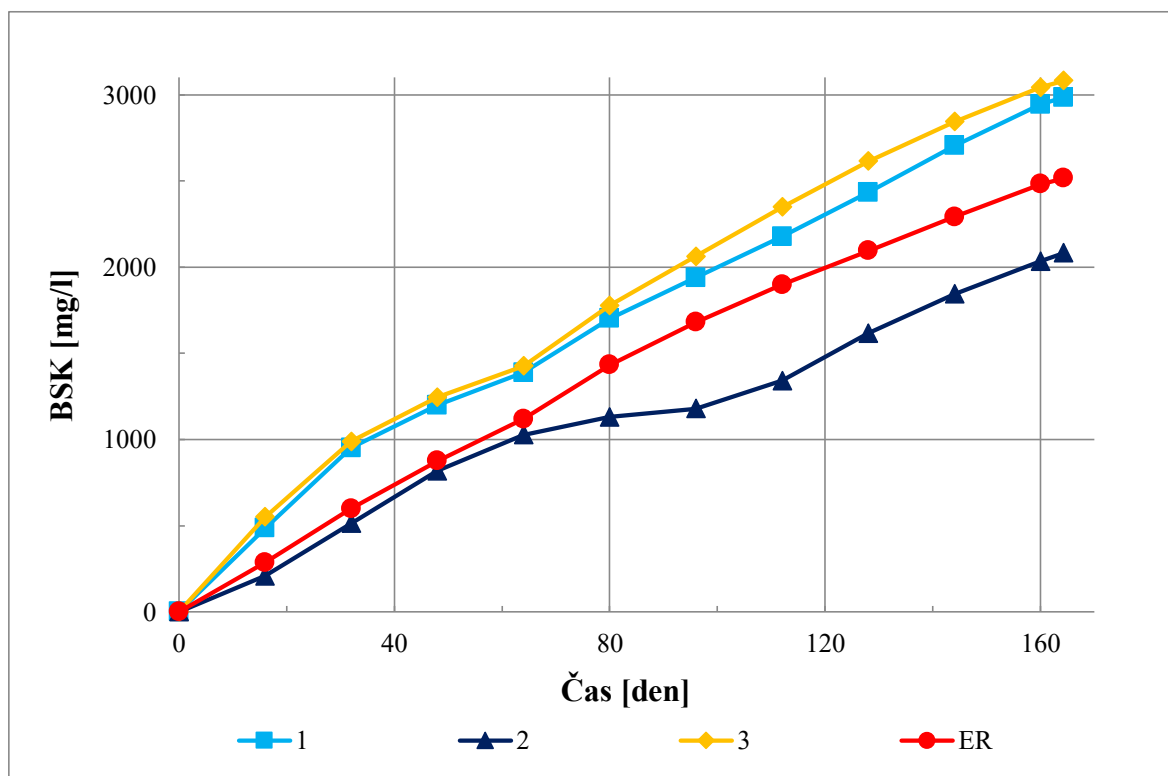
Screeningové testy během stanovení prokázaly, že zkušební médium odebrané z řeky Dřevnice prokazovalo nevyhovující biologické oživení, protože v rámci jednoměsíčního testování došlo k výraznému přemnožení nitěnek v sedimentu, které negativně ovlivnili stanovení v podobě zaznamenané vysoké biologické spotřeby kyslíku. Médium tak bylo vyhodnoceno za nevyhovující pro stanovení. Vzorek zkušebního média z řeky Koprivničky, odebraného u pramene, naopak po měsíční zkoušce vykazoval nízké mikrobiální zastoupení. Biologická spotřeba kyslíku byla zaznamenána na dolní hranici meze detekce přístroje OxiTop®Control, a proto toto médium bylo také vyhodnoceno jako nevyhovující pro stanovení, avšak výsledek testu naznačoval dobrou spolehlivost – nedocházelo k výrazným odchylkám biologické spotřeby kyslíku v rámci jednotlivých stanovení. Proto byl další odběr proveden ze stejné řeky, ale cca 1 km dále od pramene za předpokladu vyššího mikrobiálního oživení. Po měsíčním screeningovém testu byl předpoklad potvrzen a zkušební médium bylo vyhodnoceno za nejvhodnější volbu ze všech testovaných médií.

U vybraného zkušebního média byla provedena analýza TOC ve vodě - 24,26 mg/l a pomocí elementární analýzy byla stanovena hodnota uhlíku v sedimentu - 1,92 %, která splnila normované rozmezí. Zkušební médium tak bylo zvoleno k dalšímu testování pro stanovení biologické rozložitelnosti PLA materiálů ve vodním prostředí.

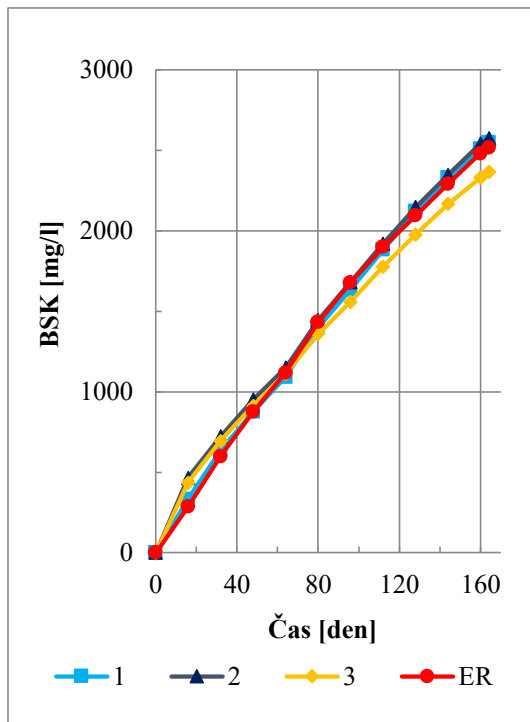
Z hlediska testovacího poměru zkušební média voda : sediment, který je taktéž limitován normou na rozmezí 3 : 1 až 5 : 1, byly screeningové testy spuštěny v následujících poměrech – 3 : 1, 4 : 1 a 5 : 1. Biologická spotřeba kyslíku byla přístrojem OxiTop®Control nejlépe detekovatelná při poměru 5 : 1, a proto byl tento objemový poměr vybrán pro následný zkušební test. Podle zvoleného poměru zkušební média, byla v souladu s normovanou metodou vypočítána i odpovídající hmotnost zkušební a referenčního materiálu s přibližnou testovací koncentrací 196 mg/l říční vody a sedimentu.

9.2.2 Zkušební test

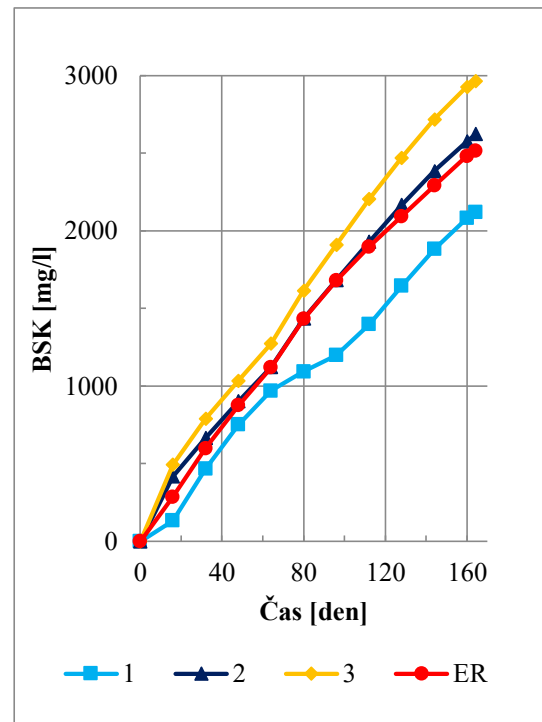
Na základě výsledků uvedených v kap. 9.2.1, byl zkušební test zaveden s médiem odebraným z řeky Koprivničky v Koprivnici; cca 1 km od pramene v objemovém poměru 5 : 1. Naměřené hodnoty biologické spotřeby kyslíku pro referenční (obrázek 19) a zkušební PLA materiály (obrázky 20 - 27), byly vyjádřeny pomocí grafických závislostí biologického rozkladu na čase. Pozn.: zaznamenané křivky celkové biologické spotřeby kyslíku s označením ER odpovídají endogenní respiraci. Označení 1 - 3 udává pořadové číslo měření pro referenční a zkušební materiály.



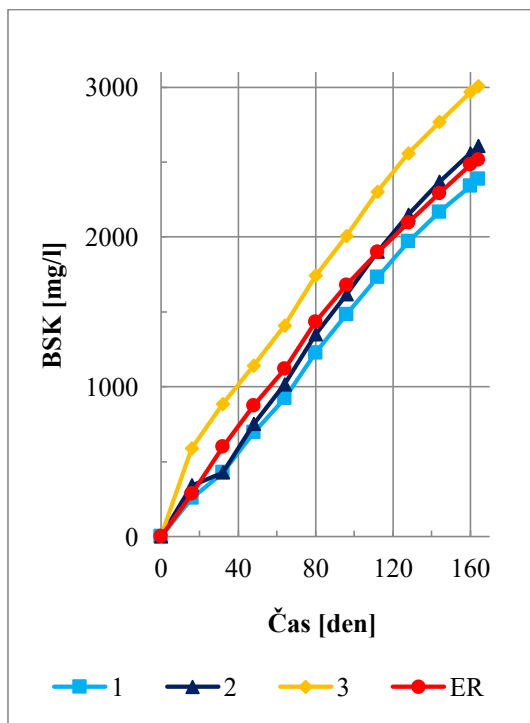
Obrázek 19: Zkušební test – celková BSK pro referenční materiál.



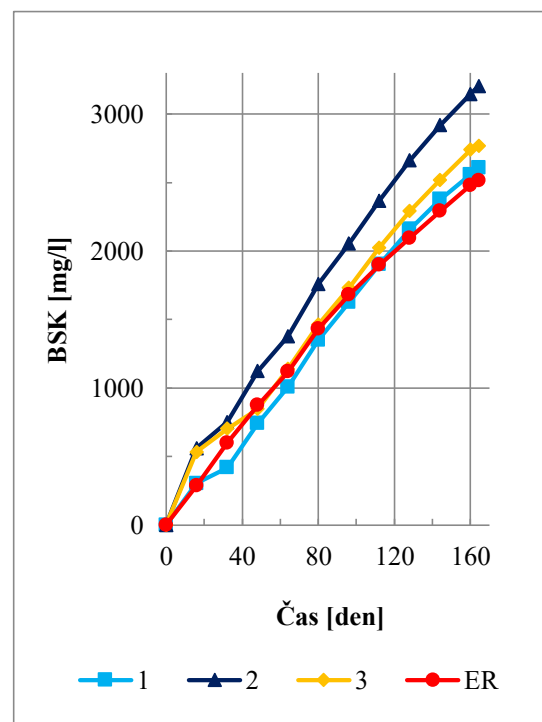
Obrázek 20: Zkušební test – celková BSK pro PLA.



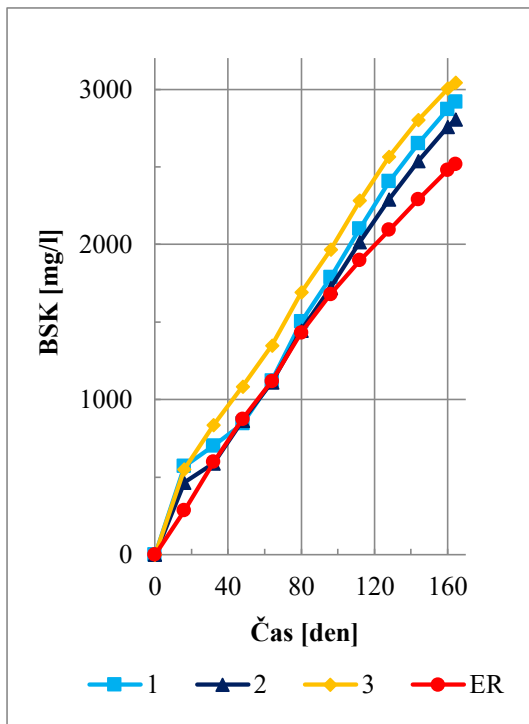
Obrázek 21: Zkušební test – celková BSK pro PLA + T 5%.



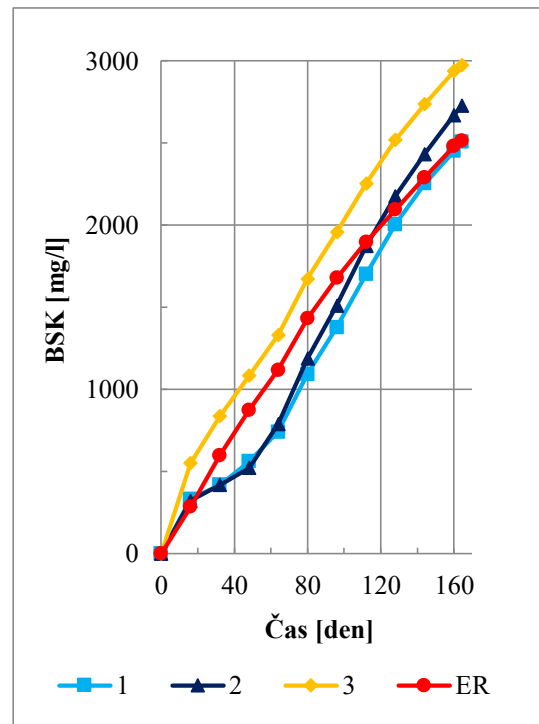
Obrázek 22: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M 20%.



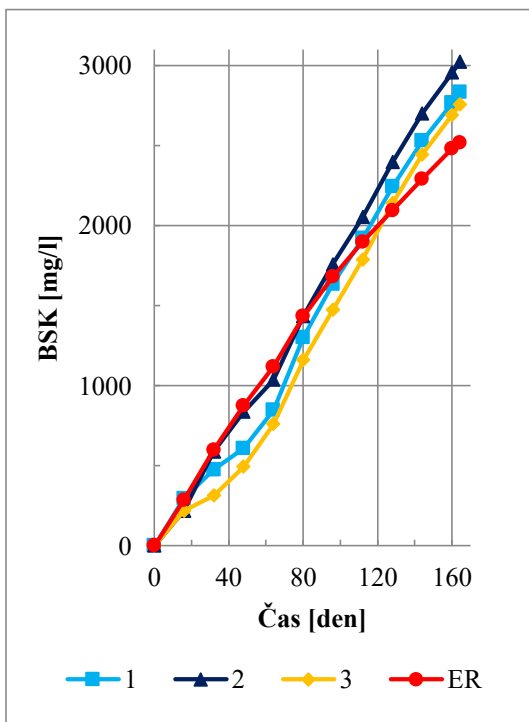
Obrázek 23: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M 20% + L 0,5%.



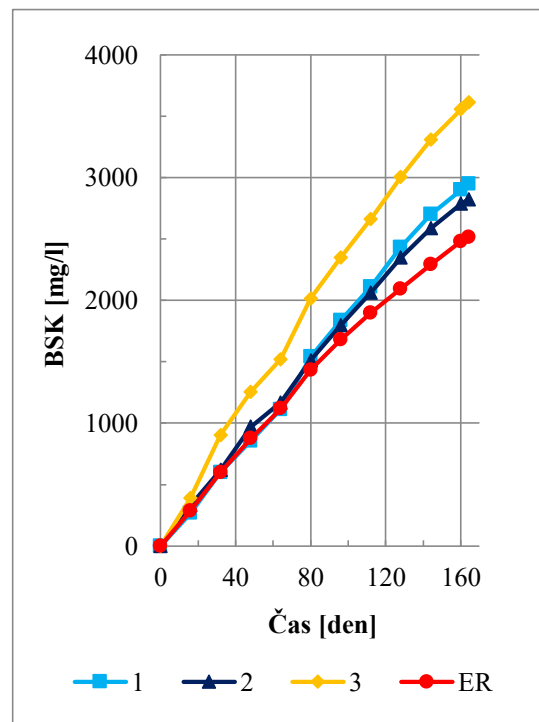
Obrázek 24: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 2,5 %.



Obrázek 25: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 5 %.

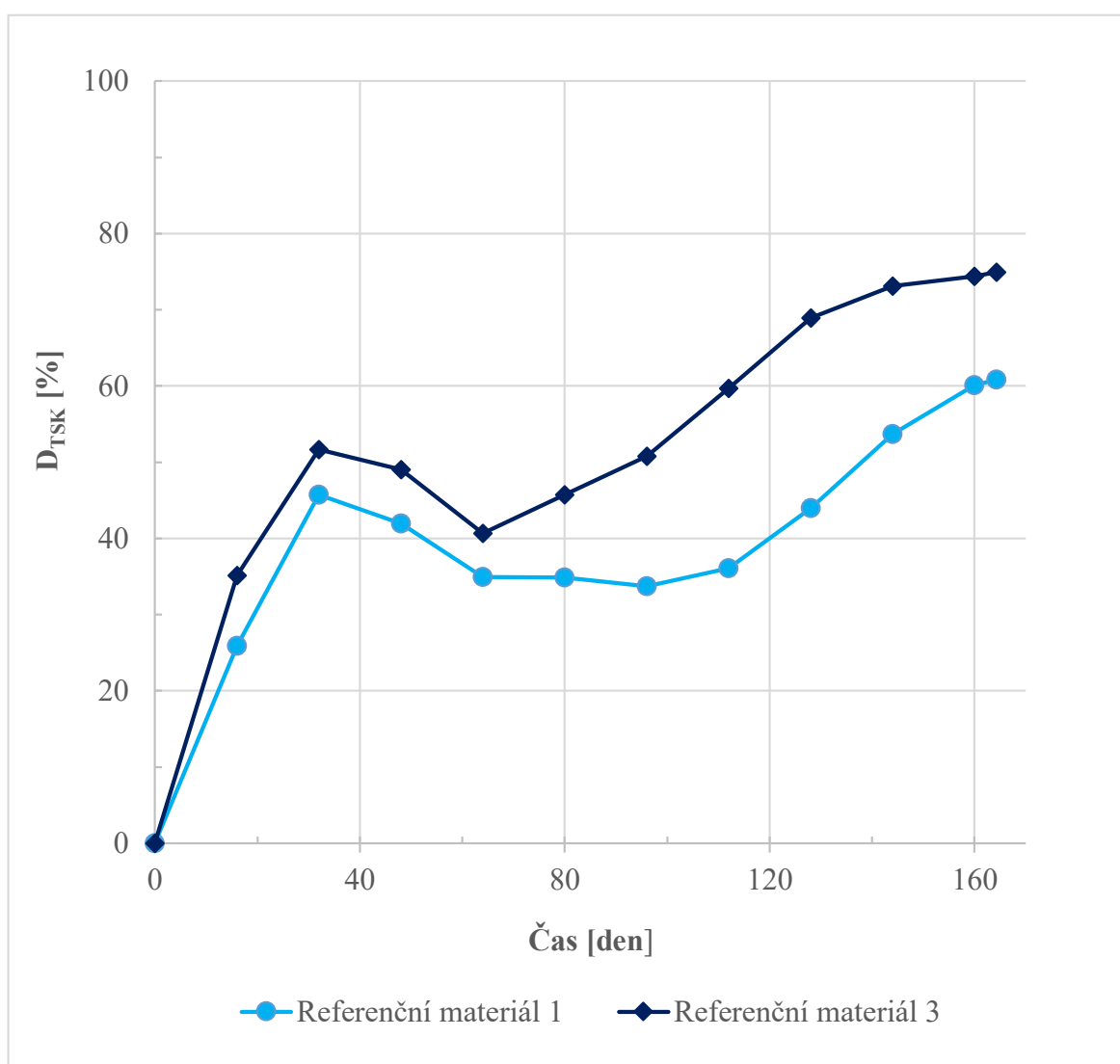


Obrázek 26: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 10 %.

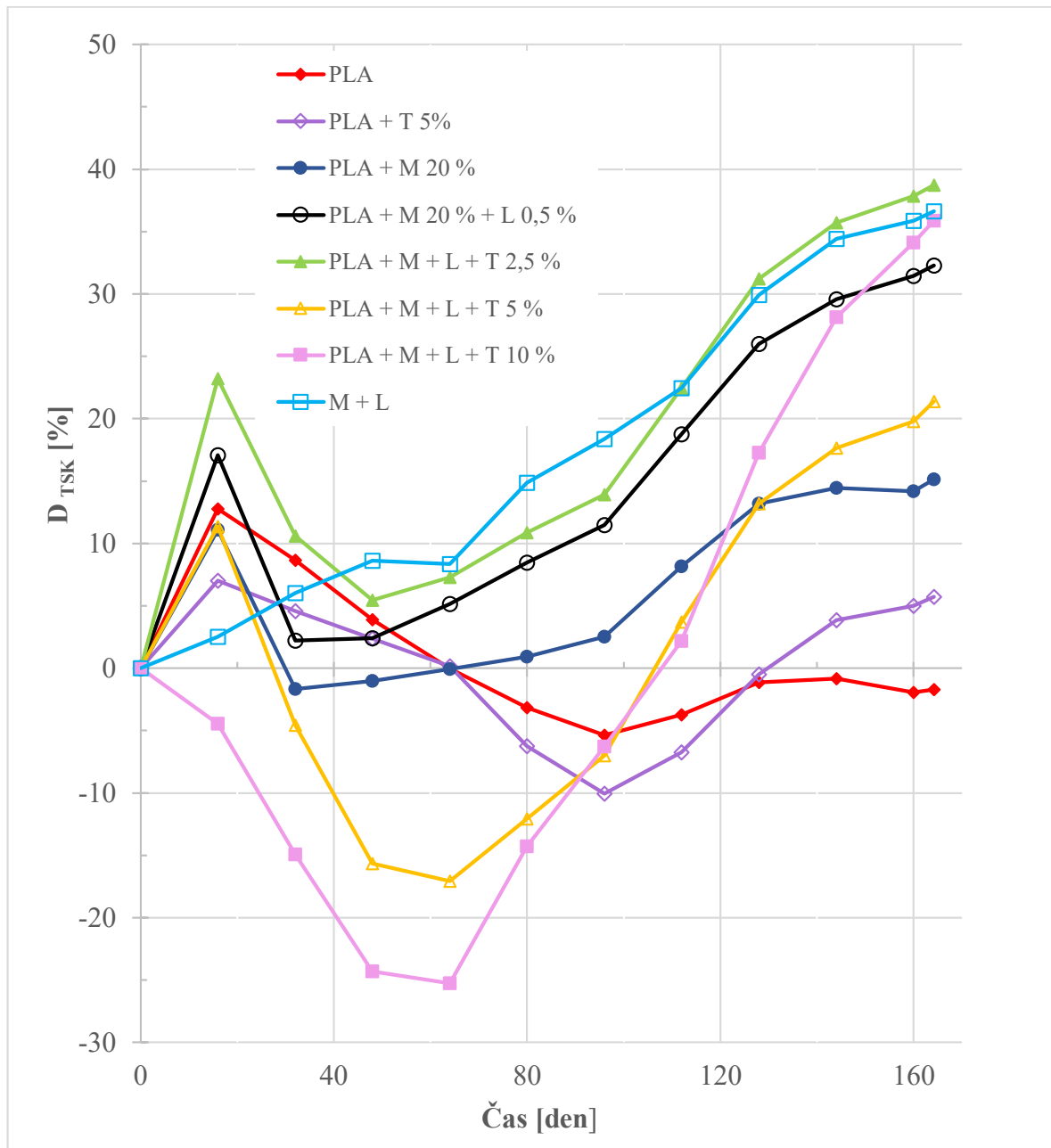


Obrázek 27: Zkušební test – celková BSK pro M + L.

Přehledy výsledků z vypočtených procent biologických rozkladů, byly také vyjádřeny pomocí grafických závislostí. Vynesené průměrné procenta biologických rozkladů pro referenční a zkušební PLA materiály jsou zaznamenány na obrázcích 28 a 29 v závislosti na čase. Vypočítaná hodnota D_{TSK} pro referenční materiál 2 vykazovala na konci stanovení nevyhovující zápornou hodnotu v důsledku možné technické závady (netěsnost systému). Z tohoto důvodu bylo toto měření (2) vyřazeno ze stanovení. Pozn.: Naměřené hodnoty celkové BSK pro zkušební a referenční materiály, byly přepočítány na skutečný objem zkušebního média v jednotlivých biometrických láhvích v závislosti na softwarově nastaveném objemu v přístroji OxiTop®Control ($V = 30$ ml). Tento limitující, sw nastavitelný objem byl zvolen s ohledem na požadovaný rozsah měření BSK přístroje OxiTop®Control.



Obrázek 28: Zkušební test – vypočítané hodnoty biologického rozkladu pro referenční materiál.



Obrázek 29: Zkušební test – vypočítané hodnoty biologického rozkladu pro zkušební PLA materiály.

Zaznamenané křivky celkové biologické spotřeby kyslíku pro referenční (obrázek 19) a zkušební PLA materiály (obrázky 20 - 27), poukazují na fakt vysoké respirace v pozadí (sl. pokus – endogenní respirace), která mohla způsobit poklesy BSK hodnot do přibližně 60. dne stanovení. Následně se tento trend promítnul i do vypočítaných hodnot biologických rozkladů u sledovaných materiálů. V prezentovaných biologických křivkách na obrázcích 28 a 29 lze tak také registrovat poklesy hodnot do 60. dne stanovení. Zmíněný trend je zaznamenan i u referenčního materiálu. Ovlivnění testu vysokou endogenní respirací nebylo

u krátkodobých 30denních screeningových testů zaznamenáno. Tento negativní vliv se projevil až v rámci dlouhodobějšího testování u spuštěného zkušebnímu testu při sledované biologické rozložitelnosti zkušebních materiálů. To naznačuje jisté nesrovnalosti v postupu stanovení a zkouška si žádá upravení metodiky a vhodnější nastavení systému Oxi-Top®Control.

K výše uvedenému je nutno podotknout, že kapacita adsorbentu CO₂ byla kontrolována po celou dobu stanovení a k její úplné spotřebě nedošlo, protože indikátor nesignalizoval vyčerpání (nedošlo k barevné změně indikující vyčerpání kapacity). V rámci testu Zahn-Wellense, který byl souběžně spuštěn za identických podmínek se zkušebním testem, byly průběžně sledovány kyslíkové poměry ve vodné fázi. Naměřené hodnoty prokázaly, že aerobní podmínky v prostředí byly dodrženy, protože obsah rozpuštěného kyslíku ve vodné fázi nikdy neklesl pod 3 mg/l.

Jako nejpravděpodobnější příčinou vysokých hodnot endogenní respirace se jeví nedostačující doba aklimatizace zkušebnímu média před zahájením testů. V normě není blíže specifikována časová doba aklimatizace zkušebnímu média před zahájením experimentu. Aplikovaná 24 hodinová aerace vzduchem na zkušební médium, byla během dlouhodobého stanovení biologické spotřeby kyslíku vyhodnocena za nedostačující, a proto je nutné při úpravě metodiky prodloužit aklimatizaci zkušebnímu média tak, aby se snížil obsah organických látek a tím vysoké respirace v pozadí. Vhodným řešením se jeví také zavedení míchání vodní hladiny speciálně navrženými plovoucími magnetickými míchadly podle studie Brissoulise a kol.³⁶ Pomocí míchadel by byl zajištěn dobrý přestup kyslíku z plynné fáze do kapalné a následně do horní vrstvy sedimentu a na druhé straně i dobrý přestup vyprodukovaného CO₂ do plynné fáze k adsorpci na sorbent. Podle předpokladů, by tak mohlo dojít ke snížení variability výsledků a zlepšení přesnosti metodiky. Toto řešení se v rámci diplomové práce nepodařilo z časových důvodů ověřit, neboť dané informace ze studie Brissoulise a kol.³⁶ byly získány až po zahájení stěžejního experimentu. Nicméně u dat, která byla naměřena při stanovení biologické rozložitelnosti zkušebních materiálů v této práci, lze sledovat určitý trend převážně od 60. dne testu, který vypovídá o jisté biodegradovatelnosti materiálů.

U výsledku biodegradace čisté PLA byl po 164 dnech testu zaznamenán pokles BSK až na hodnotu BSK/TSK -2 %, nicméně pokud se podíváme na hodnoty celkové BSK pro PLA (obrázek 20) ve srovnání s hodnotami BSK případajícími na endogenní respiraci je patrné, že za testovaných podmínek biologický rozklad samotného PLA neprobíhá, a nebo probíhá

jen velmi pomalu. Na obrázku 29 můžeme vidět, že zvolená aditiva M, L i T pozitivně ovlivnila biologický rozklad PLA. Nejvyšší rozklad byl zaznamenán u směsi PLA + M + L + T 2,5 %, která se rozložila z 39 %. Stejná testovaná směs s vyšším procentuálním zastoupením plnidla T (PLA + M + L + T 10 %) byla rozložena z 36 % a směs PLA + M + L + T 5 % z 21 %. Bylo tedy zjištěno, že procentuální přídavek plnidla T v testované směsi, vyšší než 2,5 %, částečně sníží biodegradabilitu sledovaného materiálu PLA. Nejnižší biodegradabilitu z testovaných směsí vykazovala směs PLA + 5 % T, jejíž rozklad byl na konci zkoušky 6%, a bylo prokázáno, že přídavek aditiv 20 % M + 0,5 % L do směsi PLA + T 5 %, přívětivě ovlivnil rychlost biodegradace PLA materiálu ($D_{TSK} \text{ PLA} + \text{M} + \text{L} + \text{T} 5 \% = 21 \%$).

Zkušební směs PLA + M 20 % byla na konci stanovení rozložena z 15ti %. Z výsledků biologické rozložitelnosti testované směsi PLA + M 20 % + T 0,5 % lze vydedukovat, že přídavek 0,5% aditiva L do směsi PLA + M 20 % pozitivně ovlivnil biodegradaci materiálu a tato směs (PLA + M 20 % + L 0,5 %) byla rozložena z 32 %. Do stanovení byla zařazena i směs pouhých aditiv M a L, jejichž biologický rozklad byl na konci zkoušky 37%.

U zkušebního testu na biologický rozklad byly podmínky stanovené normou zkontrolovány zejména pro referenční materiál, u kterého stupeň biodegradace dosáhl 60 % do 180 dní a rozdíl mezi procentuální biodegradací referenčního materiálu v jednotlivých biometrických láhvích (referenční materiál 1 a 3) byl na konci zkoušky v průměru menší než 20 % (obrázek 28). Průměrný biologický rozklad celulózy byl 68 % za 164 dní.

U zkušebních materiálů byla po 164 dnech zkoušky provedena SEM a fluorescenční mikroskopie (FM). Zaznamenané výsledky jsou uvedeny níže.

Skenovací elektronová mikroskopie

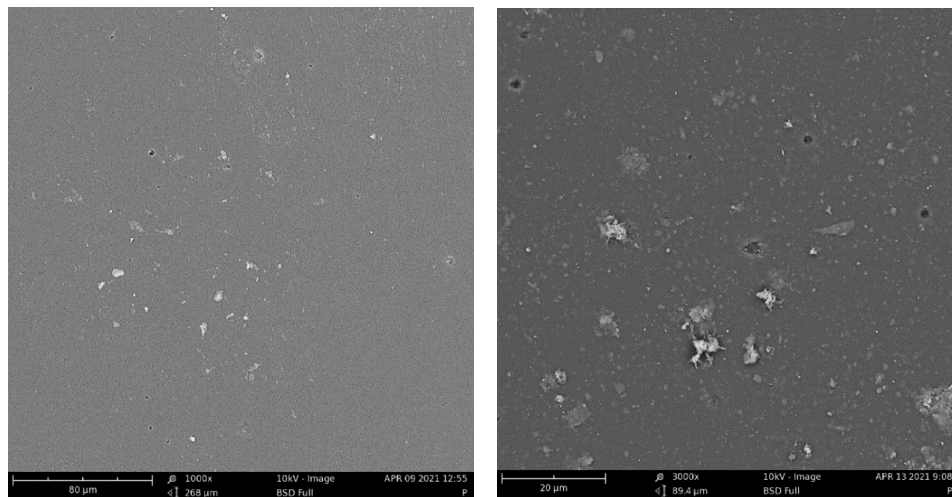
Pomocí SEM byly pořízeny snímky zachycující povrchovou morfologii sledovaných zkušebních materiálů s 3000 x zvětšením.

Na pořízených SEM snímcích (obrázky 30 - 36), které mají označení 1, jsou uvedeny zkušební vzorky po biodegradaci, jejichž povrch byl jemně očištěn, tak aby nedošlo k mechanickému poškození. Na SEM snímcích s označením 2, jsou uvedeny vzorky po biodegradaci, které nebyly po vytažení ze zkušebního média očištěny.

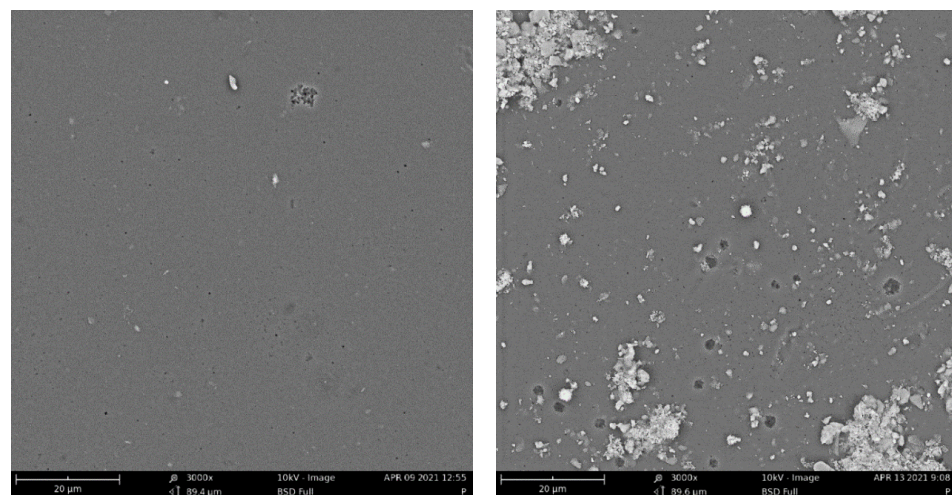
Největší povrchové změny v podobě drobných trhlin a prasklin byly zaznamenány u směsi PLA + M + L + T 2,5 %; PLA + M + L + T 10 %; a také u směsi s aditivu M a L bez zastoupeného plnidla T (PLA + 20 % M + L 0,5 %). U těchto materiálů byla prokázána

i nejúčinnější biodegradovatelnost ve spuštěném zkušebním testu na stanovení biologické rozložitelnosti. Změnu povrchové morfologie materiálu v podobě mikrotrhlin, vykazovala i směs PLA + M 20 %, u které byla zjištěna druhá nejnižší biodegradabilita ze všech testovaných směsí ($D_{TSK} \text{ PLA + M 20 \%} = 15 \%$). Výše zmíněné materiály po biotickém rozkladu vykazovaly výraznější křehkost, protože přítomná aditiva v určitém poměru ve směsi s PLA byla biologicky dobře odbouratelná.

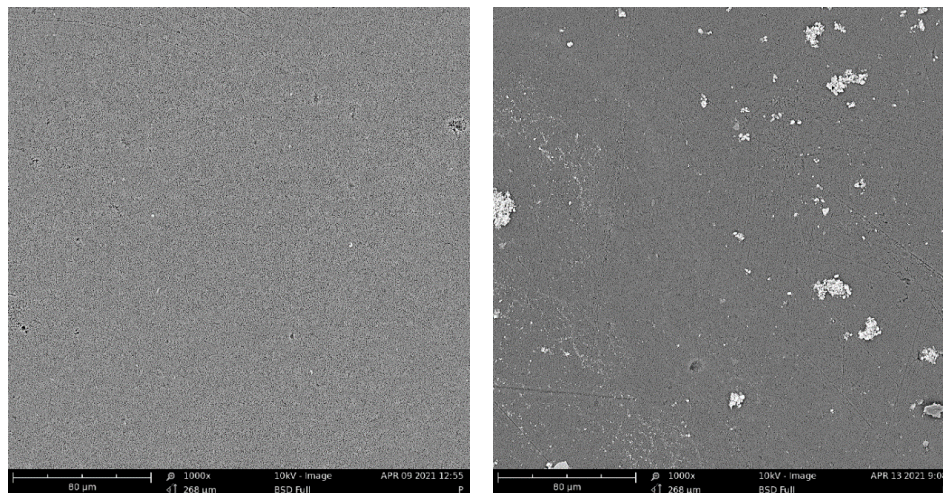
U neočištěných vzorků jde kromě výrazných nečistot vidět i jejich povrchová kolonizace mikroorganismy, která byla následně sledována pomocí fluorescenční mikroskopie.



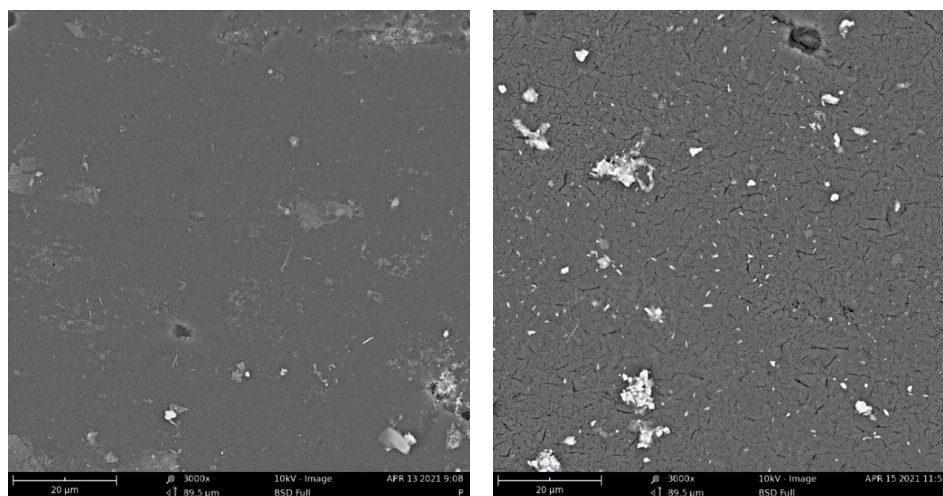
Obrázek 30: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



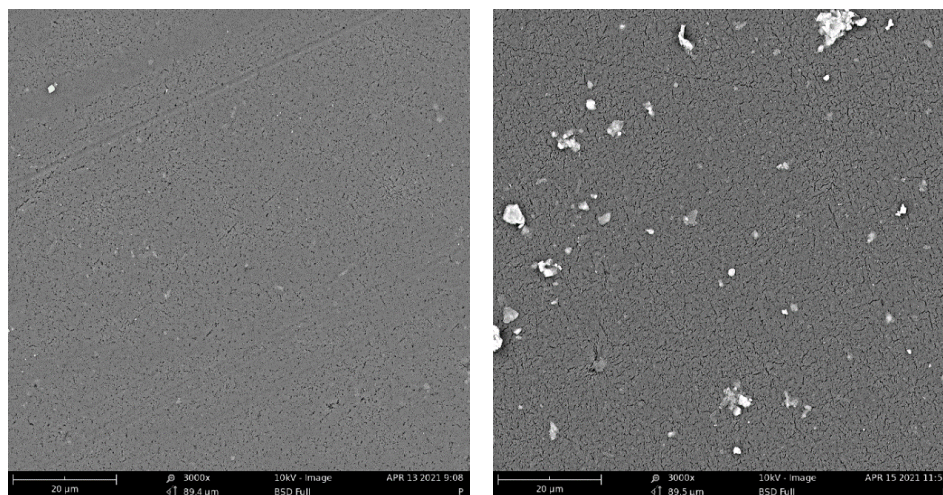
Obrázek 31: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + T 5% 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



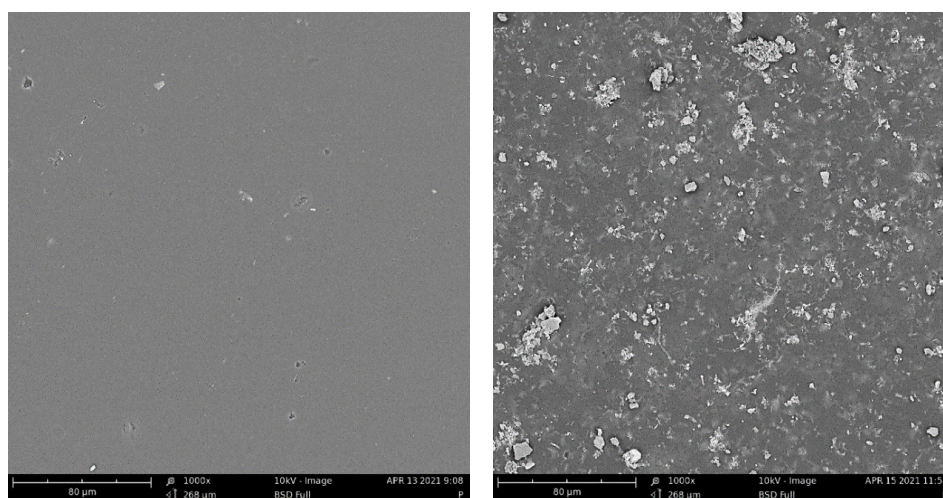
Obrázek 32: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 %
1 (vlevo) a 2 (vpravo).



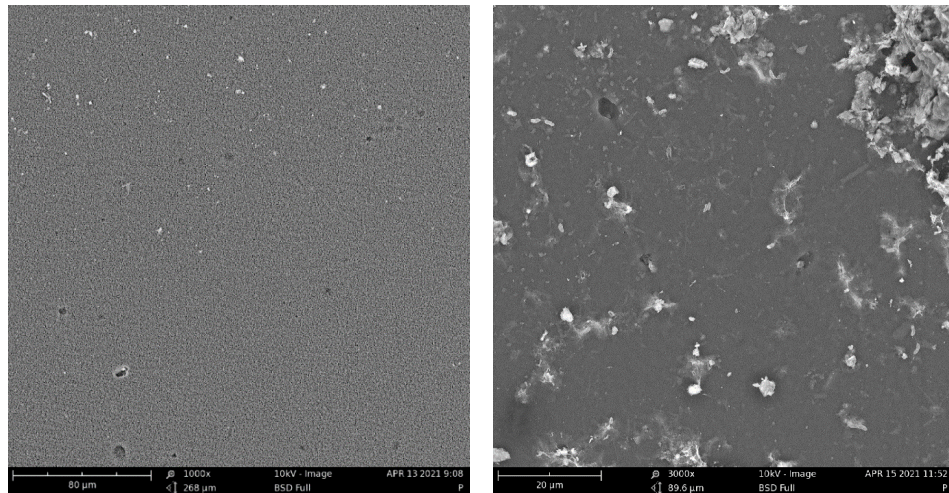
Obrázek 33: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % +
T 0,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



Obrázek 34: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 2,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



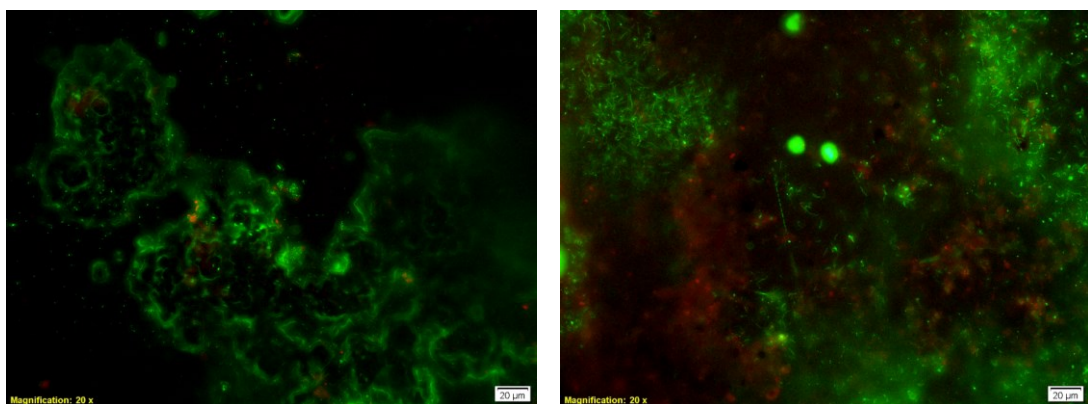
Obrázek 35: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 5 % T 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



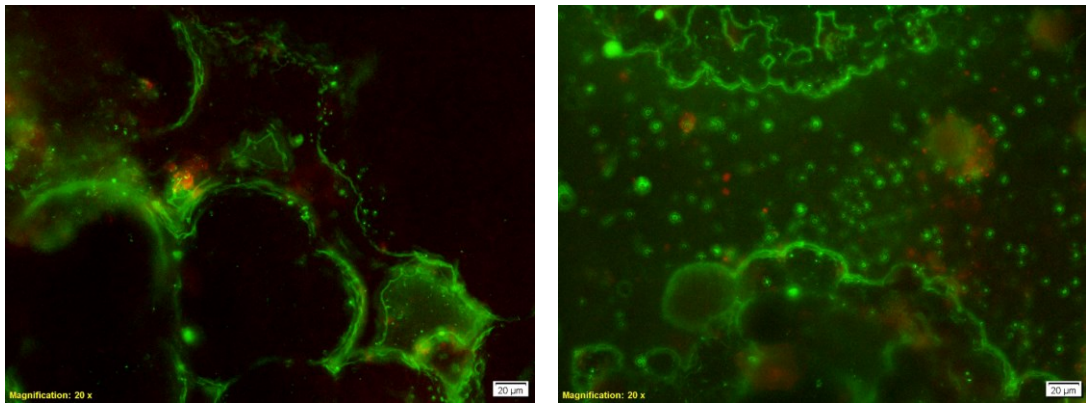
Obrázek 36: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 10 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).

Fluorescenční mikroskopie

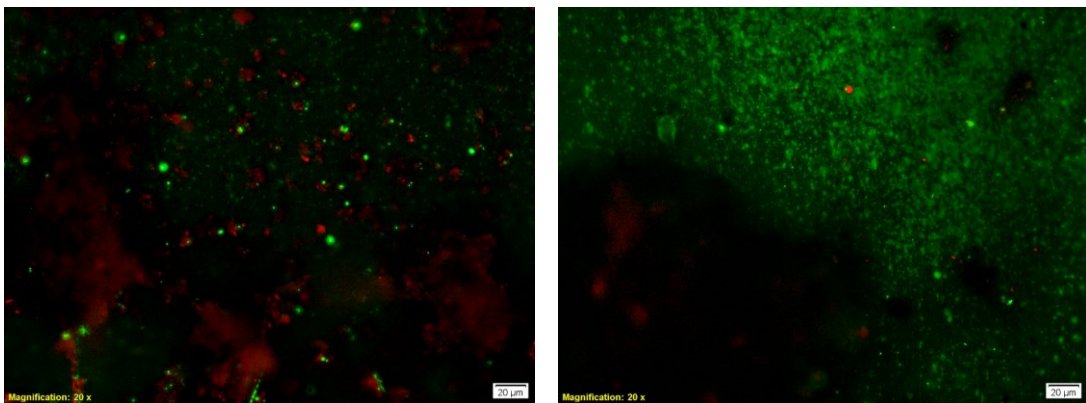
Po ukončení zkušebního testu na biologickou rozložitelnost, byly pevné zkušební materiály analyzovány pomocí optické metody FM. Pozorování proběhlo na fluorescenčním mikroskopu Olympus BX53. Níže pořízené snímky (obrázky 37 - 43) jsou 20 x zvětšeny a jejich označení (1 a 2) udává číslo pořadového měření. Zelená barva znázorňuje živé mikrobiální osídlení na povrchu zkušebního materiálu, červená barva charakterizuje již mrtvé mikroorganismy.



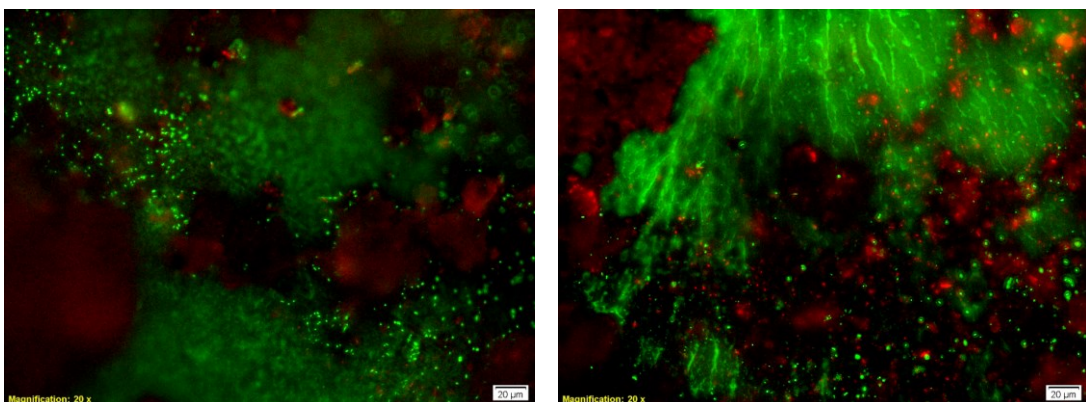
Obrázek 37: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



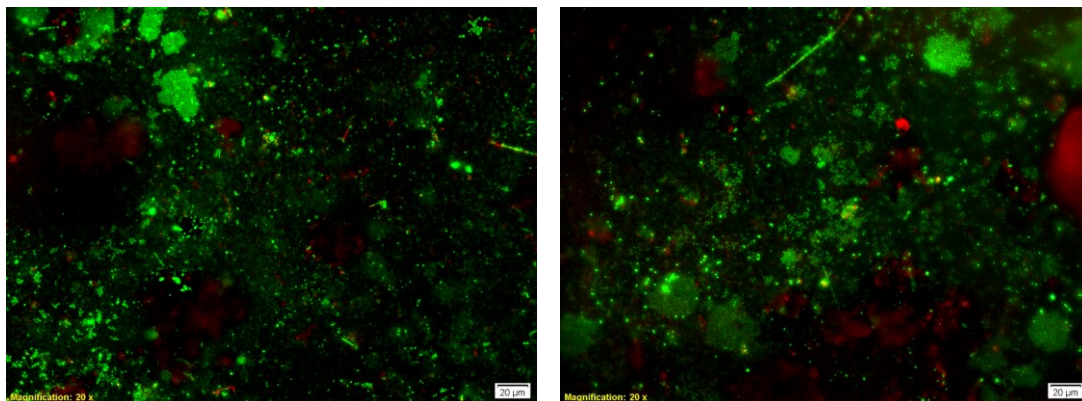
Obrázek 38: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + 5 % T 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



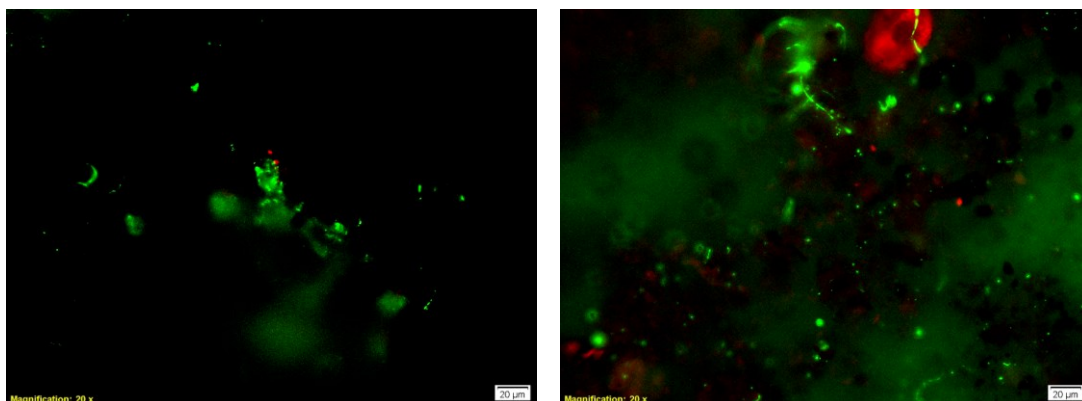
Obrázek 39: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



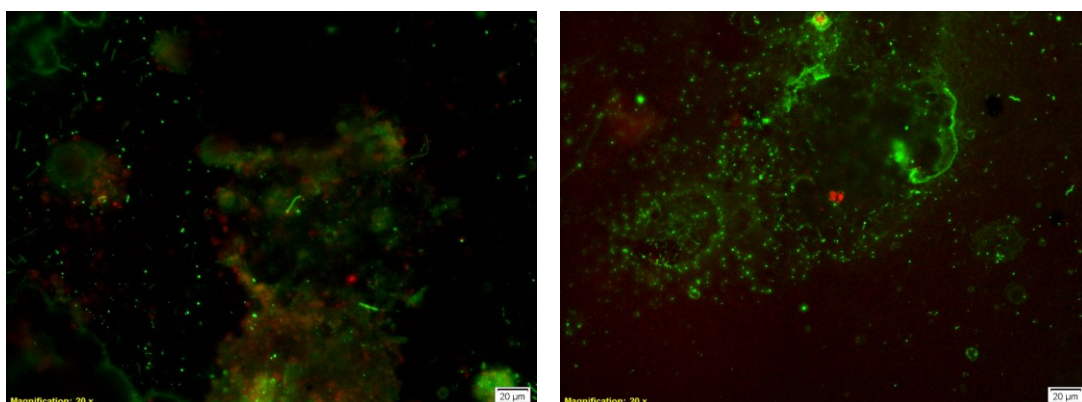
Obrázek 40: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % + L 0,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



Obrázek 41: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 2,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



Obrázek 42: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).



Obrázek 43: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 10 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).

Po zhodnocení fotografií z FM lze říci, že u materiálů PLA + M 20 % + L 0,5 % a PLA + M + L + T 2,5 % (obrázky 40 a 41) došlo k nejvýraznější povrchové kolonizaci vzorků mikroorganismy, což vypovídá i o jejich dobré biodegradabilitě. Přítomnost aditiv M, L i T

v určitém poměru ve směsi s PLA, měla tak pozitivní účinek na zvýšení mikrobiálního osídlení v porovnání se vzorkem čisté PLA (obrázek 37).

9.2.3 Modifikovaný Zahn-Wellens test

Hodnocení zkušebních materiálů v průběhu stanovení biologické rozložitelnosti proběhlo také dle modifikovaného Zahn-Wellens testu.

Počátek testu: 12. 10. 2020

2. odběr: 13. 2. 2021

1. odběr: 7. 12. 2020

3. odběr: 7. 4. 2021

V tabulce 10 jsou zaznamenány koncentrace rozpuštěného kyslíku a hodnoty pH ve vodném médiu, které byly v průběhu Zahn-Wellensova testu monitorovány. Za účelem udržení aerobních podmínek, stejně jako u zkušebního testu s uzavřeným respirometrickým systémem, byla zkoušená sestava každé dva měsíce 20 minut provzdušňována. Výrazný pokles rozpuštěného kyslíku byl zaregistrován po 3. odběru u směsí: PLA + M 20 %; PLA + M 20 % + L 0,5 % a PLA + M + L + T 2,5 %, i přesto byly dodrženy aerobní podmínky. Během testu mezi 120 a 164 dnem byl registrován vysoký nárůst BSK hodnot, a proto došlo i k rychlejšímu úbytku koncentrace rozpuštěného kyslíku v médiu.

Naměřená počáteční hodnota pH ve zkušebním médiu byla 8,4.

Tabulka 10: Zahn-Wellens test – naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH ve vodné fázi zkušebního média.

Vzorek	O ₂ [mg/l]			pH		
	1. odběr (57 dnů)	2. odběr (126 dnů)	3. odběr (179 dnů)	1. odběr (57 dnů)	2. odběr (126 dnů)	3. odběr (179 dnů)
PLA	6,45	6,04	6,26	7,05	7,20	7,14
PLA + T 5 %	6,15	6,45	6,87	7,59	8,16	7,68
PLA + M 20 %	6,36	6,58	4,16	7,81	7,79	7,14
PLA + M 20 % + L 0,5 %	6,61	6,87	4,24	7,91	8,25	7,42
PLA + M + L + T 2,5 %	6,66	6,49	4,85	7,99	7,50	7,41
PLA + M + L + T 5 %	6,64	6,37	6,55	8,04	7,71	7,48
PLA + M + L + T 10 %	6,69	6,80	6,97	8,08	8,18	8,07

Následující tabulka 11 obsahuje procentuální hmotnostní úbytky zkušebních materiálů z jednotlivých odběrů. Výrazné hmotnostní úbytky byly zaznamenány ve směsích s nejvyšším procentuálním zastoupením všech testovaných aditiv M, L i T (PLA + M + L + T 5 % a PLA + M + L + T 10 %), naopak nejnižší hmotnostní úbytek byl naměřen u pomalu biodegradovatelného vzorku PLA, který po 164 dnech z výchozí hmotnosti ubyl o 4,2 %.

Tabulka 11: Zahn-Wellens test – procentuální hmotnostní úbytky zkušebních materiálů v průběhu zkoušky.

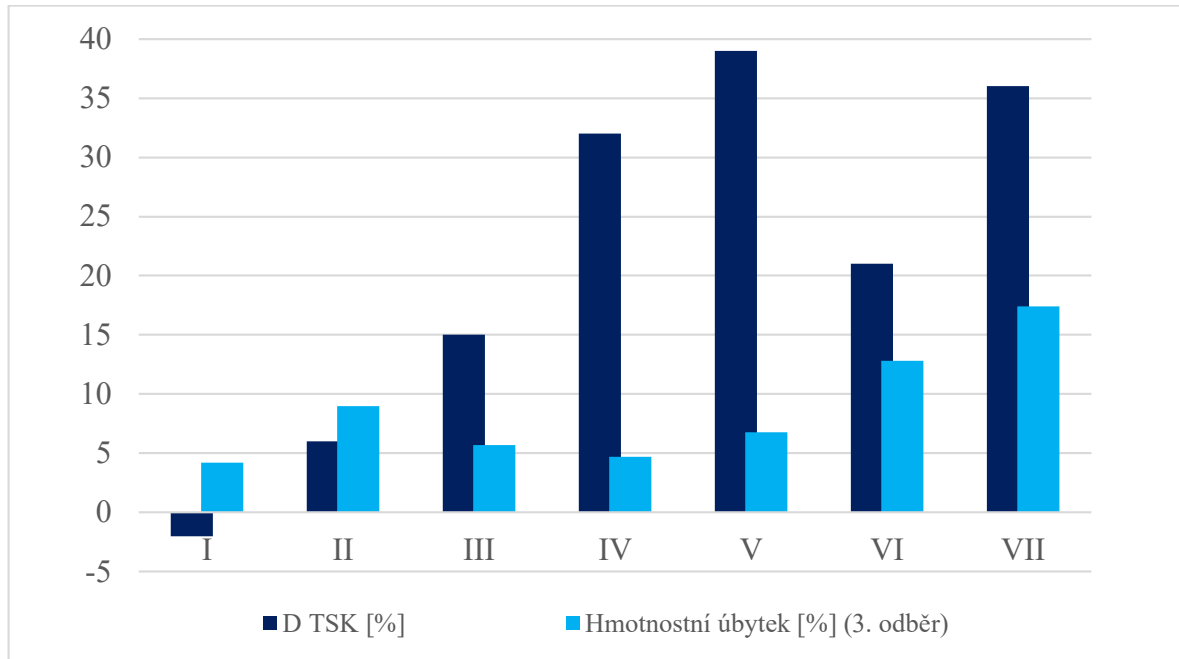
Vzorek	HMOTNOSTNÍ ÚBYTEK [%]		
	1. odběr (57 dnů)	2. odběr (126 dnů)	3. odběr (179 dnů)
PLA	0,2	0,9	4,2
PLA + T 5 %	0,5	8,9	9,0
PLA + M 20 %	4,5	5,5	5,7
PLA + M 20 % + L 0,5 %	4,3	4,4	4,7
PLA + M + L + T 2,5 %	5,7	6,6	6,8
PLA + M + L + T 5 %	11,9	12,2	12,8
PLA + M + L + T 10 %	12,2	17,1	17,4

Legenda k obrázkům 44 a 45:

- I PLA
- II PLA + T 5 %
- III PLA + M 20 %
- IV PLA + M 20 % + L 0,5 %
- V PLA + M + L + T 2,5 %
- VI PLA + M + L + T 5 %
- VII PLA + M + L + T 10 %

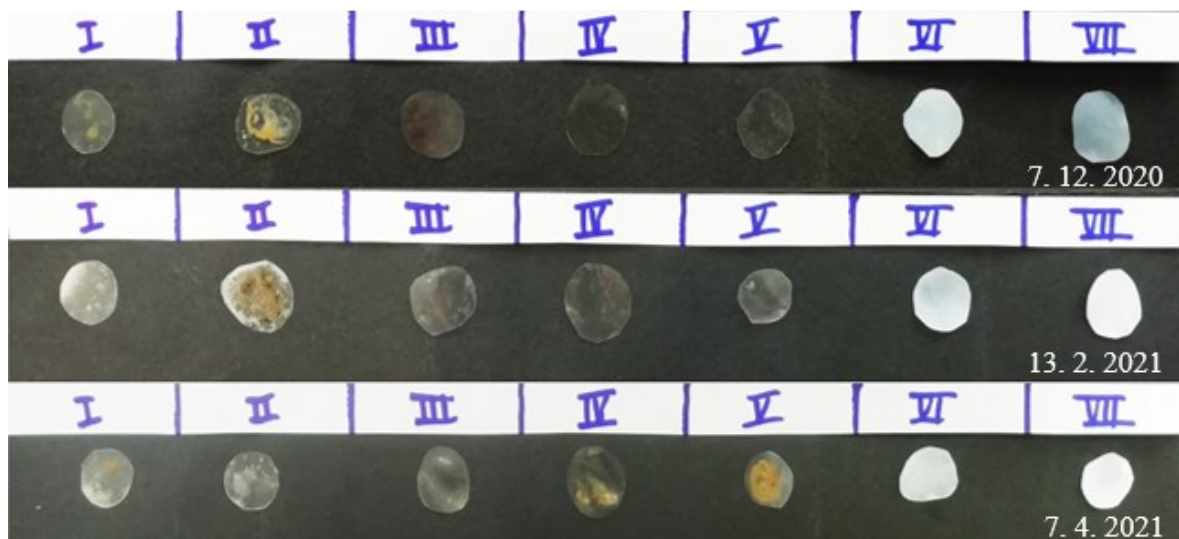
Na obrázku 44 je uvedena závislost procentuální biologické degradace (po 164 dnech) ve srovnání s hmotnostními úbytky (po 179 dnech) u jednotlivých zkušebních materiálů. Dle úsudku byla očekávána určitá korelace mezi hodnotami hmotnostních úbytků s biodegradabilitou materiálů hodnocenou dle BSK/TSK, avšak ze získaných dat vyplývá, že u materiálů PLA (I); PLA + M 20 % (III); PLA + M 20 % + L 0,5 % (IV); PLA + M + L + T 2,5 % (V) a PLA + M + L + T 10 % (VII) nebyla zaznamenána korespondující závislost hmotnostních

úbytků (světle modré sloupce) s jejich procentuální biologickou rozložitelností (tmavomodré sloupce) a vzorky vykazovaly značný nepoměr oproti materiálům PLA + T 5 % (II) a PLA + M + L + T 5 % (VI).



Obrázek 44: Srovnání konečné biodegradace zkušebních materiálů (po 164 dnech) s jejich hmotnostními úbytky na konci Zahn-Wellensova testu (po 179 dnech).

Na níže doloženém obrázku 45 jsou zaznamenány fotografie z vizuálního hodnocení průběhu biologické rozložitelnosti jednotlivých zkušebních materiálů.



Obrázek 45: Modifikovaný Zahn-Wellens test – průběžné vizuální pozorování biologicky degradovaných zkušebních materiálů.

U odebraných zkušebních materiálů byly již po prvním odběru stanovení biologické rozložitelnosti, zaznamenány viditelné změny v barvě i struktuře (obrázek 45). Výraznou změnu barvy lze zaznamenat u směsí PLA + M + L + T 5 % a PLA + M + L + T 10 % (VI, VII). Obsažená aditiva M a L ve zmíněných směsích byla rychleji biologicky odbourána, což způsobilo migraci plnidla T (pevné částice - pyrogenní oxid křemičitý) k povrchu materiálu a tudíž i jeho barevnou změnu v podobě celoplošného mléčného zbarvení. Dle FM na těchto vzorcích nedocházelo k vysoké povrchové kolonizaci mikroorganismů oproti ostatním směsím. Vzorek PLA + M + L + T 10 % (VII) vykazoval i výraznou křehkost ve formě snadného rozlomení, které bylo otestováno na konci stanovení, a dle analýzy SEM byly odhaleny celoplošné mikrotrhliny na jeho povrchu.

Naopak vzorky PLA + M 20 % + L 0,5 % a PLA + M + L + T 2,5 % (IV, V) vykazovaly dle FM vysoké mikrobiální oživení, ale podle vizuální kontroly u nich při prvním odběru nebyla zaznamenána skoro žádná barevná změna. Při druhém odběru byly vzorky nesourodě mléčně zbarveny - u vzorku PLA + M 20 % + L 0,5 % (IV) velmi minimálně, výraznější změna byla zaznamenána u vzorku PLA + M + L + T 2,5 % (V), protože navíc obsahoval 2,5 % plnidla T ve směsi. Při jejich třetím odběru byly na povrchu obou materiálů zaznamenány i nahnědlé skvrny, které by mohly být způsobeny (na základě FM) výraznější povrchovou kolonizací mikroorganismů, a opět tato viditelná barevná změna byla zřetelněji zaznamenána u vzorku PLA + M + L + T 2,5 % (V), který byl i dle stanovení biologické rozložitelnosti, vyhodnocen za nejlépe biodegradovatelný materiál ze všech testovaných směsí ($D_{TSK} \text{ PLA + M + L + T 2,5 \%} = 39 \%$). Po analýze SEM u tohoto vzorku (V) byly zaznamenány i povrchové změny v podobě drobných trhlin a prasklin, které nebyly odhaleny u pouhé vizuální kontroly.

Stejně nahnědlé skvrny i nesourodé mléčné zbarvení bylo objeveno také u vzorku PLA + T 5 % (II), který taktéž vykazoval vyšší mikrobiální kolonizaci vzorku v porovnání s celkovou analýzou z FM všech testovaných materiálů. Při vizuálním hodnocení vzorku PLA + T 5 % (II) byly zaznamenány nejvýraznější povrchové změny v podobě zdrsňeného povrchu, avšak tento fakt je v nesouladu s výsledkem z analýzy SEM. Zdrsňený povrch tak mohl být způsoben přítomností mikro nečistot, které ulpěly na povrchu materiálu z důvodu jejich špatné odstranitelnosti.

U vzorku PLA + M 20 % (III) nebyly zaznamenány výraznější změny barvy, jen minimální nesourodé mírně mléčné zbarvení, které mohlo být způsobeno degradací PLA materiálu a aditiva M. Mikrobiální oživení bylo srovnatelné se vzorky PLA + M + L + T 5 % a PLA +

M + L + T 10 % (VI, VII), a pravděpodobně proto (na základě FM) nebyly vizuálně zaznamenány viditelné nahnědlé skvrny na jeho povrchu. Materiál na konci stanovení vykazoval podobnou křehkost jako vzorek PLA + M + L + T 10 % (VII) a podle analýzy SEM, byly u vzorku PLA + M 20 % (III) zaznamenány i povrchové změny v podobě celoplošných mikrotrhlin.

Vzorek PLA (I) vykazoval podobné barevné změny jako vzorek PLA + M 20 % (III), avšak u čistého PLA byly zaznamenány i malé nevýrazné nahnědlé skvrny, což poukázalo na zastoupení povrchové kolonizace vzorku mikroorganismy, jež potvrdily i snímky z pořízené FM analýzy.

Pro detailní výsledky o degračním mechanismu zkušebních materiálů bylo provedeno následné stanovení FTIR (obrázky: 47, 49, 51, 53, 55, 57 a 59). Z pořízených záznamů lze vyzorovat, že nejznatelnější změny ve struktuře materiálu, dle poklesu sledovaného maxima při vlnočtu 1750 cm^{-1} , byly naměřeny u nejlépe biodegradovatelných směsí PLA + M + L + T 2,5 % (V), PLA + M + L + T 10 % (VII) a PLA + M 20 % + L 0,5 % (IV). Výsledná spektra jsou doložena v příloze této práce.

ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo aplikovat zkušební metodiku mezinárodní normy ISO 19679 na říční sedimentární oblast a vyhodnotit vliv aditiv na biologickou rozložitelnost PLA pomocí kvantitativní metody biologické spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru. Celkem bylo testováno 7 vzorků – čistá PLA a 6 směsí PLA s různou koncentrací a typem plniv. Na základě screeningových testů byla provedena vhodná volba a dávkování zkušebního média a poté zvolena optimální hmotnostní koncentrace referenčního a zkušebního materiálu. Metoda byla zakončena stanovením stupně biologického rozkladu u jednotlivých testovaných vzorků.

Po vyhodnocení screeningových testů bylo zkušební médium z řeky Kopřivničky odebraného cca 1 km od pramene v Kopřivnici, vybráno za nejvhodnější z celkových tří testovaných médií. Objemový poměr média byl zvolen dle biologické spotřeby kyslíku, která byla přístrojem OxiTop®Control nejlépe detekovatelná při poměru 5 : 1. Jedná se o maximální možný použitý objemový poměr dle postupu zkoušky stanovené v normě. V souladu s normovanou metodou byla zvolena i odpovídající hmotnost zkušebního a referenčního materiálu s přibližnou testovací koncentrací 196 mg/l říční vody a sedimentu.

Po 164 dnech biodegradace čisté PLA byl zaznamenán pokles BSK až na hodnotu BSK/TSK -2 %. Bylo zjištěno, že kombinace testovaných aditiv M, L a T pozitivně ovlivnila rozklad PLA materiálu. Testovaná směs PLA + M + L + T 2,5 % dosáhla nejvyššího biologického rozkladu ze všech testovaných směsí (39 % po 164 dnech), avšak s vyšším procentuálním zastoupením plnidla T než 2,5 % ve směsi PLA + M + L, klesla biodegradabilita materiálu. Také bylo prokázáno, že 0,5% přírůstek aditiva L do směsi PLA + M 20 % přívčetně ovlivnil biodegradaci materiálu (PLA + M 20 % + L 0,5 %). Analýza FTIR prokázala, že u všech zkoušených PLA materiálů, došlo k degradačním změnám ve struktuře, a tedy i k poklesu sledovaného maxima při vlnočtu 1750 cm^{-1} . Největší pokles maxima při stanovení biologické rozložitelnosti nastal u nejlépe biodegradovatelné směsi PLA + M + L + T 2,5 %. Kombinace aditiv M, L i T v určitém poměru, tak byla vyhodnocena jako účinná pro biologický rozklad PLA materiálu. Dále bylo potvrzeno, že abiotický rozklad, při inkubační teplotě 25 °C, neměl skoro žádný vliv na rozložitelnost testovaných směsí.

Během stanovení stupně biologické rozložitelnosti byly zaznamenány poklesy procentuálních biologicky rozložitelných hodnot do 60. dne stanovení nejen u testovaných vzorků PLA, ale také u referenčního materiálu, a zkouška si tak žádá částečné upravení metodiky.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- ¹ Xiang Qi, Yiwei Ren, Xingzu Wang, *New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2017, ISSN 0964-8305, [cit. 2021-01-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830517300100>
- ² Aamer Ali Shah, Fariha Hasan, Abdul Hameed, Safia Ahmed, *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*, Biotechnology Advances, 2008, ISSN 0734-9750, [cit. 2021-01-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975008000141>
- ³ Atsuyoshi Nakayama, Naoko Yamano, Norioki Kawasaki, *Biodegradation in seawater of aliphatic polyesters*, Polymer Degradation and Stability, 2019, ISSN 0141-3910, [cit. 2021-03-22]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391019302071>
- ⁴ Samuel J. Huang, *21 - Biodegradation*, Comprehensive Polymer Science and Supplements, 1989, ISBN 9780080967011, [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080967011002019>
- ⁵ Ji-Dong Gu, *Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances*, International Biodeterioration & Biodegradation, 2003, ISSN 0964-8305, [cit. 2021-03-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0964830502001774>
- ⁶ Novotný Č.: Biodegradace a biotechnologie. Vyd. 1., Ostrava: Ostravská univerzita, 2005. 96 s. ISBN: 80-7368-096-3
- ⁷ Tae Gwan Park, *Degradation of poly(d,l-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight*, Journal of Controlled Release, 1994, ISSN 0168-3659, [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0168365994902631>
- ⁸ Friederike von Burkersroda, Luise Schedl, Achim Göpferich, *Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion*, Biomaterials, 2002, ISSN 0142-9612, [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961202001709>
- ⁹ Biodegradable plastics developments and environmental impacts / prepared by Nolan-ITU Pty Ltd in association with ExcelPlas Australia. [online]. Canberra, 2002, [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: [http://www.europeanplasticfilms.eu/docs/AustralianReportonBiodegradablePlasti cs.pdf](http://www.europeanplasticfilms.eu/docs/AustralianReportonBiodegradablePlasti%20cs.pdf)

¹⁰ Ducháček V.: *Polymery - výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 2. vyd. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 2006. ISBN 80-7080-617-6

¹¹ S. Agarwal, 5.15 - *Biodegradable Polyesters*, Polymer Science: A Comprehensive Reference, 2012, ISBN 9780080878621, [cit. 2021-03-26]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044453349400145X>

¹²Antonio Greco, Francesca Ferrari, Alfonso Maffezzoli, *Mechanical properties of poly(lactid acid) plasticized by cardanol derivatives*, Polymer Degradation and Stability, 2019, ISSN 0141-3910, [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391018303847>

¹³ Strukturní vzorec PLA. In: www.researchgate.net [online]. [cit. 2020-03-14]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/figure/Atomic-chemical-structure-of-poly\(lactic-acid-PLA-and-its-monomer-L-lactide-and_fig3_327223950](https://www.researchgate.net/figure/Atomic-chemical-structure-of-poly(lactic-acid-PLA-and-its-monomer-L-lactide-and_fig3_327223950)

¹⁴ Polylactic acid, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online], 2021. [cit. 2021-03-27]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polylactic_acid

¹⁵ Lucie Husárová, Silvie Pekařová, Petr Stloukal a spol., *Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid)*, International Journal of Biological Macromolecules, 2014, ISSN 0141-8130, [cit. 2021-01-24]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813014002773>

¹⁶ Kai Zhang, Amir Hossein Hamidian, Aleksandra Tubić a spol., *Understanding plastic degradation and microplastic formation in the environment: A review*, Environmental Pollution, 2021, ISSN 0269-7491, [cit. 2021-01-29]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121001329>

¹⁷ S. Belbachir a kol., *Modelling of photodegradation effect on elastic–viscoplastic behaviour of amorphous polylactic acid films*, Journal of the Mechanics and Physics of Solids, 2010, ISSN 0022-5096, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022509609001410>

¹⁸ JANORKAR, Amol V., Andrew T. METTERS a Douglas E. HIRT, 2007. *Degradation of poly(L-lactide) films under ultraviolet-induced photografting and sterilization conditions* [online]. [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://online-library.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.24692>

- ¹⁹ Francesca Signori a kol., *Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing*, Polymer Degradation and Stability, 2009, ISSN 0141-3910, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391008003194>
- ²⁰ Ram Krishna Upadhyay, Ashish Kumar Mishra, Arvind Kumar, *Mechanical Degradation of 3D Printed PLA in Simulated Marine Environment*, 2020, ISSN 2468-0230, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468023020307707>
- ²¹ Mehlika Karamanlioglu, Richard Preziosi, Geoffrey D. Robson, *Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review*, Polymer Degradation and Stability, 2017, ISSN 0141-3910, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391017300095>
- ²² Jae Hwan Jung, Moonhor Ree, Heesoo Kim, *Acid- and base-catalyzed hydrolyses of aliphatic polycarbonates and polyesters*, 2006, ISSN 0920-5861, [cit. 2021-03-19]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920586106001465>
- ²³ Selene Chinaglia, Maurizio Tosin, Francesco Degli-Innocenti, *Biodegradation rate of biodegradable plastics at molecular level*, Polymer Degradation and Stability, 2018, ISSN 0141-3910, [cit. 2021-01-31]. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141391017303816>
- ²⁴ S. Mehdi Emadian, Turgut T. Onay, Burak Demirel, *Biodegradation of bioplastics in natural environments*, Waste Management, 2017, ISSN 0956-053X, [cit. 2021-03-23]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X1630561X>
- ²⁵ MISTRITIS, Antonis a Demetrios BRIASSOULIS, 2014. *Review of Standard Testing methods and specifications for measuring biodegradation of bio-based materials in fresh water*. Proceedings International Conference of Agricultural Engineering [online]. [cit. 2021-02-16]. Dostupné z: <http://www.geyseco.es/geystiona/adjs/comunicaciones/304/C06710001.pdf>
- ²⁶ DŘÍMAL, Pavel a Jaromír HOFFMANN. *Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí*. Chemické listy [online]. 2008, ISSN 1213-7103, [cit. 2021-04-22]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/common/article-vol_102-issue_2-page_139.html.

- ²⁷ ISO 18830: *Plastics — Determination of aerobic biodegradation of non-floating plastic materials in a seawater/sandy sediment interface — Method by measuring the oxygen demand in closed respirometer*. 2016. European Standards.
- ²⁸ ISO 14851: *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer*. 2019. European Standards.
- ²⁹ ISO 14852: *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium — Method by analysis of evolved carbon dioxide*. 2018. European Standards.
- ³⁰ ISO 14855-2: *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 2: Gravimetric measurement of carbon dioxide evolved in a laboratory-scale test*, 2018. European Standards.
- ³¹ 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*, 2019. European Standards.
- ³² ISO 9887: *Water quality — Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds in an aqueous medium — Semi-continuous activated sludge method (SCAS)*. 1992. European Standards.
- ³³ ISO 9888: *Water quality — Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium — Static test (Zahn-Wellens method)*, 1999. European Standards.
- ³⁴ J. P. Eubeler, M. Bernhard, S. Zok, T. P. Knepper. *Environmental biodegradation of synthetic polymers I. Test methodologies and procedures*, Elsevier Eltd., 2009.
- ³⁵ ČSN EN ISO 19679: *Plastics - Determination of aerobic biodegradation of non-floating plastic materials in a seawater / sediment interface : Method by analysis of evolved carbon dioxide*, 2016. Brussels: CEN.
- ³⁶ D. Briassoulis, A. Pikasi, N.G. Papardaki, A. Mistriotis, *Aerobic biodegradation of bio-based plastics in the seawater/sediment interface (sublittoral) marine environment of the coastal zone – Test method under controlled laboratory conditions*, Science of The Total

Environment, 2020, 137748, ISSN 0048-9697. [cit. 2021-01-06]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137748>

³⁷ Polylactic acid applications, In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online], 2001. [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: https://en.wikipedia.org/wiki/Polylactic_acid#Applications

³⁸ Poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate. *MERCK. Darmstadt* [online]. Germany [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/polyethyleneglycolmethylethermethacrylate123452691572011?lang=en&ion=CZ>

³⁹ Luperox® 101, 2,5-Bis(tert-butylperoxy)-2,5-dimethylhexane. *MERCK. Darmstadt* [online]. Germany [cit. 2021-03-03]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/388092?lang=en&ion=CZ>

⁴⁰ BARTUŇKOVÁ, Michaela, 2015. *Biodegradace materiálů na bázi kyseliny polyléčné v aerobním a anaerobním vodném prostředí*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati.

⁴¹ HOLINKA, Radim, 2014. *Posouzení biodegradability PLA filmů s aditivou upravujícími jejich senzitivitu k hydrolyze*. Zlín. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati.

⁴² Instruction Manual Total Organic Carbon Analyzer Model TOC – 5000 A.

⁴³ [www.google.com/maps](https://www.google.com/maps/place/49%C2%B013'39.3%22N+17%C2%B039'37.1%22E/@49.2275993,17.6593481,225m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.227577!4d17.660303) [online]. [cit. 2021-01-24]. Dostupné z: <https://www.google.cz/maps/place/49%C2%B013'39.3%22N+17%C2%B039'37.1%22E/@49.2275993,17.6593481,225m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.227577!4d17.660303>

⁴⁴ [www.google.com/maps](https://www.google.com/maps/place/49%C2%B035'10.6%22N+18%C2%B009'17.4%22E/@49.586269,18.152631,374m/data=!3m2!1e3!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.586269!4d18.154825) [online]. [cit. 2021-01-24]. Dostupné z: <https://www.google.cz/maps/place/49%C2%B035'10.6%22N+18%C2%B009'17.4%22E/@49.586269,18.152631,374m/data=!3m2!1e3!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.586269!4d18.154825>

⁴⁵ [www.google.com/maps](https://www.google.com/maps/place/49%C2%B035'20.0%22N+18%C2%B008'44.7%22E/@49.5888979,18.1451968,122m/data=!3m2!1e3!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.588897!4d18.145744) [online]. [cit. 2021-01-24]. Dostupné z: <https://www.google.com/maps/place/49%C2%B035'20.0%22N+18%C2%B008'44.7%22E/@49.5888979,18.1451968,122m/data=!3m2!1e3!4b1!4m5!3m4!1s0x0:0x0!8m2!3d49.588897!4d18.145744>

⁴⁶ *Elektronová mikroskopie* [online]. [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: http://triton.paru.cas.cz/old-lem/bak/1_1.htm

⁴⁷ KANIA, Patrik. *Infračervená spektrometrie* [online]. VŠCHT Praha [cit. 2021-4-29]. Dostupné z: <https://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infra%C4%8Derven%C3%A1+spektrometrie.pdf?redirected>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BSK	Biologická spotřeba kyslíku
FM	Fluorescenční mikroskopie
FTIR	Infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
M	Molární koncentrace
M_w	Molekulová hmotnost
PLA	Kyselina polymléčná
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
TC	Celkový uhlík
T_g	Teplota skelného přechodu
T_m	Teplota tání
TOC	Celkový organický uhlík
TSK	Teoretická spotřeba kyslíku
UV	Ultrafialové
V	Objem
ρ	Hustota

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma procesu biodegradace.	13
Obrázek 2: Strukturální vzorec PLA. ¹³	17
Obrázek 3: Způsoby syntézy PLA. ¹⁴	17
Obrázek 4: Schéma biochemických procesů při degradaci PLA.	21
Obrázek 5: Thermo Scientific HAAKE Minilab II Micro Compounder.	34
Obrázek 6: Vzorky po studeném lisování.	35
Obrázek 7: Vzorek vylisované fólie.	35
Obrázek 8: Test hydrolýzy - zkušební sestava.	38
Obrázek 9: Mapa odběrového místa 1. Řeka Dřevnice, Zlín. ⁴³	40
Obrázek 10: Odběrové místo 1 - řeka Dřevnice, Zlín.	40
Obrázek 11: Mapa odběrového místa 2. Pramen řeky Kopřivničky, Kopřivnice. ⁴⁴	41
Obrázek 12: Odběrové místo 2 - pramen řeky Kopřivničky, Kopřivnice.	41
Obrázek 13: Mapa odběrového místa 3. Řeka Kopřivnička, Kopřivnice. ⁴⁵	41
Obrázek 14: Odběrové místo 3 - Řeka Kopřivnička, Kopřivnice.	41
Obrázek 15: Zkušební sestava uzavřeného systému OxiTop®Control.	43
Obrázek 16: Detail rozhraní sediment/voda s diskem referenčního materiálu.	43
Obrázek 17: Průběh abiotické degradace zkušebních materiálů – stupeň hydrolýzy.	55
Obrázek 18: Stanovení hydrolýzy – průběžné vizuální pozorování abioticky degradovaných zkušebních materiálů.	56
Obrázek 19: Zkušební test – celková BSK pro referenční materiál.	58
Obrázek 20: Zkušební test – celková BSK pro PLA.	59
Obrázek 21: Zkušební test – celková BSK pro PLA + T 5 %.	59
Obrázek 22: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M 20 %.	59
Obrázek 23: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M 20 % + L 0,5 %.	59
Obrázek 24: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 2,5 %.	60
Obrázek 25: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 5 %.	60
Obrázek 26: Zkušební test – celková BSK pro PLA + M + L + T 10 %.	60
Obrázek 27: Zkušební test – celková BSK pro M + L.	60
Obrázek 28: Zkušební test – vypočítané hodnoty biologického rozkladu pro referenční materiál.	61
Obrázek 29: Zkušební test – vypočítané hodnoty biologického rozkladu pro zkušební PLA materiály.	62
Obrázek 30: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	65
Obrázek 31: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + T 5% 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	65

Obrázek 32: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	66
Obrázek 33: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % + T 0,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	66
Obrázek 34: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 2,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	67
Obrázek 35: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 5 % T 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	67
Obrázek 36: SEM - modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 10 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	68
Obrázek 37: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	68
Obrázek 38: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + 5 % T 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	69
Obrázek 39: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	69
Obrázek 40: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % + L 0,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	69
Obrázek 41: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 2,5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	70
Obrázek 42: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 5 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	70
Obrázek 43: FM – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + T 10 % 1 (vlevo) a 2 (vpravo).	70
Obrázek 44: Srovnání konečné biodegradace zkušebních materiálů (po 164 dnech) s jejich hmotnostními úbytky na konci Zahn-Wellensova testu (po 179 dnech).	73
Obrázek 45: Modifikovaný Zahn-Wellens test – průběžné vizuální pozorování biologicky degradovaných zkušebních materiálů.	73
Obrázek 46: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA	89
Obrázek 47: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA	89
Obrázek 48: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + T 5 %	90
Obrázek 49: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + T 5 %	90
Obrázek 50: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + M 20 %	91
Obrázek 51: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 %	91
Obrázek 52: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + M 20 % + L 0,5%	92
Obrázek 53: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % + L 0,5 %	92
Obrázek 54: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + M + L + 2,5 % T	93
Obrázek 55: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 2,5 %	93
Obrázek 56: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + M + L + 5 % T	94
Obrázek 57: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 5 %	94

Obrázek 58: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA + M + L + 10 % T	95
Obrázek 59: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 10 %.....	95

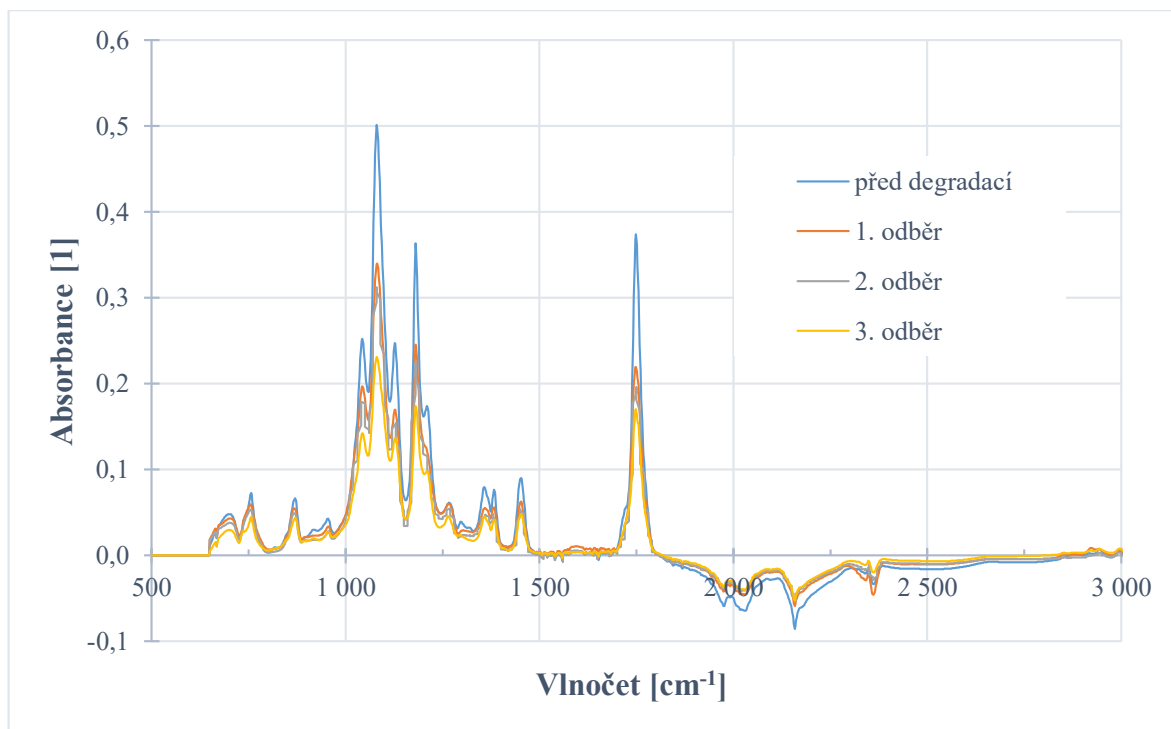
SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Biologická rozložitelnost PLA (fólie) v různých typech prostředí. ²⁴	22
Tabulka 2: Procentuální zastoupení aditiv ve směsi s PLA vztažené na celkovou navážku.	35
Tabulka 3: Test hydrolýzy - hmotnost testovaných materiálů ve skleněných láhvích.	37
Tabulka 4: Screeningová zkouška odběrového místa 3.....	45
Tabulka 5: Zkušební test – navážky sedimentu a testovaných materiálů.	45
Tabulka 6: Modifikovaný Zahn-Wellens test - navážky sedimentu a testovaných materiálů	46
Tabulka 7: Stanovení hydrolýzy – naměřené hodnoty TC v kapalném vzorku.....	52
Tabulka 8: Stanovení hydrolýzy – stanovený stupeň hydrolýzy u zkušebních materiálů (průměr ± směrodatná odchylka).	53
Tabulka 9: Stanovení hydrolýzy – procentuální hmotnostní úbytek zkušebních materiálů po 273 dnech (5. odběr).	54
Tabulka 10: Zahn-Wellens test – naměřené hodnoty koncentrace rozpuštěného kyslíku a pH ve vodné fázi zkušebního média.	71
Tabulka 11: Zahn-Wellens test – procentuální hmotnostní úbytky zkušebních materiálů v průběhu zkoušky.	72

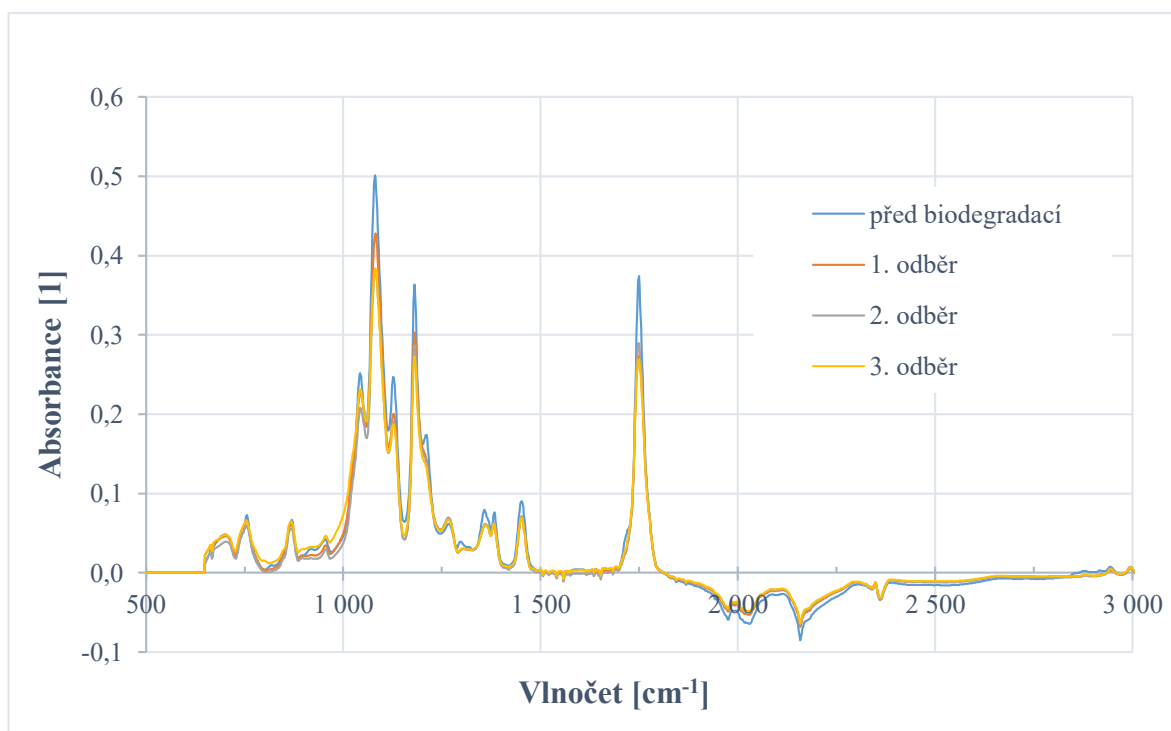
SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: FTIR

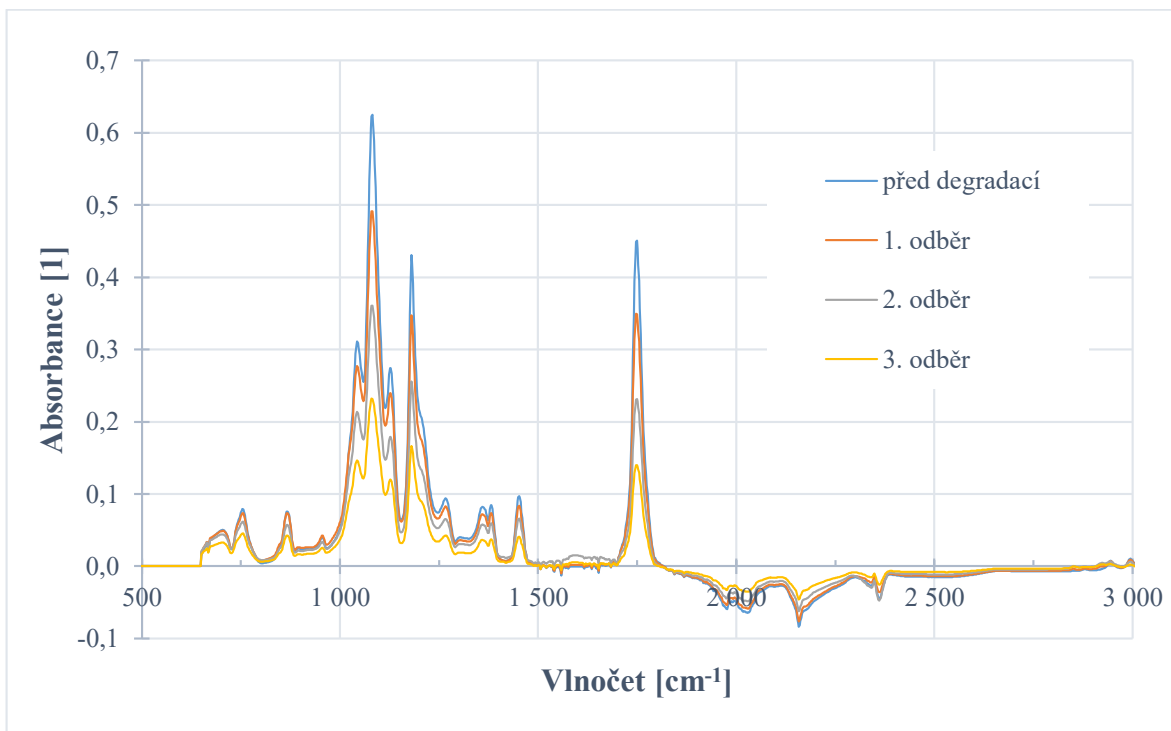
PŘÍLOHA I: FTIR



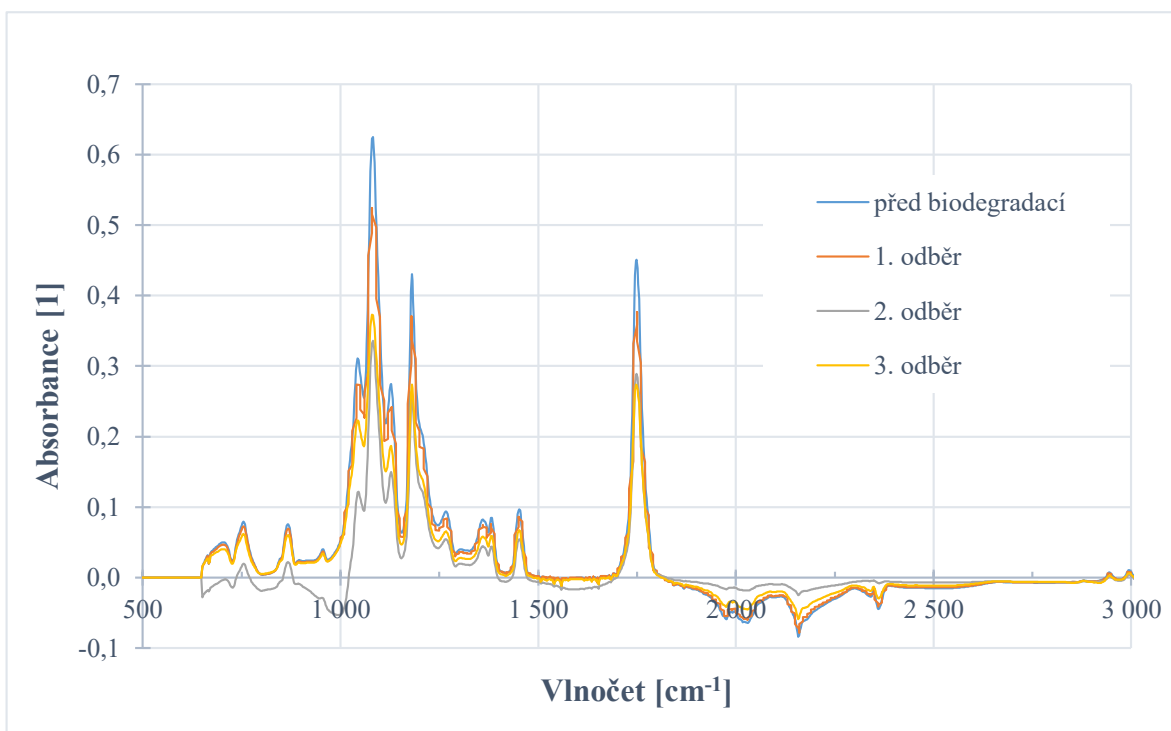
Obrázek 46: FTIR – stanovení hydrolýzy: PLA



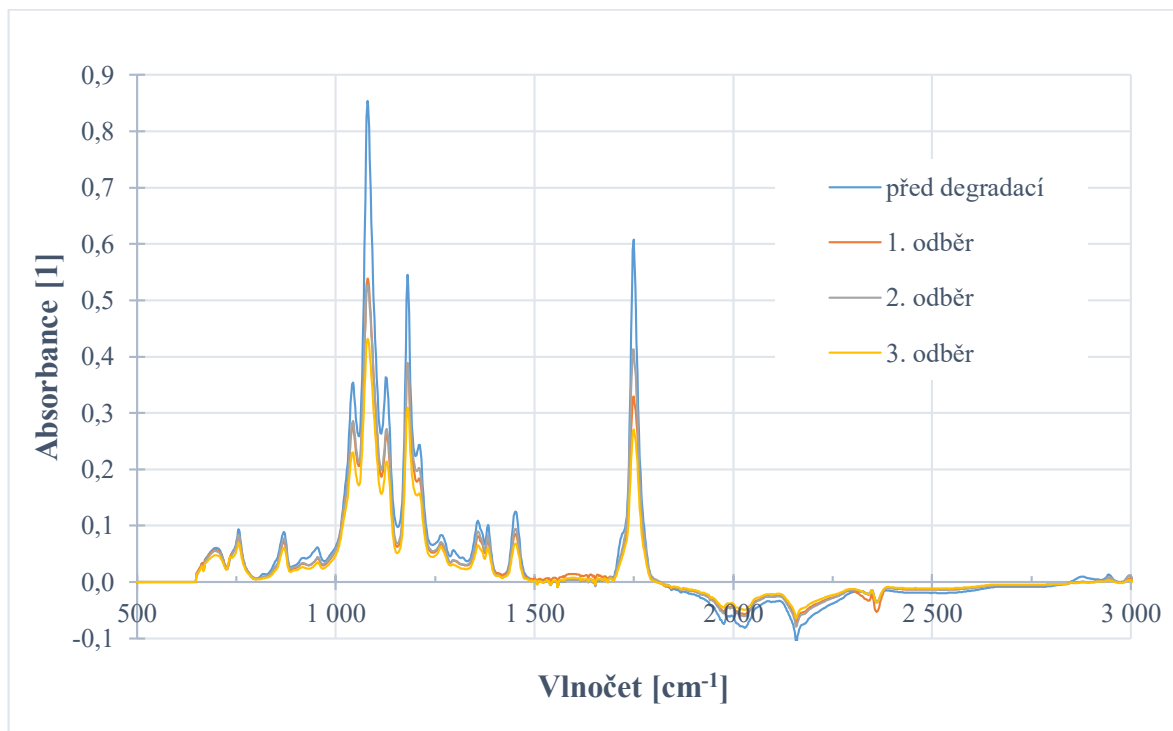
Obrázek 47: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA



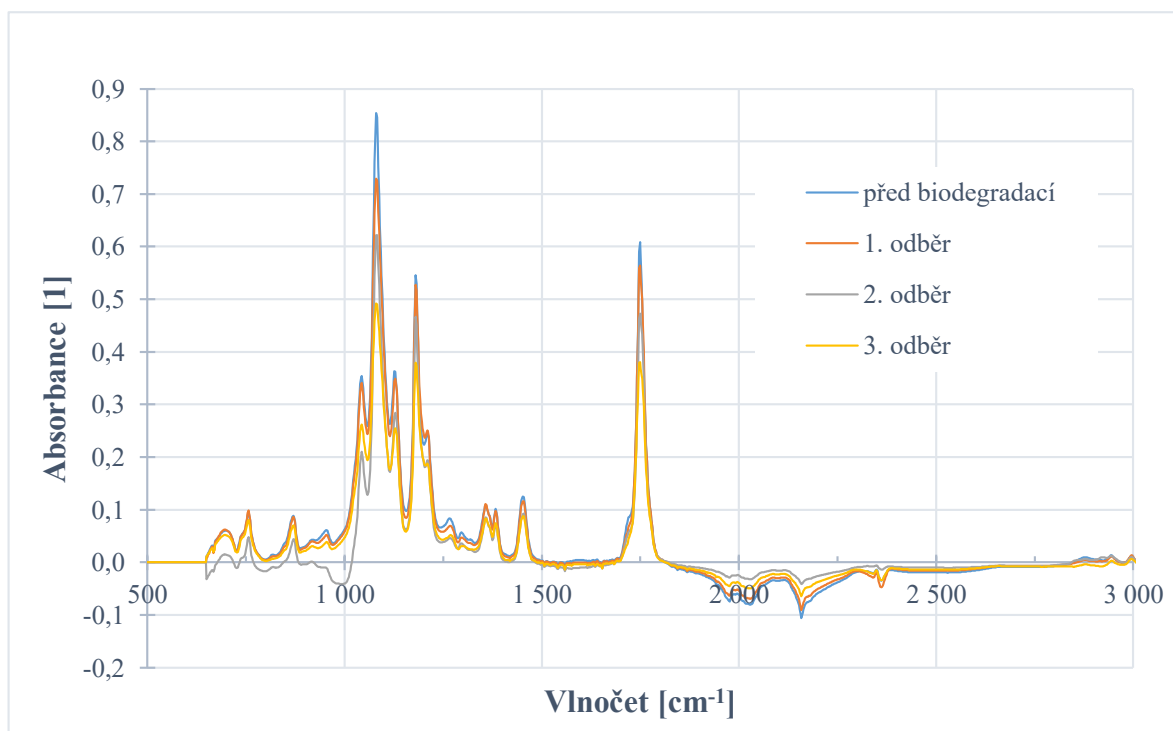
Obrázek 48: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + T 5 %



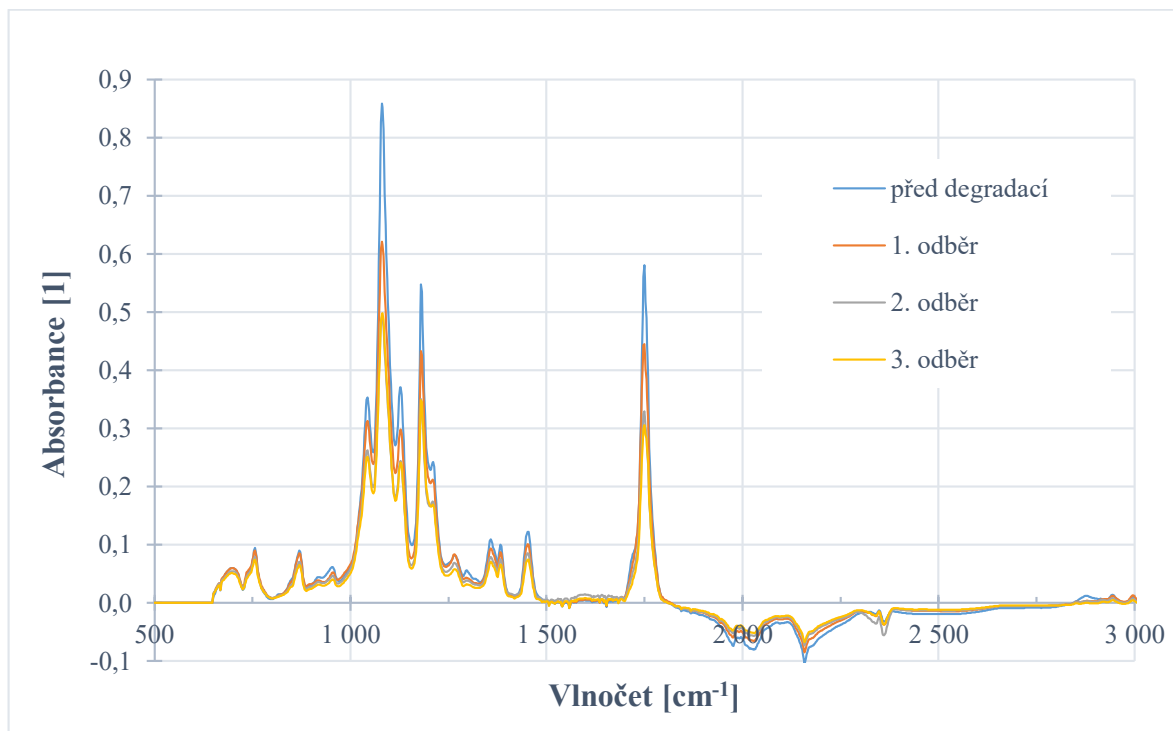
Obrázek 49: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + T 5 %



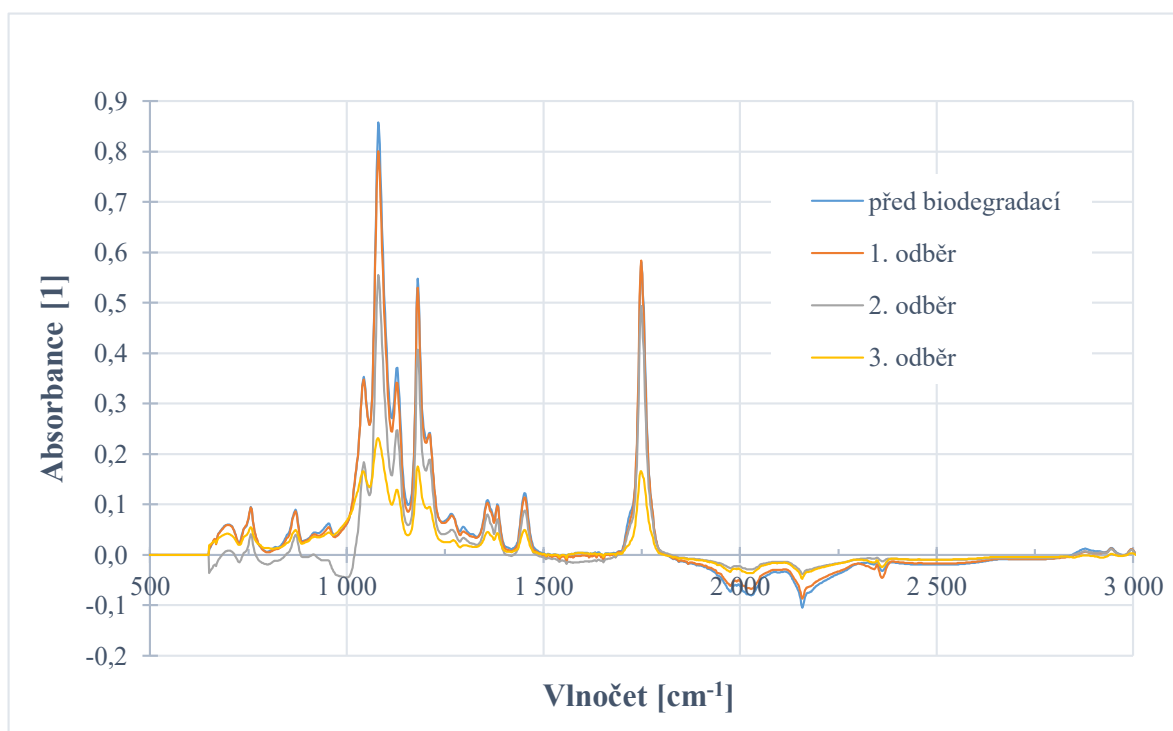
Obrázek 50: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + M 20 %



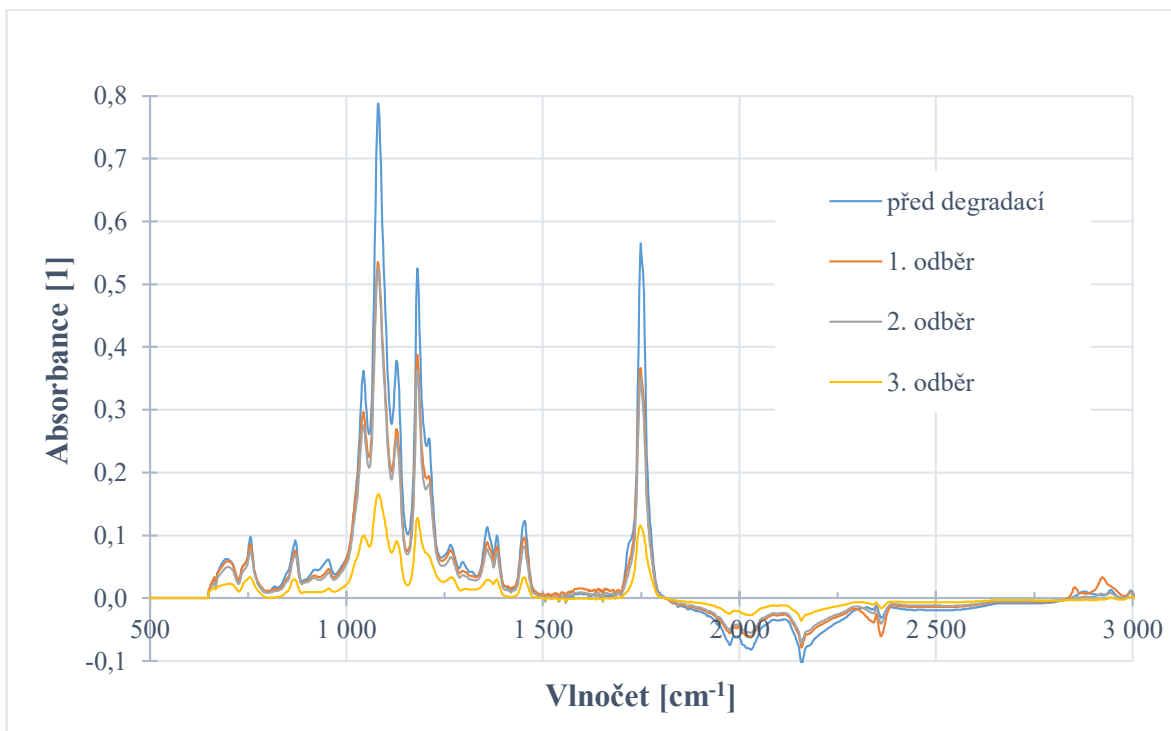
Obrázek 51: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 %



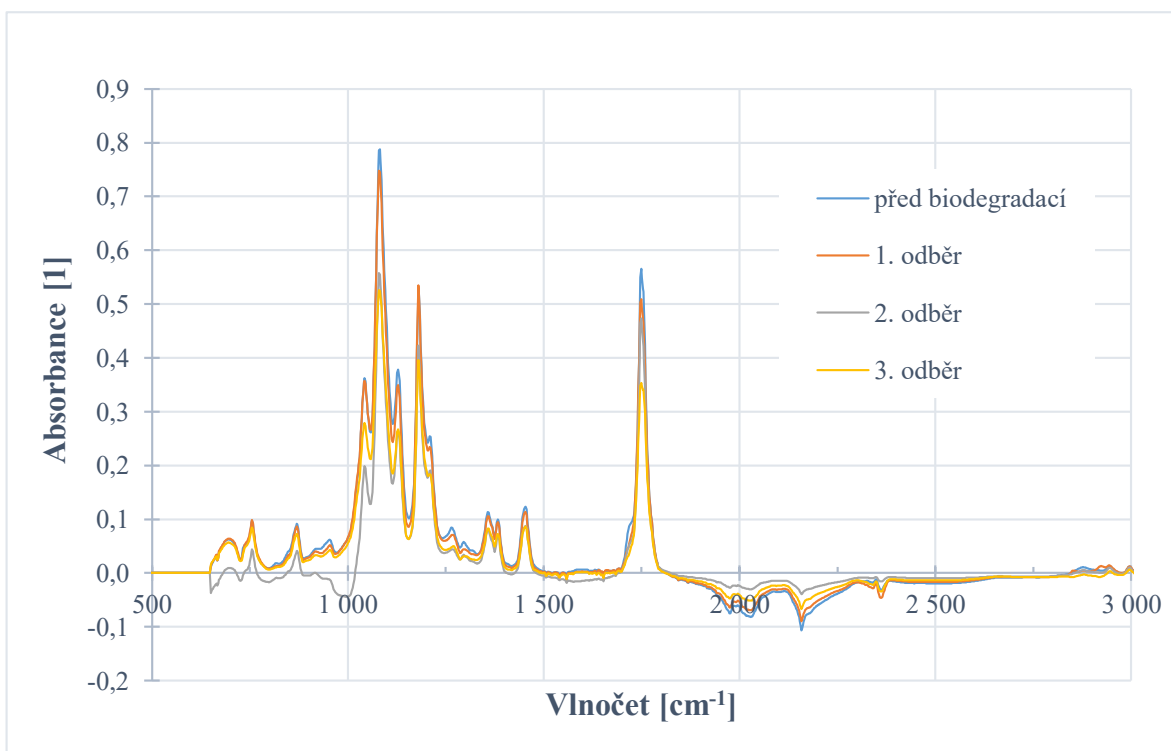
Obrázek 52: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + M 20 % + L 0,5%



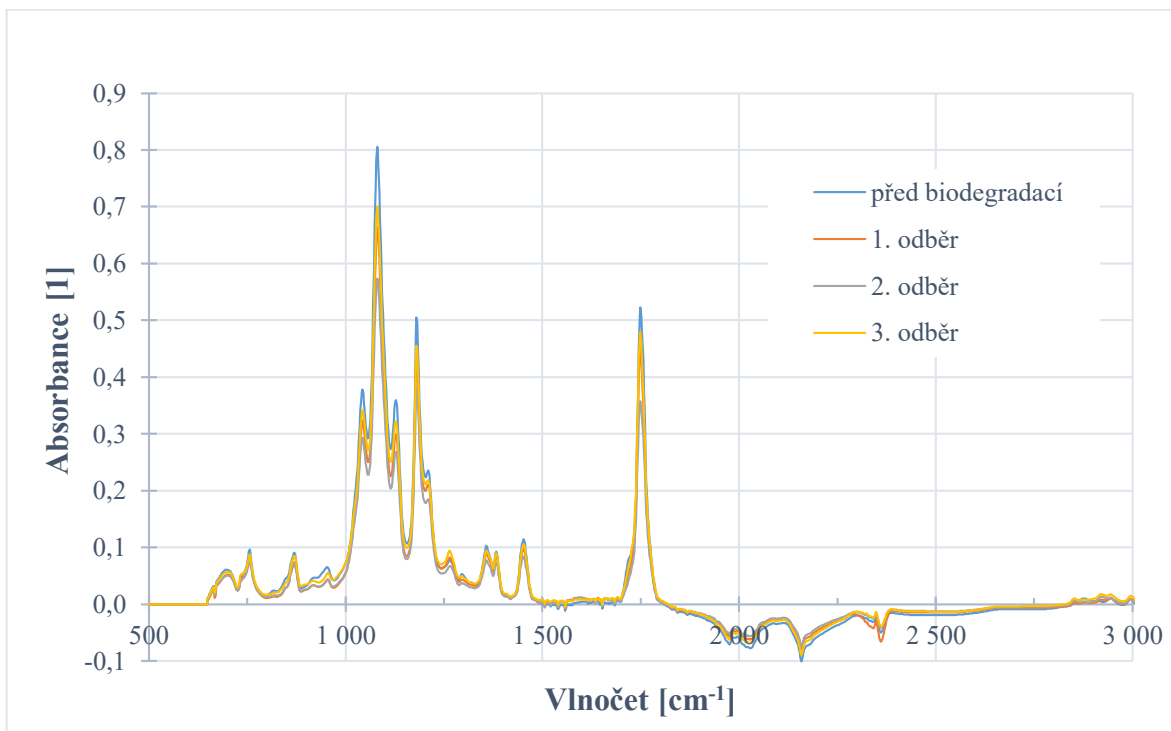
Obrázek 53: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M 20 % + L 0,5 %



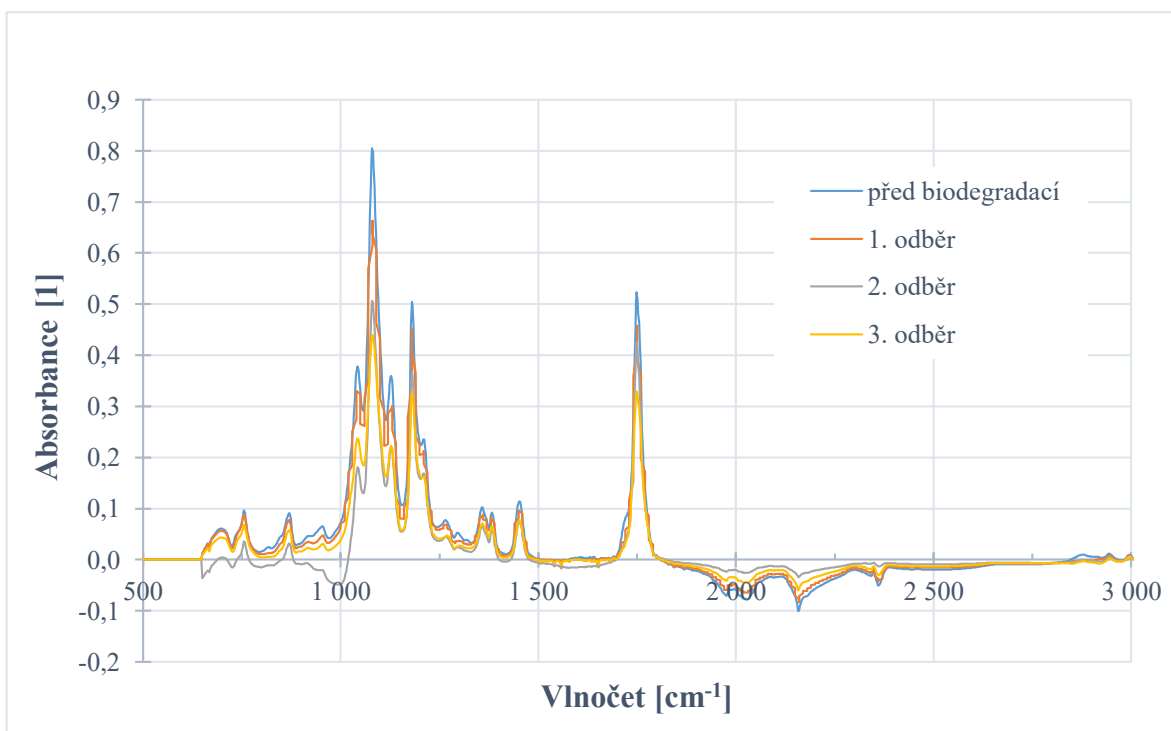
Obrázek 54: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + M + L + 2,5 % T



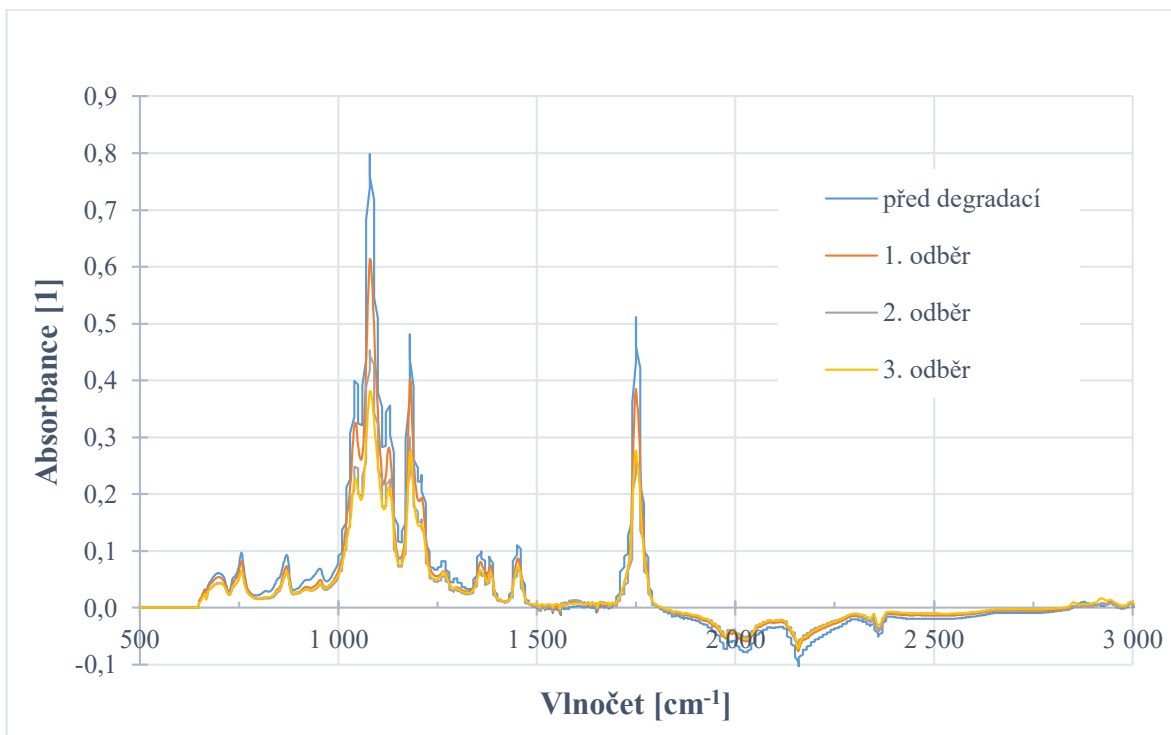
Obrázek 55: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 2,5 %



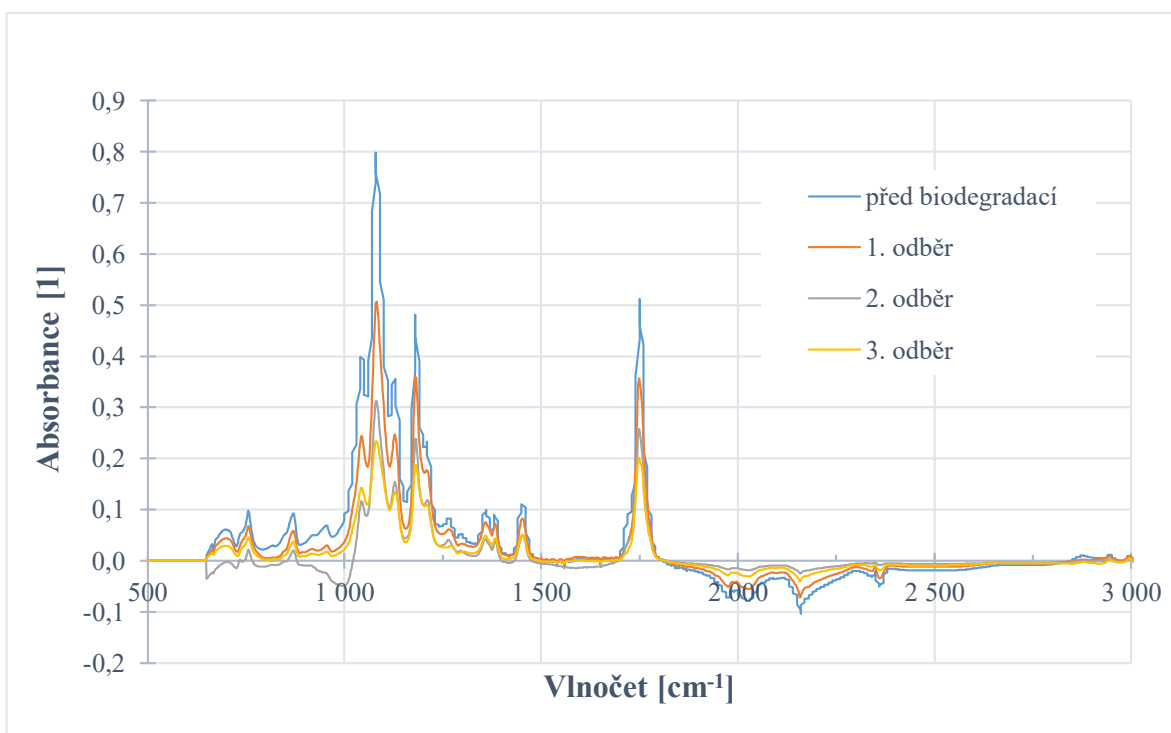
Obrázek 56: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + M + L + 5 % T



Obrázek 57: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 5 %



Obrázek 58: FTIR – stanovení hydrolyzy: PLA + M + L + 10 % T



Obrázek 59: FTIR – modifikovaný Zahn-Wellens test: PLA + M + L + 10 %