



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**KOMPOSTOVÁNÍ BIOLOGICKY ROZLOŽITELNÝCH
BIOPOLYMERŮ**

COMPOSTING OF BIODEGRADABLE POLYMERS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Tereza Hollá

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.

BRNO 2021

Zadání diplomové práce

Číslo práce: FCH-DIP1498/2020 Akademický rok: 2020/21
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie
Studentka: **Bc. Tereza Hollá**
Studijní program: Chemie pro medicínské aplikace
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace
Vedoucí práce: **doc. Ing. Stanislav Obruča, Ph.D.**

Název diplomové práce:

Kompostování biologicky rozložitelných biopolymerů

Zadání diplomové práce:

1. Literární rešerše na zadané téma
2. Studium rozkladu vybraných biopolymerů v kompostu
3. Charakterizace a posouzení kvality získaných kompostů

Termín odevzdání diplomové práce: 30.7.2021:

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

Bc. Tereza Hollá
student(ka)

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

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2021

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
děkan

ABSTRAKT

Táto diplomová práca sa zaoberá štúdiom kompostovania polyhydroxybutyrátu (PHB) a polyesteru kyseliny mliečnej (PLA). Experimentálna časť je zameraná na kompostovací test založený podľa normy IS/ISO 20200, v ktorom boli v priebehu 8 týždňov degradované biopolyméry. Výhodou kompostovacieho testu bolo jedinečné použitie vrecúšok na granule polymérov, čím bola zjednodušená manipulácia so vzorkami. Umiestnenie polymérov zabezpečovalo rovnomerné zaťaženie kompostu, ktoré simulovalo prostredie skládky, čím bol tiež tento experiment výnimočný. Použitie rôznych metód analýzy zabezpečilo skúmanie vplyvu kompostu na degradáciu polymérov, ale aj vplyv polymérov na mikrobióm kompostu. V prostredí kompostu došlo k degradácii všetkých skúmaných polymérov. V prípade PHB došlo po 8 týždňoch k úbytku hmotnosti o približne 40 %. Amorfné PLA kompletne degradovalo už v 5. týždni experimentu, kým semikryštalické PLA stratilo hmotnosť o približne 70 %. Pomocou SEM snímok a SEC analýzy dedukujeme, že degradácia PHB prebiehala prevažne biologicky. U vzoriek PLA bola zistená degradácia prevažne abioticky. Analýzou vzoriek kompostu bolo zistené, že v porovnaní s kompostom bez polyméru došlo v kompostoch s polymérmi k zvýšeniu enzymatickej aktivity esteráz. Pomocou Biolog EcoPlates™ bol analyzovaný vplyv polymérov na mikrobióm v komposte. Kompost s PHB vykazoval vysokú schopnosť adaptácie na rôzne substráty a v priebehu kompostovania došlo k rozširovaniu mikrobiómu. V prípade vzorky so semikryštalickým PLA bolo zistené, že v poslednom týždni kompostovania došlo k zníženiu schopnosti adaptácie a využívania substrátov mikroorganizmami, čo naznačuje možný negatívny vplyv tohto polyméru na vývoj kompostu.

KEÚČOVÉ SLOVÁ

Polyhydroxyalkanoáty, poly(3-hydroxybutyrát), polyester kyseliny mliečnej, biodegradácia, kompost, IS/ISO 20200, EcoPlates™

ABSTRACT

This master's thesis deals with the study of composting of polyhydroxybutyrate (PHB) and polylactic acid (PLA). The experimental part focuses on the composting test based on the IS/ISO 20200 standard, in which biopolymers were degraded within 8 weeks. The advantage of the composting test was the unique use of bags for polymer granules, which simplified the handling of samples. The placement of the polymers ensured an even load of compost, which simulated the landfill environment, which also made this experiment exceptional. The use of different methods of analysis ensured the investigation of the influence of compost on the degradation of polymers, but also the influence of polymers on the compost microbiome. In the compost environment all of the studied polymers degraded. After 8 weeks the weight loss of approximately 40 % was detected in PHB. Amorphous PLA degraded completely in the 5th week of experiment, while semicrystalline PLA lost approximately 70 % of its weight in 8 weeks. Using SEM images and SEC analysis, we conclude that PHB degradation was predominantly biological. Degradation of PLA samples was found to be predominantly abiotic. Analysis of compost samples revealed that the enzymatic activity of esterases increased in composts with polymers compared to compost without polymers. The effect of polymers on the microbiome in compost was analyzed using Biolog EcoPlates™. Compost with PHB showed a high ability to adapt to various substrates and microbiome expanded during composting. In the case of a sample with semicrystalline PLA, it was found that in the last week of composting, the ability of microorganisms to adapt and use substrates decreased, which indicates a possible negative effect of this polymer on compost development.

KEYWORDS

Polyhydroxyalkanoates, poly(3-hydroxybutyrate), polylactic acid, biodegradation, compost, IS/ISO 20200, EcoPlates™

HOLLÁ, Tereza. *Kompostování biologicky rozložitelných biopolymerů*. Brno, 2021. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Stanislav Obruča.

PREHLÁSENIE

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne, a že som všetky literárne zdroje správne a úplne citovala. Diplomová práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho diplomovej práce a dekana FCH VUT.

.....
Podpis študenta

POĎAKOVANIE

V prvom rade by som sa chcela poďakovať vedúcemu mojej diplomovej práce doc. Ing. Stanislavovi Obručovi PhD. za cenné rady, odborné vedenie práce a trpezlivosť. Veľké ďakujem patrí konzultantovi Ing. Jurajovi Vodičkovi, bez ktorého pomoci by nebolo možné túto prácu zrealizovať a taktiež za pomoc a vedenie pri spracovávaní teoretickej a experimentálnej časti. Vďaka patrí tiež Ing. Jaromírovi Pořízkovi PhD. za pomoc pri spracovaní štatistických výsledkov. V neposlednej rade by som chcela poďakovať rodine a priateľom za motiváciu a podporu behom celej doby štúdia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	8
2	TEORETICKÁ ČASŤ	9
2.1	Biopolyméry	9
2.1.1	Polyhydroxyalkanoáty (PHA).....	9
2.1.2	Polyester kyseliny mliečnej (PLA)	11
2.2	Biokompatibilita biopolymérov.....	14
2.2.1	Využitie biopolymérov v medicíne.....	14
2.2.2	Ostatné využitie.....	16
2.3	Degradácia biopolymérov	18
2.3.1	Biodegradácia.....	18
2.3.2	Biodegradácia polyhydroxyalkanoátov.....	20
2.3.3	Biodegradácia polyesteru kyseliny mliečnej.....	22
2.3.4	Abiotická degradácia PHA a PLA	23
2.4	Kompostovanie.....	24
2.4.1	Fázy kompostovania	25
2.4.2	Mikrobiálne konzorcium v komposte	26
2.4.3	Technológie kompostovania	27
2.4.4	Regulácie kompostovania v rámci EÚ	28
2.5	Súčasný stav riešenej problematiky.....	28
3	EXPERIMENTÁLNA ČASŤ.....	30
3.1	Použité materiály	30
3.1.1	Použité chemikálie	30
3.1.2	Polyméry a suroviny použité na kompostovanie	30
3.1.3	Použité prístroje	30
3.2	Použité metódy	31
3.2.1	Príprava a postup kompostovania	31
3.2.2	Príprava vzoriek na analýzu.....	32
3.2.3	Stanovenie hmotnostného úbytku polymérov.....	33
3.2.4	Sledovanie zmien molekulovej hmotnosti polymérov pomocou SEC.....	33
3.2.5	Sledovanie zmeny povrchu polymérov pomocou SEM.....	33
3.2.6	Stanovenie enzýmovej aktivity esteráz v komposte	33

3.2.7 Sledovanie biodiverzity vo vzorkách kompostu	34
4 VÝSLEDKY MERANÍ A DISKUSIA	36
4.1 Kompostovací test	36
4.2 Výsledky analýz degradovaných polymérov	36
4.2.1 Sledovanie hmotnostných úbytkov polymérov	36
4.2.2 Sledovanie zmien molekulových hmotností polymérov pomocou SEC	38
4.2.3 Hodnotenie povrchových zmien polymérov	42
4.3 Výsledky analýz vzoriek kompostov	48
4.3.1 Stanovenie enzýmovej aktivity esteráz	48
4.3.2 Sledovanie biodiverzity mikroorganizmov	50
5 ZÁVER	61
6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERTÚRY	63
7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK	74
8 PRÍLOHY	76
8.1 Zloženie krmiva pre králiky	76
8.2 Rozloženie substrátov na Biolog EcoPlates™	76

1 ÚVOD

Súčasťou moderného života sú petrochemické plasty, ktoré sú rozšírené do všetkých kútov každodenného života. Spolu s nimi však prichádza zodpovednosť za znečistenie planéty nerozložiteľnými látkami a tvorba mikroskopických častíc plastov. Jednou z možností ako odbremeniť našu planétu je hľadanie nových materiálov s priaznivejšími vlastnosťami. Z tohto dôvodu vzbudzujú biologicky rozložiteľné plasty stále väčšiu a väčšiu pozornosť. Pri používaní biologicky odbúrateľných plastov je potrebné sa zamerať nie len na rozložiteľnosť bioplastu samotného, ale aj na prostredie, v ktorom tento dej prebieha.

Medzi najčastejšie používané bioplasty patria polyester kyseliny mliečnej (PLA) a polyhydroxybutyrát (PHB). Biodegradabilita materiálu, alebo biologická odbúrateľnosť, silno súvisí s podmienkami prostredia, kde má prebiehať. Biodegradácia môže prebiehať za prítomnosti enzýmov produkovaných mikroorganizmami a znamená schopnosť materiálu podliehať dekompozícii až na nízkomolekulárne jednotky. Schopnosťou biologicky rozkladať bioplasty disponujú mnohé mikroorganizmy, ktoré sú hojne zastúpené v komposte.

Kompost predstavuje zmes bioodpadu, kde prebiehajú rozkladné procesy prostredníctvom biologicky aktívnych činiteľov. Prostredie kompostu je výborným hostiteľom mikrobiómu, ktorý sa priebehom času mení v závislosti na aktuálnych podmienkach, preto je takmer ideálnym prostredím pre štúdium biodegradácie. Prostredníctvom kompostovania sú skúmané ako čisté polyméry, tak aj rôzne kompozity. Predmetom tejto práce je nie len sledovanie degradácie polymérov v bioaktívnom komposte, ale taktiež analýza zmien v prostredí biodegradácie. Schopnosť biodegradácie bude študovaná u polyhydroxybutyrátu a polyesteru kyseliny mliečnej. Polyhydroxybutyrát patrí medzi zástupcov bioplastov produkovaných baktériami v rôznych podmienkach. Baktérie sú pri jeho produkcii schopné spracovať rôzne odpadné materiály. Veľmi podobnou chemickou štruktúrou disponuje PLA, avšak nadobúda odlišné vlastnosti, čo môže znamenať odlišnosti v biodegradácii.

Motiváciou tejto práce je analyzovať podmienky, pri akých dochádza k biodegradácii, a taktiež analyzovať prostredie, v ktorom biodegradácia prebieha. Experimenty budú prebiehať pri extrémnych podmienkach kompostu, čo má za úlohu simulovať prostredie skládky. Dôležitou súčasťou práce bude analýza zmien mikrobiómu v komposte v priebehu experimentu. Mikrobióm sa časom mení, čo znamená, že určitým mikroorganizmom sa v daných podmienkach darí lepšie ako iným. Súčasťou práce je taktiež analýza aktivity enzýmov zodpovedných za degradáciu v priebehu experimentu. V súčasnosti sú vo väčšine štúdií sledované iba polyméry a na samotný kompost nie je kladený až taký dôraz. Preto predpokladáme, že experimenty zahrnuté v tejto práci majú sľubnú budúcnosť pri sledovaní biodegradácie a pre lepšie pochopenie, ako môže kompostovanie biologicky rozložiteľných plastov ovplyvniť životné prostredie.

2 TEORETICKÁ ČASŤ

2.1 Biopolyméry

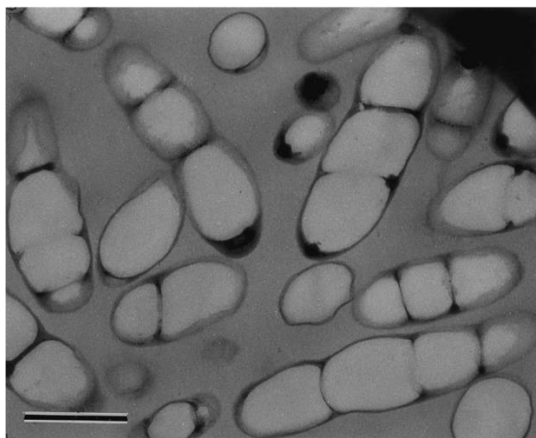
Medzi biopolyméry sa radia mnohé makromolekulárne látky, ktoré sú produkované živými systémami. Biopolyméry sú produkované z obnoviteľných zdrojov, ako je kukurica alebo škrob, a sú označované ako udržateľná alternatíva k syntetickým plastom na báze ropy. V súčasnosti sú rozšírené takmer do všetkých odvetví, ako obalové materiály, jednorazové vrecká, príbory, ale našli využitie aj v medicíne. Často využívanými biopolymérmi sú polyester kyseliny mliečnej (PLA) a polyhydroxyalkanoáty (PHA). PHA je kompletne produkovaný pomocou metabolizmu baktérií, avšak u PLA je biologicky syntetizovaný iba monomér, ktorého polymerizácia musí byť zabezpečená chemicky. Oba biopolyméry patria medzi biologicky rozložiteľné látky [1].

2.1.1 Polyhydroxyalkanoáty (PHA)

Polyhydroxyalkanoáty sa radia do skupiny biologicky odbúrateľných plastov. Mechanickými vlastnosťami sa približujú práve petrochemickým plastom, avšak ich výhodou je kompletná biodegradabilita, produkcia z obnoviteľných zdrojov a ďalšie vlastnosti priaznivé nielen pre životné prostredie, ale aj pre spotrebiteľov [2].

2.1.1.1 Charakteristika a štruktúra

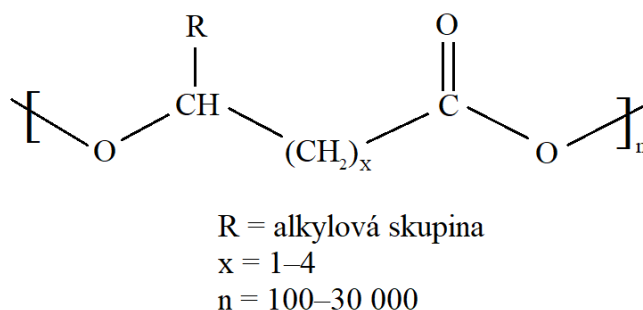
PHA sa radia medzi organické polyméry, ktoré nie sú toxické voči prírode. Sú syntetizované mikroorganizmami ako zásobné látky pre prípad, kedy by sa dostali do stresových podmienok. V nepriaznivých podmienkach im slúžia ako zásoba dôležitých živín a tiež potrebnej redukčnej sily, čo im zabezpečí dočasné prežitie. Môžu byť produkované z rastlinných olejov a odpadných substrátov, ako napríklad odpad z potravinárskeho a poľnohospodárskeho priemyslu [2, 3]. Mikroorganizmy ich syntetizujú v prípade nadbytku zdroja uhlíka pri súčasnej limitácii esenciálnych prvkov, ako je kyslík, dusík alebo fosfor. Sú syntetizované v cytoplazme vo forme hydrofóbnych granúl, ktorých veľkosť môže byť 0,2–0,5 μm [4]. Monomérne jednotky – hydroxyalkánové kyseliny, sú na rozdiel od hydrofóbnych granúl rozpustné vo vode. U určitých typov mikroorganizmov môžu granule predstavovať až 90% hmotnosti vysušenej biomasy, čo je zobrazené na obr. 1 [5].



Obr. 1: Granule PHA v bunkách *C. necator* [5]

Intracelulárne granule PHA – karbozómy, pozostávajú z hydrofóbného vnútorného priestoru, kde sa nachádza samotný polymér v amorfnom stave. Okolo polyméru sa nachádza fosfolipidová monovrstva, ktorá obsahuje rôzne proteíny, ako je PHA syntáza, PHA depolymerázy a tzv. phasiny, proteíny, ktoré majú za úlohu stabilizovať granule v cytoplazme bunky a zabrániť koagulácií jednotlivých granúl [5, 6].

Z chemického hľadiska patria PHA medzi lineárne polyestery hydroxyalkánových kyselín (HA). Najčastejšie sa vyskytujú ako 3-hydroxyalkánové kyseliny, avšak u niektorých mikroorganizmov môže ísť aj o 4-, 5- alebo 6-hydroxyalkánové kyseliny [7]. Všetky jednotky HA sa vyskytujú v *R* konfigurácii kvôli stereošpecifite polymerizačného enzýmu PHA syntázy [2]. Molekulová hmotnosť PHA je v rozmedzí 200–3 000 kDa a závisí na druhu produkčného mikroorganizmu, zdroji uhlíka a jeho koncentrácii [8]. Na obr. 2 je zobrazená všeobecná štruktúra PHA.



Obr. 2: Chemická štruktúra PHA [10]

2.1.1.2 Typy PHA a ich vlastnosti

Polyhydroxyalkanoáty sa delia podľa zastúpenia monomérnych jednotiek na homopolyméry a heteropolyméry. Medzi homopolyméry patrí napríklad poly(3-hydroxybutyrát) – P3HB, poly(3-hydroxyvalerát) – PHV a poly(4-hydroxybutyrát) – P4HB. Heteropolyméry obsahujú minimálne dva rozdielne monoméry a patrí sem kopolymér poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát) – P(3HB-co-3HV). Ďalšou možnosťou rozdelenia je podľa dĺžky uhlíkového reťazca na short-chain-length PHA (SCL PHA), medium-chain-length PHA (MCL PHA) a long-chain-length PHA (LCL PHA) [10, 11].

SCL PHA sa vlastnosťami podstatne líšia od MCL PHA, čo je popísané v tab. 1. Reťazce pozostávajúce z 3–5 atómov uhlíka patria do skupiny SCL PHA. Táto skupina vykazuje vysoký stupeň kryštalinity, ktorý často dosahuje až 80% [9]. Dosahujú vysokú pevnosť v ťahu, ale aj krehkosť, preto ich menšou nevýhodou je nízke relatívne predĺženie [7, 12]. Pre zlepšenie fyzikálnych vlastností PHA sú vytvárané heteropolyméry, najčastejšie kopolymér P(3HB-co-3HV). Percentuálne zastúpenie monomérnych jednotiek má vplyv na vlastnosti a je dané v závislosti od produkčného mikroorganizmu. Tento kopolymér disponuje vylepšenými vlastnosťami ako je výrazné zvýšenie relatívneho predĺženia [12, 13].

MCL PHA obsahujú monomérne jednotky s dĺžkou 6–14 atómov uhlíka. Patria medzi flexibilné a elastické materiály s nízkym stupňom kryštalinity a nižšou hustotou. Na rozdiel od SCL PHA je ich schopnosť relatívneho predĺženia násobne vyššia [14].

LCL PHA obsahujú monomérmne jednotky pozostávajúce z viac než 15 atómov uhlíka. Tento typ PHA bol zistený iba pri *in vitro* produkcii [8].

Tab. 1: Porovnanie vlastností SCL PHA, MCL PHA a polypropylénu (PP) [9]

Vlastnosti	SCL PHA	MCL PHA	PP
Kryštalinita [%]	40–80	20–40	70
Maximálne predĺženie [%]	6–10	300–450	400
Pevnosť v ťahu [MPa]	43	20	34
Hustota [g.cm ⁻³]	1,25	1,05	0,91
Teplota topenia [°C]	80–180	30–80	176
Teplota skleného prechodu [°C]	-148–4	-40–50	-10
Odolnosť voči rozpúšťadlám	slabá	slabá	dobrá
Biologická odbúrateľnosť	výborná	výborná	žiadna

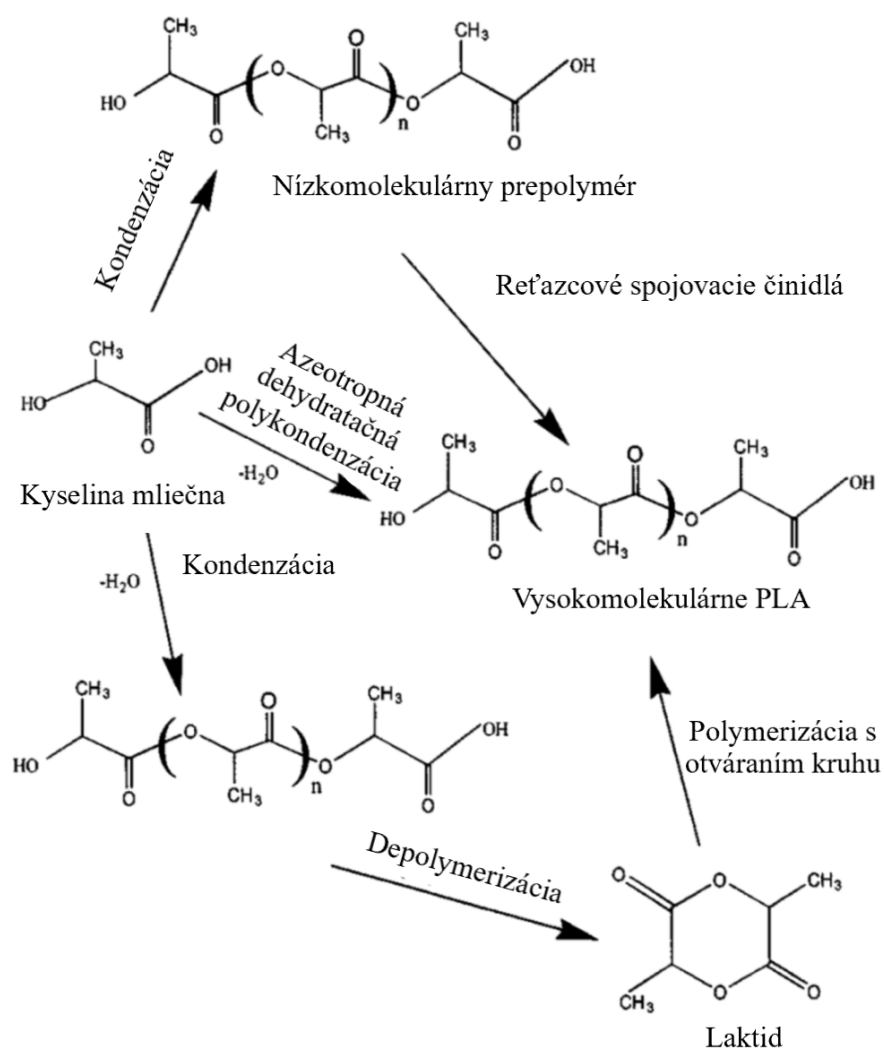
2.1.2 Polyester kyseliny mliečnej (PLA)

Polyester kyseliny mliečnej, alebo polylaktát, patrí do skupiny alifatických polyesterov. Je vyrábaný z obnoviteľných zdrojov ako je kukurica, cukrová trstina alebo zemiaky. Podobne ako PHA patrí medzi biologicky odbúrateľné a biokompatibilné polyméry. Základnou monomérmnou jednotkou PLA je kyselina mliečna (kyselina 2-hydroxypropánová), ktorá sa získava fermentáciou sacharidov zo zdrojov. Komerčná produkcia LA prebieha najčastejšie pomocou baktérií mliečneho kvasenia. V závislosti na druhu baktérií môžu byť spracovávané jednoduché sacharidy, ako je glukóza, maltóza, sacharóza alebo laktóza. Kyselina mliečna sa ako výsledný produkt mliečneho kvasenia vďaka prítomnosti asymetrického uhlíka vyskytuje v dvoch opticky aktívnych formách, a to kyselina L-mliečna a D-mliečna. Fermentáciou je možné získať prevažne kyselinu L-mliečnu s optickou čistotou približne 98,5 % [15, 16].

2.1.2.1 Syntéza PLA

Syntéza PLA už nie je biologický proces, ale musí byť zabezpečená chemicky. Môže prebiehať viacerými spôsobmi, ktoré sú zobrazené na obr. 3. Prvým spôsobom je priama polykondenzácia, avšak týmto spôsobom je možné získať iba nízkomolekulárny polymér. Pri komerčnej výrobe je najčastejšie využívaný spôsob polymerizácie s otvorením kruhu laktidov (dimérov kyseliny mliečnej), anglicky tzv. ring-opening polymerization. Laktidy sú pripravované depolymerizáciou nízkomolekulárnych oligomérov a musia byť purifikované, aby bola dosiahnutá vysoká molekulárna hmotnosť PLA. Pri výrobe týmto spôsobom je výťažkom polymér s vysokou čistotou a molekulovou hmotnosťou minimálne 100 kDa [15, 17].

Ďalším spôsobom na prípravu vysokomolekulárneho PLA je azeotropná dehydratačná polykondenzácia. Touto metódou je PLA pripravené priamo, bez potreby pridávať činidlá na predĺženie reťazca. Pre zlepšenie výťažku reakcie je pridávaná vysoká koncentrácia anorganického katalyzátoru. Zostatkový katalyzátor môže spôsobovať rôzne problémy, ako nechcená degradácia polyméru a nepredvídateľná rýchlosť hydrolýzy. V prípade použitia v medicínskom prostredí môže byť polymér nepoužiteľný z dôvodu toxicity katalyzátora alebo môžu nastať rôzne problémy pri postupnom uvoľňovaní [15, 18].



Obr. 3: Mechanizmy syntézy vysokomolekulárneho PLA [15]

Environmentálne priaznivou metódou je enzymatická polymerizácia, ktorú je možné uskutočniť za miernych podmienok. Chanfreau a kol. skúmali enzymatickú polymerizáciu využitím iónovej kvapaliny a biokatalyzátoru lipázy B získanej z huby *Candida antarctica* (viz. [19]). Podarilo sa im syntetizovať poly-L-laktid s výťažkom 63 % a početne strednou molekulovou hmotnosťou $37,8 \cdot 10^3$ g/mol [19].

2.1.2.2 Typy a vlastnosti PLA

PLA sa vyskytuje v troch stechiometrických formách, a to kyselina poly(L-mliečna) (PLLA), kyselina poly(D-mliečna) (PDLA) a kyselina poly(D,L-mliečna) (PDLLA). PLLA a PDLA sú semikryštalické, izotaktické polyméry, ktorých kopolymeráciou vznikne amorfný kopolymér PDLLA [20]. Fyzikálne vlastnosti PLA súvisia s optickou čistotou, morfológiou a molekulovou hmotnosťou. PLA môže byť produkované ako kompletne amorfné, alebo až do 40 % v kryštalickom stave. Polymér obsahujúci viac ako 93 % kyseliny L-mliečnej je semikryštalický, ale ak obsahuje 50 až 93 % kyseliny L-mliečnej, tak je kompletne amorfný [21]. Najbežnejšie vyskytujúcim sa typom je PLLA, pretože väčšina bakteriálnych producentov produkuje práve L-formu kyseliny mliečnej. Všeobecne, PLA vykazuje vyššiu teplotu skleného prechodu a nižšiu teplotu topenia ako súčasné ropné polyméry [15]. Tepelné vlastnosti sú závislé na optickej čistote, molekulovej hmotnosti a tepelnej histórii. Amorfná PLA má teplotu skleného prechodu okolo 60 °C, čo obmedzuje jej použiteľnosť [22]. Semikryštalická forma polyméru je už použiteľnejšia aj pri vyšších teplotách, až po jej teplotu topenia 140–170 °C [22]. So zvyšujúcim sa obsahom druhého izoméru sa znižuje kryštalinita, teplota skleného prechodu aj teplota topenia [16].

PLA disponuje vysokým modulom pružnosti, vysokou pevnosťou v ťahu, ale aj vysokou krehkosťou a nízkou rázovou húževnatosťou [22]. Z tohto dôvodu je PLA modifikované za účelom zvýšenia ťažnosti a rázovej húževnatosti. Používajú sa aditíva a rôzne kopolyméry, avšak pre zlepšenie niektorých vlastností opticky čistej PLA (napríklad zníženie krehkosti) stačí prídanie druhého optického izoméru. Dôležitým parametrom je taktiež zachovanie biologickej rozložiteľnosti a kompostovateľnosti [15].

Jedným z najdôležitejších faktorov pri použití polymérov ako obaly na potraviny je priepustnosť pre plyny, ako O₂, CO₂ a vodnú paru. Obsah stereoizomérov PLA neovplyvňuje priepustnosť plynov, avšak stupeň kryštalizácie znižuje priepustnosť pre plyny. Vhodný stupeň kryštalizácie vykazuje dostatočnú priepustnosť pre plyny, vďaka čomu môže byť PLA používané na výrobu obalov [23].

Tab. 2: Porovnanie vlastností PLA a polypropylénu (PP) [22, 24]

Vlastnosti	PLLA	PDLLA	PP
Kryštalinita [%]	0–40	0	70
Maximálne predĺženie [%]	6–7	5,4	400
Pevnosť v ťahu [MPa]	1,5–150	27,6–50	34
Modul pružnosti [GPa]	2,7–4,1	1–3,5	1,7
Hustota [g.cm ⁻³]	1,24–1,30	1,25–1,27	0,91
Teplota topenia [°C]	170–200	amorfné	176
Teplota skleného prechodu [°C]	55–65	50–60	-10
Biologická odbúrateľnosť	dobrá	výborná	žiadna

2.2 Biokompatibilita biopolymérov

Biokompatibilita polyméru je jednou z najdôležitejších vlastností pre použitie v medicíne. Po *in vivo* zavedení polyméru dochádza v organizme k interakciám medzi povrchom materiálu a biologickým prostredím. Sila a druh interakcií závisia na povrchových vlastnostiach materiálu [25]. V biologickom prostredí prebieha interakcia polyméru s prostredím prostredníctvom proteínov, ktoré sú prvým a jedným z najdôležitejších členov biokompatibility. Chemická štruktúra, povrch a čistota materiálu môže ovplyvniť adsorpciu proteínov, interakciu buniek a tiež odpoveď hostiteľa. Adsorbovaná proteínová vrstva má veľký vplyv na nasledujúce reakcie, vrátane adhézie a aktivácie krvných doštičiek [26]. Preto má štúdium interakcií medzi proteínmi a povrchom dôležitú úlohu a je najdôležitejším faktorom pri navrhovaní biokompatibilných materiálov [27].

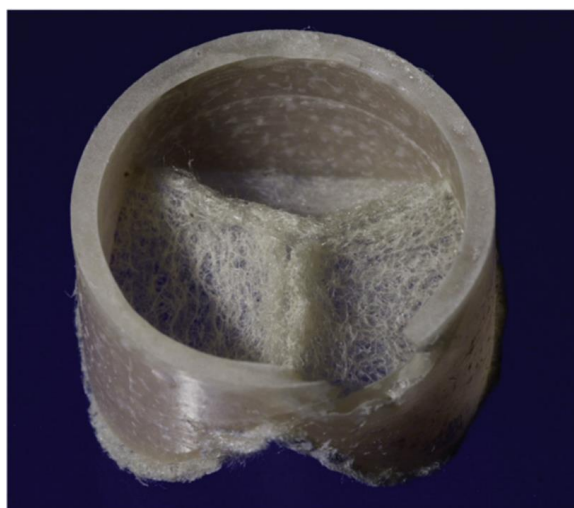
2.2.1 Využitie biopolymérov v medicíne

Významnou oblasťou aplikácie rôznych biopolymérov je medicína. Materiály však musia vyhovovať rôznym požiadavkám ako je biokompatibilita, vhodné mechanické vlastnosti materiálu a udržateľnosť. Preto v súčasnosti dochádza k náhrade dlho využívaných materiálov, ako sú polyuretány, polykaprolaktón alebo deriváty polyetylénglykolu rôznymi prírodnými polymérmi. Medzi tieto prírodné polyméry patria PHA a PLA [28].

PHA majú veľký potenciál prekonať niektoré polymérne materiály najmä v oblasti medicíny. Degradčné produkty P3HB a P(3HB-co-3HV) patria medzi prirodzené zložky ľudskej krvi ako kyselina 3-hydroxybutánová, ktorej prirodzená produkcia je zabezpečená pečťou pri procese ketogenézy. Homopolyméry PHA vykazujú menšie nevýhody vo svojich vlastnostiach, ako napríklad príliš nízky alebo príliš vysoký stupeň kryštalinity, nepredvídateľný stupeň biodegradácie a priemerné mechanické vlastnosti [29]. Preto sú vyvíjané rôzne pokročilé produkčné metódy, ktoré vyúsťujú do genetického inžinierstva. Medzi tieto metódy patrí napríklad genetická modifikácia substrátovej špecifity PHA syntáz, ktoré sú hlavným enzýmom pri syntéze PHA. Zlepšenie vlastností môže byť

zabezpečené pridaním rôznych funkčných skupín, napríklad dvojítych a trojítych väzieb, amino skupín, benzénových skupín a iných [30]. Taktiež sú vyvíjané rôzne nové kompozitné materiály, ktoré obsahujú PHA spolu s inými prírodnými polymérmi alebo anorganickými materiálmi [29]. V súčasnosti sa mnoho štúdií zaoberá kompozitom vytvoreným z PHA v spojení s PLA. Tento kompozit má vylepšené vlastnosti, ako napríklad nižšia kryštalinita, vylepšené mechanické vlastnosti a prijateľnejšie správanie pri degradácii. Znížením kryštalinity materiálu je zabezpečená lepšia adhézia a prerastanie buniek na povrchu [31]. Vlastnosti sú ovplyvniteľné typom PHA použitého v danom kompozite, avšak tento materiál je ešte vo fáze výskumu a jeho komerčné využitie v biomedicínskom prostredí ešte nebolo zaznamenané [32]. V tkanivovom inžinierstve sú na tvorbu komplexných štruktúr využívané biopolyméry, ktoré ale prirodzene neobsahujú bioaktívne zložky (napríklad enzýmy, ktoré zabezpečujú odozvu buniek). Z tohto dôvodu sú vytvárané kompozity biopolymérov s bioaktívnou anorganickou zložkou, ktorá je inkorporovaná buď ako výplň, alebo ako povrchová vrstva. Najčastejšie sa využíva hydroxylapatit a bioaktívne sklo vo forme častíc alebo vlákien [33].

Prvou farmaceutickou aplikáciou PHA bolo ich využitie v systéme uvoľňovania liečiv. *In vivo* degradácia PHA prebieha omnoho pomalšie ako degradácia PLA alebo poly(laktát-co-glykolátu) (PLGA), preto sú PHA využívané ako nosiče pre postupné uvoľňovanie pri dlhšom čase [34, 35]. Ďalšie využitie majú PHA v oblasti implantátov, kde sa často skúma P3HB a jeho kompozity, pretože majú podobný modul pružnosti a pevnosť v ťahu ako kosti [33, 36]. V porovnaní s klinicky využívanými polymérmi majú P3HB implantáty výhodu v tom, že pri degradácii sa pH hodnota v okolí miesta nemení, čo ich robí veľmi dobre tolerovanými imunitným systémom a bunkami [29]. Implantáty obsahujúce PHA môžu byť využité v tkanivovom inžinierstve ako náhrada ciev, kostí, nervov, ale aj srdcových chlopní [37]. Rôzne typy PHA boli skúmané pre rôzne využitie, avšak doteraz bol schválený na medicínske použitie iba poly(4-hydroxybutyrát) po takmer 10 rokoch klinických štúdií [35].



Obr. 4: Dizajn srdcovej chlopne vytvorenej z nanovláken PGA, ktoré sú pokryté 1% P4HB [37]

PLA a jeho kopolyméry majú dlhú históriu použitia a bezpečnosti v ľudskom tele. Sú požívané vďaka biokompatibilite a rozložiteľnosti prostredníctvom hydrolýzy esterovej väzby,

čím vznikajú netoxické oligoméry kyseliny mliečnej. Pre použitie v tkanivovom inžinierstve sú vytvárané rôzne kopolyméry a kompozity s PLA, pretože samotná PLA má slabé mechanické vlastnosti pre takéto využitie (viz. tab. 2). Často sa využíva na výrobu tzv. scaffoldov, ktoré tvoria lešenie pri náhrade kostí a zabezpečujú tvorbu kostného tkaniva a obnovu samotnej kosti [20]. Podobne ako u PHA, sú skúmané kompozity s hydroxylapatitom, ktorý zabezpečuje osteogézu cez aktiváciu osteoblastov (kostných buniek) [38].

Ďalšie využitie nájdeme PLA v spojení s kardiovaskulárnymi ochoreniami. Pacienti, ktorí trpia ochorením koronárnych tepien vyžadujú po čase bypass, ktorý je v súčasnosti vykonávaný transplantáciou hrudnej tepny alebo žily z dolnej končatiny. Po čase môže dôjsť k opakovanému zúženiu daného štepu, preto sú skúmané nové metódy transplantácie. Jednou z nich je vytvorenie syntetického štepu z PLA, ktorý dokáže zabezpečiť dostatočnú mechanickú podporu a má dobrú biologickú odbúrateľnosť, ktorá je vhodná pre proces hojenia [39]. PLA a jeho kopolyméry sú využívané aj v rade aplikácií súvisiacich s hojením rán, napríklad ako chirurgické nite, ktoré sú reabsorbovateľné. V súčasnosti obsahujú rôzne antibiotiká, baktericídne a antimikrobiálne látky. Spojením mikročastíc PLA a karboxymetylcelulózového gélu bola vytvorená injekčná zmes (Sculptra®, Dermik Laboratories, Berwyn, PA), ktorá sa využíva pri tvárovej lipoatrofii ako výplň postihnutých miest na tvári (viz. [42]).

PLA sa využíva takmer v celom lekárskom svete, medzi ďalšie využitie patria nosiče liečiv s postupným uvoľňovaním. Skupina vedcov Sadr S. H. a kol. zistili, že nosiče zložené z nanovláken PLA v spojení s časticami magnetitu (Fe_3O_4) majú pozitívny efekt na špecifitu liečiva, čo sa využíva pri znížení vedľajších účinkov (viz. [40]). Tie môžu nastať pri interakciách liečiva s bunkou, ktorá nebola cieľom liečby [40]. Medzi ďalšie využitia PLA v medicínskom prostredí patria náhrady kože, nanočastice pre transdermálny prenos, prenos toxických liečiv enkapsulovaných v micelách a lipozómoch, náhrady ciev a mnoho iných [41]. V súčasnosti sú PLA filamenty používané pri 3D tlači, čo sa využíva pri tvorbe protéz [42].

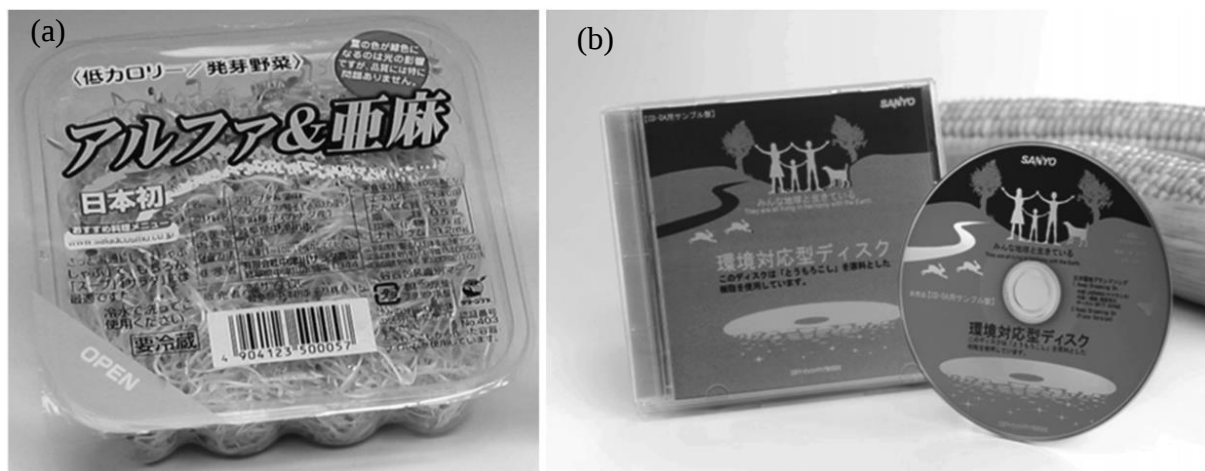
2.2.2 Ostatné využitie

V súčasnej dobe sa celosvetová produkcia rôznych obalových materiálov zameriava na náhradu syntetických plastov biopolymérmi. Obalové materiály tvorili v roku 2005 v Európe 25 % (56,3 milión ton) z celkového tuhého komunálneho odpadu [43]. Metódy na zníženie znečistenia prostredia sú recyklácia a kompostovanie. Väčšina v súčasnosti využívaných plastov môže byť efektívne obnovená recykláciou, avšak znečistenie jedlom alebo iným biologickým materiálom to znemožňuje. Preto je kompostovanie vhodnejším postupom pri znížení znečistenia [43]. Vhodnými materiálmi na náhradu syntetických plastov sú polyhydroxyalkanoáty a polyester kyseliny mliečnej, ktoré sú označované ako kompostovateľné [32].

PHA majú vlastnosti blízke syntetickým plastom, preto patria medzi ideálnych kandidátov na ich náhradu (viz. tab. 1). Samotné PHA nemajú všetky vlastnosti, ktoré sú od nich očakávané, preto sú skúmané rôzne kompozity alebo pridávané plastifikátory. Medzi jeden z biologických plastifikátorov a tepelných stabilizátorov patrí epoxidovaný brokolicový olej, ktorý bol skúmaný z dôvodu nízkej ceny a dobrej biologickej odbúrateľnosti,

čo pozdvihuje ekologické vlastnosti PHA [44]. Po zmiešaní s PHA dochádza k zníženiu modulu pružnosti, zvýšeniu maximálneho predĺženia a k zníženiu teploty skleného prechodu [44]. Tento plastifikátor je využívaný pri výrobe baliacich fólií. Medzi ďalšie využitie PHA materiálov patrí výroba kozmetických obalov, fliaš na šampóny, kartónov na mlieko a hrebeňov [8, 45]. Z kopolymérov, ktoré majú mierne odlišné vlastnosti sú vyrábané plienky, odpadkové vrecká a obaly na potraviny [46]. V súčasnosti je však ich produkcia nízka vzhľadom na vysoké výrobné náklady, preto sú vytvárané kompozity s inými polymermi, čo znižuje nie len cenu produkcie, ale aj zlepšuje niektoré mechanické vlastnosti [47].

Dlhú dobu bola aplikácia PLA obmedzená na medicínu vďaka jej vysokej cene. Aj keď je jej cena stále vyššia ako cena syntetických polymérov, vďaka ekologickým vlastnostiam je o ňu stále väčší záujem. Vyrábajú sa z nej hlavne obalové materiály ako sú poháre, kelímky na jogurty, fľaše na vodu, príbory a iné [48]. Obaly z PLA sú využívané na uchovávanie čerstvých potravín ako je zelenina a ovocie [49]. PLA sa využíva na výrobu jednorazových vreciek, čo predstavuje ekologickejšiu, ale drahšiu variantu. V súčasnosti vyrábané a celosvetovo rozšírené jednorazové vrecká z HDPE majú lepšie mechanické vlastnosti, sú tenké, flexibilné a lacné [50]. Ich najväčšou nevýhodou je ich vysoká stabilita, vďaka čomu môžu znečisťovať prírodu niekoľko desiatok až stoviek rokov. PLA vrecká majú výhodu vo svojej biologickej odbúrateľnosti, avšak sú krehkejšie [51]. Pre zvýšenie krehkosti sú vyvíjané rôzne kompozity, ako napríklad kompozit PLA a polykaprolaktónu (PCL). Vytvorením tohto kompozitu bolo zistené, že sa zlepšili mechanické vlastnosti, tepelná stabilita a zvýšila sa krehkosť [52]. PLA sa využíva aj v textilnom priemysle na výrobu nití, poťahov, vreckoviek, kobercov, záclon a iných. V elektronickom priemysle sa využíva napríklad na výrobu ovládačov a CD/DVD nosičov [31].



Obr. 5: Využitie PLA v priemysle: (a) obalový materiál; (b) CD disk od spoločnosti SANYO MarwickMedia [47]

Čisté PHA a PLA majú limitácie vo vlastnostiach, ako napríklad krehkosť a tepelná nestabilita, čo obmedzuje ich aplikácie. Tieto nevýhody môžu byť ovplyvnené vytvorením kompozitu PHA/PLA. P3HB/PLA kompozit (v pomere PHA/PLA 75:25) s použitím plastifikátoru je vhodným kandidátom na jednorazové použitie, napríklad na obalové materiály pre rýchle občerstvenie [53]. PHA/PLA kompozity môžu byť využívané nie len v potravinárskom priemysle, ale aj v kozmetike, napríklad na výrobu hygienických vreckoviek [31].

Ďalšie využitie môžu nájsť na výrobu rôznych elektronických produktov, ako sú displeje a senzory [31].

2.3 Degradácia biopolymérov

Degradácia je proces, pri ktorom v materiáli dochádza k štruktúrnym zmenám a zmenám vo vlastnostiach. Podliehajú jej ako prírodné, tak aj syntetické plasty. Zmeny v štruktúre makromolekúl môžu byť vyvolané fyzikálnymi, biologickými a chemickými vplyvmi [54]. Chemická degradácia je proces, ktorý využíva prostredie ako zdroj chemicky účinných látok, ktoré indukujú degradáciu polyméru. Je účinná hlavne pre plastické hmoty, ktoré majú v reťazci zavedené funkčné skupiny, ako napríklad hydroxylovú alebo acetátovú skupinu. Fyzikálna degradácia je iniciovaná napríklad ultrafialovým žiarením a teplom. Slnečné žiarenie je absorbované väzbami v polyméroch a musí mať väčšinou charakter ultrafialového žiarenia. Pri degradácii teplom dochádza k chemickým aj fyzikálnym zmenám. Makromolekula je štiepená v mieste najslabšej väzby a dochádza k zmene konformácie molekuly. Biodegradácia je špeciálnym typom degradácie, ktorú zabezpečujú rôzne biologické činitele, ale primárne enzýmy [55]. Z ekologického hľadiska je pri degradácii syntetických a prírodných polymérov dôležitým faktorom toxicita konečného produktu [56].

2.3.1 Biodegradácia

Bioplasty sa delia na biologicky odbúrateľné plasty, kde patria napríklad PHA, PLA, PBAT, PBS a PCL a biologicky založené plasty. Biologicky odbúrateľné plasty môžu byť syntetizované priamo biologicky, čiastočne biologicky alebo chemicky. Biologicky založené plasty, tzv. bio-based sú pripravované na základe biologicky získaných monomérov, napríklad z citrusových šupiek, kukurice, fermentačne pripraveného etanolu a glycerolu. Syntéza prebieha chemicky a nie vždy sú biologicky odbúrateľné. Patrí sem napríklad PLA, bio-polyetylén (BioPE), bio-polyetyléntereftalát (BioPET) a podobne [57].

Biodegradácia je definovaná ako mineralizácia organických materiálov mikroorganizmami, ktorej výsledkom sú pri aeróbných podmienkach oxid uhličitý, voda a mikrobiálna biomasa [58]. Biopolyméry (PHA, PLA) obsahujú medzi jednotlivými monomérmi esterové väzby, preto je prvým krokom biodegradácie ich hydrolýza, ktorá zabezpečí vznik menších molekúl. Proces biologického rozpadu biopolymérov závisí na rôznych vlastnostiach molekuly, napríklad na povrchovej štruktúre, funkčných skupinách v reťazci, molekulovej hmotnosti, teplote topenia, kryštalinite a iných [54]. Závisí taktiež na pridaných aditívach a plastifikátoroch. Kinetika biodegradácie závisí rovnako na vlastnostiach prostredia, ktoré sa môžu výrazne odlišovať. Rýchlosť mikrobiálneho pôsobenia sa bude meniť v suchom prostredí, v morskom prostredí, na skládkach, v kompostoch alebo v morskom prostredí [57]. Veľký vplyv na biodegradáciu majú faktory ako pH prostredia, svetlo, teplota, vlhkosť a biologická aktivita [54]. Zloženie mikrobiálneho konzorcia je taktiež špecifické pre každé prostredie. Biodegradáciu zabezpečujú extracelulárne enzýmy vylučované rôznymi mikroorganizmami a v prípade exogénnych biopolymérov prebieha vo vonkajšom prostredí [59]. Menšie molekuly (oligoméry a monoméry) môžu byť následne prenesené do vnútra mikroorganizmov, kde prebieha degradácia pomocou rôznych intracelulárnych

enzýmov. Pri biodegradácii ide hlavne o povrchovú eróziu, z dôvodu, že enzýmy sú relatívne veľké častice a nie sú schopné preniknúť do štruktúry polymérov ako napríklad chemikálie a radikály. Abiotická degradácia funguje ako objemová aj povrchová degradácia a často prebieha ako predpríprava pred biodegradáciou. Objemová erózia pri abiotickej degradácii zabezpečuje rozloženie vzorky na menšie časti a zníženie molekulovej hmotnosti. Medzi abiotické fyzikálne faktory patrí napríklad teplota prostredia, vlhkosť, UV žiarenie alebo pH prostredia. Mechanická degradácia môže byť zabezpečená prerastaním polyméru rôznymi druhmi húb alebo mechanickou prácou dažďoviek a pôdných červov [57, 60].

Mikrobiálna degradácia zahŕňa štyri kroky, a to biodeterioráciu, biofragmentáciu, asimiláciu a mineralizáciu. Pri biodeteriorácii dochádza k tvorbe mikrobiálneho filmu na povrchu a vo vnútri polyméru, čo urýchľuje jej proces. Dôsledkom sú chemické zmeny, ako napríklad odstránenie aditív a fyzikálne zmeny. Ďalším krokom je biofragmentácia, ktorá zahŕňa mikrobiálnu aktivitu enzýmov produkovaných mikroorganizmami na povrchu. Medzi tieto enzýmy patria oxygenázy, lipázy, esterázy a endopeptidázy [61]. Tie zabezpečujú štiepenie polymérov na kratšie oligoméry a monoméry. Posledným krokom biodegradácie je asimilácia a mineralizácia. Monoméry vytvorené v procese biofragmentácie sú absorbované bunkami mikroorganizmov, kde dochádza k mineralizácii. Prostredníctvom katabolických dráh sú monoméry oxidované na primárne a sekundárne metabolity. Vytvorená energia je ďalej bunkami využívaná na tvorbu novej biomasy [62]. Výsledné produkty závisia aj na prítomnosti kyslíku. Pri anaeróbných podmienkach sú k štiepeniu väzieb využívané dusičnany, sírany a oxid uhličitý ako finálne akceptory elektrónov. V tomto prípade pri degradácii vzniká predovšetkým metán a oxid uhličitý. Anaeróbne podmienky sú zabezpečené najmä na skládkach a v kompostoch, kde sú nežiadúce. Pri aeróbnej degradácii je kyslík využívaný ako terminálny akceptor elektrónov, ktorý má za úlohu štiepiť organické molekuly na menšie. Pri tejto biodegradácii vzniká hlavne oxid uhličitý a voda [60, 63].

2.3.1.1 Mikroorganizmy podieľajúce sa na biodegradácii

Hlavné skupiny mikroorganizmov a degradačné dráhy zapojené do degradácie biopolymérov závisia na podmienkach prostredia, v ktorom degradácia prebieha [64]. Medzi mikroorganizmy podieľajúce sa na biodegradácii PHA patria ako baktérie, tak aj plesne. Prvé, PHB degradujúce mikroorganizmy boli objavené už v 60. rokoch minulého storočia. Patria sem rody *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Streptomyces* [65]. Medzi ďalšie aeróbne aj anaeróbne druhy mikroorganizmov izolované z pôdy patria druhy *Pseudomonas lemoigne*, *Acidovorax faecalis*, *Aspergillus fumigatus*. Mikroorganizmy boli izolované aj z aktívneho kalu (*Alcaligenes faecalis*, *Ilyobacter delafieldi*) a morskej vody (*Comamonas testosterone*, *Pseudomonas stutzeri*). Väčšina z týchto druhov bola izolovaná z mezofilných podmienok, iba málo z nich je schopných degradovať PHB pri vysokých teplotách. Percentuálne bolo zo všetkých známych mikroorganizmov stanovené množstvo PHB degradujúcich na 0,5–9,6 % [66].

Z dôvodu, že PLA nie je bežne vyskytujúcim sa biopolymérom v prírode neexistujú ani špecifické depolymerizačné enzýmy. Kyselina L-mliečna môže byť mikroorganizmami rozpoznaná ako L-alanín, ktorý tvorí mnoho polypeptidov. Mnoho kmeňov rodu *Amycolatopsis* a *Saccharothrix* je schopných degradovať PLA a aj hodvábný fibroín rovnakým enzýmom [67].

Niekoľko proteínových materiálov, medzi ktoré patrí hodvábný fibroín, želatína, elastín a niektoré peptidy a aminokyseliny stimulujú produkciu enzýmov, ktoré sú schopné rozkladať ako spomenuté materiály, tak aj PLA. Taktiež bolo zistené, že enzým proteínáza K z druhu *Tritirachium album* je schopná degradácie PLA [66].

2.3.2 Biodegradácia polyhydroxyalkanoátov

Polyhydroxyalkanoáty sú vhodné materiály na biologickú recykláciu, pretože degradácia pomocou mikroorganizmov môže prebiehať ako za aeróbnych, tak aj za anaeróbných podmienok. Biodegradácia PHA má niekoľko výhod, napríklad použitie PHA na pomalé uvoľňovanie aktívnych látok v poľnohospodárstve a zároveň nezanechávanie rezíduí po krátkom čase. Schopnosť degradácie PHA a produkcie intracelulárnych a extracelulárnych PHA depolymeráz je rozšírená medzi mnohými baktériami a plesňami [68]. Degradácia PHA prebieha cez acetyl-CoA, ktorý je centrálnym metabolitom. Mikroorganizmy zvyčajne absorbujú a využívajú fragmenty (oligoméry a monoméry), ale nie sú schopné degradovať polyméry s väčšou molekulovou hmotnosťou. Biodegradačná rýchlosť je vyššia u kopolymérov, vďaka väčšej amorfnosti. Nižší stupeň kryštalinity zabezpečuje lepšiu dostupnosť pre degradačné enzýmy, preto bude napríklad kopolymér P(3HB-co-3HV) s vyšším percentuálnym obsahom monoméru 3HV degradovať rýchlejšie ako homopolymér P3HB [69].

Biodegradácia PHA sa delí na intracelulárnu a extracelulárnu degradáciu, pričom každá z nich je katalyzovaná inými enzýmami. Tieto enzýmy sa nazývajú PHA depolymerázy a patria do skupiny esteráz [5].

2.3.2.1 PHA depolymerázy

Enzýmy, ktoré katalyzujú intracelulárnu degradáciu PHA sa nazývajú intracelulárne PHA depolymerázy (i-PHA depolymerázy). Pri intracelulárnej degradácii ide o aktívnu degradáciu mikroorganizmom, ktorý daný polymér akumuloval. Pri extracelulárnej degradácii sa jedná o využívanie polyméru mimo bunky mikroorganizmami, ktoré produkujú extracelulárne PHA depolymerázy (e-PHA depolymerázy) a nemusia byť producentom polyméru. PHA prítomné v bakteriálnych bunkách vo forme granúl a materiál nachádzajúci sa mimo bunky predstavujú dva rôzne fyzikálne stavy. Intracelulárne PHA, alebo natívne PHA (nPHA) sú vysoko amorfné a vonkajšia vrstva granúl je pokrytá fosfolipidovým obalom obsahujúcim proteíny. PHA uvoľnené z buniek po smrti producenta a bunkovej lýze sa nazývajú denaturované PHA. V prostredí však ľahko kryštalizuje, preto je extracelulárne PHA v čiastočne kryštalickom stave (50–60 %) [70].

Extracelulárne PHA depolymerázy sa delia do dvoch skupín v závislosti na ich substrátovej špecifite. Prvou skupinou sú PHA_{SCL} depolymerázy, ktoré rozkladajú iba PHB a jeho monolyméry. Do druhej skupiny patria PHA_{MCL} depolymerázy, ktoré primárne rozkladajú alifatické a aromatické PHA pozostávajúce z 6–14 uhlíkatého reťazca [70]. Väčšina PHA degradiujúcich mikroorganizmov produkuje iba jeden typ PHA depolymeráz, buď PHA_{SCL} alebo PHA_{MCL} depolymerázy [71]. Jedným z najviac preštudovaných PHA degradiujúcich mikroorganizmov je baktéria *Pseudomonas lemoignei*, ktorá produkuje až 5 typov PHA depolymeráz, ktoré sa líšia v biochemickej štruktúre [72].

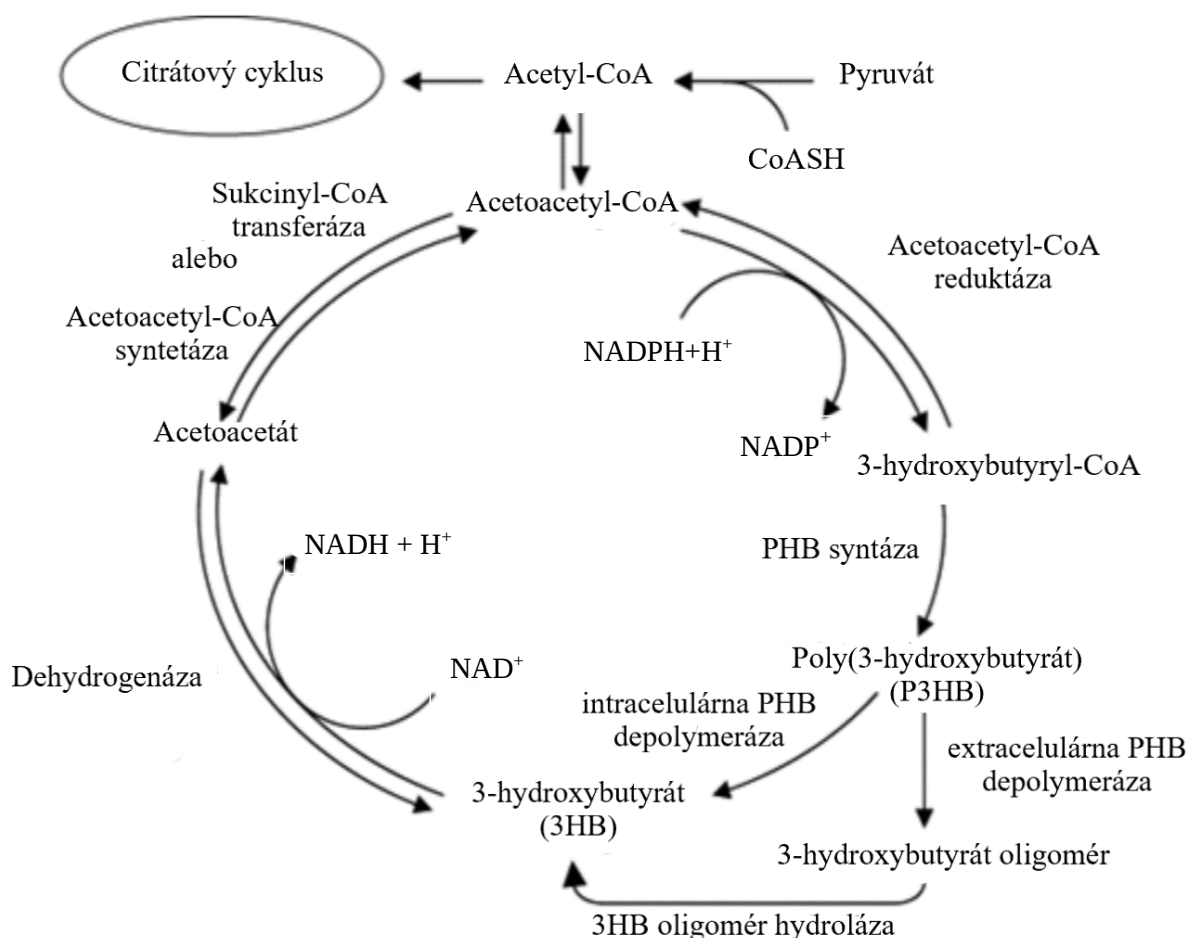
Purifikované PHA depolymerázy pozostávajú z polypeptidového reťazca s molekulovou hmotnosťou medzi 37–60 kDa [71]. Ich primárna štruktúra pozostáva z dvoch oblastí, ktoré sú spojené spojovacím úsekom. Oblasť na C konci reťazca zabezpečuje viazanie substrátu a oblasť na N konci reťazca sa nachádza katalytická oblasť. Špecificky sa na C koniec viaže vo vode nerozpustné PHB, je však neprístupný pre vo vode rozpustné oligoméry PHB [71]. Katalytická oblasť obsahuje katalytický aparát, ktorý pozostáva z aminokyselín serínu, histidínu a kyseliny asparágovej [73]. Serín je súčasťou pentapeptidového lipázového boxu (Gly-X-Ser-X-Gly) ako aktívna oblasť, ktorá bola nájdená v ďalších hydrolázach, ako sú lipázy, esterázy a serínové proteázy [74].

2.3.2.2 Extracelulárna degradácia PHA

Schopnosť degradovať extracelulárne PHA má mnoho mikroorganizmov a závisí na produkcii enzýmov extracelulárnych PHA depolymeráz. Enzýmy podieľajúce sa na depolymerácii PHA sú vysoko špecifické. Extracelulárne PHA depolymerázy hydrolyzujú PHA nachádzajúce sa mimo bunky v kryštalickom stave a intracelulárne PHA depolymerázy sú špecifické pre nPHA [75]. Niekoľko PHB depolymeráz bolo izolovaných z rôznych druhov mikroorganizmov, napríklad *Alcaligenes*, *Comamonas* a *Pseudomonas* [76–78].

2.3.2.3 Intracelulárna degradácia PHA

Všetky mikroorganizmy, ktoré produkujú PHA sú tiež schopné ich degradovať. Intracelulárna degradácia nastáva, keď sa bakteriálna bunka nachádza v stresových podmienkach s nízkou dostupnosťou uhlíka. Dochádza k hydrolýze akumulovaných PHA granúl v bunke, z ktorých je baktéria zásobovaná uhlíkom a energiou. V procese intracelulárnej degradácie pôsobia enzýmy intracelulárne PHA depolymerázy (PhaZ), ktoré sa spolu PHA syntázou (PhaC) nachádzajú v stabilizačnej proteínovej vrstve, ktorá tvorí obal okolo granúl polymérov [79].



Obr. 6: PHA cyklus [80]

PHA depolymeráza štiepi PHA na monoméne jednotky – hydroxyalkánové kyseliny. Monoméry sú ďalej oxidované dehydrogenázami na acetoacetyl-CoA. β -ketothioláza štiepi acetoacetyl-CoA na acetyl-CoA, ktorý pri aeróbných podmienkach pokračuje do Citrátového cyklu, kde vzniká oxid uhličitý a redukované prenášače elektrónov [2, 79]. Intracelulárna degradácia PHA je veľmi pomalý proces, asi desaťkrát pomalší než biosyntéza PHA, aj to len v prípade, že sa bunka nachádza v najvhodnejších podmienkach pre depolymerizáciu [81]. Obr. 6 zobrazuje systém intracelulárnej a extracelulárnej degradácie.

2.3.3 Biodegradácia polyesteru kyseliny mliečnej

V prírode dochádza k biotickej a abiotickej degradácii PLA súčasne, v závislosti na podmienkach prostredia. Polyester kyseliny mliečnej môže podliehať prirodzenej degradácii jednoduchou hydrolýzou esterových väzieb. Pri vhodnej kombinácii vlhkosti, prísunu kyslíka a prirodzene sa vyskytujúcich mikroorganizmov v pôde dôjde k rozloženiu PLA pri aeróbných podmienkach na vodu, CO₂ a biomasu a pri anaeróbných podmienkach na metán, uhl'ovodíky a biomasu [82]. Rýchlosť degradácie PLA závisí na mnohých faktoroch, ako sú vlastnosti materiálu (obsah izomérov, veľkosť a tvar) a vlastnosti prostredia (teplota prostredia, pH, vlhkosť a koncentrácia kyslíka) [83]. Degradácia PLA pomocou mikroorganizmov nastáva po hydrolýze vysokomolekulárneho PLA na polymér s veľkosťou do 10 kDa [82]. Mikroorganizmami sú následne vylučované extracelulárne enzýmy, ktoré hydrolyzujú menšie molekuly PLA. Prítomnosť stimulantov na aktiváciu procesu, ako napríklad želatína, elastín

alebo rôzne aminokyseliny podporuje degradáciu, a to hlavne kvôli indukcii sekrécie proteáz, ktoré degradujú PLA [83]. Po enzymatickej hydrolýze intramolekulárnych esterových väzieb vznikajú oligoméry a monoméry, ktoré môžu byť následne infiltrované mikrobiálnymi membránami. Následne pôsobia intracelulárne enzýmy, ktoré rozložia špecie na konečné produkty. Tieto molekuly slúžia ako zdroj živín pre rast bakteriálnych buniek [83]. Materiály z PLA sú menej náchylné k mikrobiálnemu ataku v prostredí v porovnaní s inými biologicky rozložiteľnými polyesterami. Medzi mikroorganizmy schopné degradovať PLA patria hlavne aktinomycéty a malé množstvo baktérií a húb [84].

Tab. 3: Niektoré mikroorganizmy a ich enzýmy schopné degradácie PLA (prevzaté z [84])

Kmeň	Substrát	Typ enzýmu	pH _{opt}	T _{opt} [°C]
Aktinomycéty				
<i>Amycolatopsis</i> HT-32, No.3118, KT-s-9	PLLA	proteáza	-	-
<i>Amycolatopsisorientalis</i>	PLLA	proteáza	7,0	30
<i>Actinomadura</i> T16-1	PLLA	proteáza	10,0	70
<i>Laceyellasacchari</i> LP175	PLLA	proteáza	9,0	60
Baktérie				
<i>Bacillusbrevis</i>	PLLA	-	-	-
<i>Bacillusmithii</i> PL21	PLLA	esteráza	5,5	60
<i>Alcanivoraxborkumensis</i> ABO2449	PDLLA	esteráza	9,5–10	30–37
Huby				
<i>Tritirachium album</i> ATCC 22563	PLLA	proteáza	8,6	37
<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	PDLA	kutináza	7,0	37

Enzýmy degradujúce PLA zahŕňajú hlavne proteázy, esterázy a kutinázy [84]. Bolo zistené, že proteázy štiepia hlavne polyester PLLA a esterázy preferujú polyester PDLA [85]. Alkalické proteázy produkujú značné množstvo kyseliny mliečnej z PLA, pričom kyslé a neutrálné proteázy vykazujú nízku aktivitu pri štiepení polyesteru [83].

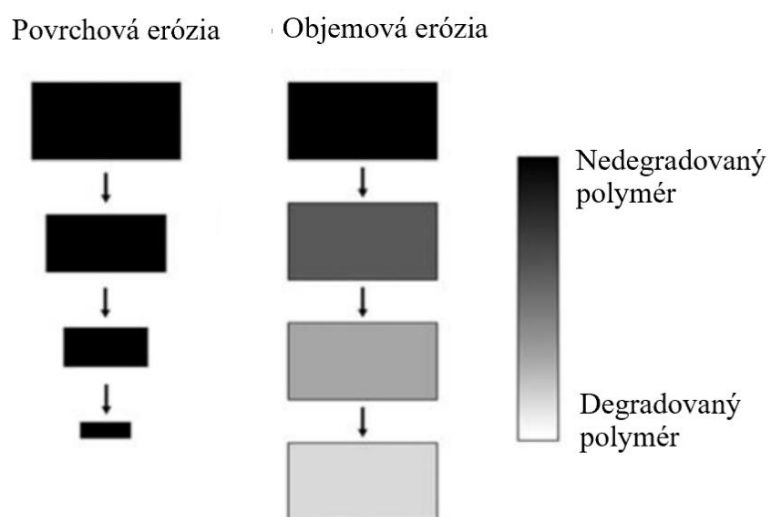
2.3.4 Abiotická degradácia PHA a PLA

Biologicky odbúrateľné polyméry môžu byť rozložené mnohými abiotickými dráhami, ktoré zahŕňajú hlavne alkoholýzu, hydrolýzu a depolymerizáciu [86]. Pri enzymatickej degradácii PLA, ktorá je spomenutá v kapitole 2.3.3, jej predchádza degradácia polyméru pomocou hydrolýzy, preto bude spomenutý iba tento typ abiotickej degradácie.

2.3.4.1 Hydrolytická degradácia esterových väzieb

Hydrolytická degradácia môže byť definovaná ako štiepenie väzieb polyméru molekulou vody za vzniku dvoch alebo viacerých produktov s nižšou molekulovou hmotnosťou ako pôvodný materiál. U polyesterov dochádza k štiepeniu esterovej väzby. Dôležitú úlohu zohrávajú konjugované väzby, ktoré zvyšujú odolnosť molekuly k hydrolýze. Ďalším dôležitým faktorom

je stérické bránenie, ktoré nedovolí molekule vody atakovať väzbu medzi atómami [87]. Hydrolýza môže byť katalyzovaná kyslo alebo bázicky. V prípade hydrolýzy polyesterov dochádza k autokatalýze reakcie produktami, konkrétne rastúcou koncentráciou kyselín, ktoré vznikajú v procese reakcie [86]. Hydrolytická degradácia PLA prebieha vo vodných roztokoch náhodným štiepením esterovej väzby a závisí na rýchlostnej konstante, množstve absorbovanej vody, difúznom koeficiente fragmentov a rozpustnosti produktov [88]. Môže prebehnúť dvomi mechanizmami, a to povrchovou alebo objemovou eróziou (viz. obr. 7). Prvý typ vo všeobecnosti prebieha rýchlejšie ako objemová erózia. Degradácia semikryštalického PLA môže byť rozdelená do dvoch etáp. Prvou je náhodné štiepenie esterových väzieb, po ktorom nasleduje difúzia molekúl vody do amorfných oblastí. Postupnou degradáciou amorfných oblastí začne stúpať stupeň kryštalinity. V druhej etape dochádza k hydrolytickému štiepeniu od konca reťazca do stredu kryštalických domén, pričom amorfné oblasti už sú z väčšej časti zdegradované [89].



Obr. 7: Rozdiel medzi degradáciou z povrchu a objemu [83]

Hydrolýza P3HB môže taktiež prebiehať v kyslých aj bázických podmienkach. V miernych podmienkach ide o relatívne pomalý proces, ale jeho rýchlosť je ovplyvniteľná viacerými faktormi, ako je teplota, pH a kryštalinita polyméru [90]. Reakcia prebieha náhodným štiepením esterovej väzby a produkuje monomérmé jednotky polyméru. U P3HB je omnoho účinnejšia bázická hydrolýza, ktorá prebieha rýchlejšie [91].

2.4 Kompostovanie

Kompostovanie je biochemický dej, počas ktorého je procesom mineralizácie organická hmota premenená na stabilnejšie zložky, ktoré sú prekursorami huminových látok. Hlavné suroviny používané na kompostovanie sú poľnohospodárske a agropriemyselné odpady, ale aj potravinárske organické zvyšky. Ide o kontinuálny proces, ktorým sú organické látky redukované na menšie objemy. Deje sa za prírodných alebo kontrolovaných podmienok, v ktorých dochádza k rozkladu organických látok za aeróbnych podmienok na produkt prostredníctvom mikrobiálnych aktivít [92]. Pomocou kompostovania je zabezpečená recyklácia minerálnych živín, ako je dusík, fosfor a draslík, ktoré môžu byť ďalej využité v poľnohospodárstve ako hnojivo. Je ovplyvňovaný fyzikálno-chemickými faktormi,

ako je teplota, pH, veľkosť častíc, pomer C/N, obsah vlhkosti a prístup kyslíku. Termofilný charakter kompostovania zabezpečuje elimináciu patogénnych mikroorganizmov v odpade [93].

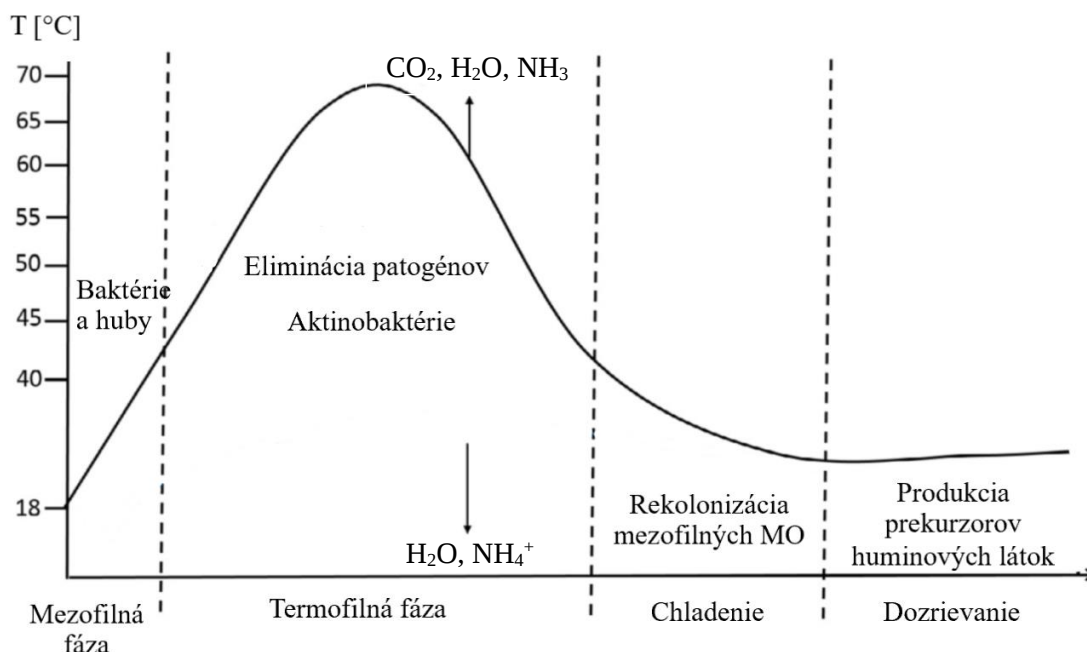
2.4.1 Fázy kompostovania

Proces kompostovania sa delí do troch hlavných fáz, kde patrí mezofilná fáza, ktorá je nasledovaná termofilnou fázou, a posledná je fáza chladenia a dozrievania kompostu (viz. obr. 8). Trvanie každej fázy je závislé na počiatočnom obsahu organickej hmoty, vlhkosti, kvality a zloženia mikrobiálneho základu pre kompost [94].

V prvej fáze zabezpečuje mezofilná teplota a substrát bohatý na uhlík nárast mezofilných mikroorganizmov, ktoré rastú pri teplote v rozmedzí 15–45 °C, a dosahujú optimum rastu pri teplote 30–39 °C [95]. Pomocou mikroorganizmov dochádza k degradácii jednoduchých zlúčenín, ako sú sacharidy, aminokyseliny a proteíny. Týmto procesom sa zvyšuje okolitá teplota prostredia a tvorbou organických kyselín dochádza k znižovaniu pH. Zvyšovanie teploty preukazuje aktivitu kompostu a následne prechádza do druhej, termofilnej fázy [94, 96].

V termofilnej fáze dochádza k degradácii väčšiny organickej hmoty a vzniká oxid uhličitý, voda a amónne ióny. Termofilné mikroorganizmy nahrádzajú mezofilné mikroorganizmy prítomné počas prvej fázy. Pomocou nich sú degradované hlavne mastné kyseliny, celulóza a hemicelulóza. Ich optimálna teplota pre rast je v rozmedzí 40–80 °C a prítomné sú hlavne aktinomycéty a termofilné baktérie rodu *Bacillus* [97]. Vysokou teplotou je zabezpečená eliminácia patogénnych mikroorganizmov a semien rastlín. V okrajových častiach kompostu môžu byť prítomné niektoré mezofilné huby, ktoré po ukončení termofilnej fázy rekolonizujú prostredie kompostu. Ku koncu termofilnej fázy dochádza k postupnému vyčerpaniu zdroju uhlíka, čím sa znižuje aktivita prítomných mikroorganizmov a tým aj teplota kompostu. V tomto bode prechádza kompost do ochladzovacej a dozrievacej fázy [94].

Konečná fáza dozrievania sa vyznačuje teplotou okolo 25 °C. Po vyčerpaní uhlíkového zdroja dochádza k rekolonizácii mezofilnými mikroorganizmami zo spór, v ktorých prežívajú nepriaznivé podmienky, ako sú vysoké teploty. Prítomnosť určitého množstva dostupných substrátov sa stáva limitujúcim faktorom, čo vedie k poklesu mikrobiálnej aktivity a zníženiu teploty. V tejto fáze dochádza k tvorbe prekursorov pre huminové látky [99].



Obr. 8: Časový priebeh teplôt v procese kompostovania [99]

2.4.2 Mikrobiálne konzorcium v komposte

Pri kompostovaní ide hlavne o fermentačný proces tuhých organických látok, ktorý je zabezpečovaný hlavne termofilnými aeróbnymi mikroorganizmami. Aj keď sa jedná o aeróbnny proces, ktorý zahŕňa hydrolýzu organickej hmoty na humus, bola zaznamenaná prítomnosť aj anaeróbných mikroorganizmov, ako napríklad baktérií z rodu *Clostridium* [100]. Prostredníctvom mikrobiómu kompostu dochádza k rozloženiu odpadu za vlhkých, samovoľne zahrievajúcich sa podmienok. Na procese sa podieľajú predovšetkým huby a aktinomycéty, ktoré zohrávajú kľúčovú úlohu pri kompostovaní. Prítomnosť rôznych druhov baktérií alebo plesní môže mať na proces kompostovania ako pozitívny, tak aj negatívny vplyv [93]. Negatívny vplyv má hlavne kompost, ktorý je nezrelý a nestabilný. Jeho použitie do pôdy môže spôsobovať problémy, ako napríklad uvoľňovanie toxických látok a obmedzovanie rastu rastlín [96]. Nesprávne zloženie mikrobiómu môže tiež spôsobovať zápach a pri nesprávnych podmienkach (hlavne anaeróbných) môže dôjsť k tvorbe nežiadúcich produktov [96]. Veľký vplyv na rozmanitosť mikrobiómu v komposte má výber a množstvo pôvodného organického materiálu. Rozmanitosť a vývoj mikrobiálneho konzorcia počas kompostovania závisí na mnohých faktoroch, ako je dostupnosť kyslíka, prítomnosť a charakter živín, teplota a obsah vlhkosti. Mikroorganizmy prítomné v komposte vylučujú enzýmy do prostredia, ktoré majú za úlohu hydrolyzovať organickú hmotu do stabilnej a využiteľnej formy, eventuálne môže dôjsť k produkcii humusu alebo bioplynu [101].

Dôležitou funkciou mikroorganizmov je premena a prenos živín v pôde a v komposte. V procese kompostovania je prítomné množstvo baktérií, ktoré zabezpečujú transformáciu dusíka, ale aj baktérie a huby podporujúce rozpustnosť fosforu a draslíka. Baktérie prítomné v komposte sú väčšinou saprofyty, ktoré patria do skupiny chemoorganotrofných mikroorganizmov. Patria sem hlavne rody *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Zymomonas* a *Xanthomonas* [102]. Aktinomycéty sú skupinou baktérií, ktoré sú dôležitou súčasťou procesu

kompostovania, pretože dokážu rásť pri vysokých teplotách, zásaditom pH a sú schopné degradovať komplexné zlúčeniny, ako sú zmesi polymérov v mŕtvych rastlinách a živočíchoch [98]. Ich prítomnosť prevláda v termofilnej fáze procesu kompostovania. Najčastejšie zastúpenie majú druhy *Streptomyces thermovulgaris*, *Actinobifida chromogena*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Micromonospora carbonacea* a *Streptomyces lincolnsensis* [103].

Huby sú prírodné dekompostéry a v komposte sú aktívne v prvej (mezofilnej) a poslednej fáze (dozrievanie). Najčastejšie vyskytujúce sa rody sú *Aspergillus*, *Acremonium*, *Chrysosporium*, *Fusarium*, *Mortierella*, *Penicillium* a *Trichoderma* [104].

2.4.3 Technológie kompostovania

Existuje mnoho metód kompostovania ako v priemysle, tak aj v domácnostiach. Patrí sem napríklad vermi-kompostovanie, riadkové kompostovanie, prevzdušňované statické kompostovanie a kompostovanie v boxoch [94]. Metódou vermi-kompostovania je produkovanie kompostu pomocou aktivity dážďoviek. Dážďovky rozkladajú organický odpad ako na tuhý kompost, tak aj na tekutý, ktorý je bohatý na živiny ako dusík, fosfor a draslík. Tekutý kompost sa využíva ako hnojivo na zalievanie pôdy. Vermi-kompostovanie je mezofilný proces, v ktorom musí byť striktné optimalizovaná vlhkosť, teplota a pH. Dážďovky sú citlivé na zmeny teplôt, ideálne teploty pre vermi-kompostovanie sú v rozmedzí 13–25 °C. Táto metóda je využívaná hlavne v domácich kompostéroch [105].

Ďalšou metódou je kompostovanie na riadku. Ide o jednu z najbežnejšie používaných metód, pretože ňou môže byť spracované veľké množstvo organického odpadu. Spočíva v uskladnení organického odpadu na dlhé a úzke hromady, ktoré sú otáčané ručne alebo mechanicky. Hromady sú otáčané po dosiahnutí určitej teploty (zvyčajne okolo 55–60 °C), čím sa zabezpečí ich prevzdušnenie. Dĺžka, šírka a výška riadkov závisí od použitého odpadu. Táto metóda je využívaná na kompostovanie vo veľkom množstve, avšak nevýhodou je potreba veľkej plochy a časová náročnosť [106].

V prevzdušňovanom statickom kompostovaní je využívané prúdenie okolitého vzduchu. Prechádza hromadou kompostu, ktorá obsahuje organický odpad a látky zväčšujúce objem, ktoré zabezpečujú zvýšenie pórovitosti kompostu, čím je zlepšené prúdenie vzduchu. Táto metóda nevyžaduje otáčanie, pretože aerácia je zabezpečená prúdením vzduchu. Touto metódou je možná produkcia kompostu v kratšom časovom úseku (okolo 3–6 mesiacov) a nevyžaduje veľkú plochu ako pri riadkovom kompostovaní [94, 107].

Kompostovanie v boxoch je často využívané v priemyselnom prostredí, ale taktiež v domácnostiach. Touto metódou môže byť spracované veľké množstvo biologického odpadu, hlavne odpadu z potravín. Organický odpad je umiestnený do nádob, v ktorých bude prebiehať dekompozícia. Nádoby sú pravidelne ručne alebo mechanicky otáčané, čím je zabezpečená aerácia [107]. Kvalita kompostu závisí ako na organickej hmote, tak aj na metóde, ktorou je kompost produkován. Kvalita a stabilita finálneho kompostu je dôležitá, pretože kompost vytvorený všetkými metódami je často využívaný ako hnojivo pre rôzne rastliny [94].

2.4.4 Regulácie kompostovania v rámci EÚ

V rámci členských štátov Európskej únie sú v reguláciách kompostovania značné rozdiely, z dôvodu, že na úrovni Európskej únie nie sú ustanovené normy a predpisy týkajúce sa kvality kompostu. Výnimkou je Nariadenie Európskeho parlamentu 2010/66/EC, ktoré ustanovuje limity na predávanie kompostu ako produktu a ustanovuje ekologický certifikát EU Ecolabel [108]. Aby bol kompost považovaný za produkt v Českej republike, je potrebná registrácia ako „kompost jednej triedy“ na základe analýzy vzoriek, ktorú vykonáva Kontrolní a zkušební ústav pro zemědělství. V rámci regulácií kvality kompostu jednotlivých krajín je agronomická hodnota (pomer C/N, minimálny obsah C) a prítomnosť kontaminantov (ťažkých kovov) dostatočne stanovená. Avšak normy pre stanovenie obsahu patogénov a fytotoxicity sa líšia v každej krajine [108].

2.5 Súčasný stav riešenej problematiky

V súčasnosti sa často biodegradabilita materiálu hodnotí pomocou kompostovacích testov. Pre laboratórne podmienky bolo vytvorených mnoho noriem, napríklad norma IS/ISO 20200 a ISO 14855–1 (viz. [109, 110]), ktoré popisujú rôzne metódy analýzy stupňa degradácie skúmaných materiálov. Skúmané sú ako samotné polyméry, tak aj rôzne kopolyméry a kompozity. Mnoho aktuálnych štúdií sa zameriava na analýzu biodegradácie s prídavkom rôznych aditív, ktoré môžu potencionálne urýchliť proces degradácie a zároveň zlepšiť vlastnosti materiálov. Aktuálne štúdie sa zameriavajú na študovaný polymér, zatiaľ čo kompost nie je predmetom výskumu.

Sintim a kolektív (viz. [111]) skúmal biodegradáciu kompostovaním *in situ* pri teplejších a chladnejších podmienkach. Okrem iných materiálov analyzovali aj kompozit zložený z PLA, amorfného PHA, plastifikátora a aditív. Ako kontrolné materiály boli použité celulózoový papier a polyetylén. Kompostovací test bol vykonaný podľa normy ISO 14855–1, ktorá popisuje metódy sledovania degradácie analýzou uvoľneného oxidu uhličitého. Kompostovací test prebiehal po dobu 5 mesiacov v zimnom období. Kompozit PLA/PHA degradoval v komposte už v priebehu dvoch týždňov [111]. Keďže kompostovací test prebiehal *in situ*, nebolo možné kvantifikovať množstvo organického uhlíka premeneného na oxid uhličitý.

Arrieta a kol. (viz. [112]) kompostoval zmesi PLA/PHA podľa normy IS/ISO 20200. Zmes PLA/PHA bola vytvorená s pridaním plastifikátora do tvaru filmov o hrúbke 200 µm. Ako kontrolná vzorka bol použitý film vytvorený z čistého PLA. Podľa výsledkov došlo k degradácii všetkých filmov v priebehu jedného mesiaca. Bolo zistené, že prítomnosť kryštalického PHB spomaľovala proces degradácie, zatiaľ čo plastifikátory ho urýchlňovali [112]. Termogravimetrickou analýzou bolo zistené, že plastifikátory boli degradované už v počiatočnej fáze degradácie [112].

Biodegradácii rôznych typov PHA sa venoval Weng a kol. (viz. [113]). Bola skúmaná rýchlosť biodegradácie tenkých filmov z PHB, P(3HB-co-4HB) a P(3HB-co-3HV) s rôznym percentuálnym zastúpením 3HV. Kompostovací test prebiehal podľa normy ISO 14855–1. Bolo zistené, že filmy s najvyšším zastúpením 3HV a 4HB podliehali biodegradácii rýchlejšie ako ostatné [113]. Predpokladá sa, že to bolo spôsobené faktom, že amorfné oblasti degradujú

rýchlejšie. Zo všetkých typov PHA má PHB najvyšší stupeň kryštalinity, preto degradoval najpomalšie [113]. Stupeň biodegradácie pre všetky z použitých materiálov prekročil 90 %, čo je podľa ISO 17088 hranica pre označenie materiálu za biologicky odbúrateľný [114].

Táto diplomová práca nadväzuje na diplomovú prácu Ing. Juraja Vodičku (viz. [115]), ktorý sa v druhej časti práce zaoberal kompostovaním granúl PHB, amorfného PLA a semikryštalického PLA podľa normy IS/ISO 20200. Kompostovací test prebiehal po dobu 4 týždňov, po ktorých došlo k redukcii hmotnosti PHB o 36 %. Amorfné PLA počas 4 týždňov degradovalo na malé častice, ktorých hmotnosť nebolo možné stanoviť. U semikryštalického PLA došlo k redukcii hmotnosti o 63 % a táto degradácia bola analogická k degradácii amorfného PLA, iba spomalená. Taktiež bolo pomocou SEM potvrdené, že degradácia PHB prebieha pomocou povrchovej erózie a degradácia PLA nastáva primárne vplyvom abiotických dejov [115].

3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Použité materiály

3.1.1 Použité chemikálie

- Hydroxid sodný (Lach-Ner)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner)
- Chloroform (Lach-Ner)
- Tris(hydroxymetyl)aminometán (Sigma-Aldrich)
- 4-metylbumbelliferón (Sigma-Aldrich)
- 4-metylbumbelliferyl acetát (Sigma-Aldrich)
- 2-metoxyetanol (Sigma-Aldrich)

Všetky chemikálie boli v čistote p.a. alebo vyššej.

3.1.2 Polyméry a suroviny použité na kompostovanie

- Polyhydroxybutyrát – granule, Biomer® P310 (Biomer)
- Polyester kyseliny mliečnej, amorfný – granule, Ingeo™ 4060D (NatureWorks)
- Polyester kyseliny mliečnej, semikryštalický – granule, Ingeo™ 4043D (NatureWorks)
- Drevené piliny
- Krmivo pre králiky (Darwin's, zloženie viz. príloha (kapitola 8.1))
- Zrelý kompost rastlinného pôvodu (Kompostárna Fertia Blansko)
- Kukuričný škrob (Amylon)
- Sacharóza, p.a. (Lach-Ner)
- Kukuričný olej (Olitalia)
- Močovina, p.a. (Sigma-Aldrich)

3.1.2.1 Špecifikácie skúmaných polymérov

Polymér PLA Ingeo™ 4060D od výrobcu NatureWorks obsahuje 12 % D-izoméru kyseliny mliečnej. Teplota skleného prechodu je stanovená v rozsahu 55–60 °C a teplota topenia je 210 °C. Granule polyméru sú priehľadné.

Polymér PLA Ingeo™ 4043D od výrobcu NatureWorks je používaný ako štandard pre použitie v extrudéri na výrobu filamentov pre 3D tlač. Teplota topenia je výrobcom stanovená na 210 °C. Granule polyméru vykazujú jemné mliečne zakalenie.

Polymér PHB Biomer® P310 má od výrobcu stanovený stupeň kryštalinity na 60–70 %. Konkrétne ide o granule poly(3-hydroxybutyrátu), ktorý je biodegradabilný a má vysokú odolnosť voči rozpúšťadlám. Ideálne teploty pre použitie sú v rozmedzí -30–120 °C.

3.1.3 Použité prístroje

- Analytické váhy PA224C (Ohaus)
- Váhy EW 620-3NM (Kern)

- Termoblok SBH10D (Stuart)
- Temperovaný biologický inkubátor BD 115 (Binder)
- SEC chromatograf, kolóna PLgel mixed-C 5 μ m, 300 by 7,5 μ m (Agilent Technologies)
 - Detektor: MALS – Dawn Heleos II, diferenčný refraktometer Optilab T-rEX (Wyatt Technology)
- Skenovací elektrónový mikroskop EVO LS 20 (Zeiss)
- ELISA Synergy HTX multi mode reader (BioTek)
- Rotátor Multi Bio RS-24 (BioSan)
- Vysokorýchlostná centrifúga Z 36 RK (HERMLE)
- Vodný kúpeľ BL4/150 (WSL)
- Temperovaná orbitálna trepačka Incubator 1000 (Heidolph)
- Magnetická miešačka TKO (Kartell)
- pH meter pH Testr 10 (Thermo Scientific)
- Plastové dóza pre kompost 3 l, rozmery 19,5×30×7,5 cm (Tontarelli)
- Bežné laboratórne sklo a pomôcky

3.2 Použité metódy

3.2.1 Príprava a postup kompostovania

Kompost bol založený na základe parametrov prevzatých z normy IS/ISO 20200. Bolo založených 12 separovaných kompostov, z ktorých 3 obsahovali granule polyhydroxybutyrátu, 3 obsahovali granule amorfného polylaktátu, 3 obsahovali granule semikryštalického polylaktátu a 3 boli prázdne a plnili úlohu blanku. Tab. 4 zobrazuje komponenty, z ktorých bola namiešaná zmes na kompostovanie.

Tab. 4: Zloženie suchého kompostu

Komponent	Hmotnostné zastúpenie [%]
Drevené piliny	40
Krmivo pre králiky	30
Zrelý kompost	10
Kukuričný škrob	10
Sacharóza	5
Kukuričný olej	4
Močovina	1

Krmivo pre králiky vo forme granúl bolo rozdrvené a preosiate cez sito s priemerom 2 mm. Všetky komponenty boli poriadne zmiešané. Do veka plastového reaktoru bolo vyvrtaných 8 aeračných otvorov s priemerom 5 mm a bol naplnený približne 250 g suchej kompostovacej zmesi. Aby vlhkosť vsádzky predstavovala 55 %, každá zmes bola zaliate 355 ml destilovanej vody. Reaktory boli umiestnené do temperovaného inkubátoru na teplotu 58 °C. Pozície reaktorov na poschodiach boli menené jedenkrát do týždňa o 1 poschodie. V rámci jedného

poschodia boli pozície reaktorov striedané približne každý druhý deň. Na dno inkubátora boli umiestnené Petriho misky naplnené destilovanou vodou, ktoré zohrávali úlohu odparníkov. Destilovaná voda bola dopĺňaná podľa potreby. Vlhkosť ovzdušia bola taktiež zabezpečená rozprašovaním vody do prostredia inkubátora približne každý druhý deň. Aerácia reaktorov bola zabezpečená premiešaním kompostu a prevetraním inkubátora.

Do reaktorov bolo vložených dohromady 20 g granúl polymérov, čo predstavuje 8% zaťaženie kompostu polymérnym materiálom. Toto zaťaženie je vyššie ako navrhuje norma IS/ISO 20200. Granule polymérov boli navážené do pripravených vrecúšok zo sieťovinového materiálu (monofil). Do každého vrecúška boli navážené 2 g granúl s presnosťou na dve desatinné miesta a taktiež bolo vložené číslo vzorky na zalaminovanom papieri. Dôvodom použitia vrecúšok bola lepšia manipulácia so vzorkami pri týždenných odberoch. Vrecúška boli uzavreté zatavením strán otvorov. Do každého reaktora bolo vložených dohromady 10 vrecúšok s polymérom. Kompostovací test prebiehal po dobu 8 týždňov. V tab. 5 je popísaný harmonogram kompostovacieho testu.

Tab. 5: Procedúra kompostovacieho testu

Číslo dňa	Operácia
0	Založenie kompostu, zalatie destilovanou vodou, premiešanie
1, 2, 3, 4, 7, 9, 11, 14	Prídavok vody, premiešanie
8, 10, 16, 18, 21, 23, 25, 28	Zvlhčenie destilovanou vodou
30, 45	Prídavok vody, premiešanie
30–60	Zvlhčenie destilovanou vodou, dvakrát do týždňa
7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56	Odber vzoriek kompostu a vrečka s polymérom, analýza

Každý týždeň bolo odoberané jedno vrecúško obsahujúce polymér z každého reaktora a taktiež reprezentatívna vzorka kompostu. Odobratie reprezentatívnej vzorky kompostu bolo zabezpečené odobratím vzoriek z viacerých oblastí reaktora v celkovom objeme približne 25–30 ml.

3.2.2 Príprava vzoriek na analýzu

3.2.2.1 Vzorky polymérov

Po odobratí vzorky polyméru z reaktora bolo vrecúško premyté destilovanou vodou a umiestnené do sušiarne na dobu 30 minút pri teplote 58 °C. Následne bola vzorka umiestnená na Petriho misku na vzduch a dosušená pri laboratórnej teplote.

3.2.2.2 Vzorky kompostu

Vzorky kompostu boli uchovávané pri teplote -20 °C. Následne boli zmrazené na teplotu -80 °C. Po 24 hodinách boli lyofilizované po dobu 24 hodín pri teplote približne -80 °C a tlaku >0,02mbar. Po lyofilizácii boli vzorky zhomogenizované v trecej miske

a na ďalšie analýzy bola odobratá najjemnejšia frakcia do vialiek. Vymrazené vzorky kompostu boli uchovávané pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ pre následné analýzy.

3.2.3 Stanovenie hmotnostného úbytku polymérov

Vysušené vrecúško s granulami polyméru bolo rozstrihnuté a polymér bol zvážený s presnosťou na dve desatinné miesta. Následne boli polyméry uchovávané vo vialkách v suchom prostredí.

3.2.4 Sledovanie zmien molekulovej hmotnosti polymérov pomocou SEC

Molekulová hmotnosť polymérov bola stanovená pomocou gélovej permeačnej chromatografie s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch (SEC-MALS). Vzorky boli pripravené do šróbovacích vialiek v objeme 1–3 ml a koncentrácií polyméru rozpusteného v chloroforme približne 4 mg.ml^{-1} . Zmesi vzoriek PHB boli následne zahrievané na termobloku pri teplote približne $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ do rozpustenia a potom boli ochladené na laboratórnu teplotu. Vzorky PLA boli rozpustené pri laboratórnej teplote. Nečistoty zo zmesí boli prefiltrované pomocou nylonového striekačkového filtra s porozitou $0,45\text{ }\mu\text{m}$ do šróbovacích vialiek v objeme v rozmedzí 0,5–1 ml. Vzorky boli následne vložené do autosampleru a bola vykonaná analýza.

3.2.5 Sledovanie zmeny povrchu polymérov pomocou SEM

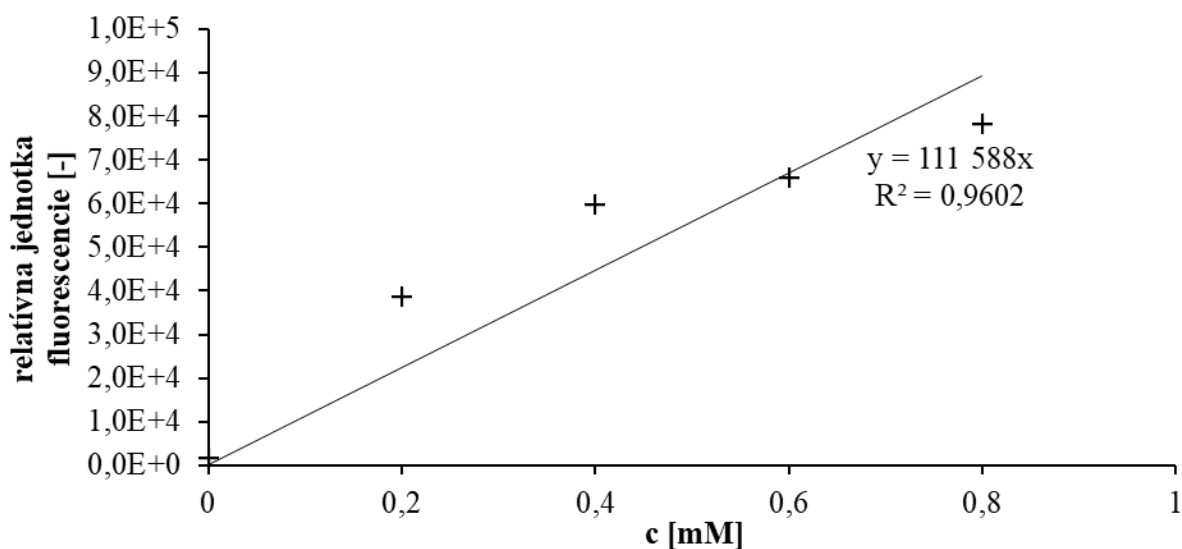
Pre analýzu skenovacím elektrónovým mikroskopom boli vybraté vzorky granúl polymérov z každého druhého týždňa procesu kompostovania. Vzorky boli pripevnené na matricu pomocou uhlíkovej obojstrannej pásky a následne pokovované zlatom. Urýchľovacie napätie bolo nastavené na 5 kV. Analýza vzoriek prebehla zachytávaním sekundárnych elektrónov pomocou detektora.

3.2.6 Stanovenie enzýmovej aktivity esteráz v komposte

Princípom stanovenia enzýmovej aktivity esteráz je štiepenie 4-metylbumbelliferyl acetátu pôsobením esteráz za vzniku fluoreskujúceho 4-metylbumbelliferónu [116]. Pre analýzu boli použité lyofilizované vzorky kompostu. Do centrifugačných skúmaviek bolo navážených približne 0,01 g vzoriek. Následne bolo do každej skúmavky pridaných 4,5 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 7,5. Vzorky boli umiestnené do vodného kúpeľa o teplote $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minút. Po uplynutí času bolo do každej vzorky pridaných 0,5 ml 10 mM roztoku 4-metylbumbelliferyl acetátu rozpusteného v 2-metoxyetanole. Nasledovala inkubácia vo vodnom kúpeli pri teplote $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minút. Pre ukončenie reakcie boli vzorky ochladené v ľadovom kúpeli a sцентриfugované pri teplote $2\text{ }^{\circ}\text{C}$, zaťaženi 4000 g po dobu 5 minút. Supernatant bol v chlade napipetovaný do mikrotitračnej doštičky, ktorá bola následne vložená do ELISA readeru na meranie. Spektrofluorometrické meranie prebehlo pri excitačnej vlnovej dĺžke 360 nm a emisnej vlnovej dĺžke 460 nm. Rovnako boli pripravené vzorky pre kontrolu, kde bol 10 mM roztok 4-metylbumbelliferyl acetátu pridaný až po zachladiení vzoriek.

3.2.6.1 Kalibračná krivka

Pre kalibračnú radu bol pripravený 10 mM štandardný roztok 4-metylbumbelliferónu rozpustený v 2-metoxyetanole. Bolo navážených 0,01 g kompostu do 6 skúmaviek, kde bolo následne pridaných 4,5 ml 0,1 M Tris-HCl pufru o pH 7,5. Ďalej bolo pridaných 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 a 0,5 ml štandardu a objem bol doplnený destilovanou vodou do 5 ml. Nasledoval rovnaký postup, ako pri vzorkách kompostu okrem prídania substrátu. Kalibračná závislosť je zobrazená na obr. 9.



Obr. 9: Kalibračná závislosť koncentrácie štandardného roztoku 4-metylbumbelliferónu na intenzite fluorescencie

3.2.7 Sledovanie biodiverzity vo vzorkách kompostu

Pre sledovanie zmien biodiverzity kompostu boli použité mikrotitračné doštičky Biolog EcoPlates™. Doštička obsahuje 96 jamiek, ktoré obsahujú 31 uhlíkových zdrojov v triplikátoch a 3 kontrolné jamky bez uhlíkového zdroja. Uhlíkové zdroje pozostávajú zo šiestich aminokyselín, dvoch amínov, desiatich uhľovodíkov, siedmych karboxylových kyselín, dvoch fenolových zlúčenín a štyroch polymérov. Rozloženie uhlíkových zdrojov v doštičke je zobrazené v prílohe (kapitola 8.2, tab. 7). Jamky tiež obsahujú redoxné farbivo tetrazoliovú fialovú, ktoré slúži ako indikátor využitia uhlíkových zdrojov mikroorganizmami.

Pre každú vzorku boli navážené 3 g lyofilizovaného kompostu do Erlenmeyerovej banky a zaliate 50 ml 0,85% roztokom NaCl. Následne prebiehala extrakcia enzýmov na trepačke pri teplote 30 °C po dobu 20 minút. Po ukončení extrakcie boli banky dekantované po dobu 10 minút. Následne bolo pipetovaných 15 µl supernatantu do jamiek a doplnených do 100 µl extrakčným roztokom NaCl. Doštičky boli umiestnené na trepačku a pri teplote 30 °C boli inkubované po dobu 7 dní. Prvé spektrofotometrické meranie prebehlo po 48 hodinách na ELISA readery, kde bola zmeraná optická hustota pri vlnovej dĺžke 590 nm. Následne prebiehalo meranie každých 12 hodín, až do času 168 hodín.

Celková miera využitia substrátu mikroorganizmami bola zistená vypočítaním priemerného vývoja farby jamky (AWCD) podľa rovnice 1.

$$AWDC = \sum \frac{(C_i - R)}{31} \quad (1)$$

Kde C_i je optická hustota v každej jamke obsahujúcej uhlíkový zdroj a R je optická hustota kontrolnej jamky. Pri výpočte boli všetky záporné hodnoty nastavené na nulu. Číslo 31 zobrazuje počet jamiek so substrátom v jednej sade.

Pomocou Shannonovho indexu diverzity H' (rovnica 2) je hodnotená funkčná diverzita mikrobiómu.

$$H' = - \sum p_i \cdot \ln p_i \quad (2)$$

kde

$$p_i = \frac{OD_i}{\sum OD_i} \quad (3)$$

kde v menovateli je suma všetkých hodnôt i jamiek v jednej sade a v čitateli je hodnota i jamky v sade.

Analýza hlavných komponentov (PCA) bola vypracovaná z normalizovaných hodnôt vývoja farby jamiek z posledného času merania. Na jej vypracovanie bol použitý softvér STATISTICA, z ktorého boli použité výstupy na interpretáciu rozdielov aktivít vzoriek na rôznych substrátoch.

4 VÝSLEDKY MERANÍ A DISKUSIA

4.1 Kompostovací test



Obr. 10: Rozloženie polymérov v komposte, vľavo – počiatok testu; vpravo – koniec testu

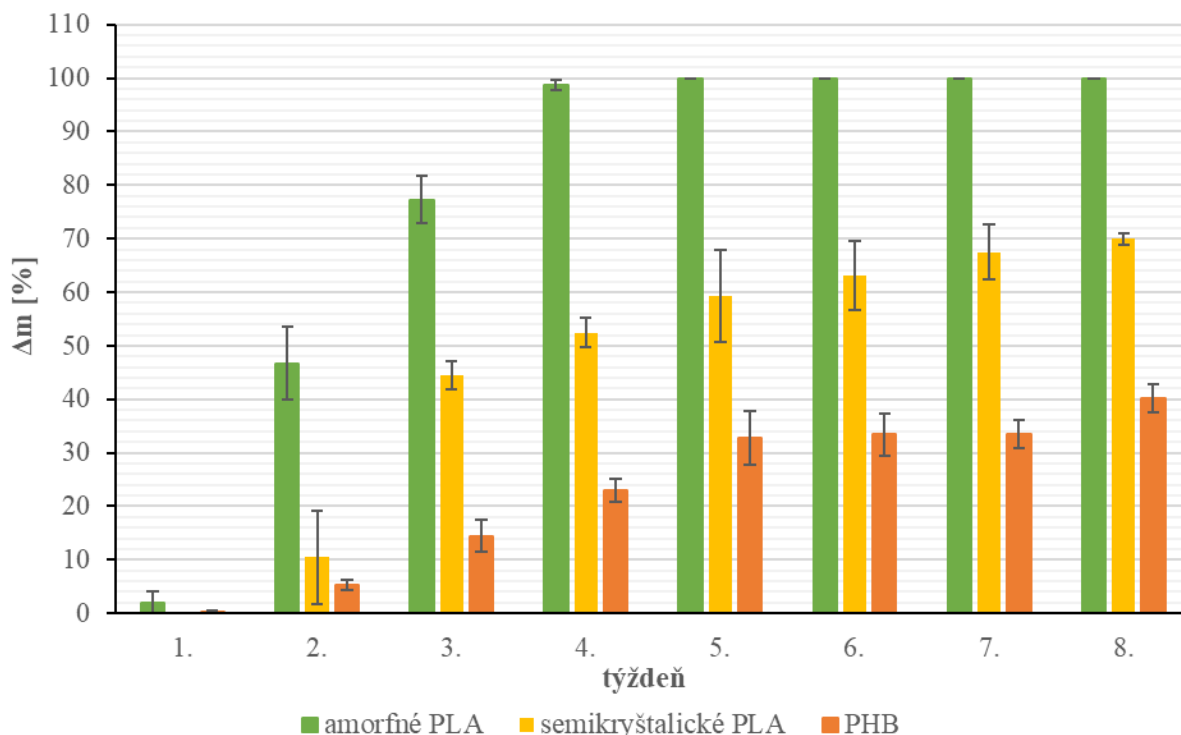
Obr. 10 zobrazuje rozloženie polymérov vo vrecúškach v komposte. Na snímke vpravo sú viditeľné vrecúška s polymérmi a ich usporiadanie v komposte. Vďaka nim bola uľahčená manipulácia pri odoberaní vzoriek. Tento systém bol vytvorený v diplomovej práci Ing. Vodičku (viz. [115]). Porovnaním kompostov z počiatku testu a z konca je viditeľný rozdiel vo farbe. Konečný kompost výrazne zhnedol, čo je spôsobené hlavne oxidáciou polyfenolov, ale prispieva k tomu aj oxidácia viacerých zložiek kompostu. Zmeny vzhľadu kompostu sa tiež odvíjajú od údržby a starostlivosti oň. V priebehu kompostovacieho testu došlo k nárastu plesne, ktorá sa prejavila ako na povrchu kompostu, tak aj na niektorých vrecúškach s polymérmi. Rozvoj plesňových kultúr naznačuje správne poradie prebiehajúcich biologických procesov.

4.2 Výsledky analýz degradovaných polymérov

4.2.1 Sledovanie hmotnostných úbytkov polymérov

Čiastkové odbery jednotlivých vzoriek boli zabezpečené odoberaním vrecúšok s polymérmi, ktoré poskytli jednoduchý a spoľahlivý spôsob získania experimentálnych dát. Výsledky analýzy sú uvedené vo forme stĺpcového grafu, ktorý je pre túto formu dát najvhodnejší (viz. obr. 11). Hmotnostné úbytky uvedené v grafoch boli spočítané ako priemerné hodnoty hmotnostných úbytkov daného polyméru z každého reaktoru. V grafoch sú výsledky uvedené v percentách. Hodnoty sú vypočítané ako priemer z troch od seba nezávislých reaktorov, ktoré môžu vykazovať rozdiely. Z tohto dôvodu sú výsledky zaťažené vyššou smerodajnou

odchýlkou, pretože je potrebné brať do úvahy to, že každý reaktor predstavoval samostatný biologický systém.



Obr. 11: Výsledky sledovania hmotnostného úbytku amorfného, semikryštalického PLA a PHB v percentách

Z obr. 11 je zrejmé, že oba typy PLA podliehajú degradácii v prostredí kompostu. Na obr. 11 je zobrazený priebeh hmotnostného úbytku amorfného PLA po dobu 8 týždňov. V prvom týždni nebol u žiadneho polyméru zaznamenaný vysoký hmotnostný úbytok v porovnaní s ostatnými týždňami, čo môže byť zapríčinené adaptáciou mikrobiómu kompostu na podmienky experimentu a substrát. V priebehu ďalších týždňov došlo k prudkému nárastu hmotnostného úbytku amorfného PLA a taktiež k rozpadu granúl polyméru na menšie častice, až prach. Tento jav môže byť spôsobený zvýšenou teplotou prostredia. V piatom týždni experimentu došlo ku kompletnej degradácii amorfného PLA. Z týchto poznatkov môžeme konštatovať, že degradácia amorfného PLA by mohla byť podporovaná predovšetkým abiotickými faktormi, ako teplota a vlhkosť. PLA je vo všeobecnosti náchylnejší k abiotickej degradácii ako PHB [82]. Rovnaké závery konštatoval Ing. Vodička v svojej diplomovej práci (viz. [115]). Obr. 11 tiež zobrazuje priebeh hmotnostného úbytku semikryštalického PLA. V prípade tohto polyméru bol v druhom týždni zaznamenaný nižší hmotnostný úbytok, čo môže byť spôsobené vyšším stupňom kryštalinity. Rovnako by na túto skutočnosť mohli vplývať neväzbové interakcie v rámci semikryštalických častí molekuly. Semikryštalický polymér je na rozdiel od amorfného tvorený oblasťami s istým druhom usporiadania reťazcov, ktoré určujú stupeň kryštalinity. To znamená, čím vyšší stupeň kryštalinity polyméru, tým je v danom polyméri viac usporiadaných oblastí a dochádza k nárastu medzimolekulárnych síl kvôli tesnejšiemu usporiadaniu reťazcov. Tieto skutočnosti môžu spomaľovať proces degradácie polyméru. Na obr. 11 je v druhom týždni pri semikryštalickom PLA vidieť, že smerodajná odchýlka je vyššia ako pri ostatných týždňoch, čo môže znamenať rôzne biologické podmienky v jednotlivých reaktoroch.

Semikryštalické PLA sa skladá z amorfných a kryštalických častí, čo mohlo mať vplyv na postup degradácie v priebehu experimentu. Amorfná časť je náchylnejšia k degradácii ako kryštalická. V spojení zvýšenej teploty a prítomnosti amorfnej časti polyméru mohlo dôjsť k degradácii tejto časti do tretieho týždňa a následne bola pre prostredie kompostu dostupná už len kryštalická časť polyméru, ktorá podlieha abiotickej degradácii pomalšie. Touto skutočnosťou môže byť vysvetlený len slabý nárast hmotnostného úbytku od tretieho do ôsmeho týždňa. Semikryštalické PLA dosiahlo na konci experimentu hmotnostný úbytok približne 70 %. Z tohto výsledku môžeme konštatovať, že vyšší stupeň kryštalinity PLA môže spôsobiť spomalenie procesu degradácie v prostredí kompostu.

Na obr. 11 je zobrazený percentuálny hmotnostný úbytok PHB v priebehu experimentu. V prvom týždni nedošlo k výraznému nárastu hmotnostného úbytku, čo môže byť spôsobené rovnako, ako v prípade PLA, adaptáciou mikrobiómu kompostu na podmienky. Nízky hmotnostný úbytok v počiatočných kompostovacom teste mohol byť spôsobený prítomnosťou viacerých zdrojov uhlíka – hlavne sacharózy a polyméru. Tento jav sa nazýva diauxia, a v takomto prípade dochádza k prvotnému spracovaniu jednoduchšieho zdroja uhlíka mikroorganizmami, v našom prípade hlavne sacharózy. Zdrojom uhlíka pre niektoré druhy mikroorganizmov mohol byť aj kukuričný olej alebo škrob, avšak druhý spomenutý už patrí medzi polyméry. Škrob môže byť niektorými mikroorganizmami utilizovaný jednoduchšie ako PHB, avšak u niektorých mikroorganizmov to môže byť práve naopak. Preto nie je možné jednoznačne určiť, či išlo o využitie polysacharidov dodaných v komposte, alebo skúmaných polymérov. V druhom týždni experimentu bol zaznamenaný hmotnostný úbytok okolo 5 %, ktorý lineárne stúpal až do 5. týždňa, kedy dosiahol približne 33 %. Tento výsledok je zaťažený vyššou smerodajnou odchýlkou, čo môže byť dôsledkom zmeny mikrobiálneho konzorcia v prostredí kompostu. Táto zmena môže mať za dôsledok aj konštantný hmotnostný úbytok až do siedmeho týždňa. PHB je náchylnejší k biologickej degradácii, avšak je potrebná prítomnosť mikroorganizmov, ktoré produkujú PHA depolymerázy [68]. V prostredí kompostu mohlo v tomto čase dôjsť k prevahe mikroorganizmov, ktoré neprodukujú tieto enzýmy, a tým bola degradácia spomalená. V poslednom týždni experimentu došlo k nárastu hmotnostného úbytku na hodnotu približne 40 %. Výsledky tohto experimentu môžu naznačovať, že v porovnaní s rýchlosťou hmotnostného úbytku PLA, PHB podlieha predovšetkým biologickej degradácii, avšak pre potvrdenie tejto hypotézy prebehli nasledujúce analýzy.

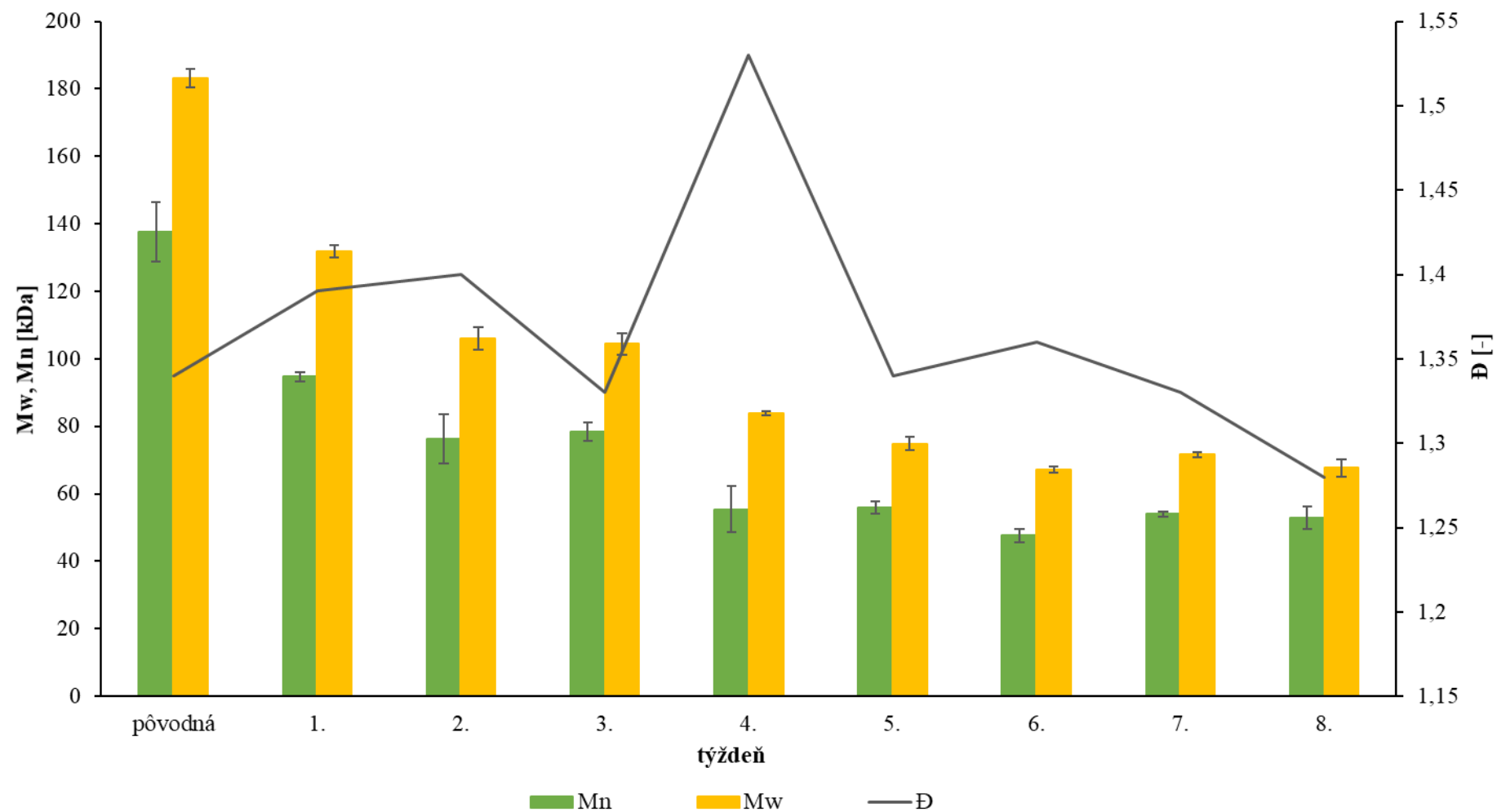
4.2.2 Sledovanie zmien molekulových hmotností polymérov pomocou SEC

Degradáciou polymérov dochádza k skracovaniu ich reťazcov, čo sa prejaví na ich molekulovej hmotnosti. Analýza molekulových hmotností polymérov v priebehu kompostovania poskytne informácie o účinnosti hydroláz, a teda schopnosti polyméru podliehať degradácii v prostredí kompostu. Hmotnostne stredná molekulová hmotnosť (M_w) je vhodnou veličinou znázorňujúcou zmenu dĺžky reťazcov. Početne stredná molekulová hmotnosť (M_n) je pri tomto experimente taktiež vhodná, pretože degradácia môže v istom čase prebiehať iba na povrchu a molekulové hmotnosti v jadre polyméru sa nemusia meniť. Táto veličina pracuje s početným zastúpením jednotlivých hmotností a spolu s M_w dodávajú celkový obraz o zmene

molekulových hmotností. Poslednou dôležitou veličinou je index polydisperzity $\bar{D}$ (viz. rovnica 4), ktorý vyjadruje mieru uniformity veľkostí reťazcov polyméru.

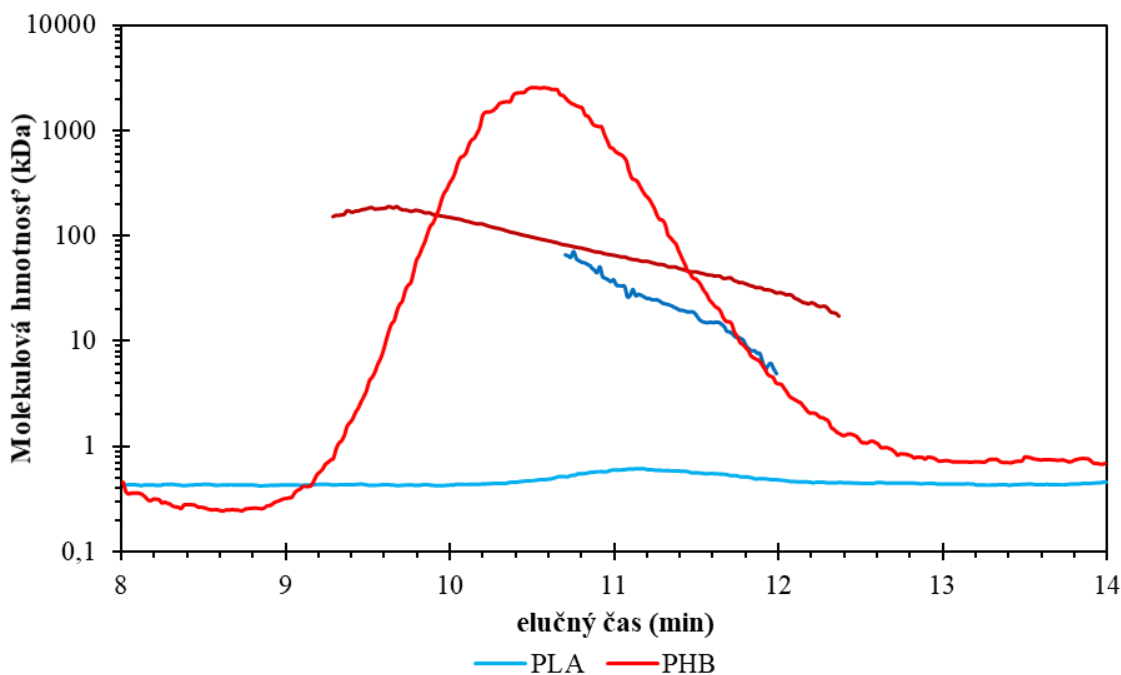
$$\bar{D} = \frac{M_w}{M_n} \quad (4)$$

Kde M_w je hmotnostne stredná molekulová hmotnosť a M_n je početne stredná molekulová hmotnosť. Ideálny polymér má $\bar{D}$ rovný 1, avšak u biopolymérov sa pohybuje medzi hodnotami 1,8 až 2. Pre stanovenie molekulovej hmotnosti v tomto experimente boli vybrané vzorky zo všetkých 8. týždňov a taktiež pôvodné granule polymérov.



Obr. 12: Zmeny molekulových hmotností PHB počas 8. týždňov, kde M_w = hmotnostne stredná molekulová hmotnosť, M_n = početne stredná molekulová hmotnosť, $\bar{D}$ = index polydisperzity

Na obr. 12 sú zobrazené zmeny molekulových hmotností PHB v priebehu experimentu a tiež zmena indexu polydisperzity. Výsledky ukazujú skracovanie reťazcov v priebehu experimentu, pričom najväčší rozdiel nastal už v priebehu prvého týždňa. V 5. týždni došlo k ustáleniu molekulovej hmotnosti na približne rovnakej hodnote, čo koreluje s výsledkami z gravimetrickej analýzy. V tomto momente mohlo dôjsť k zmene mikrobiómu v prostredí kompostu a mohli sa vyskytovať mikroorganizmy, ktoré neprodukujú PHA depolymerázy. Taktiež sa mohlo stať, že polyméry už neobsahovali dostatočné množstvo krátkych reťazcov pre enzymatickú degradáciu, čo môže potvrdzovať tiež index polydisperzity, ktorý medzi 4. a 5. týždňom viditeľne poklesol [117]. Tento jav popísal Li a kol. (viz. [117]), ktorý študovali enzymatickú degradáciu kopolyméru obsahujúceho monoméry 3-hydroxybutyrátu a MCL-HA. Prišli na to, že rýchlosť enzymatickej degradácie ovplyvňuje dĺžka postranných reťazcov polyméru, konkrétne PHA s kratšími postrannými reťazcami sú náchylnejšie k degradácii pomocou PHA depolymerázy [117]. Zmeny molekulovej hmotnosti PHB boli skúmané vedeckou skupinou Weng a kol. (viz. [113]), ktorý pozorovali degradáciu rôznych kopolymérov, ale aj homopolyméru PHB. Sledovali však len početne strednú molekulovú hmotnosť a počiatočná M_n PHB bola stanovená na 240 kDa, kým v tejto práci bola 137,6 kDa. Za 30 dní kompostovania pozorovali úbytok o 25 %, pričom v tejto práci bol po 4. týždni úbytok M_n o približne 60 % [113].



Obr. 13: Príklad chromatogramu z prístroja SEC-MALS pre PHB a PLA

Pre túto metódu boli tiež pripravené a stanovené vzorky amorfného a semikryštalického PLA, avšak po analýze a spracovaní výsledkov sa ukázalo, že molekulové hmotnosti kompostovaných polymérov sú príliš nízke, čo spôsobilo vysoké smerodajné odchýlky stanovenia. Tieto hodnoty boli v medziach detekcie prístroja, ale hodnoty boli príliš nízke a splývali so šumom. Tiež boli zreteľné viaceré píky o nízkych intenzitách. Na obr. 13 je zobrazený príklad chromatogramu vzoriek PLA v porovnaní so vzorkami PHA, ktorý nie je použiteľný na dôveryhodné stanovenie molekulových hmotností, pretože vzorky PLA už

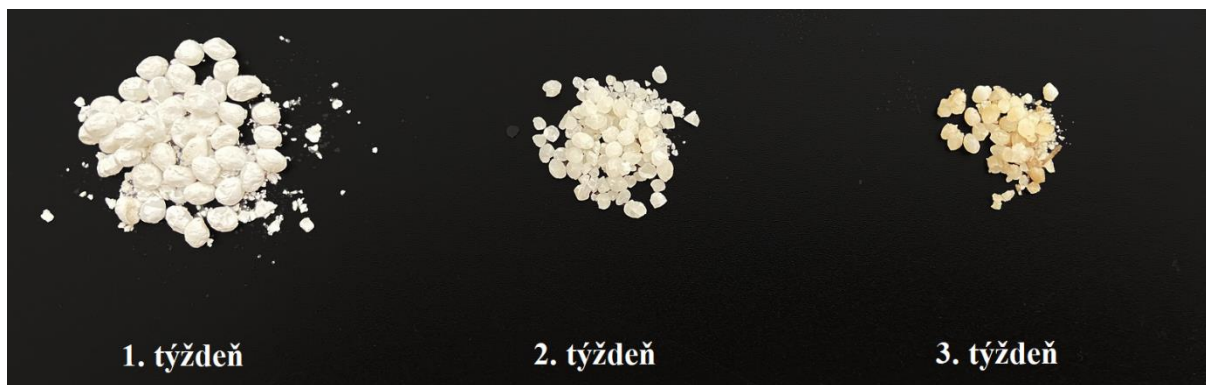
neposkytovali odozvu. Pre tieto vzorky by bola vhodná citlivejšia metóda schopná detegovať nižšie molekulové hmotnosti.

4.2.3 Hodnotenie povrchových zmien polymérov

Hodnotenie vzhľadu vzoriek degradovaných polymérov môže zabezpečiť prvé informácie o priebehu procesu. Vizuálne hodnotenie na makroskopickú úroveň môže prebiehať už počas experimentu, a vďaka takýmto informáciám môže byť postup kompostovania upravovaný. Vizuálne hodnotenie bolo rozdelené na makroskopické – okom, a mikroskopické – pomocou skenovacieho elektrónového mikroskopu.

4.2.3.1 Vizuálne hodnotenie polymérov na makroskopickú úroveň

Vizuálne zmeny jednotlivých polymérov boli dosť odlišné, hlavne sa líšili zmeny granúl PHB od granúl amorfneho a semikryštalického PLA. Na obr. 14 je zobrazená degradácia amorfneho PLA po tretí týždeň. V štvrtom týždni vrecúško stále obsahovalo častice polyméru, avšak ich množstvo bolo minimálne a manipulácia s nimi náročná, preto táto vzorka nie je zobrazená. Na počiatku experimentu bolo amorfne PLA vo forme priehľadných granúl. Už po prvom týždni bola viditeľná zmena v priehľadnosti a tvrdosti granúl pri krájaní. Granule sa pri manipulácii s nimi ľahko rozpadávali a dochádzalo k odlupovaniu povrchovej vrstvy. Po druhom týždni bol už viditeľný úbytok materiálu. Došlo k zmenšeniu granúl a lámaniu materiálu na menšie a ostrejšie častice. V treťom týždni bolo množstvo granúl viditeľne menšie a objavilo sa väčšie množstvo malých, takmer prachových častíc. Tieto pozorované zmeny indikujú prevažne objemovú degradáciu, ktorá prebieha prevažne pri abiotickej degradácii.



Obr. 14: Priebeh degradácie amorfneho PLA

V prípade semikryštalického PLA boli zmeny počas kompostovacieho testu podobné ako pri amorfnom PLA, avšak prebiehali pomalšie. Obr. 15 zobrazuje granule semikryštalického PLA po dvoch, štyroch a šiestich týždňoch experimentu.



Obr. 15: Pribeh degradácie semikryštalického PLA

Z obr. 15 je zrejmé, že granule v druhom týždni začali javiť známky degradácie. Pôvodné granule majú mierne mliečne zafarbenie, kým granule v druhom týždni boli výrazne belšie a nepriehľadné. Dochádzalo k štiepeniu granúl na menšie častice, až prášok. V štvrtom týždni došlo k rozpadu granúl na menšie, nepravidelné štruktúry. Taktiež sa viditeľne znížilo ich množstvo. V šiestom týždni je na vzorke viditeľné mierne znečistenie z prostredia degradácie (kompostu). V tomto týždni boli granule krehkejšie a boli viditeľné väčšie zhluky viacerých granúl, čo mohlo byť spôsobené teplotou prostredia. Tieto poznatky môžu vykazovať, rovnako ako pri amorfnom PLA, degradáciu granúl prevažne abiotickými faktormi. Abiotický rozklad polymérov vedie k vzniku mikročastíc, ktorých osud je doposiaľ nejasný. V poslednej dobe sú avšak častou témou mikročastice vzniknuté z petrochemických polymérov (tzv. mikroplasty), ktoré spôsobujú veľké problémy v znečistení životného prostredia. Môžu sa dostávať do potravinového reťazca alebo narúšať niektoré vlastnosti pôdy. Mikroplasty môžu vznikať v oceáne znečistenom plastovým materiálom, kde dochádza k ich rozpadu. Následne môžu klesnúť na dno, kde hrozí požitie morskou faunou, čím sa môžu dostať do morského potravinového reťazca a ďalej aj do ľudskej potravy [118]. Preto je dôležitou témou osud a ekologický dopad mikročastíc PLA, ktoré môžu vznikať aj pri kompostovaní.



Obr. 16: Pribeh degradácie PHB

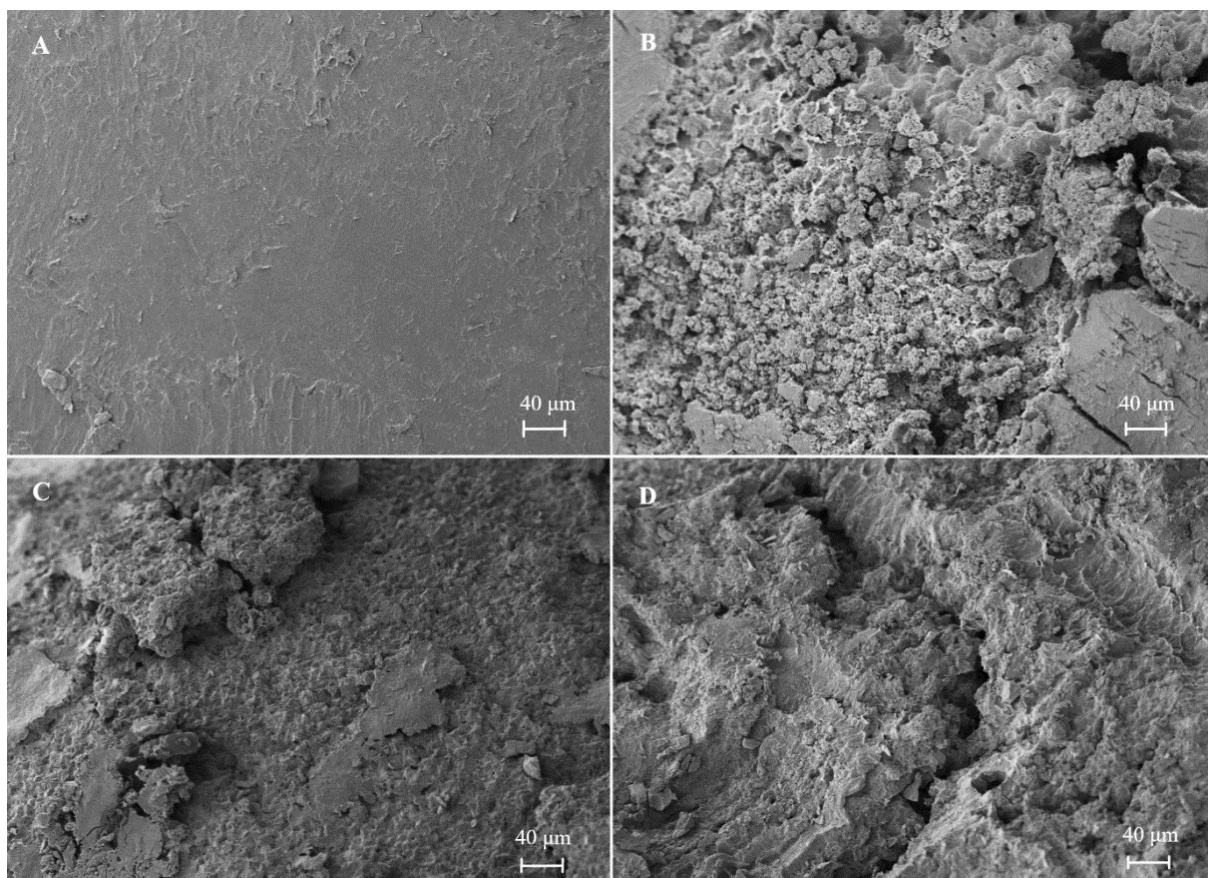
Degradácia PHB prebiehala vizuálne odlišne, ako degradácia PLA. Obr. 16 zobrazuje vzorky odobraté po druhom, štvrtom a ôsmom týždni. Z obr. 16 je zrejmé, že v procese experimentu neubúdala počet granúl, ani nedochádzalo k viditeľnému štiepeniu na menšie častice. Po druhom týždni nebola viditeľná žiadna zmena oproti pôvodným granulám. V nasledujúcich týždňoch

dochádzalo k povrchovým zmenám, ktoré sú viditeľné na vzorkách zo štvrtého a ôsmeho týždňa. Dochádzalo k zmenšovaniu granúl a jemnému mliečnemu zakaleniu hrán peliet. V prípade PHB pozorované zmeny naznačujú, že ide prevažne o biologickú degradáciu a prebieha prevažne povrchovo.

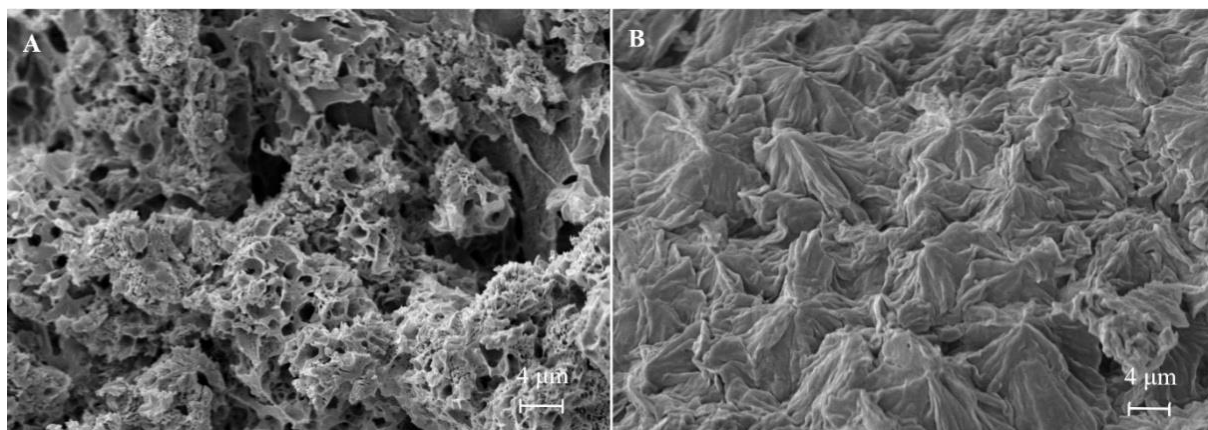
4.2.3.2 Vizúálne hodnotenie polymérov na mikroskopickej úrovni pomocou SEM

Pomocou skenovacej elektrónovej mikroskopie sa naskytuje možnosť bližšie sledovať zmeny na povrchu materiálov, preto bola použitá ako v tejto práci, tak aj v iných štúdiách sledujúcich degradačné procesy (viz. [113, 119,120]). Pre analýzu boli vybrané vzorky z celého priebehu experimentu a referenčná vzorka pôvodného materiálu.

Na obr. 17 a obr. 18 sú zobrazené snímky z elektrónového mikroskopu vzoriek amorfného PLA. V tomto prípade boli snímané vzorky z prvého, druhého a tretieho týždňa z dôvodu následnej kompletnej degradácie granúl. Na snímke B, ktorá zobrazuje granulu po 1. týždni experimentu, sú viditeľné povrchové zmeny, podľa ktorých môže byť určený spôsob degradácie. Na tejto snímke sú viditeľné pórovité zmeny, ako aj opakované zlomy a členité útvary. Zvrásnenia a členité útvary sú výsledkom abiotickej degradácie, kavitácia je spôsobená dezintegráciou materiálu enzýmami produkovanými mikroorganizmami. Snímka C a D na obr. 17 zobrazuje nasledujúce týždne experimentu (2. a 3.). Viditeľná je už prevaha úlomkov nad kavitami, čo môže znamenať počiatočnú prevahu biodegradácie a následnú degradáciu krehkejšieho polyméru teplotou.



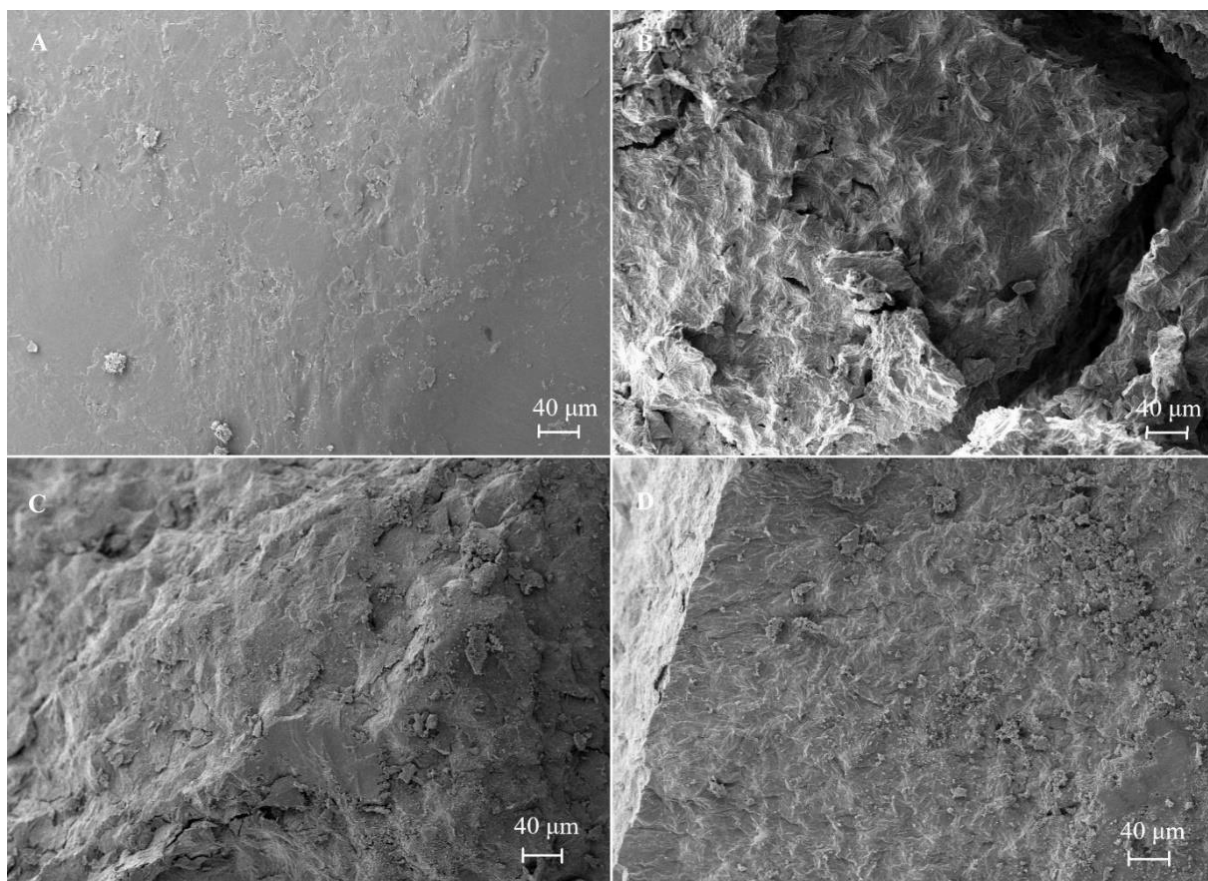
Obr. 17: Snímka amorfného PLA, priblíženie 500x (A – pôvodná; B – 1. týždeň; C – 2. týždeň; D – 3. týždeň)



Obr. 18: SEM snímka amorfného PLA, priblíženie 5000x, (A – 1. týždeň; B – 2. týždeň)

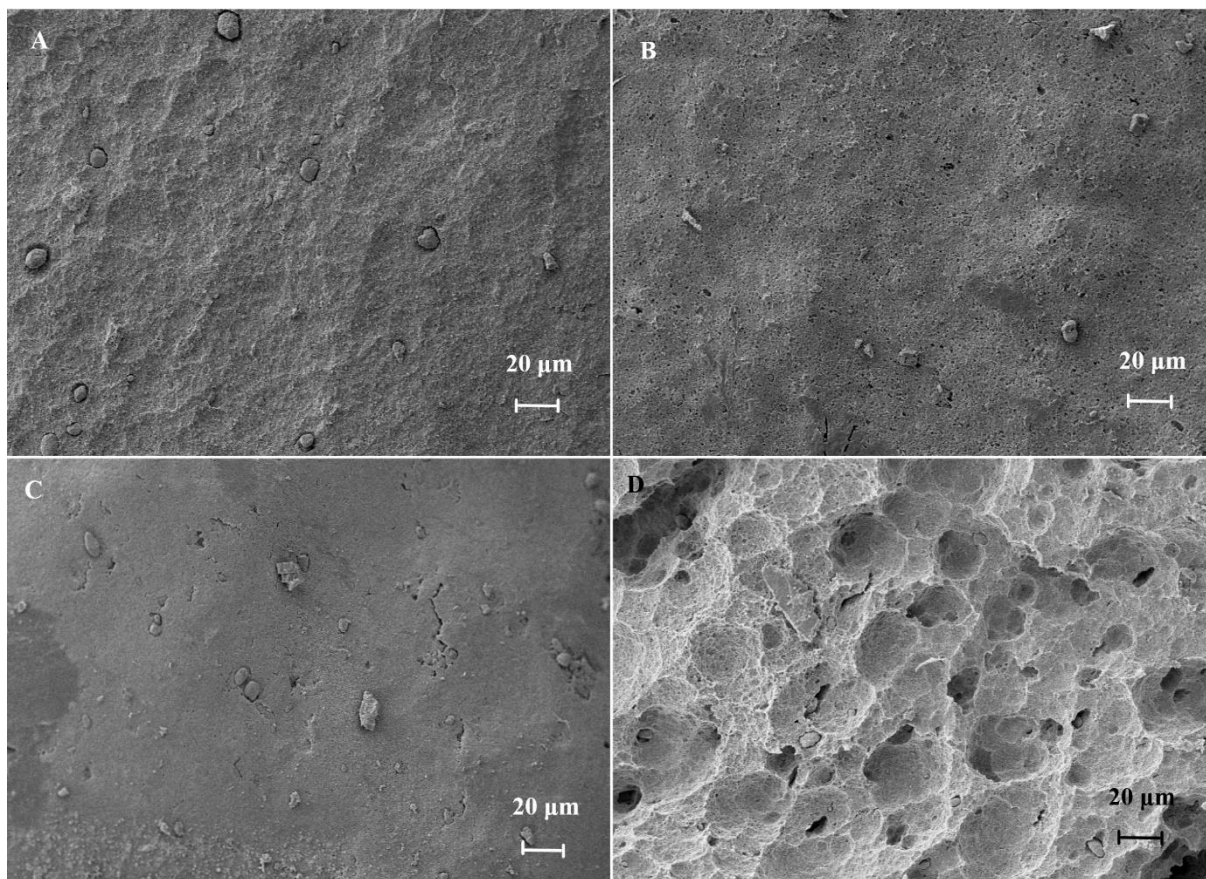
Obr. 18 zobrazuje detailnú SEM snímku granule amorfného PLA v 1. a 2. týždni. Na snímke A sú zobrazené detailné pórovité úseky, ktoré naznačujú prítomnosť mikroorganizmov schopných produkcie depolymeráz a degradáciu polyméru pomocou nich, teda biologickú degradáciu. Snímka B zobrazuje členité útvary spôsobené pravdepodobne tepelnou degradáciou. Tieto snímky ukazujú, že amorfné PLA teda podlieha ako abiotickej, tak aj biologickej degradácii v prostredí kompostu. V určitom okamihu (po 2. týždni) ale začala prevládať abiotická degradácia väčších granúl, ktoré obsahovali ešte dlhé reťazce polyméru. Taktiež mohla popri tom pokračovať biodegradácia kratších reťazcov, avšak, ako bolo viditeľné aj z makroskopických snímok granule sa už rozpadávali na menšie častice a prach. Menšie častice mohli byť zdrojom uhlíka pre enzýmy, avšak tieto vzorky nebolo možné udržať vo vrecúšku a ďalej analyzovať.

Podobné závery konštatoval aj Kale a kol. (viz. [121]). V ich štúdií sledovali degradáciu fliaš vyrobených z PLA v prostredí kompostu. Navrhovali záver, že degradácia PLA prebieha dvojstupňovým systémom, a to hydrolýzou väzieb na kratšie reťazce, ktoré môžu byť následne degradované enzýmami [121].



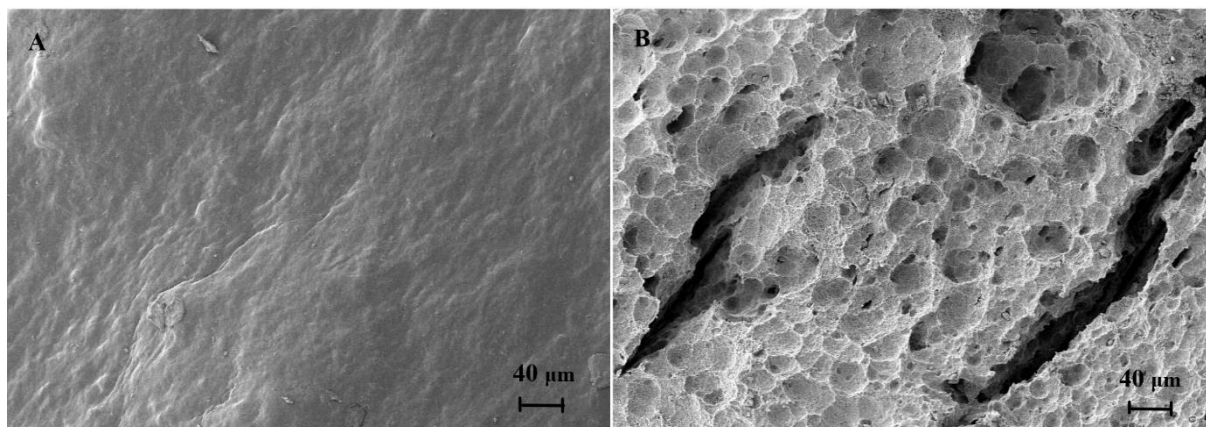
Obr. 19: Snímka semikryštalického PLA, priblíženie 500x, mierka zobrazuje 40 µm (A – pôvodná vzorka; B – 2. týždeň; C – 6. týždeň; D – 8. týždeň)

Obr. 19 zobrazuje snímky z elektrónového mikroskopu vzoriek semikryštalického PLA. Na snímke B sú viditeľné zlomy a členité útvary, ktoré pokračovali aj v 6. a 8. týždni (C a D). V porovnaní je vzorka na snímke B členitejšia ako vzorky na snímke C a D. Môžeme konštatovať, že u semikryštalického PLA nebola viditeľná biologická degradácia, pretože na snímkach zo SEM neboli nájdené žiadne pórovité časti spôsobené enzýmami. Biodegradácia mohla prebiehať, podobne ako u amorfneho PLA, už na odštiepených častiach polyméru, ktoré obsahovali kratšie, už degradované reťazce. Snímky zobrazujúce posledné týždne experimentu (C a D) vykazujú vyššiu pravidelnosť, čo môžu byť nedegradované semikryštalické oblasti, ktoré podliehajú degradácii pomalšie. Táto skutočnosť môže byť spôsobená pôsobením medzimolekulárnych síl a usporiadanosťou reťazcov v semikryštalických oblastiach, vďaka čomu je štiepenie väzieb medzi nimi náročnejšie. Taktiež sa so zvyšujúcim sa obsahom semikryštalickej oblasti zvyšuje teplotná odolnosť PLA, čo môžeme aplikovať aj na tento experiment. V porovnaní s amorfným PLA prebiehala degradácia analogicky, avšak pomalšie. U semikryštalického PLA pravdepodobne došlo k prvej degradácii amorfnej oblasti, ktorá je menej odolná voči teplote z dôvodu menšej usporiadanosti reťazcov a následnej postupnej degradácii semikryštalických oblastí.



Obr. 20: Snímka PHB, priblíženie 1000x, (A – 2. týždeň; B – 4. týždeň; C – 6. týždeň; D – 8. týždeň)

Na obr. 20 sú zobrazené snímky z elektrónového mikroskopu vzoriek PHB. Snímky A, B a C zobrazujú vzorky PHB po 2., 4. a 6. týždni experimentu. Je viditeľná zvýšená pórovitosť povrchu, čo znamená degradáciu pomocou enzýmov. Snímka D zobrazuje povrch granule po 8. týždni kompostovania. Sú viditeľné veľké póry a dezintegrácia povrchu oproti predchádzajúcim snímkam, čo môže byť spôsobené hlavne enzymatickou degradáciou materiálu od povrchu do vnútra.



Obr. 21: Snímka PHB, priblíženie 500x (A – pôvodná vzorka, B – vzorka po 8. týždňoch)

Na obr. 21 je zobrazené porovnanie povrchu pôvodnej granule polyméru a granule po 8. týždňoch experimentu. Snímka A zobrazuje pôvodnú vzorku PHB, ktorá má pomerne hladký povrch neobsahujúci žiadne členité oblasti. Snímka B obsahuje mnoho vakancií a pórov,

ale taktiež sú viditeľné priečne zlomy, ktoré môžu znamenať degradáciu pomocou tepla, ktorá spôsobuje lámanie granúl na menšie. V porovnaní s makroskopickým pozorovaním, kedy bolo viditeľné iba zmenšovanie granúl, môžeme konštatovať, že degradácia PHB prebieha primárne biologicky, ale taktiež nemôžeme vylúčiť abiotickú degradáciu po určitom čase. Keďže priečne zlomy boli viditeľné až na snímke z posledného týždňa experimentu, je pravdepodobné, že k abiotickej degradácii PHB by došlo v pokročilejšej fáze rozkladu. Pre potvrdenie by bolo vhodné, aby experiment s polymérom prebiehal v dlhšom časovom úseku. V porovnaní so semikryštalickým PLA (obr. 19, snímka B), ktorý degraduje primárne abioticky je veľkosť zlomov na povrchu PHB omnoho menšia. Podobné závery konštatoval Weng a kol. (viz. [113]), ktorí tvrdili, že degradácia PHB prebieha enzymatickou eróziou od povrchu do vnútra granule [113].

4.3 Výsledky analýz vzoriek kompostov

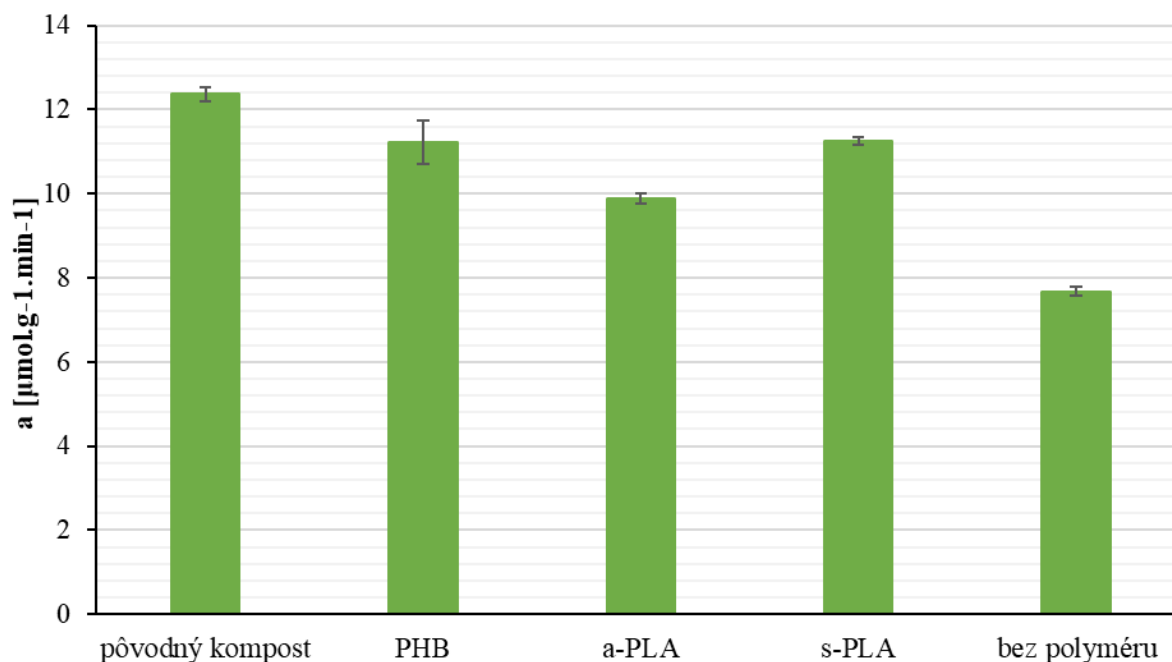
4.3.1 Stanovenie enzýmovej aktivity esteráz

4.3.1.1 Optimalizácia testu

Postup experimentu bol prebratý z knihy „Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry“, kapitoly „Enzyme activities“ (Kassem Alef a Paolo Nannipieri, viz. [116]). Po uskutočnení prvého testu bola kvôli podmienkam v laboratóriu a povahe testovanej látky potrebná optimalizácia. V pôvodnom experimente bol štandardný roztok pred použitím na kalibráciu riedený 100-krát, avšak pre naše vzorky bolo vhodnejšie ho neriediť. Taktiež bola optimalizovaná navážka kompostu pre reakciu, vybrané boli navážky 0,1; 0,05; 0,01; 0,005 a 0,001 g. Ako najvhodnejšia sa preukázala navážka 0,01 g, ktorá bola ďalej používaná. Z hľadiska časovej, finančnej a manipulačnej náročnosti bola enzýmová aktivita stanovená pre jeden týždeň a vzorku pôvodného kompostu. Tento experiment slúžil primárne na hodnotenie použiteľnosti metódy pre analýzu kompostu a jej optimalizácie pre ďalšie merania.

4.3.1.2 Výsledky analýzy

Pre využitie polymérnych substrátov mikroorganizmami je dôležitá produkcia vhodných extracelulárnych hydrolytických enzýmov. Tieto enzýmy majú za úlohu štiepenie väzieb v použitých polyméroch. V tejto práci boli použité práve polyestery, preto môže byť očakávaná prítomnosť hlavne esteráz. Polyhydroxalkanoáty sú štiepené prevažne PHA depolymerázami, ktoré sa tiež radia medzi esterázy. Taktiež môžu byť štiepené pomocou niektorých extracelulárnych lipáz. Na rozdiel od nich však PHA depolymerázy vykazujú omnoho vyššiu substrátovú špecifitu a nie sú schopné štiepiť esterovú väzbu lipidov [70]. Pre štiepenie PLA je vzhľadom na esterovú väzbu potrebná prítomnosť esteráz, avšak pre polylaktát nebol zistený špecifický degradačný enzým, ako pre polyhydroxyalkanoáty.



Obr. 22: Aktivita esteráz v pôvodnom komposte a vo vzorkách v 4. týždni

Na obr. 22 sú zobrazené enzymové aktivity esteráz vo vzorke pôvodného kompostu a vo vzorkách kompostu zo 4. týždňa. Pôvodný kompost predstavoval kompost z počiatku experimentu, ktorý neobsahoval polyméry. Enzymová aktivita esteráz bola vo vzorke pôvodného kompostu a vo vzorkách kompostu, ktoré obsahovali polyméry o niečo vyššia ako enzymová aktivita vo vzorke kompostu zo 4. týždňa, ktorý neobsahoval polymér. Táto skutočnosť naznačuje, že v komposte boli prítomné mikroorganizmy schopné deteriorácie polyesterov a následnej sekrécie esteráz. Vysoká enzymová aktivita bola zaznamenaná v komposte obsahujúcom PHB. Esterázy prítomné v komposte spolu s PHB pravdepodobne patrili do rodiny PHA depolymeráz. Táto vzorka je však tiež zaťažená vyššou smerodajnou odchýlkou ako ostatné vzorky. Táto skutočnosť môže byť spôsobená tým, že PHA depolymeráza je vysoko špecifická, a vzorky mohli byť odobraté práve z miesta kompostu, kde bola nižšia abundancia tohto enzýmu. V prípade vzoriek amorfného PLA bola zaznamenaná o niečo nižšia enzymová aktivita. Kompost so semikryštalickým PLA vykazoval enzymovú aktivitu esteráz vyššiu ako kompost s amorfným PLA a takmer rovnakú, ako vzorka kompostu s PHB. V porovnaní s kompostom bez polyméru môžeme teda konštatovať, že prítomnosť či už amorfného alebo semikryštalického PLA indukuje produkciu extracelulárnych esteráz. Ako však naznačujú výsledky analýz úbytkov polymérov (viz. kapitola 4.2) je schopnosť týchto vyprodukovaných enzýmov štiepiť tieto substráty menšia ako v prípade PHB. Zaujímavá je skutočnosť, že aktivita esteráz v komposte so vzorkami semikryštalického PLA je takmer rovnako vysoká, ako v prípade kompostu s PHB, kde bola enzymatická degradácia potvrdená pomocou SEM snímok (viz. obr. 20). V prípade semikryštalického PLA však enzymatická degradácia na základe predchádzajúcich výsledkov nefunguje v takom rozsahu, preto mohla byť zvýšená aktivita esteráz spôsobená prítomnosťou polyméru, avšak tieto esterázy neboli schopné plnohodnotne degradovať PLA.

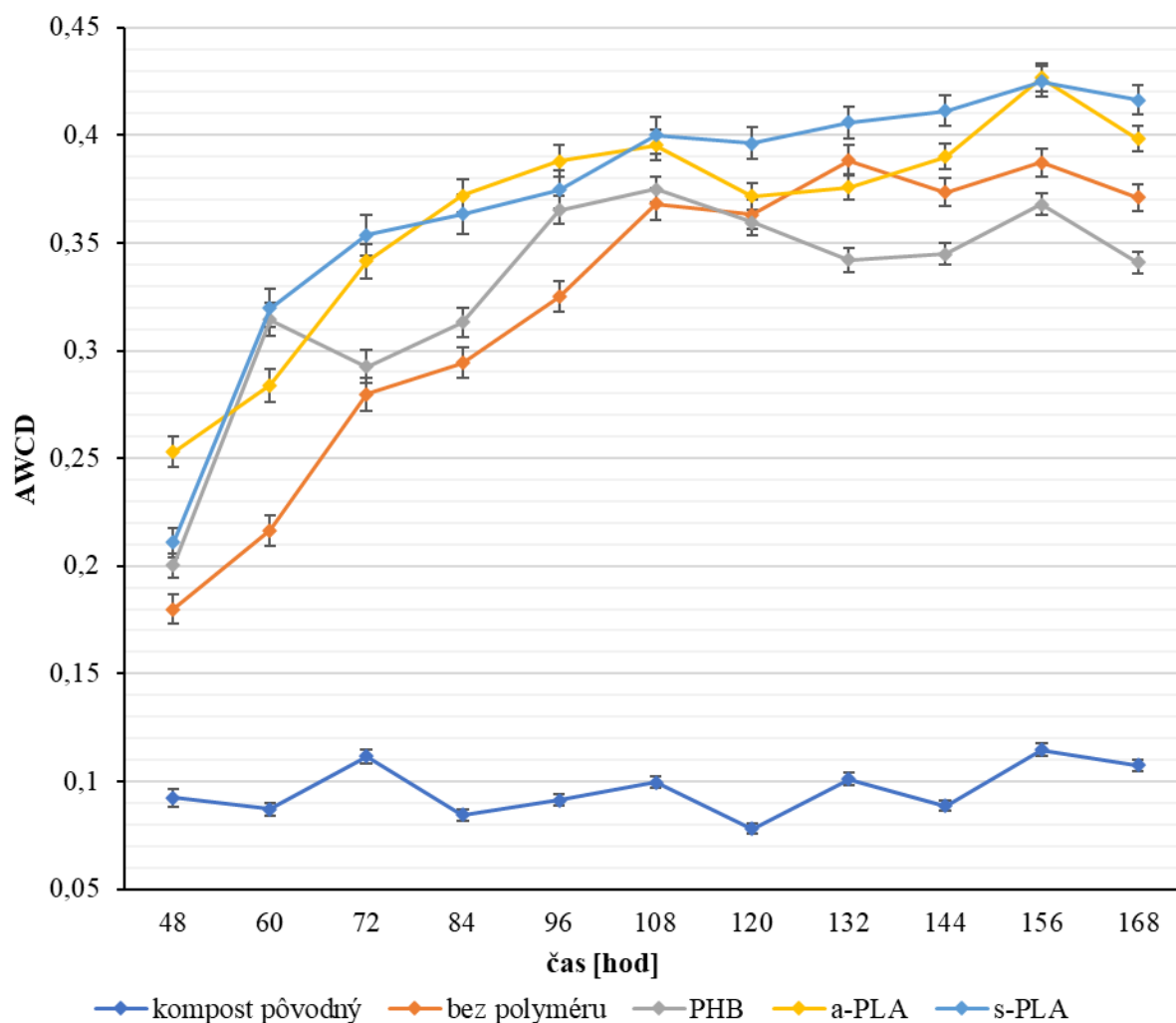
4.3.2 Sledovanie biodiverzity mikroorganizmov

Pre sledovanie biodiverzity mikroorganizmov v kompostoch boli použité mikrotitračné doštičky Biolog EcoPlates™. Obsahujú najvyužiteľnejšie zdroje uhlíka pre fyziologické profilovanie heterotrofných mikrobiálnych skupín v pôdach. Často sú používané pre analýzu dopadu rôznych znečistení pôd, ako napríklad ťažkých kovov alebo antibiotík (viz. [122]). Výrobca uvádza, že tieto doštičky sú vhodné pre analýzu mikrobiómu rôznych pôd, kompostu, odpadových vôd, priemyselného odpadu a iných [123]. Ich využitie vo výskume ekológie môže mať pozitívny vplyv na zisťovanie a hodnotenie zmien v životnom prostredí.

V tejto práci boli použité na sledovanie zmien biodiverzity mikroorganizmov v komposte v priebehu kompostovacieho procesu. Analyzovaná bola vzorka pôvodného kompostu, vzorky kompostov zo všetkých reaktorov v 4. týždni a v 8. týždni. Pomocou nich bolo cieľom zistiť, ako a či vôbec jednotlivé polyméry ovplyvňujú mikrobióm v prostredí kompostu v porovnaní s kompostom bez polymérov. Boli spočítané publikáciami odporúčané hodnoty AWCD, Shannonov index diverzity (H') a dáta boli spracované analýzou hlavných komponentov (PCA) [122, 124].

4.3.2.1 Priemerný vývoj farby jamky (AWCD)

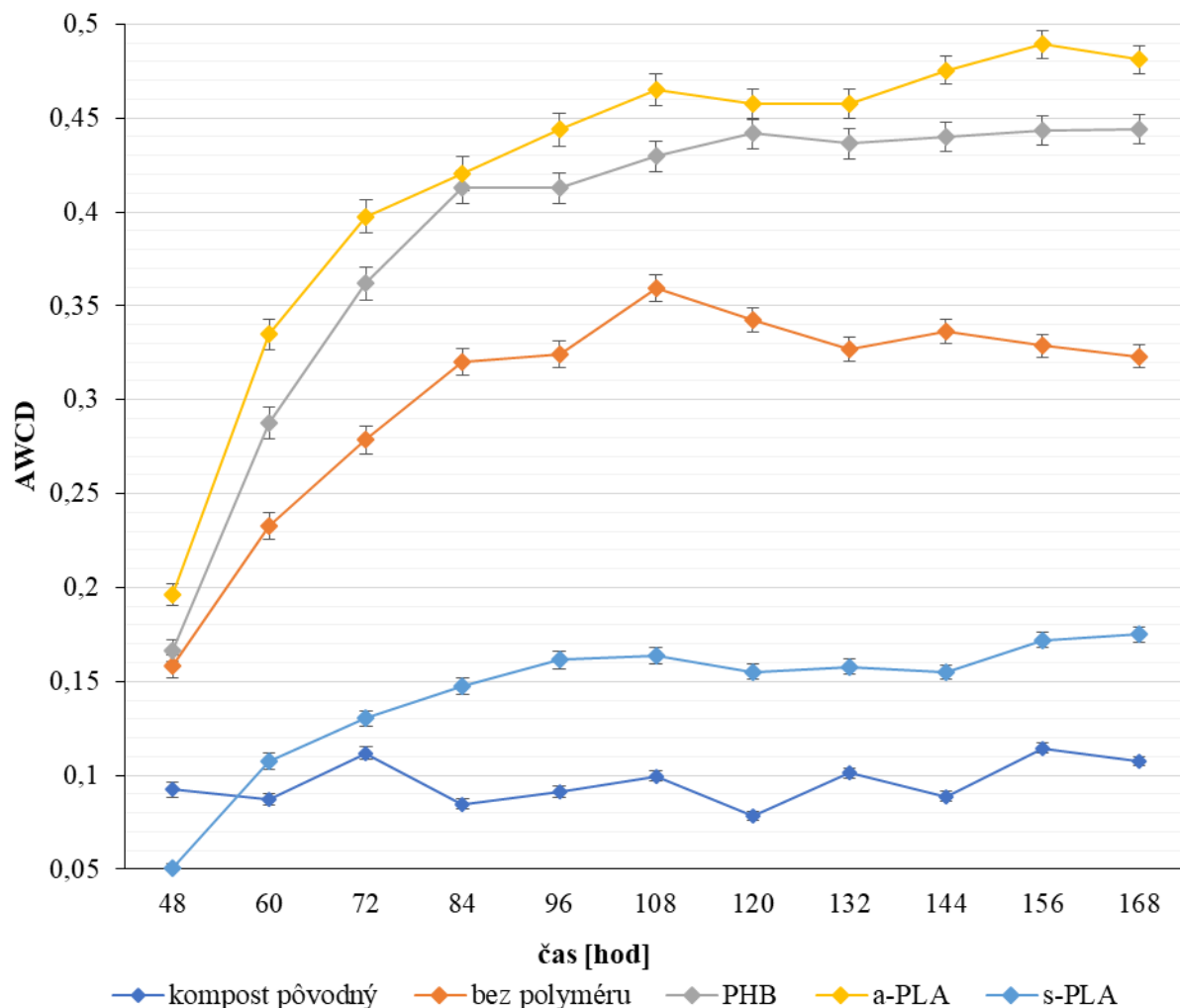
Priemerný vývoj farby jamky ukazuje mieru intenzity využívania substrátov v danej sade jamiek prítomnými mikroorganizmami. Touto štatistickou analýzou sa dá určiť priemerná aktivita daných mikroorganizmov v čase, pričom hodnoty sú znormalizované, čím je eliminovaný vplyv počiatočného množstva buniek inokulovaných do jamiek.



Obr. 23: AWCD pre vzorky kompostu zo 4. týždňa a pôvodného kompostu

Na obr. 23 je zobrazené AWCD vzorky pôvodného kompostu v porovnaní so vzorkami kompostu zo 4. týždňa. Pôvodný kompost reprezentoval kompost na počiatku experimentu bez polymérov. Jeho analýza bola prevedená pre porovnanie vývoja kompostov v procese testu. Z obr. 23 je viditeľný výrazný rozdiel vo vývoji farieb jamiek pôvodného kompostu a ostatných vzoriek. Nízky priemerný vývoj farby jamiek môže byť spôsobený tým, že vzorka pôvodného kompostu bola oproti ostatným vzorkám v počiatočnej fáze dozrievania, preto v porovnaní so vzorkami z procesu kompostovania môže obsahovať nižšiu koncentráciu mikroorganizmov. Rovnako sa mohlo stať, že do kompostu boli v priebehu kompostovania zanesené mikroorganizmy z vonkajšieho prostredia, ktoré rozšírili počet druhov a tým aj možnosť využitia väčšieho rozsahu substrátov. Vo vzorkách kompostov s PHB, semikryštalickým PLA a bez polyméru je v prvých hodinách inkubácie viditeľný strmší nárast AWCD, čo môže znamenať rýchlejšiu adaptáciu druhov mikroorganizmov na rôzne substráty. V prípade vzorky kompostu s amorfným PLA je tento nárast pomalší, avšak v konečnom dôsledku dosahujú všetky vzorky z 4. týždňa podobné hodnoty. Táto skutočnosť môže znamenať, že vo vzorkách odobratých zo 4. týždňa procesu kompostovania sú druhy mikroorganizmov schopné rýchlejšej adaptácie na rôzne druhy substrátov ako vo vzorke pôvodného kompostu. Nárast AWCD vo všetkých vzorkách zo 4. týždňa mal podobný trend, kým vo vzorke pôvodného kompostu je vývoj AWCD skôr konštantný. Zaujímavosťou bolo,

že pri vzorke pôvodného kompostu došlo k zmene farby kontrolnej jamky, ktorá obsahovala iba vodu, tetrazoliové farbivo a danú vzorku. Tetrazoliové farbivo sa redukuje zmenou redoxného potenciálu, čo môže znamenať, že zmeny redoxného potenciálu vzorky počas inkubácie umožnili jeho redukciu.

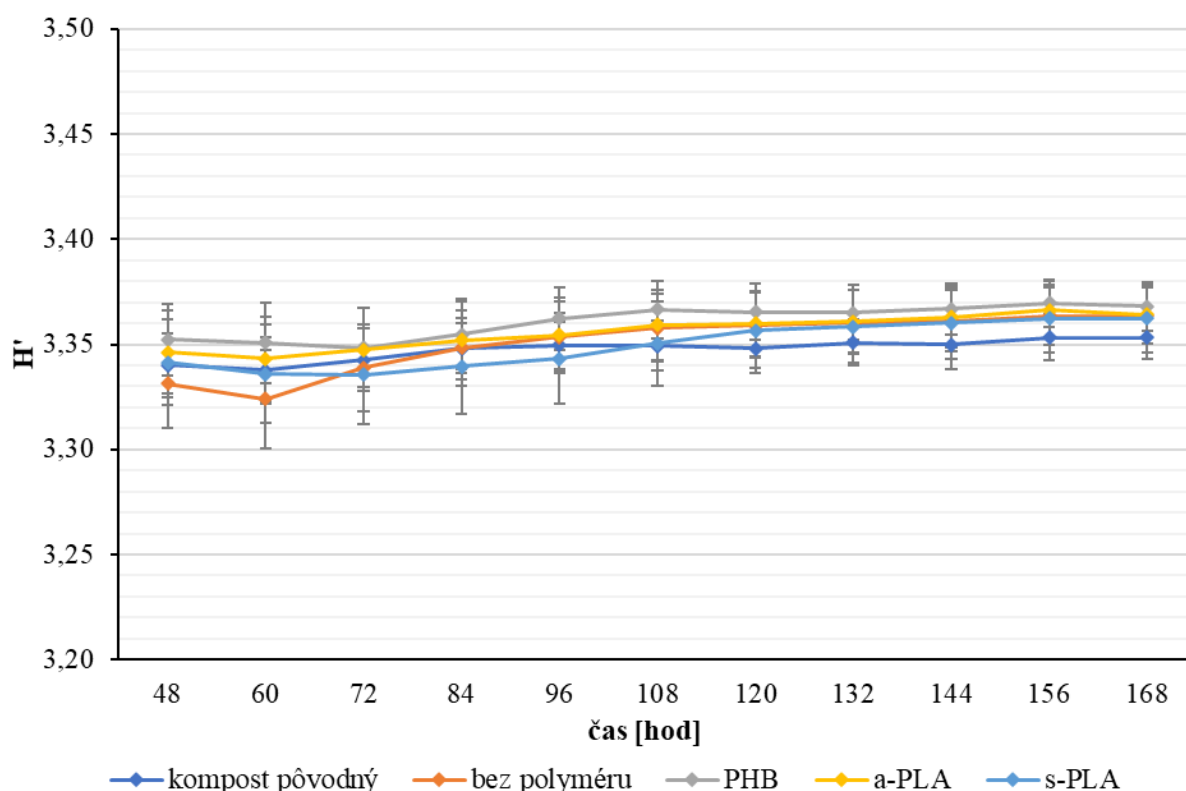


Obr. 24: AWCD vzoriek kompostu z 8. týždňa

Obr. 24 zobrazuje AWCD pre vzorku pôvodného kompostu v porovnaní so vzorkami kompostu z 8. týždňa, čiže posledného týždňa degradácie polymérov. V tejto sade vzoriek je markantný rozdiel medzi vzorkou kompostu obsahujúcou semikryštalické PLA (s-PLA) a ostatnými vzorkami. Tento rozdiel mohol byť spôsobený nižšou aktivitou mikrobiómu z dôvodu neprítomnosti amorfnej oblasti polyméru, ktorá môže byť náchylnejšia k enzymatickej degradácii, a to vďaka lepšej prístupnosti k väzbám. V dôsledku toho mohlo dôjsť k hladovaniu niektorých druhov neschopných využitia iných komponent kompostu a k ich následnému odumretiu. Podobne ako u vzoriek z 4. týždňa (viz. obr. 23) je vo vzorkách z 8. týždňa viditeľný podobný trend nárastu, kým v 4. týždni dosahuje s-PLA najvyššie hodnoty spomedzi všetkých vzoriek. Vzorka kompostu bez polyméru dosahovala tiež nižšie hodnoty ako vzorky s obsahom PHB a amorfným PLA. Mohlo to byť spôsobené tým, že prítomnosť biologicky odbúrateľných bioplastov evokuje vyššiu rozmanitosť a prítomnosť druhov schopných rýchlejšej adaptácie na viac druhov substrátov.

4.3.2.2 Shannonov index diverzity

Shannonov index diverzity (H') zobrazuje úmerný farebný vývoj jamky oproti celkovému farebnému vývoju všetkých jamiek v sade. Ide o často používaný index, ktorý sa zameriava na meranie rôznorodosti druhov vzhľadom na ich jednotnosť [125]. V tomto prípade hodnota H' popisuje schopnosť bakteriálneho mikrobiómu utilizovať viac alebo menej typov zdrojov uhlíka, preto ide o index fyziologickej diverzity bakteriálnej komunity. Vyššie hodnoty indexu dosahujú mikrobiálne spoločenstvá schopné utilizovať viac substrátov [125].



Obr. 25: Shannonov index diverzity pre vzorku pôvodného kompostu a vzorky z 4. týždňa

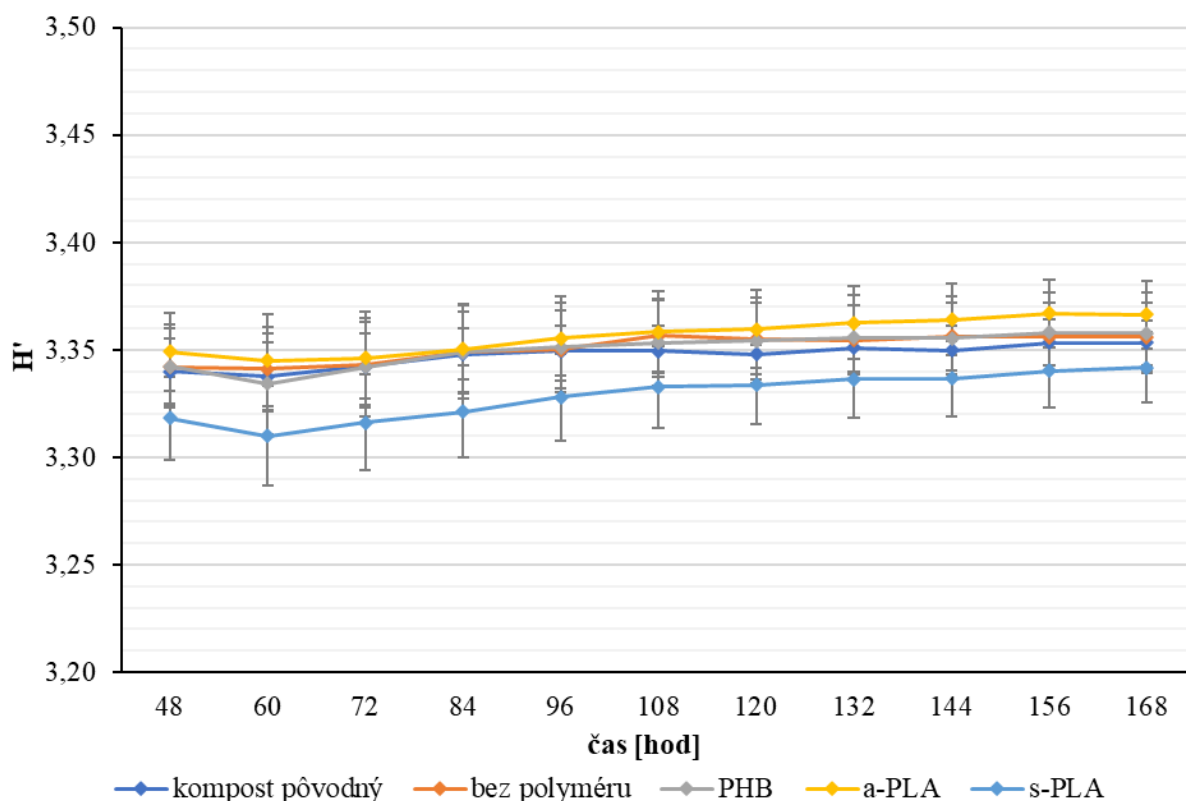
Vo vzorkách kompostov z 4. týždňa a pôvodného kompostu (viz. obr. 25) nastal v celom priebehu inkubácie mierny nárast indexu biodiverzity, priemerne o 0,02, čo je však hodnota blízka hodnotám smerodajných odchýlok vo všetkých vzorkách. Vzorka pôvodného kompostu má miernejší nárast biodiverzity v procese inkubácie, čo znamenalo pomalšie zintenzívnenie sfarbenia jamiek. Konečná hodnota indexu biodiverzity pôvodného kompostu dosiahla hodnotu 3,35. Táto hodnota bola nižšia v porovnaní so vzorkami kompostov z 4. týždňa kompostovania. Tento fakt môže byť spôsobený tým, že pôvodný kompost mohol byť ešte v počiatočnej fáze dozrievania, kedy dochádza k vývoju mikrobiómu a nemusel obsahovať dostatok druhov mikroorganizmov.

V prípade vzorky kompostu obsahujúceho granule PHB bol index biodiverzity po celú dobu inkubácie o niečo vyšší než u ostatných vzoriek. Táto skutočnosť môže znamenať zvýšenú rozmanitosť mikrobiálneho spoločenstva schopného spracovávať viac druhov uhlíkových substrátov. Vyššia konečná hodnota indexu biodiverzity kompostu s PHB než pôvodného kompostu môže znamenať lepšiu schopnosť adaptácie kompostu na rôzne substráty.

V porovnaní so SEM snímkou povrchu degradovaných granúl PHB (viz. obr. 20), kde bola viditeľná tvorba pórov spôsobená enzýmami, a faktom, že PHB je enzymaticky degradované pomocou špecifických PHA depolymeráz, môžeme konštatovať, že mierne zvýšenie biodiverzity oproti ostatným vzorkám mohlo nastať z dôvodu prítomnosti mikroorganizmov metabolicky schopných produkovať extracelulárne PHA depolymerázy.

U vzoriek s amorfným a semikryštalickým PLA bol konečný index biodiverzity vyšší, než u vzorky pôvodného kompostu, avšak v porovnaní s indexom biodiverzity kompostu z 4. týždňa bez polyméru nebola zaznamenaná žiadna výrazná zmena. Porovnaním s analýzou hmotnostného úbytku týchto polymérov (viz. obr. 11), môžeme konštatovať, že nie je viditeľná výraznejšia aktivita mikroorganizmov v prítomnosti semikryštalického PLA v prostredí kompostu.

U amorfného PLA (a-PLA) bolo pomocou SEM snímky (viz. obr. 17, snímka B) detegovaná povrchová degradácia enzýmami v 2. týždni, ktorú následne pravdepodobne prevýšila abiotická degradácia. Index biodiverzity vzorky zo 4. týždňa ukázal, že v porovnaní so vzorkou bez polyméru bola na počiatku inkubácie vyššia biodiverzita vo vzorke s a-PLA. Analýza aktivity esteráz (viz. obr. 22) tiež ukázala vyššiu aktivitu v porovnaní so vzorkou bez polyméru, čo môže znamenať zvýšenú aktivitu niektorých druhov schopných sekrécie extracelulárnych esteráz. Vo vrecúšku zo 4. týždňa bolo nájdené minimálne množstvo granúl, ktoré boli rozpadnuté na prach, preto mohli zvyšky prítomné v komposte podliehať degradácii esterázami za účelom rozkladu exogénneho polyméru a vyživovania ich producentov.



Obr. 26: Shannonov index diverzity pre vzorku pôvodného kompostu a vzorky z 8. týždňa

Vo vzorkách kompostov z 8. týždňa procesu degradácie (viz. obr. 26) nastal podobný trend ako vo vzorkách z 4. týždňa. Počas celého procesu inkubácie došlo k miernemu nárastu indexu diverzity, čo je spôsobené zintenzívnením sfarbenia v jednotlivých jamkách, teda dosiahnutím maxima rastu mikroorganizmami. Dôležitým ukazovateľom je konečná hodnota, ktorá pri porovnaní vzoriek kompostov s bioplastami a prázdneho kompostu ukazuje mieru vplyvu prítomnosti bioplastov na biodiverzitu kompostu. Vzorka pôvodného kompostu a kompostu z 8. týždňa bez polyméru dosahovali takmer identické hodnoty indexu biodiverzity. Porovnaním s kompostom z 4. týždňa bez polyméru, kedy bola táto hodnota o niečo vyššia, mohlo dôjsť po 8. týždňoch k miernemu zostarnutiu kompostu, teda k vymretiu niektorých mikrobiálnych druhov. Podľa Yang a kol. (viz. [126]) dosahuje vzorka kompostu pridaneého k pôde hodnoty H' okolo 3,2, čo je hodnota iba mierne nižšia ako hodnota dosiahnutá v tejto práci. Podľa Liu a kol. (viz. [122]) dosahuje Shannonov index biodiverzity pôdy hodnoty približne 3,16, čo je hodnota blízka hodnote kompostu. Autori Furtak a kol. (viz. [127]) analyzovali riečnu vodu a zistili, že index biodiverzity je približne 4,94, čo je omnoho vyššia hodnota, ako v pôde alebo komposte.

Nižšia hodnota biodiverzity kompostu s PHB z 8. týždňa v porovnaní so vzorkou kompostu s PHB z 4. týždňa môže znamenať vyselektovanie druhov v procese kompostovania a následnú zvýšenú aktivitu iba adaptovaných druhov. Nižšia biodiverzita môže tiež vysvetľovať stagnáciu hmotnostného úbytku v predposledných týždňoch degradácie (viz. obr. 11). Yeng a kol. (viz. [126]) zistili, že hodnota Shannonovho indexu biodiverzity v komposte sa môže pohybovať v rozmedzí 2,8–3,2, čo je v porovnaní s nami stanovenými hodnotami viditeľne nižšie. To znamená, že sa v mikrobióme našich kompostov nachádza viac mikrobiálnych druhov, a teda pravdepodobnosť výskytu producentov PHA depolymeráz je vyššia. To naznačujú aj snímky SEM analýzy PHB z 8. týždňa (viz. obr. 21), kde sú viditeľné póry spôsobené enzymatickou aktivitou.

Shannonov index diverzity bol pre vzorku s amorfným PLA z 8. týždňa v rovnakých hodnotách ako v prípade vzorky z 4. týždňa. Prekvapujúco však dosahoval najvyššie hodnoty v porovnaní s ostatnými vzorkami z 8. týždňa. V tomto týždni degradácie už neboli vo vrecúškach zachytené žiadne zvyšky polyméru a pravdepodobne došlo ku kompletnej degradácii. Ako je viditeľné v makroskopicknej analýze a-PLA (viz. obr. 14), vzorky dostatočne veľké pre manipuláciu boli iba do 3. týždňa kompostovania. Pri SEM snímkach (viz. obr. 18) boli viditeľné zmeny na povrchu granúl spôsobené enzýmami. Podobné hodnoty H' ako vo vzorke z 8. týždňa boli zaznamenané vo vzorke kompostu z 4. týždňa degradácie (viz. obr. 25), kedy mohli byť v komposte prítomné ešte nedegradované mikročastice polyméru. Preto by mohlo byť pravdepodobné, že mikroorganizmy prítomné v mikrobióme kompostu vylučujú extracelulárne esterázy, ktoré štiepia PLA. Presnejšie tvrdenia si však vyžadujú bližšie analýzy, ako napríklad molekulárne genetické prístupy.

Vzorka so semikryštalickým PLA z 8. týždňa zaznamenala nižší index diverzity ako bol zistený vo vzorke z 4. týždňa. Tento výstup koreluje s AWCD rovnakej vzorky (viz. obr. 24), kedy bola oproti vzorke z 4. týždňa výrazne znížená schopnosť mikrobiómu utilizovať viac druhov substrátov. Táto skutočnosť mohla byť spôsobená tým, že v poslednom týždni degradácie s-PLA bola už amorfná oblasť degradovaná a zostávala iba kryštalická oblasť, ktorá nebola

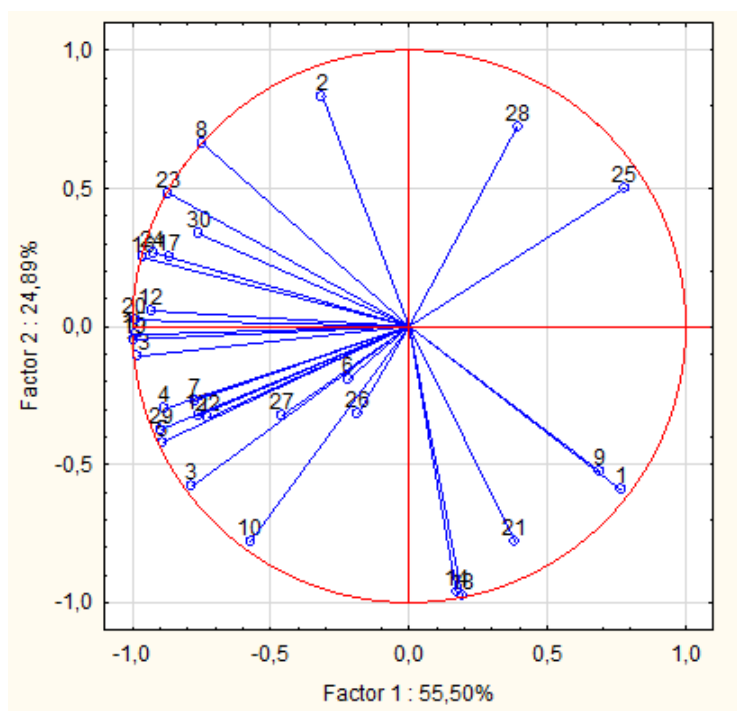
dostupná pre niektoré druhy mikroorganizmov, čím mohla byť znížená rozmanitosť mikrobiómu kompostu. Túto teóriu potvrdzujú aj analýza hmotnostných úbytkov a SEM snímky (viz. obr. 11 a obr. 19), kde je viditeľný postup degradácie, ktorý ukazuje primárnu degradáciu amorfnej oblasti a následnú pomalšiu degradáciu semikryštalickej časti. V porovnaní s indexom biodiverzity kompostu z 8. týždňa bez polyméru je táto hodnota o niečo nižšia, čo môže znamenať negatívne ovplyvnenie rozmanitosti mikrobiómu kompostu s dlhšou prítomnosťou semikryštalického PLA. Avšak tento rozdiel spadá do rozmedzia smerodajnej odchýlky, preto môžeme povedať, že rozdiel medzi vzorkami nie je štatisticky významný.

4.3.2.3 PCA analýza

Analýzou hlavných komponentov (PCA) boli spracované výsledky inkubácie sledovania biodiverzity kompostu. Pre analýzu boli použité normalizované hodnoty vývoja farby (WCD) jamiek z posledného času inkubácie, teda 168 hodín. Podľa Xu a kol. (viz. [124]) sú ideálne hodnoty pre použitie na PCA analýzu v rozmedzí 144–168 hodín inkubácie, kedy sú hodnoty už ustálené a na vývoji sfarbenia sa podieľajú aj pomalšie rastúce mikroorganizmy, ako sú plesne [124]. Pomocou PCA dochádza k zjednodušeniu veľkého množstva premenných do dvoch základných komponent zobrazujúcich vplyv všetkých sledovaných premenných, vďaka čomu je možné sledovať podobnosť vzoriek v dvojrozmernom zobrazení. V tomto prípade sme mali 31 premenných, čo znamenalo každú jamku obsahujúcu konkrétny substrát. Pre PCA bolo však použitých len 30 premenných, pretože žiadna zo vzoriek nevykazovala žiadnu rastovú aktivitu na 2-hydroxybenzoovej kyseline.

Tab. 6: Označenie substrátov vo výstupoch zo softvéru STATISTICA

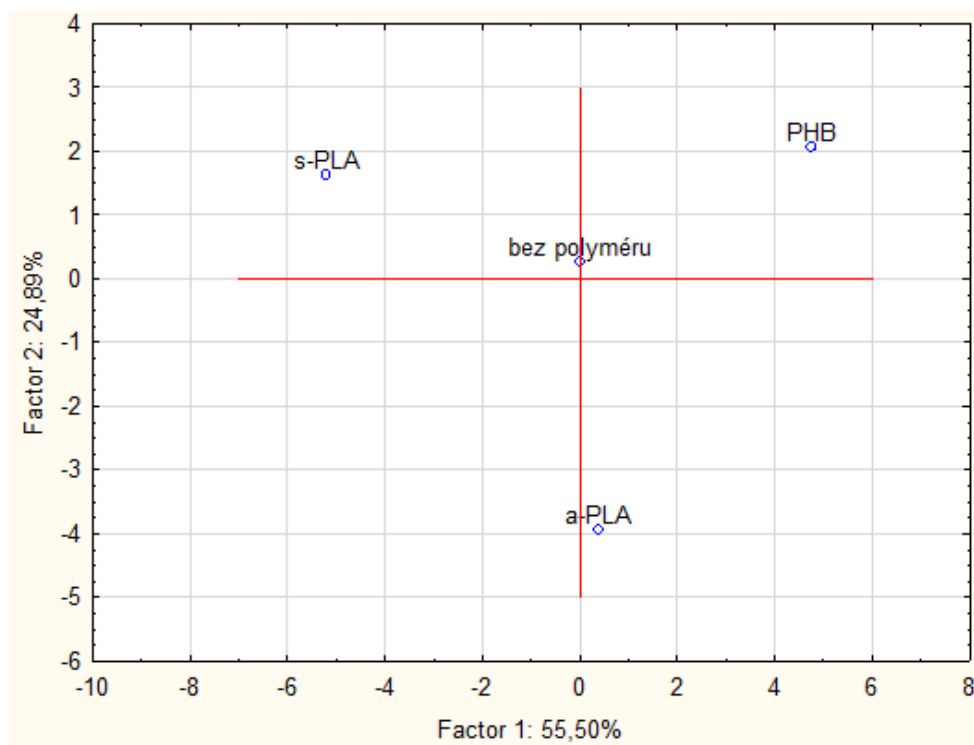
číslo	substrát	číslo	substrát
1	β -metyl-D-glukozid	16	N-acetyl-D-glukózamín
2	D-galaktóno- γ -laktón	17	γ -aminobutánová kyselina
3	L-arginín	18	L-treonín
4	metyl-pyruvát	19	glykogén
5	D-xylóza	20	D-glukózamínová kyselina
6	D-galakturónová kyselina	21	itakónová kyselina
7	L-asparagín	22	glycyl-L-glutamát
8	Tween 40	23	D-celebióza
9	i-erytritol	24	glukóza-1-fosfát
10	L-fenylalanín	25	α -ketobutánová kyselina
11	Tween 80	26	fenyletylamín
12	D-manitol	27	α -D-laktóza
13	4-hydroxybenzoová kyselina	28	D,L- α -glycerofosfát
14	L-serín	29	D-jablčná kyselina
15	α -cyklodextrín	30	putrescín



Obr. 27: Výstup pre vzorky 4. týždňa (vývoj premenných – substrátov)

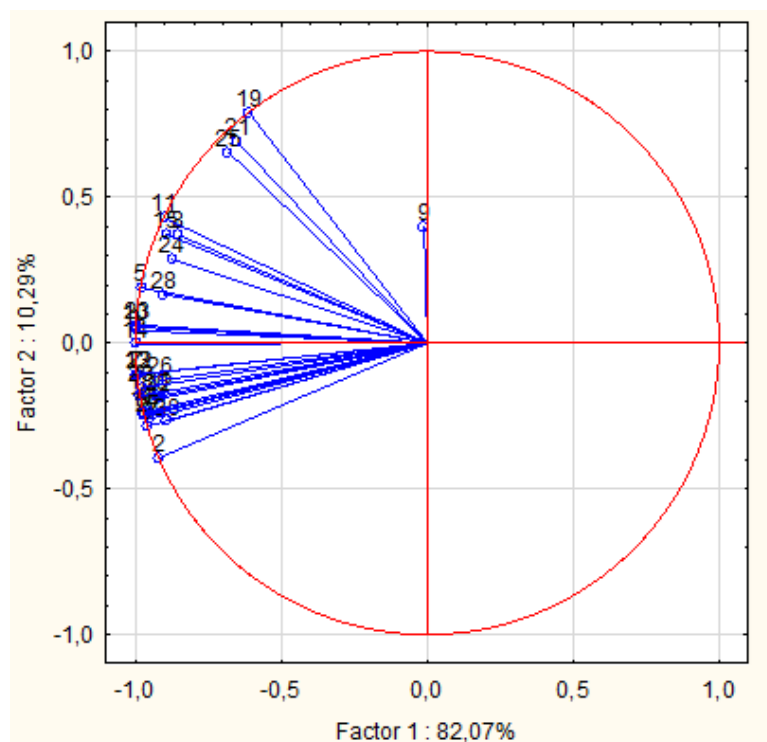
Na obr. 27 je zobrazený výstup zo softvéru STATISTICA, ktorý popisuje vývoj substrátov pre vzorky z 4. týždňa. Tento výstup nám dáva základ pre hodnotenie aktivity vzoriek

kompostov na vybraných substrátoch pre daný týždeň kompostovania. Viditeľná je vysoká rozmanitosť vývoja substrátov, avšak predovšetkým II. a III. kvadrant predstavuje smer vysokej aktivity vzoriek na väčšine substrátov.

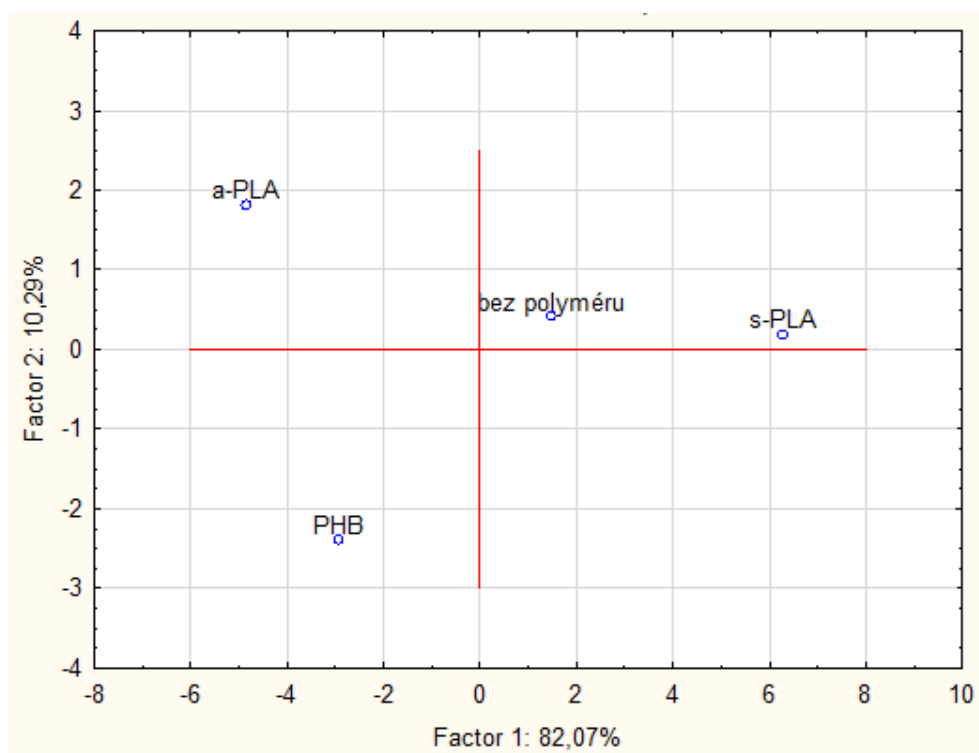


Obr. 28: Výstup pre vzorky z 4. týždňa (aktivita vzoriek)

Vzorka z 4. týždňa bez polyméru (viz. obr. 28) sa nachádza v centre grafu pri nulových hodnotách hlavných komponent, čo nám ukazuje, že tento kompost nevykazoval žiadnu selektívnu aktivitu voči konkrétnej sade substrátov. Preto táto vzorka môže byť braná ako referenčná pre porovnanie vplyvu prítomnosti polymérov na vývoj mikrobiálnych konzorcií kompostu. Porovnaním obr. 27 a obr. 28 môžeme vidieť, že všetky vzorky z 4. týždňa s obsahom polyméru vykazovali zvýšené aktivity na vybraných sádach substrátov. Vzorka kompostu z 4. týždňa s obsahom PHB vykazovala zvýšenú aktivitu na dvoch z 31 substrátov, konkrétne na D,L- α -glycerofosfáte a α -ketobutánovej kyseline. To znamená, že PHB obmedzovalo vývoj mikrobiómu v 4. týždni, pričom výraznejšiu aktivitu vykazovali len mikroorganizmy schopné rasti na týchto substrátoch. Vzorka kompostu s amorfným PLA vykazovala zvýšenú aktivitu tiež na obmedzenom počte substrátov, napríklad na itakónovej kyseline a L-fenylalaníne. Vzhľadom k predošlým výsledkom práce je zaujímavé, že kompost so semikryštalickým PLA vykazoval zvýšenú aktivitu na najväčšom počte substrátov. Táto skutočnosť môže znamenať, že prítomnosť semikryštalického PLA v komposte po 4. týždňoch podnecovala aktivitu najväčšieho množstva druhov a tým využitia viac druhov substrátov. Je teda zrejmé, že v 4. týždni kompostovania semikryštalické PLA neovplyvňovala negatívne vývoj pestrosti mikrobiómu, naopak je pravdepodobné, že bol tento kompost mikrobiálne veľmi pestrý a adaptatívny.



Obr. 29: Výstup pre vzorky z 8. týždňa (vývoj premenných – substrátov)



Obr. 30: Výstup pre vzorky z 8. týždňa (aktivita vzoriek)

Obr. 29 zobrazuje vývoj substrátov na vzorkách kompostov z 8. týždňa. Je viditeľný podobný smer pre všetky substráty, čo uľahčuje interpretáciu výsledkov. Porovnaním obr. 29 a obr. 30 vynikajú vzorky kompostov z 8. týždňa obsahujúce PHB a amorfné PLA. Tieto vzorky sa nachádzali v oblasti, ktorá zobrazovala zvýšenú aktivitu na všetkých substrátoch. V porovnaní so vzorkami z 4. týždňa, kedy bola zvýšená aktivita u oboch vzoriek iba na malom

počte substrátov (PHB na dvoch a amorfné PLA na približne štyroch) môžeme konštatovať, že v procese kompostovania dochádza k rozšíreniu aktivity rôznych druhov mikroorganizmov, a tým aj schopnosti utilizovať viac druhov substrátov. V prípade prítomnosti PHB dochádza k pomalému vývoju mikrobiómu, avšak v neskorších týždňoch kompostovania je mikrobióm vysoko aktívny voči širokej škále substrátov. Túto skutočnosť môže potvrdzovať aj nárast hmotnostného úbytku PHB v posledných týždňoch (viz. obr. 11).

Vo vzorke kompostu so semikryštalickým PLA z 8. týždňa nie je viditeľná žiadna zvýšená aktivita na vybraných substrátoch. Porovnaním so vzorkou z 4. týždňa došlo k zníženiu aktivity mikroorganizmov, ktoré boli vtedy vysoko aktívne. Táto skutočnosť potvrdzuje hypotézu z predchádzajúcej analýzy, kedy bolo v 8. týždni znížené AWCD (viz. obr. 24 a obr. 26). Podľa výsledkov tejto analýzy môžeme teda tvrdiť, že prítomnosť semikryštalického PLA v komposte po dobu 8 týždňov má skôr negatívny vplyv na aktivitu mikrobiómu.

5 ZÁVER

Táto diplomová práca pojednáva o procese kompostovania. Bol vykonaný pilotný experiment kompostovacieho testu, ktorý bol navrhnutý v diplomovej práci Ing. Juraja Vodičku [115]. V tejto diplomovej práci bol vykonaný experiment, ktorý zahŕňal proces kompostovania biologicky odbúrateľných biopolymérov, konkrétne poly(3-hydroxybutyrátu) a dvoch typov polyesteru kyseliny mliečnej (amorfného a semikryštalického). Kompostovací test bol pripravený podľa normy IS/ISO 20200, ktorá bola upravená tak, aby simulovala prostredie skládky (počiatočné zaťaženie polymérmi na 8 %). Vzhľadom k ostatným dostupným štúdiám boli v tejto práci použité granule polymérov umiestnené vo vreckách. Proces kompostovania trval po dobu 8 týždňov, kedy boli v pravidelných intervaloch odoberané vzorky polymérov a kompostu, ktoré boli ďalej analyzované. Tento nový prístup poskytol nový pohľad na študovanú problematiku.

Počas 8 týždňov došlo k redukcii hmotnosti granúl poly(3-hydroxybutyrátu) o 40 % z ich pôvodnej hmotnosti. Ich hmotnostný úbytok vykazoval lineárny priebeh po 5. týždeň procesu, kedy nastala stagnácia na hodnote okolo 33 % a v poslednom týždni došlo k opätovnému rastu. Hmotnostne stredná a početne stredná molekulová hmotnosť klesli po 8 týždňoch o približne 65 %. V prípade amorfného PLA došlo v 5. týždni ku kompletnej degradácii granúl a vo vrecúškach už ďalšie nezostali. U semikryštalického PLA došlo k redukcii hmotnosti granúl o 70 % z ich pôvodnej hmotnosti. Krivka úbytku hmotnosti bola analogická amorfnému PLA, iba spomalená dôsledkom vyššej kryštalinity. Zatiaľ sme pomocou metódy SEC-MALS neboli schopní určiť molekulovú hmotnosť oboch typov PLA, čo môže byť predmetom ďalšieho skúmania.

Pomocou makroskopického hodnotenia granúl PHB bola predpokladaná degradácia primárne pomocou extracelulárnych enzýmov, konkrétne PHA depolymeráz. Tento predpoklad bol potvrdený vytvorením SEM snímok, ktoré zobrazovali zmeny povrchu granúl PHB v procese kompostovania. Na povrchu bola viditeľná tvorba pórov, ktoré sú výsledkom enzymatickej degradácie. Pórovitosť sa do posledného týždňa zvýšila a v rovnakom čase boli zaznamenané aj zlomy, ku ktorým dochádza predovšetkým pôsobením abiotických faktorov. Makroskopickým hodnotením granúl amorfného aj semikryštalického PLA bolo predpokladané, že degradácia prebieha hlavne pôsobením abiotických faktorov, z dôvodu štiepenia granúl na menšie úlomky. Pomocou SEM snímok bolo táto predpoveď v prípade semikryštalického PLA potvrdená. Na vzorkách amorfného PLA z 1. týždňa však boli objavené ako abiotické zmeny, tak aj zmeny spôsobené enzymatickou degradáciou. Preto predpokladáme, že degradácia amorfného PLA prebieha na počiatku enzymaticky a následne krehkejší materiál zdegraduje abioticky.

Sledovaním enzýmovej aktivity esteráz pri biodegradácii biopolymérov bolo zistené, že prítomnosť polyesterov indukuje produkciu a aktivitu extracelulárnych esteráz v porovnaní s kompostom bez prítomnosti polyméru. V tejto práci bol použitý experiment, ktorý bol optimalizovaný pre naše vzorky a vykonaný ako pilotný pokus pre vzorky zo 4. týždňa. Pre ďalšie skúmania by bolo zaujímavé vykonať tento experiment pre vzorky zo všetkých týždňov procesu kompostovania.

Poslednou metódou na analýzu kompostu bolo sledovanie mikrobiálnej biodiverzity kompostu pomocou mikrotitračných doštičiek Biolog EcoPlates™. Pomocou tejto metódy bolo cieľom zistiť, či použité biopolyméry ovplyvňujú mikrobióm v komposte. Priemerným vývojom farby jamky (AWCD) bola sledovaná schopnosť a rýchlosť adaptácie mikrobiómu na substráty použité v mikrotitračnej doštičke. Pomocou Shannonovho indexu biodiverzity bola sledovaná zmena biodiverzity vzoriek kompostov v procese kompostovania. V prípade vzoriek s PHB bola schopnosť adaptácie mikroorganizmov rýchlejšia a dosahovala podobné hodnoty vo vzorkách z 4. aj 8. týždňa. Index biodiverzity dosahoval vyššie hodnoty vo vzorkách z 4. týždňa, čo naznačuje selekciu producentov PHA depolymeráz v komposte. Vo vzorke z 8. týždňa bol Shannonov index biodiverzity o niečo nižší, avšak tento výsledok potvrdil úvahu o miernej zmene mikrobiómu v posledných týždňoch procesu kompostovania PHB. Zmeny však boli v rozsahu smerodajnej odchýlky, preto nie sú štatisticky významné a nemôže im byť kladená vysoká váha. Porovnaním AWCD vzoriek obsahujúcich semikryštalické PLA z 4. a 8. týždňa bolo zistené, že v poslednom týždni bola zaznamenaná nižšia schopnosť adaptácie a využívania substrátov mikroorganizmami. Predpokladáme, že táto skutočnosť mohla byť spôsobená neprítomnosťou amorfnej oblasti v semikryštalickom PLA. Index diverzity vzoriek kompostu s amorfným PLA dosahoval veľmi podobné hodnoty v 4. aj v 8. týždni. Porovnaním s ostatnými analýzami sme zistili, že degradácia amorfného PLA prebieha spočiatku pôsobením extracelulárnych enzýmov produkovaných mikroorganizmami v mikrobióme kompostu. Pre vzorky kompostu so semikryštalickým PLA nastalo v 8. týždni zníženie indexu diverzity, čo mohlo byť spôsobené neprítomnosťou už zdegradovanej amorfnej oblasti v polyméri a nedostupnosťou kryštalickej oblasti pre niektoré druhy mikroorganizmov (enzýmov). Zníženie indexu diverzity nastalo aj v porovnaní so vzorkami kompostov, ktoré neobsahovali polymér. Táto skutočnosť môže znamenať negatívne ovplyvnenie mikrobiómu kompostu pri dlhšej prítomnosti semikryštalického PLA, avšak rovnako nie je štatisticky významná.

Analýza hlavných komponentov ukázala, že vzorky kompostu s PHB vykazujú po 4. týždňoch zvýšenú aktivitu iba na dvoch substrátoch, kým po 8. týždňoch bola viditeľná zvýšená aktivita na väčšine substrátov. Znamená to, že pri prítomnosti PHB dochádza k pomalšiemu vývoju aktivity mikrobiálneho konzorcia, avšak vylučuje negatívny vplyv na mikrobióm kompostu. Vo vzorke kompostu so semikryštalickým PLA bolo zistené, že jeho prítomnosť po dlhšiu dobu znižuje aktivitu mikrobiómu, čo naznačuje negatívny vplyv na mikrobiálny vývoj kompostu.

Pre ďalšie štúdium tejto problematiky existuje veľké množstvo vhodných noriem, ktoré navrhujú rôzne kompostovacie parametre, usporiadania a metódy analýzy vzoriek. Podľa dostupných štúdií sa ako vhodná analýza zrelosti kompostu javí zisťovanie pomeru C/N v celom procese kompostovania. Rovnako medzi vhodné metódy patrí analýza degradačných zvyškov a zloženia kompostu pomocou infračervenej spektrometrie s Fourierovou transformáciou (FT-IR). Existuje mnoho vhodných molekulárne genetických techník, ktoré sa dajú aplikovať na presnejšiu analýzu genómu kompostu, ako napríklad sekvenčné metódy novej generácie (NextGen Sequencing). Všetky tieto metódy sa javia ako vhodné a predstavujú veľký potenciál v štúdiu procesu kompostovania biopolymérov.

6 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

- [1] WEE, Young-Jung, Jin-Nam KIM a Hwa-Won RYU. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *FOOD TECHNOLOGY AND BIOTECHNOLOGY*. 2006, 44(2), 163-172. ISSN 1330-9862.
- [2] ANJUM, A., M. ZUBER, K. M. ZIA, A. NOREEN, M. N. ANJUM a S. TABASUM. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2016, (89), 161-174. ISSN 0141-8130.
- [3] KOLLER, M., A. ATLIĆ, M. DIAS, A. REITERER a G. BRAUNEGG. (2010a). Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. In: Steinbüchel, A. a G. GuoQiang Chen (eds.) *Plastics from bacteria: natural functions and applications. Microbiology Monographs*. Springer Berlin Heidelberg, 2012. 14, 85-119. ISBN 978-3-642-02796-3.
- [4] LOO, C.-Y., SUDESH, K.: Polyhydroxyalkanoates: Bio-based microbial plastics and their properties. *Malaysian Polymer Journal*. 2007, vol. 2, no. 2, p 31-57.
- [5] SUDESH, K, H ABE a Y DOI. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*. 2000, 25(10), 1503-1555. DOI: 10.1016/S0079-6700(00)00035-6. ISSN 00796700.
- [6] BRESAN, Stephanie, Anna SZNAJDER, Waldemar HAUF, Karl FORCHHAMMER, Daniel PFEIFFER a Dieter JENDROSSEK. Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). ISSN 2045-2322. DOI:10.1038/srep26612.
- [7] PHILIP, S., T. KESHAVARZ a I. ROY. Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, (82), 233-247. ISSN 0268-2575.
- [8] KESHAVARZ, Tajalli a Ipsita ROY. Polyhydroxyalkanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 2010, 13(3), 321-326. DOI: 10.1016/j.mib.2010.02.006. ISSN 13695274.
- [9] AKARAONYE, Everest, Tajalli KESHAVARZ a Ipsita ROY. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology*. 2010, 85(6), 732-743. DOI: 10.1002/jctb.2392. ISSN 02682575
- [10] LU, X. Y., J. ZHANG, Q. WU, G. Q. CHEN. Enhanced production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) via manipulating the fatty acid β -oxidation pathway in *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, (221), 97-101. ISSN 0378-1097.
- [11] AKIYAMA, M., Y. TAIMA a Y. DOI. Production of poly(3-hydroxyalkanoates) by a bacterium of the genus *Alcaligenes* utilizing long-chain fatty acids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992, 37(6), 698-701. ISSN 0175-7598.
- [12] LEE, Sang Yup. Bacterial polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, 49(1), 1-14. ISSN 0006-3592.
- [13] ARCOS-HERNANDEZ, Monica V., Bronwyn LAYCOCK, Bogdan C. DONOSE, Steven PRATT, Peter HALLEY, Salah AL-LUAIBI, Alan WERKER a Paul A. LANT. Physicochemical and mechanical properties of mixed culture polyhydroxyalkanoate

- (PHBV). *European Polymer Journal*. 2013, 49(4), 904-913. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2012.10.025. ISSN 00143057.
- [14] GAGNON, K. D., R. W. LENZ, R. J. FARRIS a R. C. FULLER. Crystallization behavior and its influence on the mechanical properties of a thermoplastic elastomer produced by *Pseudomonas oleovorans*. *Macromolecules*. 1992, 25(14), 3723-3728. DOI: 10.1021/ma00040a018. ISSN 0024-9297.
- [15] GARLOTTA, Donald. A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*. 9(2), 63-84. DOI: 10.1023/A:1020200822435. ISSN 15662543.
- [16] SAEIDLOU, Sajjad, Michel A. HUNEAULT, Hongbo LI a Chul B. PARK. Poly(lactic acid) crystallization. *Progress in Polymer Science*. 2012, 37(12), 1657-1677. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2012.07.005. ISSN 00796700.
- [17] ZENG, Jian-Bing, Kun-Ang LI a An-Ke DU. Compatibilization strategies in poly(lactic acid)- based blends. *RSC Advances* [online]. 2015, 5(41), 32546-32565 [cit. 2017-12-18]. DOI: 10.1039/C5RA01655J. ISSN 2046-2069.
- [18] LASPRILLA, Astrid J.R., Guillermo A.R. MARTINEZ, Betânia H. LUNELLI, André L. JARDINI a Rubens Maciel FILHO. Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices — A review. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(1), 321-328. DOI:10.1016/j.biotechadv.2011.06.019. ISSN 07349750.
- [19] CHANFREAU, Sébastien, Maria MENA, Jaime R. PORRAS-DOMÍNGUEZ, Mariana RAMÍREZ-GILLY, Miquel GIMENO, Pedro ROQUERO, Alberto TECANTE a Eduardo BÁRZANA. Enzymatic synthesis of poly-l-lactide and poly-l-lactide-co-glycolide in an ionic liquid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2010, 33(5), 629-638. DOI:10.1007/s00449-009-0388-8. ISSN 1615-7591.
- [20] HAMAD, K., M. KASEEM, H. W. YANG, F. DERI a Y. G. KO. Properties and medical applications of polylactic acid: A review. *Express Polymer Letters*. 2015, 9(5), 435-455. DOI:10.3144/expresspolymlett.2015.42. ISSN 1788618X.
- [21] AVÉROUS, L. Polylactic Acid: Synthesis, Properties and Applications. *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*. Elsevier, 2008, 433-450. DOI:10.1016/B978-0-08-045316-3.00021-1. ISBN 9780080453163.
- [22] VAN DE VELDE, K a P KIEKENS. Biopolymers: overview of several properties and consequences on their applications. *Polymer Testing*. 2002, 21(4), 433-442. ISSN 01429418. DOI:10.1016/S0142-9418(01)00107-6.
- [23] FARAH, Shady, Daniel G. ANDERSON a Robert LANGER. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107, 367-392. ISSN 0169409X. DOI:10.1016/j.addr.2016.06.012.
- [24] AURAS, Rafael, Bruce HARTE a Susan SELKE. An Overview of Polylactides as Packaging Materials. *Macromolecular Bioscience*. 2004, 4(9), 835-864. ISSN 1616-5187. DOI:10.1002/mabi.200400043.
- [25] TIRRELL, Matthew, Efrosini KOKKOLI a Markus BIESALSKI. The role of surface science in bioengineered materials. *Surface Science*. 2002, 500(1-3), 61-83. ISSN 00396028. DOI:10.1016/S0039-6028(01)01548-5.
- [26] ANDERSON, J.M. Biological Responses to Materials. *Annual Review of Materials Research*, 2001, vol. 31. pp. 81 ProQuest Central. ISSN 15317331.

- [27] CHEN, Hong, Lin YUAN, Wei SONG, Zhongkui WU a Dan LI. Biocompatible polymer materials: Role of protein–surface interactions. *Progress in Polymer Science*. 2008, **33**(11), 1059-1087. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2008.07.006. ISSN 00796700.
- [28] MUHAMMADI, SHABINA, Muhammad AFZAL a Shafqat HAMEED. Bacterial polyhydroxyalkanoates-eco-friendly next generation plastic: Production, biocompatibility, biodegradation, physical properties and applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2015, **8**(3-4), 56-77. ISSN 1751-8253. DOI:10.1080/17518253.2015.1109715.
- [29] KOLLER, Martin. Biodegradable and Biocompatible Polyhydroxy-alkanoates (PHA): Auspicious Microbial Macromolecules for Pharmaceutical and Therapeutic Applications. *Molecules*. 2018, **23**(2). ISSN 1420-3049. DOI:10.3390/molecules23020362.
- [30] ZHENG, Yang, Jin-Chun CHEN, Yi-Ming MA a Guo-Qiang CHEN. Engineering biosynthesis of polyhydroxyalkanoates (PHA) for diversity and cost reduction. *Metabolic Engineering*. 2020, **58**, 82-93. ISSN 10967176. DOI:10.1016/j.ymben.2019.07.004.
- [31] ZHAO, Haibin, Zhixiang CUI, Xiaofei SUN, Lih-Sheng TURNG a Xiangfang PENG. *Morphology and Properties of Injection Molded Solid and Microcellular Polylactic Acid/Polyhydroxybutyrate-Valerate (PLA/PHBV) Blends*. 2013, **52**(7), 2569-2581. ISSN 0888-5885. DOI:10.1021/ie301573y.
- [32] MOZUMDER, Md S.I. Polyhydroxyalkanoate and Polylactic Acid Composite. *Encyclopedia of Renewable and Sustainable Materials*. Elsevier, 2020, 2020, , 223-235. ISBN 9780128131961. DOI:10.1016/B978-0-12-803581-8.10572-7.
- [33] MISRA, Superb K., Sabeel P. VALAPPIL, Ipsita ROY a Aldo R. BOCCACCINI. Polyhydroxyalkanoate (PHA)/Inorganic Phase Composites for Tissue Engineering Applications. *Biomacromolecules*. 2006, **7**(8), 2249-2258. ISSN 1525-7797. DOI:10.1021/bm060317c.
- [34] RODRÍGUEZ-CONTRERAS, Alejandra, Elisa RUPÉREZ, María Soledad MARQUÉS-CALVO a José María MANERO. PHAs as matrices for drug delivery. *Materials for Biomedical Engineering*. Elsevier, 2019, 2019, , 183-213. ISBN 9780128169131. DOI:10.1016/B978-0-12-816913-1.00007-6.
- [35] ZHANG, Junyu, Ekaterina I. SHISHATSKAYA, Tatiana G. VOLOVA, Luiziana Ferreira DA SILVA a Guo-Qiang CHEN. Polyhydroxyalkanoates (PHA) for therapeutic applications. *Materials Science and Engineering: C*. 2018, **86**, 144-150. ISSN 09284931. DOI:10.1016/j.msec.2017.12.035.
- [36] DWIVEDI, Ruby, Rahul PANDEY, Sumit KUMAR a Divya MEHROTRA. Poly hydroxyalkanoates (PHA): Role in bone scaffolds. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2020, **10**(1), 389-392. ISSN 22124268. DOI:10.1016/j.jobcr.2019.10.004.
- [37] WEBER, B. a S.P. HOERSTRUP. 6.15 Tissue Engineering of Heart Valves. *Comprehensive Biomaterials II*. Elsevier, 2017, 2017, , 256-272. ISBN 9780081006924. DOI:10.1016/B978-0-08-100691-7.00148-8.
- [38] BAE, Ji-Young, Jong-Eun WON, Jong-Sub PARK, Hae-Hyoung LEE a Hae-Won KIM. Improvement of surface bioactivity of poly(lactic acid) biopolymer by sandblasting with

- hydroxyapatite bioceramic. *Materials Letters*. 2011, **65**(19-20), 2951-2955. ISSN 0167577X. DOI:10.1016/j.matlet.2011.06.023.
- [39] KABIRIAN, Fatemeh, Bartek DITKOWSKI, Ali ZAMANIAN, Ruth HEYING a Masoud MOZAFARI. An innovative approach towards 3D-printed scaffolds for the next generation of tissue-engineered vascular grafts. *Materials Today: Proceedings*. 2018, **5**(7), 15586-15594. ISSN 22147853. DOI:10.1016/j.matpr.2018.04.167.
- [40] SADR, Samad Hosseini, Soodabeh DAVARAN, Effat ALIZADEH, Roya SALEHI a Ali RAMAZANI. PLA-based magnetic nanoparticles armed with thermo/pH responsive polymers for combination cancer chemotherapy. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2018, **45**, 240-254. ISSN 17732247. DOI:10.1016/j.jddst.2018.03.019.
- [41] DESTEFANO, Vincent, Salaar KHAN a Alonzo TABADA. Applications of PLA in modern medicine. *Engineered Regeneration*. 2020, **1**, 76-87. ISSN 26661381. DOI:10.1016/j.engreg.2020.08.002
- [42] TYLER, Betty, David GULLOTTI, Antonella MANGRAVITI, Tadanobu UTSUKI a Henry BREM. Polylactic acid (PLA) controlled delivery carriers for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, **107**, 163-175. ISSN 0169409X. DOI:10.1016/j.addr.2016.06.018.
- [43] KALE, Gaurav, Thitisilp KIJCHAVENGKUL, Rafael AURAS, Maria RUBINO, Susan E. SELKE a Sher Paul SINGH. Compostability of Bioplastic Packaging Materials: An Overview. *Macromolecular Bioscience*. 2007, **7**(3), 255-277. ISSN 16165187. DOI:10.1002/mabi.200600168.
- [44] AUDIC, Jean-Luc, Loïc LEMIÈGRE a Yves-Marie CORRE. Thermal and mechanical properties of a polyhydroxyalkanoate plasticized with biobased epoxidized broccoli oil. *Journal of Applied Polymer Science*. 2014, **131**(6), n/a-n/a. ISSN 00218995. DOI:10.1002/app.39983.
- [45] BUGNICOURT, E., P. CINELLI, A. LAZZERI a V. ALVAREZ. Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*. 2014, **8**(11), 791-808. ISSN 1788618X. DOI:10.3144/expresspolymlett.2014.82.
- [46] CHEN, Guo-Qiang. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009, **38**(8). ISSN 0306-0012. DOI:10.1039/b812677c,
- [47] ADELEYE, Aderemi T., Chuks Kenneth ODOH, Obieze Christian ENUDI, Oluwakemi Oluwabunmi BANJOKO, Osigbeminiyi Oludare OSIBOYE, Emmanuel TOLUWALOPE ODEDIRAN a Hitler LOUIS. Sustainable synthesis and applications of polyhydroxyalkanoates (PHAs) from biomass. *Process Biochemistry*. 2020, **96**, 174-193. ISSN 13595113. DOI:10.1016/j.procbio.2020.05.032.
- [48] OBUCHI, Shoji a Shinji OGAWA. Packaging and Other Commercial Applications. *Poly(Lactic Acid)*. Hoboken, NJ, USA, 2010, 2010-09-15, , 457-467. ISBN 9780470649848. DOI:10.1002/9780470649848.ch28.
- [49] PEELMAN, Nanou, Peter RAGAERT, Bruno DE MEULENAER, Dimitri ADONS, Roos PEETERS, Ludwig CARDON, Filip VAN IMPE a Frank DEVLIEGHERE. *Application of bioplastics for food packaging*. 2013, **32**(2), 128-141. ISSN 09242244. DOI:10.1016/j.tifs.2013.06.003.

- [50] AHAMED, Ashiq, Pramodh VALLAM, Nikhil Shiva IYER, Andrei VEKSHA, Johan BOBACKA a Grzegorz LISAK. Life cycle assessment of plastic grocery bags and their alternatives in cities with confined waste management structure: A Singapore case study. *Journal of Cleaner Production*. 2021, **278**. ISSN 09596526. DOI:10.1016/j.jclepro.2020.123956.
- [51] RASAL, Rahul M., Amol V. JANORKAR a Douglas E. HIRT. Poly(lactic acid) modifications. *Progress in Polymer Science*. 2010, **35**(3), 338-356. ISSN 00796700. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2009.12.003.
- [52] CABEDO, Lluís, José LUIS FEIJOO, María PILAR VILLANUEVA, José María LAGARÓN a Enrique GIMÉNEZ. Optimization of Biodegradable Nanocomposites Based on aPLA/PCL Blends for Food Packaging Applications. *Macromolecular Symposia*. 2006, **233**(1), 191-197. ISSN 1022-1360. DOI:10.1002/masy.200690017.
- [53] ABDELWAHAB, Mohamed A., Allison FLYNN, Bor-Sen CHIOU, Syed IMAM, William ORTS a Emo CHIELLINI. Thermal, mechanical and morphological characterization of plasticized PLA-PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2012, **97**(9), 1822-1828. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2012.05.036.
- [54] TOKIWA, Yutaka, Buenaventura CALABIA, Charles UGWU a Seiichi AIBA. Biodegradability of Plastics. *International Journal of Molecular Sciences*. 2009, **10**(9), 3722-3742. ISSN 1422-0067. DOI:10.3390/ijms10093722.
- [55] HONZÍK, Roman: Plasty se zkrácenou životností a způsoby jejich degradace. *Biom.cz* [online]. 2004-08-18 [cit. 2020-11-29]. Dostupné z : <https://biom.cz/cz/odborne-clanky/plasty-se-zkracenou-zivotnosti-a-zpusoby-jejich-degradace>. ISSN: 1801-2655.
- [56] AGAMUTHU, P. a Putri Nadzrul FAIZURA. *Biodegradability of degradable plastic waste*. 2016, **23**(2), 95-100. ISSN 0734-242X. DOI:10.1177/0734242X05051045.
- [57] POLMAN, Emma M.N., Gert-Jan M. GRUTER, John R. PARSONS a Albert TIETEMA. Comparison of the aerobic biodegradation of biopolymers and the corresponding bioplastics: A review. *Science of The Total Environment*. 2021, **753**. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.141953.
- [58] SINGH, Baljit a Nisha SHARMA. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*. 2008, **93**(3), 561-584. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.
- [59] AMOBONYE, Ayodeji, Prashant BHAGWAT, Suren SINGH a Santhosh PILLAI. Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Science of The Total Environment*. 2020. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.143536.
- [60] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*. 2008, **26**(3), 246-265. ISSN 07349750. DOI:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [61] PATHAK, Vinay Mohan a NAVNEET. Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach. *Bioresources and Bioprocessing*. 2017, **4**(1). ISSN 2197-4365. DOI:10.1186/s40643-017-0145-9.
- [62] JAISWAL, Shweta, Babita SHARMA a Pratyosh SHUKLA. *Integrated approaches in microbial degradation of plastics*. 2020, **17**. ISSN 23521864. DOI:10.1016/j.eti.2019.100567.

- [63] ALSHEHREI Fatimah. Biodegradation of Synthetic and Natural Plastic by Microorganisms. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*. 2017; 5(1):8-19. DOI:10.12691/jaem-5-1-2.
- [64] CARUSO, Gabriella. *Plastic Degrading Microorganisms as a Tool for Bioremediation of Plastic Contamination in Aquatic Environments*. 2015, **03**(03). ISSN 23754397. DOI:10.4172/2375-4397.1000e112.
- [65] CHOWDHURY, A.A. Poly- β -hydroxybuttersäure abbauende Bakterien und Exoenzym. *Archiv. Mikrobiol.* **47**, 167–200 (1963). DOI:10.1007/BF00422523.
- [66] GHOSH, Swapan Kumar, Sujoy PAL a Sumanta RAY. Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics. *Environmental Science and Pollution Research*. 2013, **20**(7), 4339-4355. ISSN 0944-1344. DOI:10.1007/s11356-013-1706-x.
- [67] PRANAMUDA, Hardaning, Akio TSUCHII a Yutaka TOKIWA. Poly (L-lactide)-Degrading Enzyme Produced by *Amycolatopsis* sp. *Macromolecular Bioscience*. 2001, **1**(1), 25-29.
- [68] VU, Danh H., Dan ÅKESSON, Mohammad J. TAHERZADEH a Jorge A. FERREIRA. Recycling strategies for polyhydroxyalkanoate-based waste materials: An overview. *Bioresource Technology*. 2020, **298**. ISSN 09608524. DOI:10.1016/j.biortech.2019.122393.
- [69] MEEREBOER, Kjeld W., Manjusri MISRA a Amar K. MOHANTY. Review of recent advances in the biodegradability of polyhydroxyalkanoate (PHA) bioplastics and their composites. *Green Chemistry*. 2020, **22**(17), 5519-5558. ISSN 1463-9262. DOI:10.1039/D0GC01647K.
- [70] JENDROSSEK, Dieter a René HANDRICK. Microbial Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Annual Review of Microbiology*. 2002, **56**(1), 403-432. ISSN 0066-4227. DOI:10.1146/annurev.micro.56.012302.160838.
- [71] ROOHI, Mohd Rehan ZAHEER a Mohammed KUDDUS. PHB (poly- β -hydroxybutyrate) and its enzymatic degradation. *Polymers for Advanced Technologies*. 2018, 29(1), 30-40. ISSN 10427147. DOI:10.1002/pat.4126.
- [72] SCHÖBER, Ute, Christian THIEL a Dieter JENDROSSEK. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, 66(4), 1385-1392. ISSN 1098-5336. DOI:10.1128/AEM.66.4.1385-1392.2000.
- [73] SHINOMIYA, Miho, Tadahisa IWATA a Yoshiharu DOI. The adsorption of substrate-binding domain of PHB depolymerases to the surface of poly(3-hydroxybutyric acid). *International Journal of Biological Macromolecules*. 1998, **22**(2), 129-135. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/S0141-8130(98)00007-5.
- [74] TOKIWA, Yutaka a Buenaventura P. CALABIA. Review Degradation of microbial polyesters. *Biotechnology Letters*. 2004, **26**(15), 1181-1189. ISSN 0141-5492. DOI:10.1023/B:BILE.0000036599.15302.e5.
- [75] JENDROSSEK, D. Peculiarities of PHA granules preparation and PHA depolymerase activity determination. *Appl Microbiol Biotechnol* **74**, 1186–1196 (2007). DOI:10.1007/s00253-007-0860-9.
- [76] TANIO, Tomoharu, Tetsuya FUKUI, Yuri SHIRAKURA, Terumi SAITO, Kenkichi TOMITA, Tatsuo KAIHO a Satoru MASAMUNE. An Extracellular Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from *Alcaligenes faecalis*. *European Journal of*

- Biochemistry*. 1982, **124**(1), 71-77. ISSN 0014-2956. DOI:10.1111/j.1432-1033.1982.tb05907.x.
- [77] KASUYA, Ken-ichi, Yoshiharu DOI a Tadashi YAO. Enzymatic degradation of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] by *Comamonas testosteroni* ATSU of soil bacterium. *Polymer Degradation and Stability*. 1994, **45**(3), 379-386. ISSN 01413910. DOI:10.1016/0141-3910(94)90208-9.
- [78] NAKAYAMA, Kazuhisa, Terumi SAITO, Tetsuya FUKUI, Yuri SHIRAKURA a Kenkichi TOMITA. Purification and properties of extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerases from *Pseudomonas lemoignei*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1985, **827**(1), 63-72. ISSN 01674838. DOI:10.1016/0167-4838(85)90101-3.
- [79] ONG, Su Yean, Jiun Yee CHEE a Kumar SUDESH. Degradation of Polyhydroxyalkanoate (PHA): a Review. *Journal of Siberian Federal University. Biology*. 2017, **10**(2), 21-225. ISSN 19971389. DOI:10.17516/1997-1389-0024.
- [80] SHIRAKI, Mari, Takakazu ENDO a Terumi SAITO. Fermentative production of (R)-(-)-3-hydroxybutyrate using 3-hydroxybutyrate dehydrogenase null mutant of *Ralstonia eutropha* and recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, **102**(6), 529-534. ISSN 13891723. DOI:10.1263/jbb.102.529.
- [81] DOI, Yoshiharu, Yasushi KAWAGUCHI, Naoyuki KOYAMA, Shigeo NAKAMURA, Masaya HIRAMITSU, Yoshinori YOSHIDA a Hiroshi KIMURA. Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates in *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*. 1992, **103**(2-4), 103-108. ISSN 03781097. DOI:10.1111/j.1574-6968.1992.tb05827.x.
- [82] KARAMANLIOGLU, Mehlika, Richard PREZIOSI a Geoffrey D. ROBSON. Abiotic and biotic environmental degradation of the bioplastic polymer poly(lactic acid): A review. *Polymer Degradation and Stability*. 2017, **137**, 122-130. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2017.01.009.
- [83] ZAABA, Nor Fasihah a Mariatti JAAFAR. A review on degradation mechanisms of polylactic acid. 2020, **60**(9), 2061-2075. ISSN 0032-3888. DOI:10.1002/pen.25511.
- [84] QI, Xiang, Yiwei REN a Xingzu WANG. New advances in the biodegradation of Poly(lactic) acid. 2017, **117**, 215-223. ISSN 09648305. DOI:10.1016/j.ibiod.2017.01.010.
- [85] KAWAI, Fusako. Polylactic Acid (PLA)-Degrading Microorganisms and PLA Depolymerases. *Green Polymer Chemistry: Biocatalysis and Biomaterials*. Washington, DC: American Chemical Society, 2010, 2010-01-11, , 405-414. ACS Symposium Series. ISBN 9780841225817. DOI:10.1021/bk-2010-1043.ch027.
- [86] LARRAÑAGA, Aitor a Erlantz LIZUNDIA. A review on the thermomechanical properties and biodegradation behaviour of polyesters. *European Polymer Journal*. 2019, **121**. ISSN 00143057. DOI:10.1016/j.eurpolymj.2019.109296.
- [87] BRANNIGAN, Ruairi P. a Andrew P. DOVE. Synthesis, properties and biomedical applications of hydrolytically degradable materials based on aliphatic polyesters and polycarbonates. *Biomaterials Science*. 2017, **5**(1), 9-21. ISSN 2047-4830. DOI:10.1039/C6BM00584E.

- [88] SCHLIECKER, Gesine, Carsten SCHMIDT, Stefan FUCHS a Thomas KISSEL. Characterization of a homologous series of d , l -lactic acid oligomers; a mechanistic study on the degradation kinetics in vitro. *Biomaterials*. 2003, **24**(21), 3835-3844. ISSN 01429612. DOI:10.1016/S0142-9612(03)00243-6.
- [89] ELSAWY, Moataz A., Ki-Hyun KIM, Jae-Woo PARK a Akash DEEP. Hydrolytic degradation of polylactic acid (PLA) and its composites. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017, **79**, 1346-1352. ISSN 13640321. DOI:10.1016/j.rser.2017.05.143.
- [90] REIER, Thomas, Carmen KUNZE, Claudia NISCHAN, Sven KRAMER, Katrin STERNBERG, Marko SASS, Ullrich T. HOPT a Klaus-Peter SCHMITZ. In vitro and in vivo degradation studies for development of a biodegradable patch based on poly(3-hydroxybutyrate). *Biomaterials*. 2002, **23**(13), 2649-2657. ISSN 01429612. DOI:10.1016/S0142-9612(01)00405-7.
- [91] YU, Jian, David PLACKETT a Lilian X.L. CHEN. Kinetics and mechanism of the monomeric products from abiotic hydrolysis of poly[(R)-3-hydroxybutyrate] under acidic and alkaline conditions. *Polymer Degradation and Stability*. 2005, **89**(2), 289-299. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.026.
- [92] ONWOSI, Chukwudi O., Victor C. IGBOKWE, Joyce N. ODIMBA, Ifeanyichukwu E. EKE, Mary O. NWANKWOALA, Ikemdinachi N. IROH a Lewis I. EZEUGU. Composting technology in waste stabilization: On the methods, challenges and future prospects. *Journal of Environmental Management*. 2017, **190**, 140-157. ISSN 03014797. DOI:10.1016/j.jenvman.2016.12.051.
- [93] PANDEY, Pramod K., Wenlong CAO, Sagor BISWAS a Venkata VADDELLA. A new closed loop heating system for composting of green and food wastes. *Journal of Cleaner Production*. 2016, **133**, 1252-1259. ISSN 09596526. DOI:10.1016/j.jclepro.2016.05.114.
- [94] PALANIVELLOO, Kishneth, Muhammad Azri AMRAN a Nur Azeyanti NORHASHIM. Food Waste Composting and Microbial Community Structure Profiling. *Processes*. 2020, **8**(6). ISSN 2227-9717. DOI:10.3390/pr8060723.
- [95] BERNAL, M.P., J.A. ALBURQUERQUE a R. MORAL. Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource Technology*. 2009, **100**(22), 5444-5453. ISSN 09608524. DOI:10.1016/j.biortech.2008.11.027.
- [96] RASTOGI, Mansi, Meenakshi NANDAL a Babita KHOSLA. Microbes as vital additives for solid waste composting. *Heliyon*. 2020, **6**(2). ISSN 24058440. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e03343.
- [97] SANTOS, Helena, Pedro LAMOSA a Nuno BORGES. *8 Characterization and Quantification of Compatible Solutes in (Hyper)thermophilic Microorganisms*. Elsevier, 2006, 173-199. Methods in Microbiology. ISBN 9780125215374. DOI:10.1016/S0580-9517(08)70011-4.
- [98] DIAZ, L.F. a G.M. SAVAGE. Chapter 4 Factors that affect the process. *Compost Science and Technology*. Elsevier, 2007, 2007, , 49-65. Waste Management Series. ISBN 9780080439600. DOI:10.1016/S1478-7482(07)80007-8.
- [99] SÁNCHEZ, Óscar J., Diego A. OSPINA a Sandra MONTROYA. Compost supplementation with nutrients and microorganisms in composting process. *Waste Management*. 2017, **69**, 136-153. ISSN 0956053X. DOI:10.1016/j.wasman.2017.08.012.

- [100] FRANKE-WHITTLE, Ingrid H., Alberto CONFALONIERI, Heribert INSAM, Mirko SCHLEGELMILCH a Ina KÖRNER. Changes in the microbial communities during co-composting of digestates. *Waste Management*. 2014, **34**(3), 632-641. ISSN 0956053X. DOI:10.1016/j.wasman.2013.12.009.
- [101] LEOW, Chee Woh, Yee Van FAN a Lee Suan CHUA. A Review on Application of Microorganisms for Organic Waste Management. *Chemical Engineering Transactions*. 2018, **63**, 85-90. ISSN 2283-9216. DOI:10.3303/CET1863015.
- [102] INSAM, H. a M. DE BERTOLDI. Chapter 3 Microbiology of the composting process. *Compost Science and Technology*. Elsevier, 2007. Waste Management Series. ISBN 9780080439600. DOI:10.1016/S1478-7482(07)80006-6.
- [103] CUESTA, Gonzalo, Rosana GARCÍA-DE-LA-FUENTE, Manuel ABAD a Fernando FORNES. Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*. 2012, **95**, S280-S284. ISSN 03014797. DOI:10.1016/j.jenvman.2010.11.023.
- [104] ANASTASI, Antonella, Giovanna Cristina VARESE a Valeria FILIPELLO MARCHISIO. Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*. 2017, **97**(1), 33-44. ISSN 0027-5514. DOI:10.1080/15572536.2006.11832836.
- [105] RAMNARAIN, Yvonne Indrani, Abdullah Adil ANSARI a Lydia ORI. Vermicomposting of different organic materials using the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. *International Journal of Recycling of Organic Waste in Agriculture*. 2019, **8**(1), 23-36. ISSN 2195-3228. DOI:10.1007/s40093-018-0225-7.
- [106] AZIZ, Shuokr Qarani, Imad Ali OMAR a Jwan Sabah MUSTAFA. Design And Study For Composting Process Site. *International Journal of Engineering Inventions*. 2018, **7**(9), 9-18. ISSN 2278-7461.
- [107] YEE LIM, Li, Cassandra PHUN CHIEN BONG a Chew TIN LEE. Review on the Current Composting Practices and the Potential of Improvement using Two-Stage Composting. *Chemical Engineering Transactions*. 2017, **61**. ISSN 2283-9216. DOI:10.3303/CET1761173.
- [108] CESARO, A., V. BELGIORNO a M. GUIDA. Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use. *Resources, Conservation and Recycling*. 2015, **94**, 72-79. ISSN 09213449. DOI:10.1016/j.resconrec.2014.11.003.
- [109] PLASTICS - DETERMINATION OF THE DEGREE OF DISINTEGRATION OF PLASTIC MATERIALS UNDER SIMULATED COMPOSTING CONDITIONS IN A LABORATORY-SCALE TEST. 1. New Delhi: BUREAU OF INDIAN STANDARDS, 2004.
- [110] Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions — Method by analysis of evolved carbon dioxide — Part 1: General method. 1. Geneva: ISO, 2005.
- [111] SINTIM, Henry Y., Andy I. BARY, Douglas G. HAYES, et al. In situ degradation of biodegradable plastic mulch films in compost and agricultural soils. *Science of The Total Environment*. 2020, **727**. ISSN 00489697. DOI:10.1016/j.scitotenv.2020.138668.

- [112] ARRIETA, M.P., J. LÓPEZ, E. RAYÓN a A. JIMÉNEZ. Disintegrability under composting conditions of plasticized PLA–PHB blends. *Polymer Degradation and Stability*. 2014, **108**, 307-318. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2014.01.034.
- [113] WENG, Yun-Xuan, Xiu-Li WANG a Yu-Zhong WANG. Biodegradation behavior of PHAs with different chemical structures under controlled composting conditions. *Polymer Testing*. 2011, **30**(4), 372-380. ISSN 01429418. DOI:10.1016/j.polymertesting.2011.02.001.
- [114] *Specifications for compostable plastics*. 2. Geneva: ISO, 2012.
- [115] VODIČKA, Juraj. *Biodegradace bioplastů v prostředí kompostu*. Brno, 2020. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Stanislav Obruča.
- [116] KASSEM, Alef a Nannipieri PAOLO. Enzyme activities. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. 1995, s. 311-373. ISBN 9780125138406.
- [117] LI, Zhenguo, Hao LIN, Nariaki ISHII, Guo-Qiang CHEN a Yoshio INOUE. Study of enzymatic degradation of microbial copolyesters consisting of 3-hydroxybutyrate and medium-chain-length 3-hydroxyalkanoates. *Polymer Degradation and Stability*. 2007, **92**(9), 1708-1714. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2007.06.001.
- [118] SHARMA, Shivika a Subhankar CHATTERJEE. Microplastic pollution, a threat to marine ecosystem and human health: a short review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2017, **24**(27), 21530-21547. ISSN 0944-1344. DOI:10.1007/s11356-017-9910-8.
- [119] MUNIYASAMY, Sudhakar, Osei OFOSU, Maya Jacob JOHN a Rajesh D. ANANDJIWALA. Mineralization of Poly(lactic acid) (PLA), Poly(3-hydroxybutyrate-co-valerate) (PHBV) and PLA/PHBV Blend in Compost and Soil Environments. *Journal of Renewable Materials*. 2016, **4**(2), 133-145. ISSN 2164-6325. DOI:10.7569/JRM.2016.634104.
- [120] KARAMANLIOGLU, Mehlika a Geoffrey D. ROBSON. The influence of biotic and abiotic factors on the rate of degradation of poly(lactic) acid (PLA) coupons buried in compost and soil. *Polymer Degradation and Stability*. 2013, **98**(10), 2063-2071. ISSN 01413910. DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2013.07.004.
- [121] KALE, Gaurav, Rafael AURAS a Sher Paul SINGH. Comparison of the degradability of poly(lactide) packages in composting and ambient exposure conditions. *Packaging Technology and Science*. 2007, **20**(1), 49-70. ISSN 08943214. DOI:10.1002/pts.742.
- [122] LIU, Bei, Yanxia LI, Xuelian ZHANG, Jing WANG a Min GAO. Effects of chlortetracycline on soil microbial communities: Comparisons of enzyme activities to the functional diversity via Biolog EcoPlates™. *European Journal of Soil Biology*. 2015, **68**, 69-76. ISSN 11645563. DOI:10.1016/j.ejsobi.2015.01.002.
- [123] GRYTA, Agata, Magdalena FRĄC a Karolina OSZUST. The Application of the Biolog EcoPlate Approach in Ecotoxicological Evaluation of Dairy Sewage Sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, **174**(4), 1434-1443. ISSN 0273-2289. DOI:10.1007/s12010-014-1131-8.
- [124] XU, Wenhuan, Zhiwei GE, Daya Ram POUDEL, J.Y. LI, T.Y. LIU, T. DENG a M. TIAN. Application and Optimization of Biolog EcoPlates in Functional Diversity Studies

- of Soil Microbial Communities. *MATEC Web of Conferences*. 2015, **22**. ISSN 2261-236X. DOI:10.1051/matecconf/20152204015.
- [125] MUÑIZ, Selene, Juan LACARTA, María P. PATA, Juan José JIMÉNEZ, Enrique NAVARRO a Volker THIEL. Analysis of the Diversity of Substrate Utilisation of Soil Bacteria Exposed to Cd and Earthworm Activity Using Generalised Additive Models. *PLoS ONE*. 2014, **9**(1). ISSN 1932-6203. DOI:10.1371/journal.pone.0085057.
- [126] YANG, Wei, Yuting GUO, Xiaochun WANG, Cheng CHEN, Yu HU, Lijun CHENG, Siyu GU a Xiuhong XU. Temporal variations of soil microbial community under compost addition in black soil of Northeast China. *Applied Soil Ecology*. 2017, **121**, 214-222. ISSN 09291393. DOI:10.1016/j.apsoil.2017.10.005.
- [127] FURTAK, Karolina, Jarosław GRZĄDZIEL, Anna GAŁĄZKA a Jacek NIEDŹWIECKI. Bacterial structure and community-level physiological profiles in water from Vistula River, Lubelskie, Poland. *Proceedings of 5th International Electronic Conference on Water Sciences*. Basel, Switzerland: MDPI, 2020, 2020-11-16, , 8457-. DOI:10.3390/ECWS-5-08457.

7 ZOZNAM POUŽITÝCH SKRATIEK

PHA	polyhydroxyalkanoáty
P3HB	poly(3-hydroxybutyrát)
HA	hydroxyalkánová kyselina
PHV	poly(3-hydroxyvalerát)
P4HB	poly(4-hydroxybutyrát)
P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)
PHB	polyhydroxybutyrát (všeobecne)
SCL PHA	polyhydroxyalkanoáty s krátkymi postrannými reťazcami
MCL PHA	polyhydroxyalkanoáty so stredne dlhými postrannými reťazcami
LCL PHA	polyhydroxyalkanoáty s dlhými postrannými reťazcami
PLA	polyester kyseliny mliečnej
LA	kyselina mliečna
PLLA	kyselina poly(L-mliečna)
PDLA	kyselina poly(D-mliečna)
PDLLA	kyselina poly(L,D-mliečna)
PP	polypropylén
PLGA	poly(laktát-co-glykolát)
PCL	polykaprolaktón
PBAT	polybutylén adipát tereftalát
PBS	polybutylén sukcinát
i-PHA depolymerázy	intracelulárne PHA depolymerázy
e-PHA depolymerázy	extracelulárne PHA depolymerázy
nPHA	natívne PHA
PHA _{SCL} depol.	depolymeráza polyhydroxyalkanoátov s krátkymi postrannými reťazcami
PHA _{MCL} depol.	depolymeráza polyhydroxyalkanoátov so stredne dlhými postrannými reťazcami
CoA	koenzým A
SEC-MALS	gélová permeačná chromatografia s detektorom statického rozptylu svetla vo viacerých uhloch (anglicky „Size-Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering“)
SEM	skenovací elektrónový mikroskop

ELISA	Imunologická metóda stanovenia antigénov využitím enzymatického značenia (anglicky „Enzyme-Linked Immunosorbent Assay“)
AWCD	priemerný vývoj farby jamky (anglicky „Average Well Color Development“)
PCA	Analýza hlavných komponentov (anglicky „Principal Component Analysis“)

8 PRÍLOHY

8.1 Zloženie krmiva pre králiky

- Vedľajšie výrobky rastlinného pôvodu
- Obilniny
- Kvasnice
- Semená
- Minerálne látky
- Doplnkové látky
 - Vitamíny: A (20 000 m.j.*), D3 (2 000 m.j.*), C (160 mg)
 - Stopové prvky: Fe (180 mg), Mn (87 mg), Zn (144 mg), Cu(29 mg), I (2 mg), Se (0,3 mg)
 - Antioxidanty

*m.j. – medzinárodná jednotka; zobrazuje množstvo účinnej látky

8.2 Rozloženie substrátov na Biolog EcoPlates™

Tab. 7: Substráty na EcoPlates™

	1	2	3	4
A	Voda	β -metyl-D-glukozid	D-galaktóno- γ -laktón	L-arginín
B	metylester kyseliny pyrohroznovej	D-xylóza	D-galakturónová kyselina	L-asparagín
C	Tween 40	i-erytritol	2-hydroxybenzoová kyselina	L-fenylalanín
D	Tween 80	D-manitol	4-hydroxybenzoová kyselina	L-serín
E	α -cyklodextrín	N-acetyl-D-glukóзамín	γ -aminobutánová kyselina	L-treonín
F	glykogén	D-glukóзамínová kyselina	itakónová kyselina	glycyl-L-glutamová kyselina
G	D-celobióza	glukóza-1-fosfát	α -ketobutánová kyselina	fenyletylamín
H	α -D-laktóza	D,L- α -glycerofosfát	D-jablčná kyselina	putrescín