Mikroskopická a molekulárně biologická analýza biodegradabilního polyesteru

Daniela Rumpová

Bakalářská práce
2021

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství polymerů

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Daniela Rumpová**
Osobní číslo:	**T18064**
Studijní program:	**B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor:	**Polymerní materiály a technologie**
Forma studia:	**Prezenční**
Téma práce:	**Mikroskopická a molekulárně biologická analýza biodegradabilního polyesteru**

Zásady pro vypracování

1. Provést literární rešerši na dané téma. Zaměřit se na produkci, vlastnosti a degradabilitu testovaného biodegradabilního polyesteru polyhydroxybutyrátu.
2. Připravit biodegradační experiment v půdním prostředí.
4. Sledovat změny na povrchu vzorků biodegradabilního polyesteru během inkubace v půdě pomocí mikroskopických metod.
5. Provést molekulárně-biologickou analýzu mikrobiálních konsorcí v jednotlivých inkubacích.
6. Vyhodnotit výsledky.
7. Výsledky přehledně zpracovat do formy BP.

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

Seznam doporučené literatury:

Glaser, John. (2019). Biological Degradation of Polymers in the Environment. 10.5772/intechopen.85124.
Wierckx, Nick & Narancic, Tanja & Eberlein, Christian & Wei, Ren & Drzyzga, Oliver & Magnin, Audrey & Ballerstedt, Hendrik & Kenny, Shane & Pollet, Eric & Avérous, Luc & O Connor, Kevin & Zimmermann, Wolfgang & Heipieper, Hermann & Prieto, Auxi & Jimenez, Jose & Blank, Lars. (2018). Plastic Biodegradation: Challenges and Opportunities. 10.1007/978-3-319-44535-9_23-1.
Sharma, Neha. (2019). Polyhydroxybutyrate (PHB) Production by Bacteria and its Application as Biodegradable Plastic in Various Industries. Academic Journal of Polymer Science. 2. 10.19080/AJOP.2019.02.555587.
Tokiwa, Yutaka & Calabia, Buenaventurada & Ugwu, Uchenna & Aiba, Seiichi. (2009). Biodegradability of Plastics. International journal of molecular sciences. 10. 3722-42. 10.3390/ijms10093722.

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jana Šerá, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **1. února 2021**
Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jana Navrátilová, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 1. dubna 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA
BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta: Daniela Rumpová

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Antimikrobiální účinek extraktů z některých rostlin je využíván při výrobě obalových materiálů pro potraviny či v medicíně. Tyto extrakty mohou být ale využity mimo jiné v zemědělství, například pro aplikaci do mulčovacích fólií vyrobených z biodegradabilních polymerů. Jedním z potenciálně využívaných polymerů je polyhydroxybutyrát (PHB). Není ho možné využít po celé produkční období zemědělských plodin, jelikož se v půdním prostředí rozkládá velmi rychle, a to především díky působení mikroorganismů. V rámci bakalářské práce byl testován efekt přírodních mikrobiálních látek ve směsi s polyhydroxybutyrátem na rychlost biodegradace v půdě při 25 °C po dobu 90 dní. Pro měření biodegradace bylo využito měření CO_2 pomocí hmotnostního analyzátoru plynů. Změny na povrchu fólií byly sledovány pomocí rastrovací elektronové mikroskopie. Pomocí kitu LIVE/DEAD a fluorescenční mikroskopie byly sledovány živé a mrtvé mikroorganismy. Ze vzorků byla izolována DNA a změřena její koncentrace.

Klíčová slova: polyhydroxybutyrát (PHB), biodegradace, antimikrobiální látky, polymery, fólie

ABSTRACT

The antimicrobial effect of extracts from some plants is used in the production of packaging materials for food or medicine. However, these extracts can be used also in agriculture, for example for application to mulching films made from biodegradable polymers. One of the potentially used polymers is polyhydroxybutyrate. It is not possible to use it troughout the whole production period of agricultural crops, as it decomposes very quickly in the soil environment, mainly due to the action of microorganisms. The effect of natural antimicrobial substances in a mixture with polyhydroxybutyrate on the rate of biodegradation in soil at 25 °C for 90 days was tested in this bachelor's thesis. CO_2 was analysed using gas analyser to measure biodegradation. The change of the surface of the films was observed by scanning electron microscopy. Live and dead microorganisms were monitored using the LIVE/DEAD kit and fluorescence microscopy on the surface of the materials. DNA was isolated from the samples and its concentration was measured.

Keywords: polyhydroxybutyrate (PHB), biodegradation, antimicrobials, polymers, films

Ráda bych poděkovala mé vedoucí bakalářské práce paní Ing. Janě Šeré, Ph.D. za její skvělé vedení, cenné rady, připomínky a ochotu při zpracovávání této bakalářské práce. Dále bych také chtěla poděkovat paním laborantkám na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za jejich rady a pomoc při práci v laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD **10**
I TEORETICKÁ ČÁST **11**
1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY **12**
1.1 VYBRANÉ SKUPINY BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ 12
1.1.1 Polyhydroxyalkanoáty 12
1.1.2 Kyselina polymléčná 14
1.1.3 Škrobové polymery 15
2 ABIOTICKÁ DEGRADACE POLYMERŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ **16**
2.1 FOTODEGRADACE 16
2.2 TERMÁLNÍ DEGRADACE 16
2.3 MECHANICKÁ DEGRADACE 16
2.4 HYDROLÝZA 17
3 BIODEGRADACE POLYMERŮ **18**
3.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI 19
3.1.1 Vlastnosti polymeru 19
3.1.2 Vlastnosti prostředí 20
4 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY **21**
4.1 PŘÍRODNÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY 21
4.1.1 Terpeny 21
4.1.2 Fenoly a polyfenoly 22
4.1.3 Alkaloidy 23
4.1.4 Lignin 23
4.2 DALŠÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY 24
4.2.1 Triclosan 24
4.2.2 Antibiotika 24
4.2.3 Peptidy 25
4.2.4 Nanočástice stříbra 25
4.2.5 Nanočástice zinku 25
4.3 SMĚSI ANTIMIKROBIÁLNÍCH LÁTEK A POLYMERŮ 26
4.3.1 Využití přírodních antimikrobiálních látek v medicíně 26
4.3.2 Využití přírodních antimikrobiálních látek v potravinářských obalech a zemědělství 26
4.3.3 Biodegradace polymerů s přídavkem antimikrobiálních látek v životním prostředí 28
II PRAKTICKÁ ČÁST **30**
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST **31**
5.1 POUŽITÉ POMŮCKY 31
5.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE 31

5.3 POUŽITÉ POLYMERNÍ VZORKY 32
5.4 PŘÍPRAVA INKUBACÍ 32
6 METODY MĚŘENÍ 36
6.1 HMOTNOSTNÍ ANALYZÁTOR PLYNŮ UGA 300 36
6.1.1 Postup měření na přístroji UGA 300 36
6.1.2 Zpracování dat naměřených pomocí UGA 300 37
6.2 IDENTIFIKACE ŽIVÝCH A MRTVÝCH MIKROORGANISMŮ POMOCÍ FLUORESCENČNÍHO MIKROSKOPU 38
6.3 RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE 39
6.4 IZOLACE DNA A MĚŘENÍ JEJÍ KONCENTRACE 39
7 VÝSLEDKY A DISKUZE 41
7.1 STANOVENÍ SUŠINY PŮDY 41
7.2 VYHODNOCENÍ BIODEGRADACE 41
7.3 FLUORESCENČNÍ MIKROSKOPIE 43
7.4 RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE 45
7.5 KONCENTRACE DNA 49
ZÁVĚR 51
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY 53
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK 58
SEZNAM OBRÁZKŮ 59
SEZNAM TABULEK 60

ÚVOD

Ročně je vyprodukováno přibližně 34 milionů tun plastového odpadu, 93 % tohoto materiálu končí v oceánech a na skládkách [1]. Proces degradace petrochemických plastů je velmi obtížný a pomalý. Jednou z možností je recyklace, ta však není vždy možná. Pokud jsou plasty spalovány, dochází ke vzniku 2,8 kg CO_2 na 1 kg plastového odpadu a produkci dalších toxických zbytků [2, 3].

To se může dít i u mulčovacích fólií vyráběných z konvenčních plastů, které pocházejí z fosilních paliv. Mulčovací fólie jsou využívány v zemědělství pro svůj pozitivní vliv na zvýšení úrody. Pokud jsou ale jejich zbytky ponechány v půdě, způsobují znečištění a také případnou degradaci půdy. Půda se tak stává tvrdší a méně úrodnou, což vede mimo environmentální problémy také ke snížení produkce plodin. Odstraňováním mulčovacích fólií po jejich využití dochází ke zvýšení nákladů na pěstování plodin, fólie pak mohou skončit na skládkách odpadu.

Alternativou k polymerům vyrobených z fosilních paliv jsou biologicky rozložitelné polymery. Ty však mohou být v půdním prostředí degradovány ještě před koncem doby jejich použití. Rychlejší degradace je způsobena především mikroorganismy, které se v půdním prostředí nacházejí. Výzkum zabývající se výrobou a studiem biologicky rozložitelných fólií s ideálně dlouhou životností je důležitý pro přechod k udržitelnějšímu způsobu zemědělství. Zlepšování vlastností fólií je možno docílit kombinací různých biodegradabilních polymerů či přídavkem přírodních antimikrobiálních látek. Pro výrobu mulčovacích fólií mohou být použity například polyhydroxyalkanoáty (PHA).

Jedním z PHA, konkrétně polyxyhroxybutyrátem (PHB), se zabývá i tato bakalářská práce, jejímž cílem je zkoumat efekt přidaných antimikrobiálních látek na rychlost biodegradace fólií vyrobených z PHB v půdním prostředí při 25 °C. Experiment trval 90 dní.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Plasty jsou člověkem vyrobené polymerní molekuly s dlouhým řetězcem, které se dnes staly nepostradatelnou součástí našeho života. Základní materiály používané k výrobě plastů se získávají z ropy, což je nežádoucí z hlediska její akumulace v životním prostředí. Množství plastového odpadu je několik milionů tun ročně. Z tohoto důvodu jsou vyráběny také biodegradabilní polymery. Termín biodegradabilní znamená, že materiál je možné rozložit na jednodušší látky za působení živých organismů nebo obecně pomocí biologických procesů. K jejich klíčovým vlastnostem patří biologická rozložitelnost, u některých biokompabilita či výroba z obnovitelných zdrojů. Používáním biodegradabilních polymerů můžeme docílit snížení plastového odpadu v životním prostředí [4].

Dělení polymerů dle původu:

- Přírodní polymery: Jsou takové, které jsou odvozeny z přírodních zdrojů.
- Polosyntetické polymery: U těch polymerů probíhá polymerace po určité chemické modifikaci, ale surovina je přírodního původu.
- Syntetické polymery: Nejsou přírodního původu, jedná se o polymery odvozené z chemické syntézy [5].

Mezi biodegradabilní polymery vyrobené z obnovitelných zdrojů řadíme polyhydroxybutyrát, kyselinu polymléčnou a termoplastický škrob. Dále také existují biodegradabilní polymery vyráběné z ropy, jako je například polykaprolakton a polyvinylalkohol či polybutylen adipát tereftalát [6].

1.1 Vybrané skupiny biodegradabilních polymerů

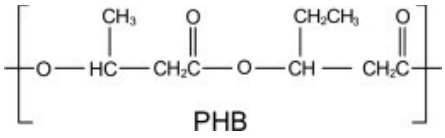
1.1.1 **Polyhydroxyalkanoáty**

Polyhydroxyalkanoáty (PHA) řadíme mezi bakteriální polyestery, které jsou bakteriemi využívány jako zdroj energie. Bakterie PHA vytvoří v prostředí s přebytkem uhlíku a nachází se ve formě granulí uvnitř bakterií v jejich cytoplazmě. PHA má své využití zejména v obalovém průmyslu a v medicíně [7, 8].

Mezi zástupce PHA se řadí například:

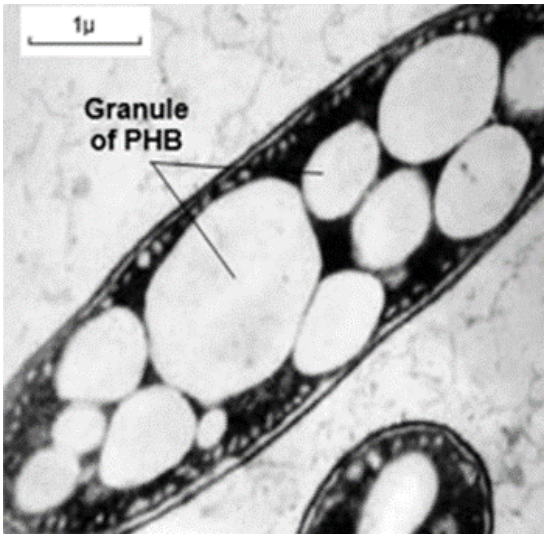
- polyhybroxybutyrát (PHB),
- polyhydroxyvalerát (PHV),
- kopolymer polyhydroxybutyrátu a polyhydroxyvalerátu (PHBV) [7].

Ale existuje přes 150 různých typů PHA [9].



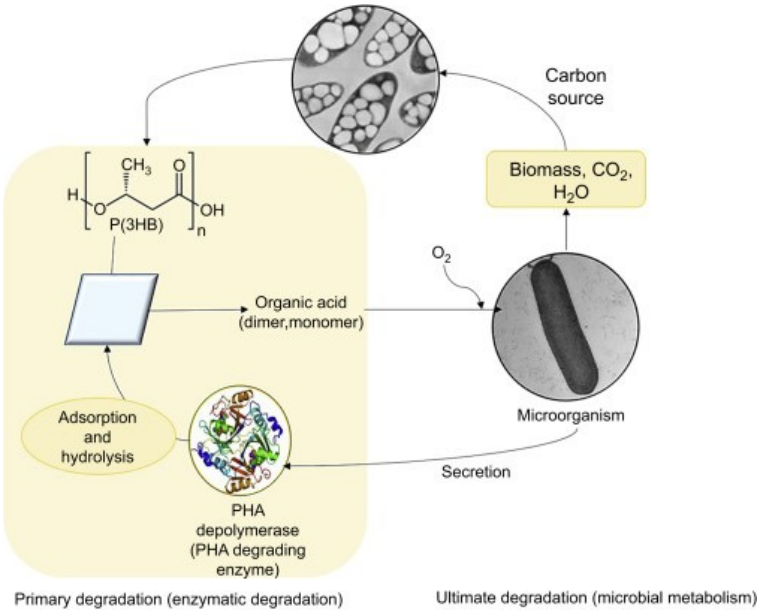
Obr. 1: Vzorec PHB [10].

PHB byl objeven jako první polyester (1920), který je produkován mikroorganismy a je také jeden z nejvíce studovaných. Jedná se o semikrystalický izotaktický homopolymer produkován například bakterií *Bacillus megaterium*, je tvrdý a křehký. Pro jeho výrobu bylo postupem času kromě bakteriální produkce vyvinuto i několik syntetických cest. Syntetická výroba PHB je problematická, jelikož jeho teplota rozkladu a teplota tání mají stejnou hodnotu (160–180 °C). Teplotu skelného přechodu vykazuje v hodnotách -5–20 °C. Je rozpustný v široké škále rozpouštědel a lze ho zpracovávat do různých výrobků, jako jsou například fólie a vlákna [7–9].



Obr. 2: Bacillus megaterium [11].

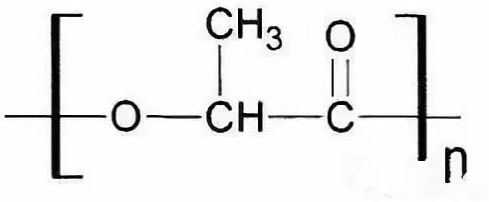
Biodegradace PHB může být dosaženo v různých prostředích, například v domácím kompostéru či půdě, a dokonce je schopný úplné biologické rozložitelnosti v mořském prostředí. PHB je degradován celou řadou mikroorganismů, jako jsou bakterie a houby. Mikroorganismy, které dokáží PHB degradovat, musí disponovat PHB depolymerázou. Co se týká bakterií, PHB depolymeráza byla objevena u bakterií gram pozitivních (G^+) i gram negativních (G^-) [12, 13]. Konkrétně PHB dokáží degradovat například bakterie z rodů *Aureobasidium, Mortierella, Absidia, Actinomucor, Streptomyces a Bjerkandera*. Z hub je to například *Penicillium oxalicum* [14, 15]. Je možné dosáhnout i úplné mineralizace PHB, a to za aerobních podmínek v přítomnosti extracelulárních enzymů, kdy jsou mikroorganismy schopné jej rozložit na vodu a oxid uhličitý [7–9]. Na obrázku (Obr. 3) je zobrazeno schéma životního cyklu PHB.



Obr. 3: Životní cyklus PHB [16].

1.1.2 **Kyselina polymléčná**

Kyselina polymléčná (PLA) je lineární alifatický termoplast. Můžeme ji získat pomocí polykondenzace kyseliny mléčné nebo polymerací za otevření cyklického kruhu laktadienového dimeru. Dále také může být získávána z brambor, kukuřice a dalších obnovitelných zdrojů zemědělské produkce. PLA je křehká, tuhá a má vysokou pevnost v tahu. Využívá se na výrobu potravinových obalů, nádobí a příborů [17, 18].



Obr. 4: Vzorec PLA [18].

1.1.3 **Škrobové polymery**

Škrob se v rostlinách nachází ve formě granulí a může mít různé složení v závislosti na druhu rostliny. Získávat ho můžeme především z brambor, rýže a kukuřice [7, 8]. Je složený z amylózy a amylopektinu.

2 ABIOTICKÁ DEGRADACE POLYMERŮ V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Abiotická degradace není způsobena živými organismy, ale abiotickými činiteli. Mezi abiotické faktory degradace můžeme řadit například fotodegradaci, termální degradaci, mechanickou degradaci a hydrolýzu.

2.1 Fotodegradace

Fotodegradací rozumíme degradaci polymeru při jeho vystavení ultrafialovému (UV) záření, ve většině případů se jedná o záření sluneční. Polyestery podléhají fotodegradaci díky přítomnosti karbonylové skupiny ve svém řetězci [19].

2.2 Termální degradace

Degradaci polymerů také může způsobit působení vysoké teploty na polymer. Hlavní rozdíl mezi světelnou a termální degradací spočívá v její iniciaci, mechanismus a produkty probíhající oxidační reakce jsou v obou případech stejné. Teplota může ovlivňovat organizaci makromolekul. Při vysoké teplotě dochází k degradaci materiálu, změně morfologie, ovlivnění mechanických vlastností a změně molekulové hmotnosti [20].

2.3 Mechanická degradace

K tomuto druhu degradace může dojít v následku vlivu mechanické síly, například při působení na polymer tlakem nebo účinkem smykových sil. Mechanická degradace může být způsobena mnoha různými faktory, jako jsou turbulence vody a vzduchu nebo tlak sněhu. Také se může jednat o poškození některými živočichy, například poškození od ptáků nebo drobných živočichů [20].

2.4 Hydrolýza

Hydrolýza je u polyesterů nejčastějším spouštěčem biodegradace. Aby mohla proběhnout degradace vyvolaná vodou, musí polymer obsahovat hydrolyzovatelné kovalentní vazby (přítomny například u etherů, anhydridů, amidů a karbamidů). Vyvolává také degradaci esterových vazeb polyhydroxybutyrátu, jehož biodegradace byla sledována v praktické části bakalářské práce. U PHB byl učiněn první objev hydrolytického štěpení mikrobiálního polymeru [20, 21].

Proces abiotické hydrolýzy je značně ovlivněn obsahem vlhkosti a teplotou, které ji z pravidla urychlují. Teplota, při které hydrolýza probíhá, způsobuje degradaci materiálu, která mění morfologii, ovlivňuje mechanické vlastnosti a molekulovou hmotnost [22, 23].

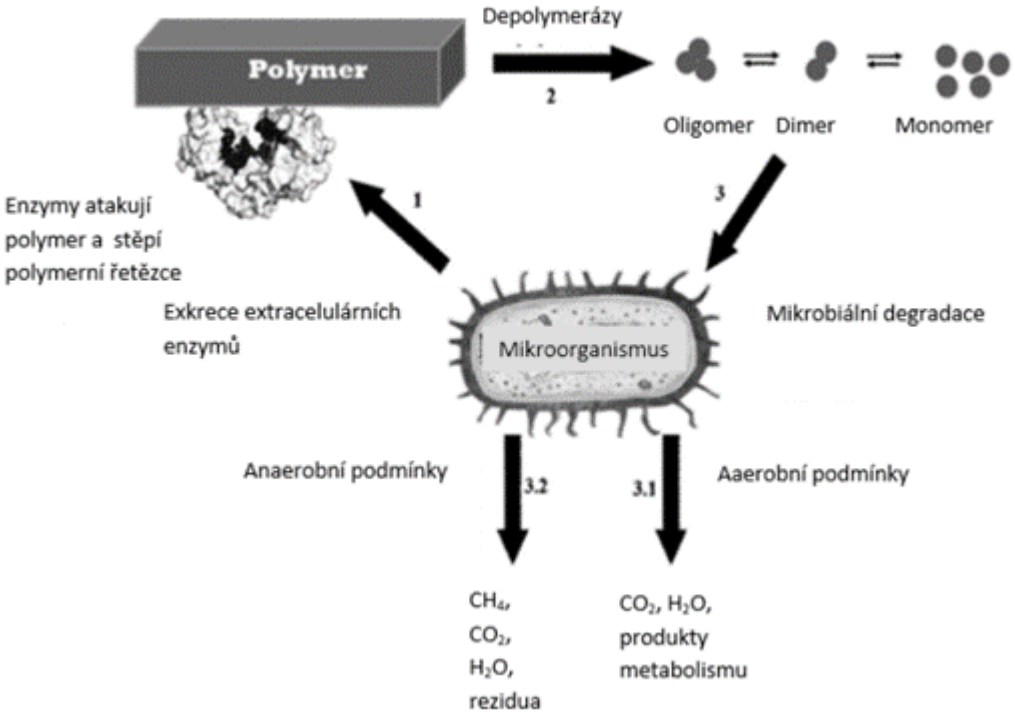
3 BIODEGRADACE POLYMERŮ

Degradací polymerů rozumíme zhoršení jejich mechanických a fyzikálních vlastností, chemické struktury a také změnu vzhledu. Plně biologicky odbouratelný polymer je takový, který se za pomoci mikroorganismů zcela přemění na své základní složky, a to bez zanechání škodlivých látek. Podle přítomnosti kyslíku rozdělujeme degradaci na biotickou aerobní – v tomto případě je kyslík přítomen a vzniká oxid uhličitý, a nebo biotickou anaerobní, kdy kyslík není k dispozici a je produkován metan. Konkrétní průběh degradace závisí na prostředí, ve kterém se degradující polymer nachází [19].

Průběh biodegradace:

Většinou se biodegradace dělí do 4 procesů: biodeteriorace, depolymerace, asimilace a mineralizace.

- Biodeteriorace může probíhat buď působením mikroorganismů a nebo může být vyvolána chemickými látkami a zářením. Dochází k povrchové erozi, která vede k porušení povrchu polymeru, ale nedochází ke změně molekulové hmotnosti [20].
- Při depolymeraci dochází k rozkladu makromolekuly. Vzniknou tak kratší řetězce nebo menší molekuly, jako jsou monomery, dimery a oligomery. Ty mají menší molekulovou hmotnost než dlouhé řetězce makromolekul, takže budou následnému rozkladu podléhat rychleji [24]. K takovéto fragmentaci se může dospět za působení fyzikálních sil mechanické povahy, jako je například zahřívaní nebo smáčení. Nejdůležitější reakcí, která zahajuje polymeraci, je abiotická hydrolýza. Biologickou degradaci polymerů mají za následek dvě kategorie enzymů: extracelulární a intracelulární depolymerázy. Degradace intracelulární štěpí polymer vně buňky. Exoenzymy mají za následek výše zmíněný vznik kratších molekul [4].
- Pro asimilaci je nezbytná předešlá fragmentace, aby vzniklé kratší řetězce mohly procházet cytoplazmatickou membránou. Odtud prochází do cytoplazmy, kde jsou využity k výrobě energie a biomasy [4, 20].
- Při procesu mineralizace vznikají konečné produkty jako CO_2, H_2O a CH_4 [4].
- Schéma biodegradace polymeru je vyobrazeno na obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Schéma biodegradace polymerů [25].

3.1 Faktory ovlivňující biodegradaci

Rychlost degradace je ovlivněna chemickou strukturou polymeru, jeho molekulovou hmotností, konfigurací, zúčastněnými mikroorganismy a podmínkami prostředí. Dále záleží i na výše zmíněných abiotických faktorech [24].

3.1.1 **Vlastnosti polymeru**

Polymery s vyšší molekulovou hmotností jsou degradované pomaleji nebo jsou méně biologicky rozložitelné než polymery, které mají nižší molekulovou hmotnost. Mezi faktory ovlivňující rychlost biodegradace také řadíme fyzikální a chemické vlastnosti povrchu polymeru. Prakticky všechny povrchy mohou působit jako substrát pro bakteriální adhezi a tvorbu biofilmu. Důležitý je specifický povrch. Čím bude specifický povrch větší, tím rychleji bude biodegradace probíhat. Toto je dobře patrné například ze studie Husárové a kol., kteří zkoumali vliv specifického povrchu na rychlost biodegradace PLA v kompostu. Sledována byla biodegradace vzorku naneseného na perlitu, prášku a fólii. Nejrychleji degradovala PLA, která byla nanesena na částicích perlitu. Větší specifický povrch perlitu podpořil mikrobiální kolonizaci materiálu a tím i jeho biodegradaci. Nejpomaleji byla degradována fólie, pravděpodobně především kvůli nejmenšímu specifickému povrchu [26].

Záleží také na krystalinitě polymeru, kdy s vyšším stupněm krystalinity stoupá i odolnost proti biodegradaci, jelikož biodegradace začíná v oblastech s amorfní strukturou. Dále zahrnujeme i přítomnost postranních a alifatických řetězců, které ve většině případů biodegradaci zpomalují, ale není tomu tak vždy. Například pokud postranní skupina zahrnuje OH^-, může být biodegradace naopak rychlejší. Také zde patří přítomnost aromatických skupin, které vedou ke zpomalení biodegradace [24, 26].

3.1.2 **Vlastnosti prostředí**

Jak probíhá degradace polymerů v konkrétním případě závisí na prostředí, kterému jsou vystaveny. Mezi podmínky prostředí můžeme zařadit například míru vlhkosti, typ půdy a kompostovacího prostředí a také typ přítomné vody (odpadní, mořská, sladká). Každé prostředí má jiné rozložení charakteristických faktorů, kterými jsou kyslík, voda a další chemické látky, denní světlo a degradující mikroorganismy [19]. Polymer může při vystavení povětrnostním podmínkám procházet transformacemi (působením sil mechanických, chemických i tepelných či světelných), které můžou ovlivňovat mechanické vlastnosti polymeru, například polymer může křehnout působením UV záření. Mikrobiální degradace v půdě se zvyšuje při vyšších teplotách, především následkem vyšší aktivity hub. Ve studii sledující degradaci PHB v půdě při různých teplotách Mergaert a kol. zjistili, že při teplotě 15 °C byla ztráta hmotnosti polymeru 0,05 % za den, při 28 °C byla ztráta 0,12 % za den a při 40 °C dosáhla 0,45 % za den. Změna hodnoty pH má také vliv na degradaci, kdy mírné snížení hodnoty pH o jednu jednotku může rychlost degradace několikanásobně zvýšit, jelikož slabě kyselá půda je ideální pro vývoj hub a některých bakterií. Také výskyt degradačních bakterií závisí na pH půdy. Bakterie degradující PHB *Bacillus megatercum* se nachází v půdách neutrálních, zatím co *Paenibacillus polymyxa* se nachází v kyselých lesních půdách [27–29].

4 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou takové, které inhibují růst a rozmnožování mikroorganismů nebo jsou mikroorganismy jejich účinkem zabíjeny. Mohou to být látky přírodního původu, syntetické i polosyntetické. Mechanismus jejich účinku je velmi složitý a může se lišit s ohledem na složení buněčné stěny a cytoplasmatické membrány mikroorganismů. Dochází při něm k poškození buněčné stěny a buněčných membrán a také k poškození molekul nukleových kyselin, adsorpci antimikrobiální látky na buněčný povrch, dále pak k průniku přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu. Následuje interakce s cílovými strukturami, jako mohou být například proteiny, enzymy nebo nukleové kyseliny [30, 31].

4.1 Přírodní antimikrobiální látky

Hlavní zdroj přírodních antimikrobiálních látek jsou esenciální oleje. Esenciálních olejů je známo více než 3000 z různých druhů rostlin. Nacházejí se v květech, listech i plodech rostlin a jejich strukturní složení může být ovlivněno i podnebím, půdou a procesem získávání. Jsou to roztoky připravené parní destilací nebo extrakcí z rostlinného materiálu. Vyznačují se svou účinností inhibovat šíření mikroorganismů se schopností působit při uvolňování volných radikálů v těle [32, 33].

4.1.1 Terpeny

Terpeny jsou velmi obsáhlá a významná skupina antimikrobiálních látek s širokým využitím. Jejich chemická struktura je odvozena od isoprenu, který je jejich základní jednotkou. Pokud sloučeniny obsahují další prvky, obvykle kyslík, nazývají se terpenoidy. Příklad běžných terpenoidů jsou mentol, kafr nebo artemisinin, který se využívá jako antimalarikum. Terpenoidy jsou zodpovědné za výrazné aroma rostlin a tvoří hlavní složku esenciálních olejů. Terpenoidy přítomné v esenciálních olejích rostlin mohou předcházet nákaze bakterií *Listeria monocytogenes*. Terpenoidy z kůry stromu zvaného *Ptelopsis suberosa* také prokazatelně zabraňují tvorbě vředů a snižují závažnost již existujících vředů. Stále ale není jasné, jestli je pozitivní působení proti vředům způsoben antimikrobiálním účinkem, nebo ochranou žaludeční sliznice [32].

Terpenoidy se také dají využít jako analgetikum, konkrétně kapsaicin, který má pozitivní vliv na nervový, kardiovaskulární a trávící systém a také působí antimikrobiálně a dokáže inhibovat velké množství bakterií. Kapsaicin je také obsažený v chilli paprikách, má schopnost vyvolat pocit pálení a tak je používán jako ochucovadlo pokrmů a díky tomu je

v dnešní době velmi rozšířený. Mechanismus antimikrobiálního účinku terpenů není zatím přesně pochopen, ale předpokládá se, že zahrnuje narušení buněčné membrány mikroorganismů [32].

4.1.2 **Fenoly a polyfenoly**

Fenolické látky obsahují ve své struktuře jeden nebo více fenolových kruhů. Mezi nejčastější zástupce této skupiny patří například kyselina kávová a skořicová, což jsou sloučeniny odvozené od fenylpropanu. Hydroxylované fenoly katechol a pyrogallol jsou prokazatelně toxické pro mikroorganismy. Počet hydroxylových skupin má vliv na toxicitu, kdy zvýšená hydroxylace vede ke zvýšené toxicitě. Katechol obsahuje dvě hydroxylové skupiny a pyrogallol obsahuje tři, je tedy pro organismy více toxický. Předpokládá se, že mechanismus zodpovědný za fenolickou toxicitu zahrnuje reakci s thiolovými skupinami [32].

Fenolové sloučeniny s kratším postranním řetězcem a bez obsahu kyslíku mohou být také klasifikovány jako esenciální oleje. Takovou látkou může být například eugenol, který je obsažený v hřebíčkovém oleji [32].

Chinony jsou aromatické systémy obsahující dvě ketoskupiny. Jsou v přírodě všudypřítomné a jsou vysoce reaktivní. Chinony snadno podléhají oxidačně-redukčním reakcím, které jsou velmi důležité v živých organismech, například ubichinon (koenzym Q) přenáší elektrony v dýchacím řetězci. Dále také poskytují zdroje volných radikálů a vytváří komplexy s nukleofilními aminokyselinami, což vede k narušení a ztrátě funkce daného proteinu a díky tomu mají chinony dobré antimikrobiální účinky. Chinony jsou také zodpovědné za reakci hnědnutí poškozeného ovoce či zeleniny a jejich přítomnost v henně dává tomuto materiálu jeho barvící vlastnosti [32].

Flavonoidy jsou fenolové skupiny obsahující jednu karbonylovou skupinu. Jsou to látky produkované rostlinami jako odpověď na reakci mikrobiální infekce, což souvisí s jejich antimikrobiálními vlastnostmi. Flavonoidy mohou narušovat povrchové proteiny mikroorganismů a tím poškodit jejich funkce. Katechiny, nejvíce redukovaná forma flavonoidů, mají velmi dobré antimikrobiální účinky a dokáží inhibovat velké množství bakterií, jako je například *Streptococcus mutans* či *Shigella sp*. Katechiny jsou obsažené v čajích oolong [32].

Taniny jsou látky se schopností denaturovat proteiny, například srážet želatinu z roztoku. Mají vysoké molekulové hmotnosti a nacházejí se téměř v každé části rostlin. Taniny vytváří podobně jako chinony komplexy s bílkovinami, díky čemuž mohou také inhibovat bakterie,

dále mají antiinfekční účinky. Jejich chuť je trpká, jsou obsažené v zeleném čaji, kávě nebo v červeném víně [32].

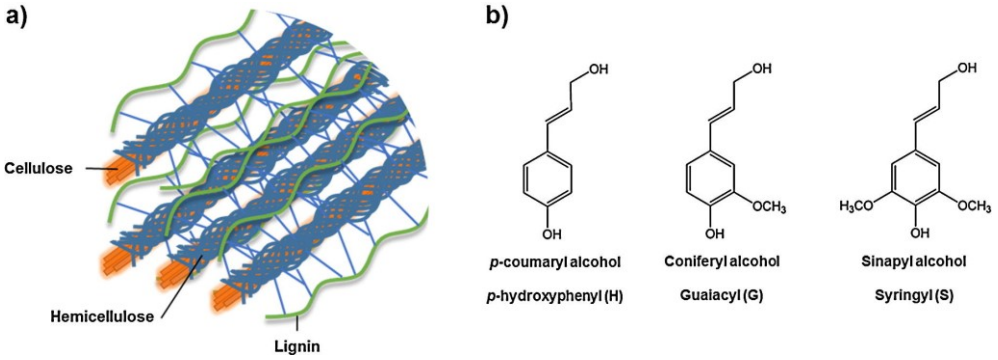
Kumariny zodpovídají za charakteristický zápach sena. Mají protizánětlivé, antivirotické a protitrombotické účinky, jsou například součástí léku warfarin. Také se používají k prevenci proti vzniku oparů [32].

4.1.3 **Alkaloidy**

Alkaloidy jsou heterocyklické sloučeniny dusíku. První lékařské použití bylo zaznamenáno již v roce 1805, kdy byl izolován morfin z nezralých makovic. Mezi deriváty morfinu řadíme kodein a heroin. Diterpenoidní alkaloidy izolovatelné z pryskyřníku mají antimikrobiální účinky. Některé typy alkaloidů také mohou působit proti infekci HIV i proti střevním infekcím spojeným s AIDS. Mechanismus jejich účinku spočívá ve schopnosti interagovat s DNA [32].

4.1.4 **Lignin**

Lignin je po celulóze druhým nejrozšířenějším biopolymerem lignocelulózové biomasy. Nachází se v buněčných stěnách rostlin, kde zvyšuje jejich pevnost a tuhost, umožňuje transport vody a rozpuštěných látek a poskytuje bariéru proti invazím různých patogenů. Jeho chemická struktura se liší podle původu, může pocházet z tvrdého dřeva, měkkého dřeva nebo z trávy. Pokud lignin pochází z jehličnatého dřeva, obsahuje hlavně guaiacylové jednotky. V případě tvrdého dřeva má lignin stejné množství guaiacylových a syringylových jednotek. Travní lignin je charakterizován jednotkami guaiacyl, syringyl a p-hydroxyfenyl. Lignin má antioxidační a protiplísňové účinky, ve srovnání s celulózou je odolnější vůči chemickým a biologickým útokům a má vyšší pevnost. Je také schopen absorbovat UV záření [34]. Antimikrobiální efekt ligninu dodávají hlavně hydroxyfenylové skupiny, methoxy skupiny, alifatické hydroxylové skupiny a dvojné vazby vnějšími uhlíky v postranním řetězci. Pro antimikrobiální účinek ligninu je důležitá především hydroxyfenolová skupina, která má schopnost zachytávat volné radikály díky atomu vodíku. Jeho antimikrobiální účinek také souvisí s aromatickými sloučeninami, které fungují podobně jako antibiotika [35]. Monomery ligninu jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 6).



Obr. 6: Monomery ligninu [34].

4.2 Další antimikrobiální látky

4.2.1 Triclosan

Triclosan je syntetické antibakteriální činidlo, které se při aplikaci snadno vstřebává do lidských tkání. Dříve se přidával do široké škály výrobků pro osobní péči, jako jsou mýdlové nemocniční výrobky, mycí prostředky na tělo a zubní pasty. Nicméně byly zjištěny jeho toxické účinky, kterými může být například potenciální karcinogenita, narušení střevní mikroflóry, oslabení imunitního systému a také zvyšuje rezistenci bakterií na antibiotika. Proto je od roku 2016 zakázáno jeho používání v mycích prostředcích na ruce a tělo. Je však ve vysokých koncentracích i v jiných spotřebních výrobcích, například v hračkách a v kuchyňském nádobí. Ukázalo se však, že triclosan dokáže inhibovat funkci žírných buněk. Ty se nachází ve většině tkání lidského těla a jsou klíčové v mnoha fyziologických a patologických procesech [36, 37].

4.2.2 Antibiotika

Mezi antimikrobiální látky mohou být řazena i antibiotika. Antibiotika jsou produkována bakteriemi nebo houbami. Například sulfonamidy jsou skupinou antibiotických léků, které mají široké antibakteriální účinky a díky tomu jsou jedny z nejpoužívanějších chemoterapeutik ve veterinární medicíně. Používají se také v humánní medicíně, ale v menší míře. Sulfonamidy jsou cílené na specifické metabolické dráhy inhibicí biologické dráhy folátu. Jelikož tyto sloučeniny nejsou plně metabolizovány, velká část z nich se vylučuje v moči a tak se dostává do životního prostředí. Sulfonamidy jsou biologicky nerozložitelné a velmi perzistentní a díky tomu jsou pravidelně detekovány ve vodním prostředí, kde mohou mít neznámé účinky na vodní organismy. Jedním z nejběžnějších chemoterapeutik

z této skupiny je sulfamethoxazol. Je používaný jak v humánní tak i ve veterinární medicíně [38].

4.2.3 **Peptidy**

Antimikrobiální peptidy jsou genově kódované obranné molekuly, které mohou být účinnou alternativou k tradičním antibiotikům v boji proti infekcím kvůli jejich širokospektrální antimikrobiální aktivitě a obtížím patogenů vyvinout si proti nim rezistenci. Jsou součástí přirozené imunity většiny živých organismů a tak pravděpodobně hrají zásadní roli ve vrozené imunitě většiny organismů. Vykazují antimikrobiální aktivitu proti různým bakteriím, houbám a virům, včetně některých z čeledi *Coronaviridae*. Jejich chemická syntéza je ale velmi drahá a proto je jejich užívání omezeno [39].

4.2.4 **Nanočástice stříbra**

Nanočástice stříbra mají silný antimikrobiální účinek proti různým mikroorganismům. To souvisí s jejich velikostí a tvarem, čím menší jsou částice stříbra, tím vyšší je jejich antimikrobiální účinek. Jelikož jsou koloidní disperze stříbra nestabilní, je nutná stabilizace velikosti částic. Ke stabilizaci se z polymerů používá polyvinylpyrolidon, který se adsorbuje na povrch částic a tak zamezí jejich agregaci. Stabilizace vede ke snížení hodnoty minimální inhibiční koncentrace zejména u gram pozitivních bakterií. Nanočástice stříbra také dokáží zvýšit účinnost antibiotik [36, 40]. Nanočástice stříbra se využívají v oblasti textilního průmyslu, mohou se přidávat do oblečení, kde díky svým antimikrobiálním vlastnostem ničí bakterie produkující zápach z potu. Také mohou být obsaženy v deodorantech a pracích prostředcích, hojně se využívají i v lékařském průmyslu a také v elektronice na konstrukci mikroelektronických obvodů [41, 42]. Z hlediska bezpečnosti je však stříbro toxickým prvkem, který by za normálních okolností neměl být přítomen v lidském těle [43].

4.2.5 **Nanočástice zinku**

Zinek je na rozdíl od stříbra v těle dobře využit, tělo ho dokáže vyloučit a zároveň působí antibakteriálně. Nanočástice oxidu zinečnatého mají antibakteriální vlastnosti proti gram pozitivním i gram negativním bakteriím. Z gram negativních bakterií je účinný například proti bakterii *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi* a *Vibrio cholerae*. Z gram pozitivních bakterií to můžou být například *Streptococcus mutans* a *Streptococcus pyogenes*. Oxid zinečnatý může ovšem vykazovat určitou toxicitu pro buňky savců. Vliv velikosti a

tvaru částic na toxicitu není stále jasný, ale nejvyšší antibakteriální vlastnosti vykazují nanočástice při nejmenších velikostech [43].

4.3 Směsi antimikrobiálních látek a polymerů

4.3.1 Využití přírodních antimikrobiálních látek v medicíně

V současnosti se vyrábí z polymerů mnoho zdravotnických materiálů a vybavení, které musí být sterilní. Jako například implantáty, protézy, katetry, ventilační trubice nebo srdeční chlopně. Tyto zdravotnické prostředky se aplikují přímo do těla pacienta a případná infekce je pak výsledkem adheze bakterií. Následně bakterie na povrchu vytvoří biofilm a jsou tak mnohem lépe chráněny před změnami prostředí i proti antibakteriálním látkám a také může dojít k uvolňování bakteriálních buněk do okolí, kde mohou způsobovat infekci v jiných částech těla. Tyto infekce mohou mít negativní následky pro organismus člověka, je tedy snaha o vývoj antibakteriálních materiálů, které by zabránily kolonizaci bakterií na povrchu polymeru [44–46]. Je známo několik metod ke snížení výše uvedeného potencionálního rizika. Lze toho dosáhnout zabudováním antibakteriálního činidla do materiálu, ale to vyžaduje velké množství antibakteriálního činidla a může dojít k nekontrolovatelnému uvolňování do těla, což by mohlo vést k dalším problémům. Další možností je ošetření pouze povrchové vrstvy materiálu. Povrch materiálu může být ošetřen pomocí povrchové funkcionalizace, nebo pomocí roubování za použití látek, které zabraňují adhezi mikrobům. Mohou být využity například nanočástice [46].

4.3.2 Využití přírodních antimikrobiálních látek v potravinářských obalech a zemědělství

S rostoucími obavami o životní prostředí díky rozsáhlému používání syntetických a biologicky nerozložitelných polymerních obalů vzrostly v poslední době také požadavky na biologicky rozložitelné a obnovitelné materiály pro obalové aplikace. V průmyslu balení potravin je potřeba zamezit mikrobiální činnost. Toho můžeme dosáhnout pomocí začlenění antimikrobiálních látek, které poskytují možnost ochrany potravin před vývojem a šířením mikroorganismů. Antimikrobiální obaly dokáží prodloužit trvanlivost produktů deaktivací nebo snížením růstu různých bakterií nebo plísní, které jsou škodlivé pro lidské zdraví. Antimikrobiální obal lze připravit vytvořením fólie pomocí antimikrobiálních polymerů, potáhnutím bioaktivních látek na povrch obalu nebo zabudováním bioaktivních látek přímo do obalových sloučenin [47]. Z průmyslového hlediska je při výrobě obalových fólií

nejvýhodnější použití klasických polymerních technologických postupů, jako je vytlačování. Avšak během vytlačování může dojít ke zhoršení antimikrobiální aktivity z důvodu použití vysoké teploty, vysokých vstřikovacích rychlostí a vysokého tlaku [48].

Fólie na bázi škrobu s nisinem vykazovala dobré antimikrobiální vlastnosti proti *Listeria monocytogenes* a *Clostridium perfringens*, ale také měla zlepšenou tepelnou stabilitu a mechanickou pevnost. Škrob obsahující propolis již při malých dávkách zmenšil antimikrobiální účinnost proti různým patogenům. Začlenění antimikrobiálních látek do PLA umožnilo kontrolovatelné uvolňování látek, čímž se zlepšila jejich účinnost proti mikroorganismům. Antimikrobiální látky zabudované do potahové vrstvy PLA vytvořily hydrofilní povrch, který zabraňuje adhezi mikroorganismů k povrchu fólií [47].

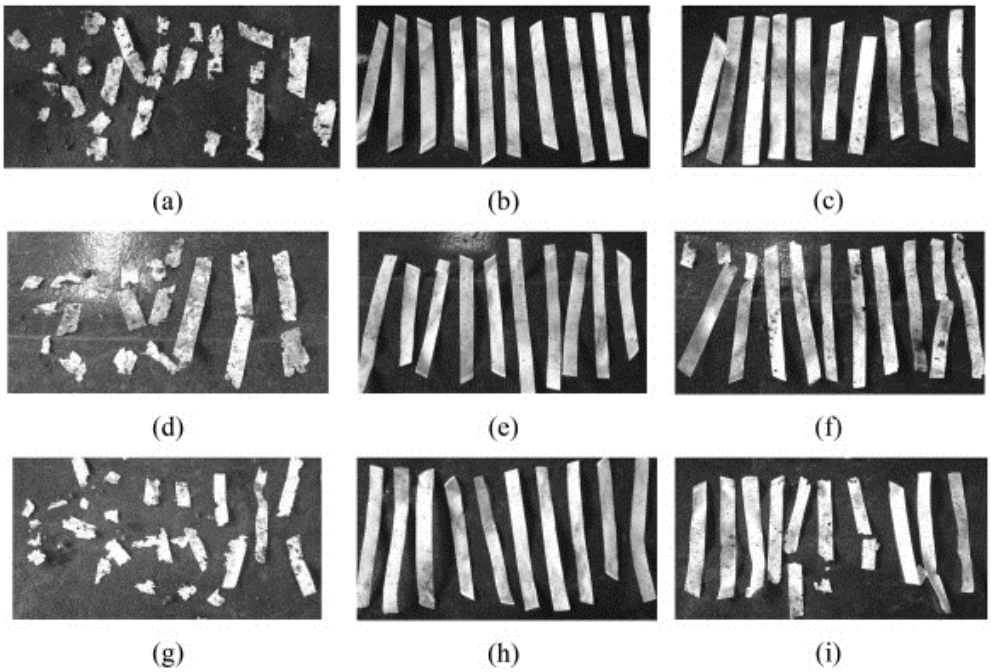
Polymer PHB je vhodný pro balení potravin díky své lamelární struktuře, která přispívá k jeho vynikajícím bariérovým vlastnostem proti propustnosti vody. Vyznačuje se dobrými bariérovými vlastnostmi pro plyn a vodu, může být vyráběn ve velkém měřítku, což umožňuje jeho komerční využití. Také má vysokou krystalinitu a dobré mechanické vlastnosti, čímž se velmi podobá polyethylenu. Fólie PHB s antimikrobiálními činidly vykazují vysokou aktivitu při inhibici růstu mikroorganismů a kontrolovaném uvolňování dezinfekčních prostředků. Antimikrobiální látky extrahované z přírodních zdrojů, jako jsou esenciální oleje, měly ve studii Araujo a kol. požadovanou antimikrobiální aktivitu bez škodlivých účinků na potraviny [49]. Při obsahu vanilinu a eugenolu již v malém množství jsou fólie účinné proti různým druhům bakterií. Začlenění přírodních antimikrobiálních látek do PHB však často snižuje tepelnou stabilitu a mechanické vlastnosti fólií. Eugenol se vyznačuje vysokou antimikrobiální aktivitou proti plísním a široké škále bakterií, což je pro balení potravin ideální [47, 50].

V zemědělství mohou být biodegradabilní polymery použity jako mulčovací fólie. Ty pomáhají zabránit růstu plevelů a snížit tak spotřebu pesticidů, dále snížit spotřebu vody na zálivku, zvýšit teplotu půdy a mají schopnost udržet stálé teplotní podmínky, což urychluje růst plodin. Mulčovací fólie také udržují plodiny (například saláty) čisté a snižují tak potřebu jejich čištění po sklizni [51]. Biologicky odbouratelné mulčovací fólie jsou zapracovávány do půdy, kde se očekává jejich biodegradace a díky tomu jsou ekologicky udržitelnou alternativou k polyethylenovému mulčování. Dále také začlenění biologicky odbouratelných mulčovacích fólií vede ke zvýšené mikrobiální aktivitě a tak můžou pozitivně ovlivnit dynamiku půdní organické hmoty. Pro výrobu mulčovacích fólií lze využít mimo jiné biodegradabilní polymery, jako je škrob nebo PBAT, také PHB. Jeho vlastnosti,

pro které je využíván v balení potravin, jsou klíčové také pro použití v zemědělství. Fólie vyrobené z PHB ale nemusí udržet požadované mechanické vlastnosti po celé produkční období. Proto je v některých případech výhodné inkorporovat do fólií antimikrobiální látky, které mohou zpomalit jejich biodegradaci [52].

4.3.3 Biodegradace polymerů s přídavkem antimikrobiálních látek v životním prostředí

Ve studii z roku 2015 byly srovnány fólie PHB uložené v půdě zemědělské, písčité a skládkové z hlediska rychlosti jejich biodegradace. Fólie v zemědělské půdě byly degradovány nejrychleji. To může být způsobeno lepší dostupností půdního fosforu a zastoupením většího množství hub. Dále také hraje roli kyselost půdy, vlhkost a krystalinita polymeru. Vliv eugenolu na biodegradaci PHB v různých typech půdy je patrný na obrázku (Obr. 7). Fólie obsahující 20 % eugenolu vykazovaly nižší antimikrobiální aktivitu než fólie připravené se 40 % eugenolu. Účinek přidané antimikrobiální látky je tedy závislý na koncentraci. Fólie uložené v zemědělské půdě vykazovaly rychlejší degradaci než v jiných typech půdy. Fólie byly inkubovány v půdě po dobu 60 dní [50].



Obr. 7: Biodegradace fólií PHB s obsahem antimikrobiálních látek. Fólie PHB v zemědělské, písčité a skládkové půdě (a, b, c); fólie PHB připravené s 20 % eugenolu a zakopané v zemědělské, písčité a skládkové půdě (d, e, f); fólie PHB připravené s 40 % eugenolu a zakopané v zemědělské, písčité a skládkové půdě (g, h, i) [50].

Ve studii, která sledovala biodegradabilitu biopolymeru, který obsahoval olej z kurkumy v systému domácího kompostování (29,1 °C) bylo zjištěno, že s rostoucí tloušťkou povlaku a s množstvím kurkumového oleje úbytek hmotnosti během biodegradace klesal, dokud nedosáhl minimální hodnoty a ztráta se poté zvyšovala. Snížení úbytku hmotnosti mohlo být způsobeno přítomností kurkumového oleje, který je hydrofobní sloučeninou. Pokud by objem kurkumového oleje byl 15 μl, mohlo by dojít ke změně vlastností povrchu fólie na hydrofobní. Tím by bylo dosaženo snížení absorpce vody a tak by došlo ke zpomalení rychlosti biodegradace vzorků. Větší objem kurkumového oleje (30 μl) v biopolymerní fólii by způsobil rychlejší biodegradaci a to kvůli přítomnosti polárních skupin jak v biopolymeru, tak v oleji, které umožňují vzorkům vytvářet vodíkové vazby s vodou a ty pak urychlují rozpad vzorků [53].

Extrakty kávy, kakaa a skořice byly přidány k polylaktidu v množství 0,5; 5 a 10 % hmotnosti vzorků. Vzorky byly kompostovány po dobu až 28 dní. V provedené studii bylo zjištěno, že tyto rostlinné extrakty neměly negativní vliv na proces průmyslového kompostování. Kávové a skořicové výtažky dokonce urychlily a zintenzivnily biodegradaci polylaktidu [54].

Latos-Brozia a Masek se věnovali studii, jejímž cílem bylo analyzovat procesy kompostování biologicky odbouratelných polymerů polylaktidu a polyhydroxyalkanoátu obsahujících β-karoten, juglon, morin a kurkumin. V rámci výzkumu bylo provedeno šestiměsíční kompostování materiálů. V časových intervalech jednoho měsíce byl zkoumán úbytek hmotnosti vzorků, povrchová energie, změna barvy, mechanické vlastnosti a karbonylové indexy (na základě FTIR spektroskopie) kompostovaných materiálů. Pomalejší degradace vzorků s rostlinnými přísadami byla potvrzena výsledky zkoušek mechanické pevnosti a analýzou změn karbonylového indexu. Analýza ukázala, že polylaktid a PHA obsahující přírodní přísadu se rozložili o měsíc později než referenční vzorky [55].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Použité pomůcky

Analytické váhy KERN 770, Německo;

Automatické pipety, Nicciipet (Eppendorf AG);

(2, 10, 20, 100, 200, 500, 1000 a 5000 μl);

Elektronická sušárna Memmert UFB 400;

Fluorescenční mikroskop Olympus BX53M;

Fluorometr DeNovix QFD;

Hmotnostní analyzátor plynů UGA 300;

Chladnička Whirpool kombi WBE 34162;

Laboratorní autokláv Varioklav 75S, H+P;

Laboratorní předvážky KERN 440-47;

Provzdušňovací aparatura;

Rastrovací elektronový mikroskop VEGA LMU (Tescan, Česká republika);

Váhy KERN WEW 1500-2M;

Dále byly využity běžné laboratorní pomůcky a sklo.

5.2 Použité chemikálie

H_2O	Destilovaná voda
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát
C_2H_5OH	Ethanol
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
$KHCO_3$	Hydrogenuhličitan draselný
NH_4Cl	Chlorid amonný
$NaCl$	Chlorid sodný

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Chlorid vápenatý dihydrát
H_3BO_3	Kyselina boritá
HCl	Kyselina chlorovodíková
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$	Molybdenyn amonný tetrahydrát
$(C_4H_6O_2)_n$	Polyhydroxybutyrát
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	Síran amonno-železnatý hexahydrát
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Síran manganatý heptahydrát
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	Síran měďnatý pentahydrát
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	Síran zinečnatý heptahydrát

5.3 Použité polymerní vzorky

Pro studii bylo použito PHB od firmy Helian Polymers, ze kterého byla připravena fólie z čistého PHB a dále fólie se třemi antimikrobiálními látkami rostlinného původu (v práci označené jako vzorek 1, 2, 3). Přídavek antimikrobiální látky činil 2 %. PHB s antimikrobiálními látkami bylo smícháno pomocí mikro extruderu při 180 °C s rotací 50 otáček za minutu. Fólie byly připraveny lisováním také při 180 °C po dobu 2 minut, následné chlazení trvalo 2 až 3 minuty. Vzhledem k tomu, že práce byla vypracována v návaznosti na běžící projekt, nebylo možné uvést názvy konkrétních antimikrobiálních látek. Výrobce udává, že teplota tání použitého PHB je 170–176 °C. Průměrná hodnota krystalinity PHB je 70 % [56].

5.4 Příprava inkubací

Do láhví o objemu 500 ml předem sterilizovaných v autoklávu po dobu 30 minut na 125 °C bylo připraveno:

- 15 g sušiny půdy
- 5 g perlitu
- 11,4 ml minerálního média
- 50 mg vzorku

V rámci biodegradačního pokusu byly připraveny vždy 3 paralelní láhve se zkoumaným vzorkem, 3 paralelní láhve s práškovým PHB jako pozitivní kontrola a 3 láhve bez přidaného vzorku (slepý pokus) kvůli sledování respirační aktivity samotné půdy. Sledované vzorky byly fólie, které byly nastříhané na čtverce o velikosti 0,5 x 0,5 cm. Uzávěry byly sterilizovány pod UV zářením po dobu 20 minut. Všechny láhve byly uchovány při teplotě 25 °C bez přístupu světla.

Minerální médium

Minerální médium slouží jako zdroj důležitých prvků pro organismy. Neslouží ovšem jako zdroj energie.

Zásobní roztoky použité k přípravě minerálního média:

Roztok A

KH_2PO_4 dihydrogenfosforečnan draselný. Koncentrace roztoku je 9,07 g/l.

Roztok B

$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát. Koncentrace roztoku je 23,90 g/l.

Roztok C

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ chlorid vápenatý dihydrát. Koncentrace roztoku je 1 g/l.

Roztok D

$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ síran amonno-železnatý hexahydrát. Koncentrace roztoku je 3 g/l.

Roztok E

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ síran manganatý heptahydrát. Koncentrace roztoku je 10 g/l.

Roztok F

$NaCl$ chlorid sodný. Koncentrace roztoku je 50 g/l.

Roztok G

NH_4Cl chlorid amonný. Koncentrace roztoku je 30 g/l.

Roztok stopových prvků:

0,043 g/l $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ síran manganatý pentahydrát

0,057 g/l H_3BO_3 kyselina boritá

0,043 g/l $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ síran zinečnatý heptahydrát

0,037 g/l $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ molybdenyn amonný tetrahydrát

0,025 g/l $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ dusičnan kobaltnatý hexahydrát

0,040 g/l $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ síran měďnatý pentahydrát

Složení:

Roztok A	20 ml
Roztok B	80 ml
Roztok C	10 ml
Roztok D	10 ml
Roztok E	10 ml
Roztok F	10 ml
Roztok G	10 ml
Roztok stopových prvků	2,4 ml

Všechny roztoky byly smíchány a doplněny destilovanou vodou na výsledný objem 1 l. Následně bylo minerální médium sterilizováno v autoklávu při 125 °C 30 minut a poté ochlazeno a dávkováno do inkubací.

Půda

Byla použita standardní půda LUFA 2.2 (LUFA Speyer, Německo). Půda byla přesetá přes 2 mm síto. Následně byla stanovena její sušina. Standardní půda byla využita pro své výhody oproti artificiální půdě a půdě odebrané z životního prostředí. Především:

- Dlouhodobá dostupnost a tedy srovnatelnost testů z různých let.
- Žádné potíže s hledáním, získáváním, přípravou a péčí o vhodné půdy.
- Rychlé dodání se všemi potřebnými údaji o poloze, historii, ošetření, vzorkování.

Stanovení sušiny půdy:

Na čistou, suchou a zváženou Petriho misku bylo naváženo 10 g půdy. Miska s půdou byla vložena do elektrické trouby, kde se sušila při 105 °C 3 hodiny. Po vysušení byla miska vložena do exsikátoru a po zchladnutí na laboratorní teplotu byla zvážena. Poté byla stanovena sušina půdy a z ní vypočítaný potřebný přídavek minerálního média do inkubací pro dosažení 50% vlhkosti. Stanovení se provádělo 2x. Výpočet hodnot probíhal podle následujících vzorců:

$$S_1 = \frac{m_{mp1} - m_{m1}}{m_{mpv1} - m_{m1}} \quad (1)$$

$$S_2 = \frac{m_{mp2} - m_{m2}}{m_{mpv2} - m_{m2}} \quad (2)$$

$$S_{\emptyset} = \frac{S_1 + S_2}{2} \quad (3)$$

Kde:

$S_{1,2}$	jednotlivé hodnoty sušiny půdy	[%]
$m_{m1,2}$	hmotnosti prázdných Petriho misek	[g]
$m_{mp1,2}$	hmotnosti Petriho misek s naváženou půdou	[g]
$m_{mpv1,2}$	hmotnosti Petriho misek s vysušenou půdou	[g]
$S_{\emptyset}$	průměrná hodnota sušiny půdy	[%]

Perlit

Perlit byl 2x promyt vodou z vodovodního řádu, 1x destilovanou vodou a vysušený v elektrické troubě při 105 °C. Používá se pro udržování vlhkosti a pro lepší přístup vzduchu v celém objemu půdy.

6 METODY MĚŘENÍ

6.1 Hmotnostní analyzátor plynů UGA 300

Pro vyhodnocení biodegradace vzorku byl použit analyzátor plynů UGA 300, na kterém mohou být detekovány molekuly do 300 amu. Na přístroji byla sledována produkce CO_2, který vzniká jako produkt aerobní biodegradace. Dále byl sledován argon jako standard.

6.1.1 Postup měření na přístroji UGA 300

Přístroj byl před každým měřením nastaven tak, aby měřil signál pouze určitých plynů, které měří v aktuálním čase. Přístroj zobrazí graf závislosti tlaku na čase. Na grafu je možno v reálném čase sledovat, jak dochází k ustalování signálu, což umožňuje vybrat vhodný okamžik pro odečet odezvy. K měření byl využit jako detektor elektronový násobič, jelikož je schopen dosahovat nízkých detekčních limitů. Po zapnutí přístroje dochází k ustalování hodnot, proto bylo nutné jej uvést do chodu hodinu před samotným měřením. Před samotnou analýzou byly připraveny roztoky pro přípravu kalibrační křivky, kde se využívá reakce hydrogenuhličitanu draselného s kyselinou chlorovodíkovou. Navážka cca 1,1 g $KHCO_3$ byla rozpuštěna ve 100 ml odměrné baňce a doplněna destilovanou vodou po rysku. Do zkumavky bylo odpipetováno 10 ml 1M HCl. Oba roztoky byly přeneseny do láhví, kde byly smíchány. Tak došlo k reakci mezi HCl ze zkumavky s přesně napipetovaným množstvím $KHCO_3$ v závislosti na navážce. Reakce je poměrně rychlá, ale i tak se láhve před měřením musí nechat odstát aspoň hodinu, aby se měřený oxid uhličitý dostal do celého objemu láhve. Kalibrační řada byla připravena: 0; 0,2; 0,45; 1; 1,5; 2; 3 a 8 % $KHCO_3$.

Před měřením byl pokaždé vyměněn filtr, aby nedocházelo k jeho ucpávání. Filtr obsahuje hydrofilní membránu z PTFE, jedná se o nylonový filtr o průměru 13 mm a porozitě 0,45 μm. Septum měřené láhve bylo propíchnuto tenkou kapilárou, která umožňuje dávkování plynů do přístroje. Naměřená data byla zobrazována na počítači pomocí softwaru UGA. Po měření byly inkubace provzdušňovány vzduchem, který byl vháněný pomocí silikonových hadiček napojených na čerpadlo. Vzduch byl vháněn do láhví přes promývací láhev.

6.1.2 **Zpracování dat naměřených pomocí UGA 300**

Denní produkce uhlíku vyjádřena ve formě CO_2:

$$m_{(d)C} = \frac{p \cdot (s_{vz} - q).V_g}{100 \cdot k \cdot R \cdot T} \cdot M_C \quad (4)$$

Kde:

$m_{(d)C}$ množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO_2 [mg]

p atmosférický tlak v okamžiku provzdušňování [kPa]

s_{vz} poměr odezvy detektoru pro CO_2 a Ar [-]

q absolutní člen získaný z lineární regrese pro kalibraci [-]

V_g plynný objem biometrické láhve [ml]

k směrnice přímky získaná z lineární regrese pro kalibraci [-]

R molární plynová konstanta; $R = 8{,}314\ [J \cdot mol^{-1} \cdot K^{-1}]$

T termodynamická teplota v okamžiku provzdušňování $[K^{-1}]$

M_C atomární hmotnost uhlíku; $M_C = 12{,}0107\ [g \cdot mol^{-1}]$

Kumulativní produkce uhlíku ve formě CO_2:

$$m_{(k)C(2)} = m_{(k)C(1)} + m_{(d)C(2)} \quad (5)$$

Kde:

$m_{(k)C(2)}$ kumulativní produkce uhlíku z aktuálního měření [mg]

$m_{(k)C(1)}$ kumulativní produkce uhlíku z předchozího měření [mg]

$m_{(d)C(2)}$ denní produkce uhlíku z aktuálního měření [mg]

Substrátová produkce uhlíku:

Denní produkce uhlíku vyjádřená jako kumulativní produkce uhlíku v bioreaktorech snížená o produkci uhlíku ze slepých pokusů:

$$n_{(s)C} = m_{(k)CV_z} + m_{(k)CS_l} \quad (6)$$

Kde:

$n_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2 [mg]

$m_{(k)CV_z}$ kumulativní produkce uhlíku z láhve se vzorkem [mg]

$m_{(k)CS_l}$ denní produkce uhlíku z láhve bez vzorku [mg]

Procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2:

$$D_C = \frac{n_{(s)C}}{m_C \cdot TC} \tag{7}$$

Kde:

D_C procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 [%]

$n_{(s)C}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO_2 [mg]

m_C hmotnost testovaného materiálu [mg]

TC obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu [%]

6.2 Identifikace živých a mrtvých mikroorganismů pomocí fluorescenčního mikroskopu

Fluorescenční mikroskop funguje na principu využívání záření v UV oblasti. Dochází zde k ozáření atomu, elektrony absorbují energii a jsou excitovány do vyšší energetické hladiny. Excitovaný stav není stabilní, dochází k deexcitaci, tzn. k přeskoku elektronů zpět na původní hladinu. Je uvolněna přebytečná energie (fluorescence). Vzorek tak vyzáří fluorescenční záření a to je možné snímat. V praxi se využívají umělé látky, které po ozáření fluoreskují, tzv. fluorochromy. Jsou schopny po ozáření světlem o určité vlnové délce (z viditelné či UV oblasti) světlo vyzářit zpátky. K detekci živých a mrtvých buněk na fluorescenčním mikroskopu byl použit kit LIVE/DEAD® BacLight Bacterial Viability Kit od firmy Molecular Probes, který obsahuje dvě fluorescenční barviva. Barvivo SYTO® 9 slouží ke vstupu do bakteriální buňky neporušenými i porušenými membránami. Propidium jodid prostupuje pouze membránami poškozenými [57]. Každého barviva bylo odpipetováno 1,5 μl a smícháno s 1 ml destilované vody. Do tohoto roztoku byl vložen pomocí pinzety vzorek fólie na 10 sekund, vzorek byl poté přenesen na podložní sklíčko, kam byla nanesena kapka destilované vody a poté byl vzorek přiklopen krycím sklíčkem. Takto připravený vzorek byl přenesen do mikroskopu, kde byly sledovány mikroorganismy na povrchu vzorků. Pod vhodnými filtry mikroorganismy po aplikaci barviva fluoreskují. Všechny mikroorganismy fluoreskují zeleně, zatímco mrtvé mikroorganismy s narušenými membránami fluoreskují červeně. Po kombinaci fotografií v programu mikroskopu vznikne obrázek zachycující jak živé, tak mrtvé mikroorganismy.

6.3 Rastrovací elektronová mikroskopie

Rastrovací elektronový mikroskop (SEM) byl využit pro analýzu povrchů vzorků. Při měření dopadají paprsky elektronů na vzorek, kdy při interakci vzorku s elektronovým paprskem dochází k vytváření signálů v detektoru a z těchto signálů se následně sestavuje výsledný obraz. Vzorek byl před skenováním pokoven velmi tenkou vodivou vrstvou zlata a palladia. Pokovování se provádí kvůli kvalitnějšímu zobrazení. Jelikož polymer sám o sobě je nevodivý, pokovuje se vodivou vrstvou, která umožňuje lepší odražení paprsků elektronů při měření. Pokovování probíhalo po dobu 30 sekund. Pokovený vzorek byl ofouknutý vzduchem, aby se případnými nečistotami nezanášel detektor a byl přemístěn do držáku v mikroskopu. Při mikroskopování na vzorek dopadají paprsky elektronů, které se odráží od povrchu vzorku a tak vznikne výsledný obraz přenášený do programu v počítači. V našem konkrétním případě bylo měřeno při napětí 10 kV a byl použit svazek 5 elektronů.

Rastrovací elektronová mikroskopie byla provedena ve spolupráci s Ústavem fyziky a materiálového inženýrství.

6.4 Izolace DNA a měření její koncentrace

Pro izolaci DNA byl z každé inkubace vyjmut jeden vzorek fólie o velikosti 0,5 x 0,5 cm, který byl lehce omyt destilovanou vodou.

Izolace DNA ze vzorků probíhala pomocí DNeasy PowerSoil Kit od firmy Qiagen. Kit obsahuje roztoky C1 až C6, které jsou postupně přidávány ke vzorku. Složení roztoků výrobce nesděluje. Jako první byly ke vzorku přidány zirkonové kuličky a dále 60 µl roztoku C1. Obsah zkumavky byl promíchán na vortexu po dobu 10 minut a poté centrifugován. Supernatant byl přenesen do čisté zkumavky, bylo k němu přidáno 250 µl roztoku C2, zkumavka byla promíchána na vortexu a na 5 minut vložena do lednice. Tím došlo k porušení buněčných membrán a uvolnění DNA do roztoku. Poté byl vzorek centrifugován. Supernatant byl opět přemístěn do čisté zkumavky, bylo přidáno 200 µl roztoku C3, zkumavka byla promíchána na vortexu, na 5 minut vložena do lednice a opět centrifugována. Roztok C3 slouží k odstraňování inhibitorů polymerázové řetězové reakce. Supernatant byl přemístěn do čisté zkumavky. Roztok C4 byl před přidáním do vzorku promíchán, bylo přidáno 1200 µl a výsledný roztok byl opět promíchán na vortexu a centrifugován. Dále byl postupně všechen supernatant přemístěn do kolonky a centrifugován. Roztok C4 slouží k navázání DNA na kolonku v následujícím kroku. V tomto kroku byla DNA vzorku již zachycena na filtru kolonky, přebytečná tekutina byla odstraněna a na filtr bylo napipetováno

500 µl roztoku C5. Byla provedena opakovaná centrifugace, aby došlo k odstranění nežádoucích látek z filtru, roztok C5 je promývací. Kolonka s filtrem s DNA byla přemístěna do nové zkumavky, bylo přidáno 50 µl roztoku C6, který slouží k eluci DNA. Roztok C6 byl před použitím předehřátý na 37 °C. Roztok byl centrifugován. Získaná DNA se nacházela v podobě roztoku v mikrozkumavce, může být amplifikována a analyzována.

Stanovení koncentrace DNA bylo provedeno pomocí fluorometru DeNovix QFD od firmy Thermo Fisher Scientific. Byl k tomu použit AccuGreen High Sencitivity dsDNA Quantitation Kit od firmy Biotium. Stanovení bylo provedeno následovně. Nejprve byla připravena kalibrační křivka pomocí standardních roztoků. Poté byl připraven pracovní roztok pro měření vzorků DNA naředěním fluorescenčního barviva AccuGreen Dye a pufru pro kvantifikaci DNA v poměru 1:200, 200 µl pracovního roztoku bylo odpipetováno do čiré zkumavky, k roztoku byl přidán 1 µl vzorku. Zkumavka byla promíchána na vortexu, vložena do fluorometru a následně byla změřena koncentrace vzorku.

Izolovaná DNA bude v laboratoři molekulární biologie Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí použita v rámci další práce na tématu.

7 VÝSLEDKY A DISKUZE

7.1 Stanovení sušiny půdy

Stanovená sušina půdy a potřebného množství minerálního média do inkubací bylo následující:

Průměrná hodnota sušiny půdy: 88,09 %

Přídavek minerálního média do každé inkubace: 11,4 ml

7.2 Vyhodnocení biodegradace

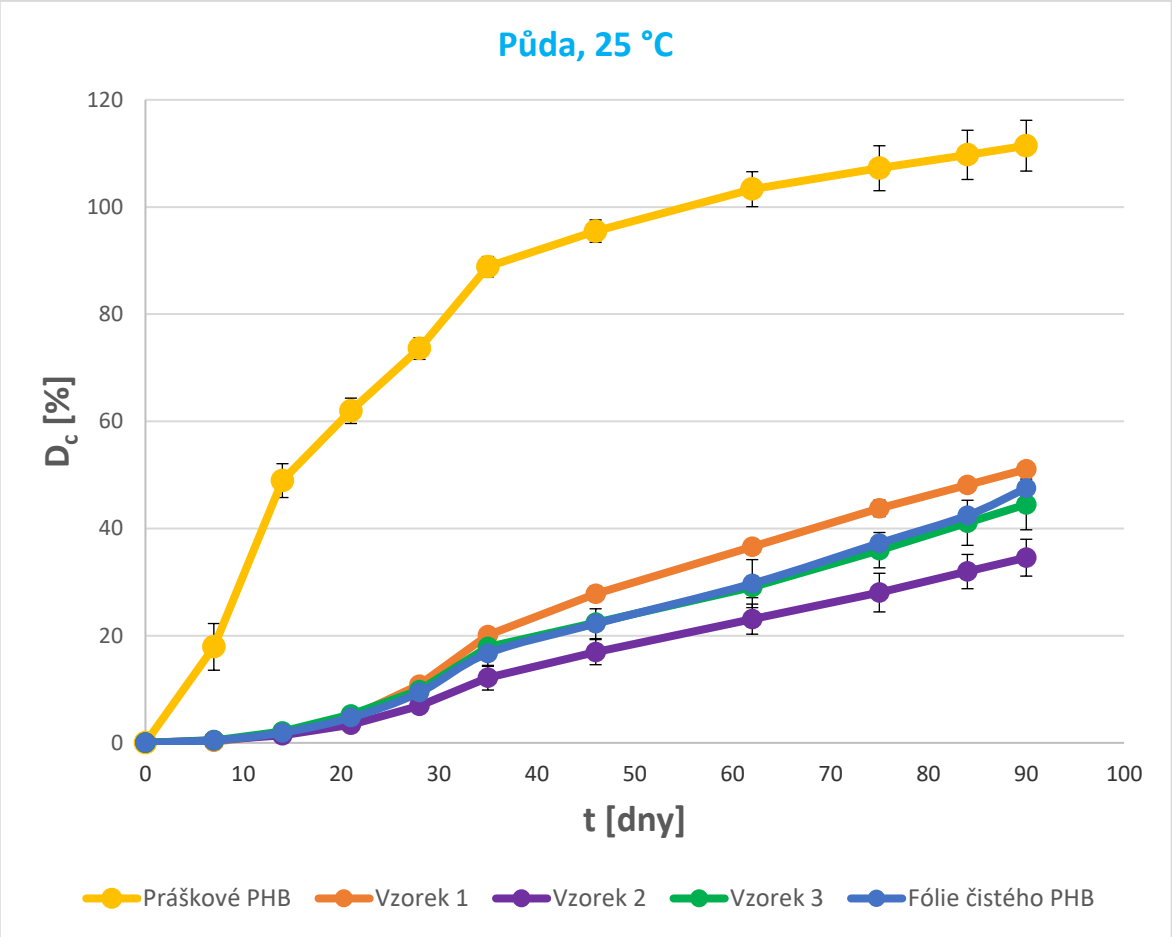
Jak je z obrázku (Obr. 8) patrné, práškové PHB vykazovalo rychlý nárůst biodegradace již od prvních dní experimentu. Nejrychlejší nárůst probíhal na začátku, kdy 20. den bylo dosaženo 60 % degradace. Na konci experimentu byl již polymer zcela degradován. Mineralizace byla po 90 dnech změřena jako 111 %, což bylo v rámci odchylky měření akceptovatelné. Je ale také možné, že po zkonzumování polymeru začaly mikroorganismy využívat jako zdroj energie odumřelé mikrobiální buňky přítomné v konsorciu a produkce CO_2 tak pokračovala. V publikaci, která se zabývala vztahy mezi členy mikrobiálního konsorcia bylo potvrzeno, že mikroorganismy mohou při nedostatku zdroje energie konzumovat mrtvé buňky [58]. Tento druh mikrobiální interakce byl zkoumán také ve studii Schink a kol., kde byla zkoumána kinetika získávání energie a nutrientů z mrtvých mikroorganismů po spotřebování primárního zdroje energie [59].

U vzorků ve formě fólií probíhala prvních 14 dní pravděpodobně tzv. lag fáze, během které docházelo k pozvolnějšímu růstu produkce oxidu uhličitého. U fólie z čistého PHB bylo na konci experimentu dosaženo 48 % degradace. Po srovnání rychlosti degradace vzorků PHB s přidanými antimikrobiálními látkami a fólie z čistého PHB vyplývá, že u vzorku 1 přidaná látka neměla na rychlost biodegradace vliv, případně ji mírně urychlila. Mineralizace byla po 90 dnech 51 %. Naopak vzorek 2 degradoval pomaleji než čistá fólie z PHB, mineralizace po 90 dnech dosáhla 35 %. U vzorku 3 bylo dosaženo v 90. dnu 44 % degradace, přidaná antimikrobiální látka tedy neměla na rychlost biodegradace významný efekt, případně jen velmi mírně zpomalující. Všechny křivky fólií kopírovaly téměř stejný trend, kdy 35. den docházelo k mírnému zpomalení produkce CO_2. Na začátku došlo pravděpodobně k rozkladu lépe degradovatelných částí řetězce (např. bočních řetězců, které mohou být obecně více mobilní a lépe dostupné pro mikrobiální exoenzymy) [60].

Rozdíl mezi rychlostí degradace čistého PHB ve formě fólie a práškového PHB byl zřejmě způsobený zejména mnohem vyšším specifickým povrchem prášku oproti PHB ve formě fólie. Čím je specifický povrch větší, tím rychleji biodegradace probíhá. To je způsobeno dobrou dostupností vzorku pro mikroorganismy, které tak mají větší možnost vzorek napadnout. Husárová a kol. zkoumali vliv specifického povrchu na rychlost degradace PLA v kompostu při 58 °C. Došli k závěru, že nejrychleji degradovala PLA nanesena na částicích perlitu, jako druhá byla PLA ve formě prášku. Naopak nejpomaleji byla díky nejmenšímu specifickému povrchu degradována fólie. Předmětem jejich zájmu byly PLA s různou molekulovou hmotností. Fólie z PLA se střední molekulovou hmotností dosáhla 95. den 45 % mineralizace a prášková PLA 80 % mineralizace, prášek se tedy degradoval téměř 2x rychleji [26]. V našem výzkumu prášek degradoval asi 2,3x rychleji než fólie. Výsledky jsou sumarizovány v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Výsledné hodnoty mineralizace (D_c) pro jednotlivé vzorky.

	D_c [%]	t [dny]
Vzorek 1	51	90
Vzorek 2	35	90
Vzorek 3	44	90
Fólie čistého PHB	48	90
Prášek PHB	111	90



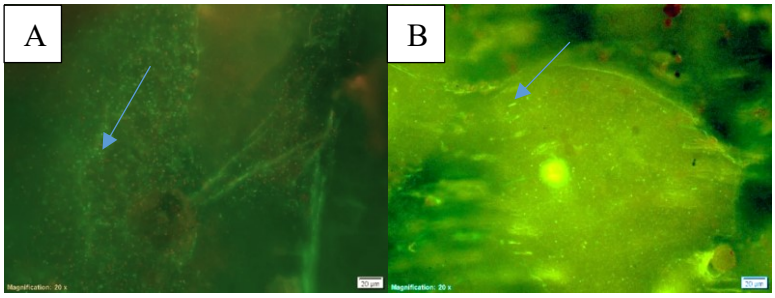
Obr. 8: Graf závislosti mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 na počtu dní.

7.3 Fluorescenční mikroskopie

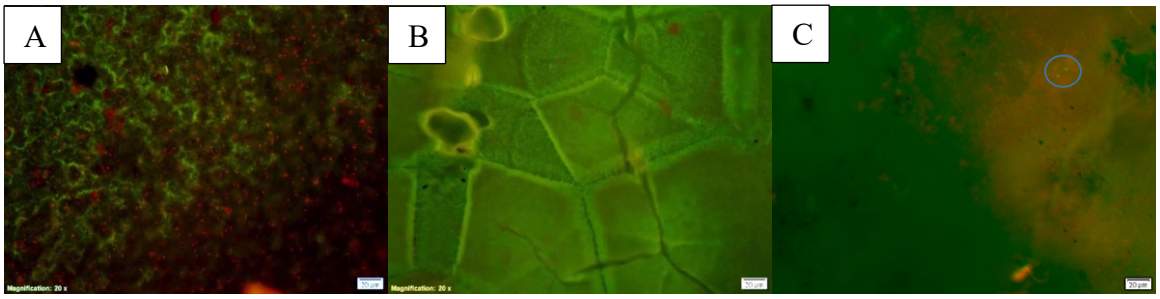
Pomocí fluorescenční mikroskopie byly sledovány živé a mrtvé mikroorganismy na povrchu fólií. Mikroorganismy byly patrné jako zelené a červené tyčinky. Mikroorganismy byly především ve tvaru koků a tyčinek. Zeleně jsou zobrazeny živé mikroorganismy, červeně mrtvé. Zelená a červená fluorescence na pozadí byla způsobena autofluorescencí vzorků. U vzorku 1 a u fólie z čistého PHB nebylo možné odebrat 90. den vzorek z inkubace, jelikož mohlo dojít k degradaci amorfní fáze, vzorek byl tedy velmi křehký a nedržel tvar [26]. Z tohoto důvodu u zmíněných vzorků chybí snímky z 90. dne.

Vzorek 1 (Obr. 9) obsahoval po 14 dnech inkubace (snímek A) velké množství kulovitých bakterií, po 28 dnech (snímek B) se objevily i bakterie ve formě tyčinek. Nebyly pozorovány téměř žádné mrtvé bakterie. Velké množství bakterií kulového tvaru bylo pozorováno také u fólie z čistého PHB (Obr. 12), ale zde se po 14 dnech inkubace vyskytovalo také větší množství mrtvých mikroorganismů. Po 28 dnech (snímek B) byl povrch pokryt mikrobiálním biofilmem. U vzorku 2 (Obr. 10) se na snímcích z fluorescenčního mikroskopu

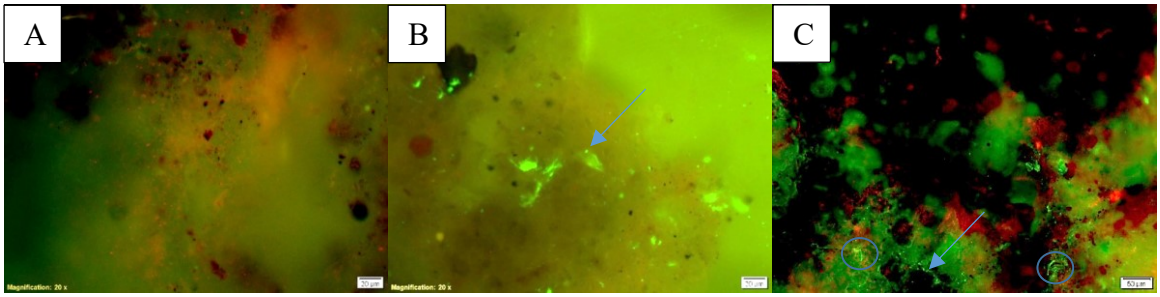
nevyskytovaly téměř žádné mikroorganismy. Barvivo se zde dostalo do rýh na povrchu fólie. Na snímku pořízeném po 90 dnech degradace (snímek C) bylo nalezeno malé množství bakterií nahloučených u sebe v jednom místě. Antimikrobiální látka přidaná ve vzorku 2 tedy přispěla k eliminaci výskytu mikroorganismů na povrchu fólie. To koreluje s výsledky mineralizace, jelikož vzorek 2 degradoval podle výsledků mineralizace (Obr. 8) nejpomaleji. U vzorku 3 (Obr. 11) bylo pozorováno jen malé množství mikroorganismů. U pozorování vzorků po 90 dnech bylo zvoleno větší zvětšení, kde se podařilo u vzorku 3 nalézt kolonie mikroorganismů. Výsledky z pozorování pomocí fluorescenční mikroskopie souhlasí s výsledky mineralizace (Obr. 8).



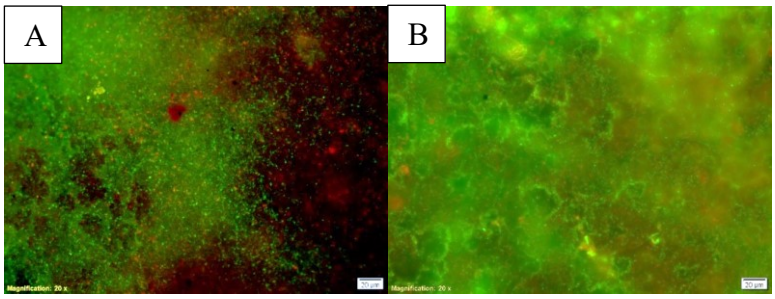
Obr. 9: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 1. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 200x.



Obr. 10: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 2. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace (C). Zvětšeno 200x.



Obr. 11: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 3. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B). Zvětšeno 200x. Fólie po 90 dnech biodegradace (C). Zvětšeno 500x.



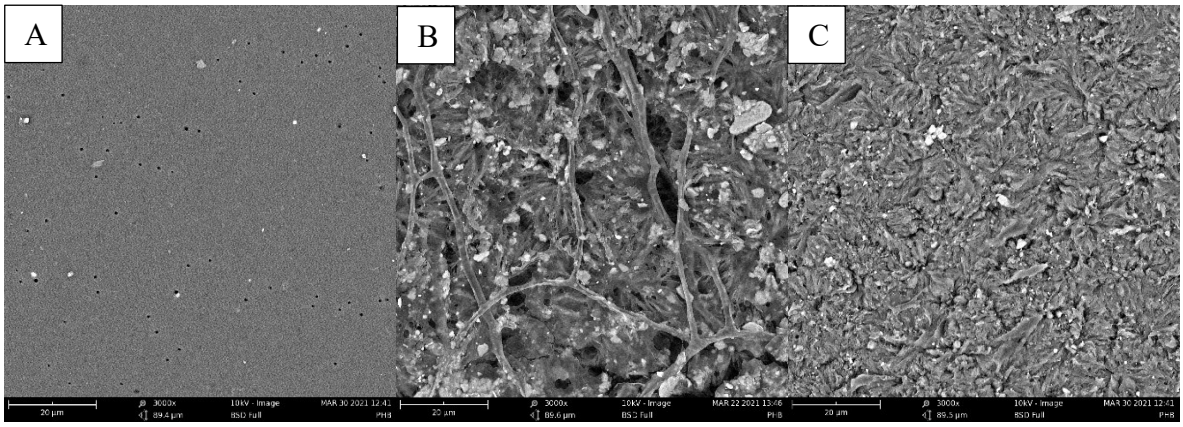
Obr. 12: Fluorescenční mikroskopie, fólie čistého PHB. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 200x.

7.4 Rastrovací elektronová mikroskopie

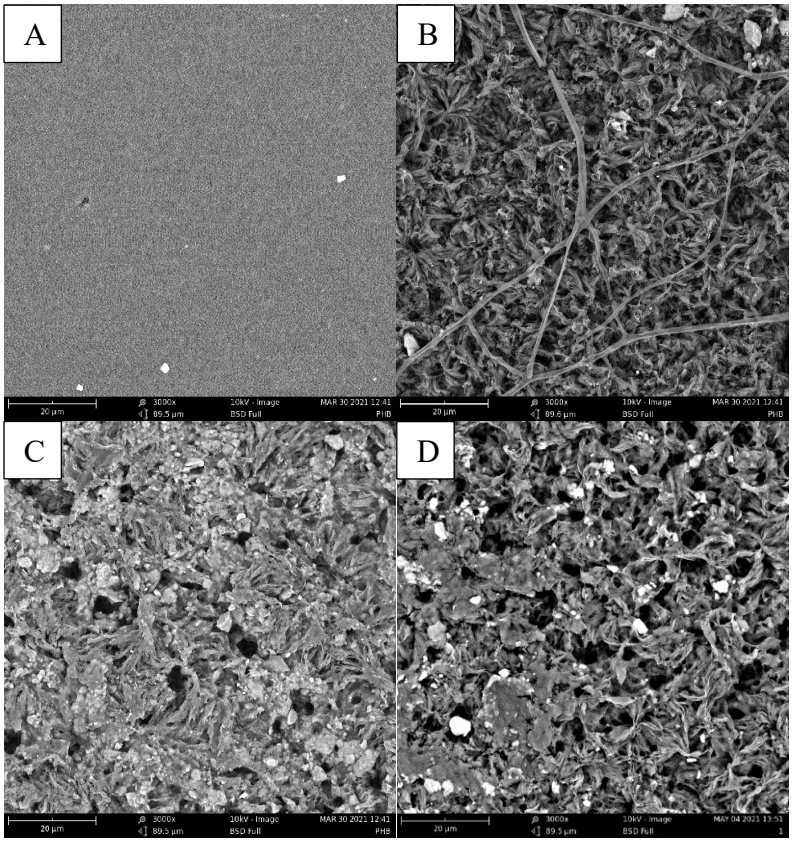
Metoda pozorování vzorků pomocí rastrovacího elektronového mikroskopu byla použita kvůli detailnímu pozorování mikroorganismů a také pro pozorování změn na povrchu fólií. Mikroskopie byla provedena pro fólie před degradací a po 14, 28 a 90 dnech degradace. Snímky z 90. dne biodegradace nebylo možné pořídit u vzorku 1 a u fólie z čistého PHB z důvodu křehkosti vzorků způsobené biodegradací. Vzorky nebylo možné odebrat. Snímky ze SEM jsou vyobrazené na obrázcích 13–17. Všechny snímky s označením A jsou vždy fólie jednotlivých vzorků před biodegradací, jejich povrch byl hladký a neporušený. Na snímcích s označením B, které byly pořízeny po 14 dnech biodegradace, byl povrch již odkrytý, vyskytovaly se na něm póry a trhliny, bylo možné vidět i sférolity.

U vzorku 1 (Obr. 13) po 14 dnech (snímek B) se kolem rozrušené struktury fólie nacházely vláknité houby, které po 28 dnech biodegradace (snímek C) již nebyly pozorovány. U vzorku 2 (Obr. 14) byly po degradaci na povrchu pozorovány póry a prohlubně, po 14

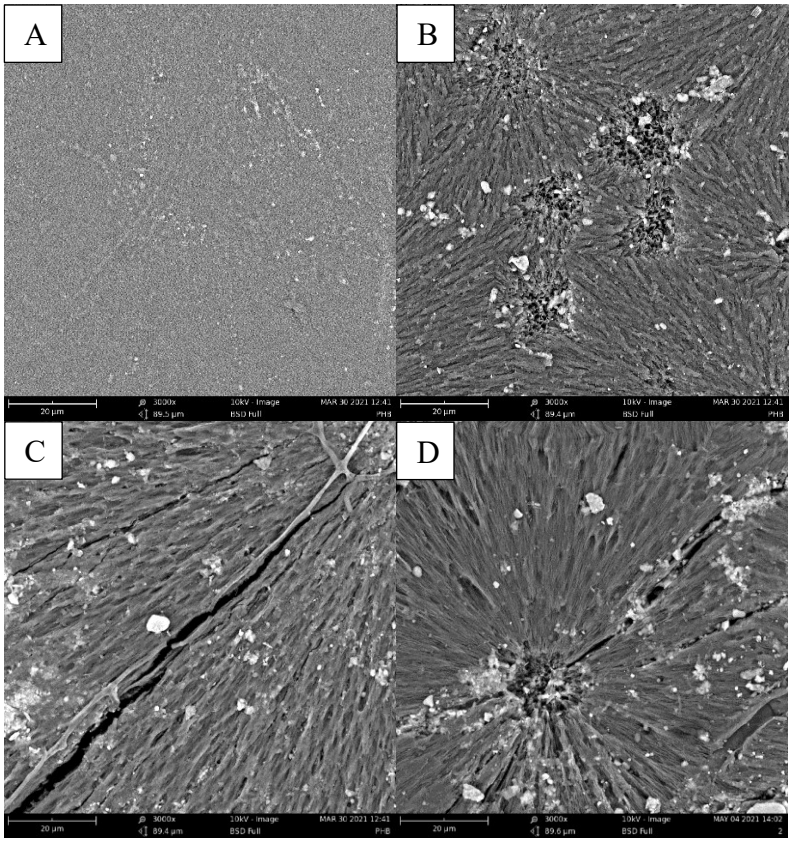
dnech biodegradace (snímek B) se zde nacházely také vláknité houby. Na následujících snímcích se mikroorganismy již nevyskytovaly. U vzorku 3 (Obr. 15) se po 28 dnech biodegradace (snímek C) nacházela rozsáhlá trhlina, kolem které se nacházelo vlákno. Nejspíš se jednalo o vláknitou houbu, kdy působením exoenzymů houby došlo k rozrušení polymerní struktury. Na ostatních snímcích vzorku 2 po biodegradaci (snímek B a D) bylo také sledováno narušení povrchu. Kolem narušení se vyskytovaly mikroorganismy, ale nacházely se zde zejména zbytky půdy. U fólie z čistého PHB (Obr. 16 a 17) byly přítomny také koky, ale zejména byla pozorována vlákna (snímek B i C), mohlo by se jednat o vláknité houby. Vidíme zde narušení povrchu v okolí vláken, jsou patrné trhliny v materiálu. Pro přesné zjištění degradujících mikroorganismů by byl nutný mikrobiologický rozbor, avšak ve studii Mergaert a kol. bylo zjištěno, že mezi mikroorganismy degradující PHB můžeme řadit například vláknité houby *Paecilomyces marquandii*, také houby z řádu *Penicillium* a nebo bakterie *Streptomyces* [28]. Mohlo by se tedy jednat o výše zmíněné mikroorganismy. Z výsledků SEM je patrné, že pro biodegradaci PHB jsou důležité především mikroskopické houby, což koreluje s literaturou [61].



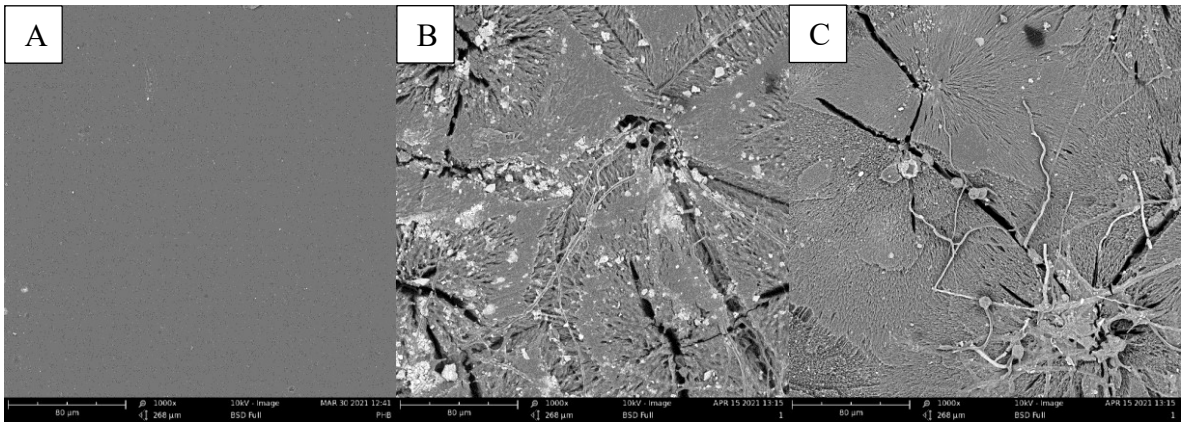
Obr. 13: SEM snímky, vzorek 1. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 3000x.



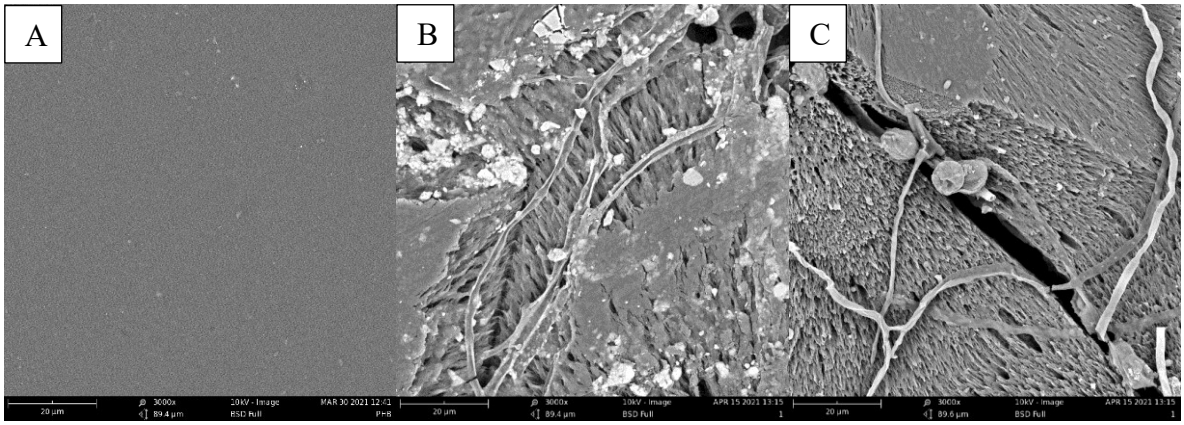
Obr. 14: SEM snímky, vzorek 2. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace (D). Zvětšeno 3000x.



Obr. 15: SEM snímky, vzorek 3. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace (D). Zvětšeno 3000x.



Obr. 16: SEM snímky, fólie čistého PHB. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 1000x.



Obr. 17: SEM snímky, fólie čistého PHB. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 3000x.

7.5 Koncentrace DNA

Ze vzorků byla izolována DNA a změřena její koncentrace (Tab. 2). Koncentrace DNA pomohla k odhadu množství biomasy ve vzorcích. Z blanku (půda bez vzorku) byl vždy odebrán 1 g půdy, z kterého byla izolace DNA prováděna. Z inkubací se vzorky byla po 14 a po 28 dnech vždy odebrána 1 fólie. Po 90 dnech již nebyl možný odběr kousku samotné fólie, proto byl odebrán z každé inkubace 1 g mixu vzorku a půdy, u kterého byla následně změřena koncentrace DNA. Koncentrace DNA v 1 g půdy před založením experimentu byla 37,4 ng/µl. Koncentrace DNA blanku byla po celou dobu inkubace téměř stejná, můžeme tedy předpokládat, že v inkubačních láhvích přetrvávaly konstantní podmínky a množství mikroorganismů nebylo ovlivněno prostředím. U samotných vzorků nedošlo k významnému zvýšení množství DNA v průběhu experimentu. Nejvyšší koncentrace bylo jednoznačně dosaženo u fólie čistého PHB, na jejímž povrchu bylo také pomocí mikroskopie pozorováno největší množství mikroorganismů. U vzorků, které obsahovaly antimikrobiální látky, byla koncentrace DNA při prvních dvou odběrech nižší, což odpovídá také snímkům z mikroskopie. Výsledky po 90 dnech byly zkresleny tím, že byla odebrána především půda, proto byla koncentrace ve všech inkubacích velmi podobná. Větší nárůst koncentrace DNA byl zaznamenán jen u inkubace, která obsahovala čisté PHB.

Tab. 2: Výsledky z měření koncentrace DNA vzorků a blanku.

	Odebráno po:		
	14 dnech	28 dnech	90 dnech
	c [ng/µl]	c [ng/µl]	c [ng/µl]
Vzorek 1	0,14	0,25	43,3
Vzorek 2	0,03	0,10	43,4
Vzorek 3	0,05	0,34	42,6
Čisté PHB	3,39	3,02	48,3
Blank	41,90	41,60	40,4

ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo otestovat vliv přidaných antimikrobiálních látek do fólií připravených z přírodního polymeru polyhydroxybutyrátu (PHB) na rychlosti biodegradace. Na experiment byly použity celkem 4 fólie, z nichž 3 obsahovaly kromě čistého PHB ještě přidanou antimikrobiální látku. Přídavek antimikrobiální látky činil 2 %.

Procento mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 v závislosti na čase bylo sledováno pomocí hmotnostního analyzátoru plynů UGA 300. Přídavek antimikrobiálních látek neměl na rychlost biodegradace výrazný vliv. Pouze antimikrobiální látka, která byla přidaná ke vzorku 2, rychlost biodegradace fólie snížila.

Pomocí fluorescenční a rastrovací elektronové mikroskopie bylo možno sledovat mikroorganismy na povrchu vzorků po 14, 28 a 90 dnech inkubace. Vzorek 1 a fólie z čistého PHB nebylo možno na konci experimentu odebrat. Na všech materiálech se vyskytovala mikrobiální filamenta či bakteriální kolonie. Hustota mikrobiálního osídlení byla největší u fólie vyrobené z čistého PHB. Z výsledků mikroskopického pozorování je možné usuzovat, že antimikrobiální látky eliminovaly množství mikroorganismů na povrchu fólií. Z výsledků dále vyplývá, že růst mikroorganismů byl zřejmě eliminován zejména na povrchu vzorku 2, u kterého byly také naměřeny nejmenší hodnoty mineralizace.

S výsledky mikroskopického pozorování a měření mineralizace koreluje také množství izolované DNA z jednotlivých vzorků a inkubací. DNA byla izolována 14. a 28. den experimentu přímo z fólií a 90. den experimentu ze směsi půdy a zbytků vzorků. Množství DNA izolované z blanku (půda bez vzorku) bylo po dobu experimentu konstantní, lze tedy usuzovat, že na výskyt mikroorganismů nepůsobilo, ať pozitivně či negativně, vnější prostředí. Koncentrace izolované DNA byla v průběhu inkubace pro vzorky podobná, nejvyšších hodnot bylo dosaženo pro čisté PHB. Na konci experimentu byly hodnoty koncentrace DNA inkubací i blanku velmi podobné, největší množství DNA bylo vyizolováno z inkubace s fólií z čistého PHB. Izolovaná DNA bude v rámci výzkumu využita k dalším analýzám (např. next generation sequencing), což umožní detailní rozbor mikrobiálního konsorcia v inkubacích.

Na základě výsledků práce lze říci, že aplikace testovaných antimikrobiálních látek nevedla vždy ke zpomalení rychlosti degradace biodegradabilních polymerů v půdě. Velký vliv na rychlost biodegradace mají pravděpodobně také abiotické faktory, například abiotická

hydrolýza. Všechny testované antimikrobiální látky ale eliminovaly růst mikroorganismů na povrchu fólií.

Závěrem je tedy možno říci, že pro účely v oblasti zemědělství pro výrobu mulčovacích fólií s delší dobou životnosti by byl nejvhodnější vzorek 2, právě díky své pomalejší degradaci.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] T. Mekonnen, P. Mussone, H. Khalil a D. Bressler. Progress in bio-based plastics and plasticizing modifications. *Journal of Materials Chemistry A,* [online]. 2013, 1, no. 43, pp. 13379-13398, [cit. 2021-14-05]. Dostupné z: doi: 10.1039/c3ta12555f.

[2] S. Thakur, J. Chaudhary, B. Sharma, A. Verma, S. Tamulevicius a V. K. Thakur. Sustainability of bioplastics: Opportunities and challenges. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry,* [online]. 2018, 13, pp 68-75, [cit. 2021-28-01]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cogsc.2018.04.013.

[3] S. M. Emadian, T. T. Onay a B. Demirel. Biodegradation of bioplastics in natural environments. *Waste Management,* [online]. 2017, 59, pp. 526-536, [cit. 2021-14-05]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.wasman.2016.10.006.

[4] A. A. Shah, F. Hasan, A. Hameed a S. Ahmed. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances,* [online]. 2008, 26, no. 3, pp. 246-265, [cit. 2021-28-01]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.

[5] T. V. Shah a D. V. Vasava. A glimpse of biodegradable polymers and their biomedical applications. *E-Polymers,* [online]. 2019, 19, no. 1, pp. 385-410, [cit. 2021-28-01]. Dostupné z: doi: 10.1515/epoly-2019-0041.

[6] F. Gironi a V. Piemonte. Bioplastics and Petroleum-based Plastics: Strengths and Weaknesses. *Energy Sources Part a-Recovery Utilization and Environmental Effects,* [online]. 2011, 33, no. 21, pp. 1949-1959, [cit. 2021-28-01]. Dostupné z: doi: 10.1080/15567030903436830.

[7] L. S. Nair a C. T. Laurencin. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science,* [online]. 2007, 32, no. 8-9, pp. 762-798, [cit. 2021-29-01]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.017.

[8] E. Rudnik. Compostable Polymer Materials: Definitions, Structures, and Methods of Preparation. *Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications,* [online]. 2013, pp. 189-211, [cit. 2021-30-01]. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-008045371-2.50004-4.

[9] K. Dietrich *et al.* Increasing PHB production with an industrially scalable hardwood hydrolysate as a carbon source. *Industrial Crops and Products,* [online]. 2020, 154, no. 112703, p. 9, [cit. 2021-29-01]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112703.

[10] T. M. de Resende a M. M. da Costa. Chapter 12 - Biopolymers of sugarcane. *Sugarcane Biorefinery, Technology and Perspectives,* [online]. F. Santos, S. C. Rabelo, M. De Matos, a P. Eichler Eds.: Academic Press, 2020, pp. 229-254, [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814236-3.00012-3.

[11] A. Santos, L. Dalla Valentina, A. Schulz a M. Duarte. From Obtaining to Degradation of PHB: Material Properties. Part I. *Ingeniería y Ciencia,* [online]. 2017, 13, pp. 269-298, [cit. 2021-25-02]. Dostupné z: doi: 10.17230/ingciencia.13.26.10.

[12] T. Hiraishi, Y. Hirahara, Y. Doi, M. Maeda a S. Taguchi. Effects of mutations in the substrate-binding domain of poly (R)-3-hydroxybutyrate (PHB) depolymerase from Ralstonia pickettii T1 on PHB degradation. *Applied and Environmental Microbiology,* [online]. 2006, 72, no. 11, pp. 7331-7338, [cit. 2021-15-02]. Dostupné z: doi: 10.1128/aem.01187-06.

[13] D. Jendrossek. Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases. *Polymer Degradation and Stability,* [online]. 1998, 59, no. 1-3, pp. 317-325, [cit. 2021-15-02]. Dostupné z: doi: 10.1016/s0141-3910(97)00190-0.

[14] L. Jeszeova *et al.* Microbial communities responsible for the degradation of poly(lactic acid)/poly(3-hydroxybutyrate) blend mulches in soil burial respirometric tests. *World Journal of Microbiology & Biotechnology,* [online]. 2018, 34, no. 101, p. 12, [cit. 2021-28-02]. Dostupné z: doi: 10.1007/s11274-018-2483-y.

[15] S. M. Satti, Z. Shah, A. Luqman, F. Hasan, M. Osman a A. A. Shah. Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by Newly Isolated Penicillium oxalicum SS2 in Soil Microcosms and Partial Characterization of Extracellular Depolymerase. *Current Microbiology*, [online]. 2020, 77, no. 8, pp. 1622-1636, [cit. 2021-05-03]. Dostupné z: doi: 10.1007/s00284-020-01968-7.

[16] P. Basnett, S. Ravi a I. Roy. Natural bacterial biodegradable medical polymers: polyhydroxyalkanoates. *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties*, [online]. X. Zhang Ed., Woodhead Publishing Series in Biomaterials. Cambridge: Woodhead Publ Ltd, 2017, 117, pp. 257-277, [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/B978-0-08-100372-5.00008-8

[17] H. Q. Lu a S. G. Kazarian. How does high-pressure CO_2 affect the morphology of PCL/PLA blends? Visualization of phase separation using in situ ATR-FTIR spectroscopic imaging. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy,* [online]. 2020, 243, no. 118760, p. 8, [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.saa.2020.118760.

[18] Polymléčná kyselina PLA, kolik toho víte a Pla příbory Set - znalosti - Dongugan Dexuan plast hardwarové produkty Co., Ltd. Příbory do vzduchu, Nádobí do vzduchu, Jednorázové plastové příbory, Jednorázové plastové nádobí, Plastové míchačky Dodavatelé Čína - velkoobchodní cena – DEXUAN, [online]. Copyright © Dongugan Dexuan Plastic Hardware Products Co., Ltd. Všechna práva vyhrazena, [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: http://cz.dxcutlery-ar.com/info/polylactic-acid-pla-how-much-do-you-know-30513428.html

[19] I. Kyrikou a D. Briassoulis. Biodegradation of agricultural plastic films: A critical review. *Journal of Polymers and the Environment,* [online]. 2007, 15, no. 2, pp. 125-150, [cit. 2020-11-19]. Dostupné z: doi: 10.1007/s10924-007-0053-8.

[20] N. Lucas, C. Bienaime, C. Belloy, M. Queneudec, F. Silvestre a J. E. Nava-Saucedo. Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques. *Chemosphere,* [online]. 2008, 73, no. 4, pp. 429-442, [cit. 2021-05-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.

[21] F. Jbilou *et al.* Biodegradation study of plasticised corn flour/poly(butylene succinate-co-butylene adipate) blends. *Polymer Testing,* [online]. 2013, 32, no. 8, pp. 1565-1575, [cit. 2021-05-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.polymertesting.2013.10.006.

[22] Y. J. Phua, W. S. Chow a Z. A. M. Ishak. The hydrolytic effect of moisture and hygrothermal aging on poly(butylene succinate)/organo-montmorillonite nanocomposites. *Polymer Degradation and Stability,* [online]. 2011, 96, no. 7, pp. 1194-1203, [cit. 2021-04-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2011.04.017.

[23] M. Dvorackova, P. Svoboda, L. Kostka a S. Pekarova. Influence of biodegradation in thermophilic anaerobic aqueous conditions on crystallization of poly(butylene succinate). *Polymer Testing,* [online]. 2015, 47, pp. 59-70, [cit. 2021-06-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.polymertesting.2015.08.006.

[24] J. D. Gu. Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *International Biodeterioration & Biodegradation,* [online]. 2003, 52, no. 2, pp. 69-91, [cit. 2021-15-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/s0964-8305(02)00177-4.

[25] T. Ahmed *et al.* Biodegradation of plastics: current scenario and future prospects for environmental safety. *Environmental Science and Pollution Research,* [online]. 2018, 25, no. 8, pp. 7287-7298, [cit. 2021-15-03]. Dostupné z: doi: 10.1007/s11356-018-1234-9.

[26] L. Husárová *et al.* Identification of important abiotic and biotic factors in the biodegradation of poly(l-lactic acid). *International Journal of Biological Macromolecules,* [online]. 2014, 71, pp. 155-162, [cit. 2021-15-03]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.04.050.

[27] T. P. Haider, C. Volker, J. Kramm, K. Landfester a F. R. Wurm. Plastics of the Future? The Impact of Biodegradable Polymers on the Environment and on Society. *Angewandte Chemie-International Edition,* [online]. 2019, 58, no. 1, pp. 50-62, [cit. 2021-16-03]. Dostupné z: doi: 10.1002/anie.201805766.

[28] J. Mergaert, A. Webb, C. Anderson, A. Wouters a J. Swings. MICROBIAL-DEGRADATION OF POLY(3-HYDROXYBUTYRATE) AND POLY(3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) IN SOILS. *Applied and Environmental Microbiology,* [online]. 1993, 59, no. 10, pp. 3233-3238. Dostupné z: doi: 10.1128/aem.59.10.3233-3238.1993.

[29] A. N. Boyandin *et al.* Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils. *International Biodeterioration & Biodegradation,* [online]. 2013, 83, pp. 77-84, [cit. 2021-16-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ibiod.2013.04.014.

[30] D. Kalemba a A. Kunicka. Antibacterial and Antifugal properties of essential oils. *Curr Med Chem,* [online]. 2003, 10, no. 10, pp. 813-29, [cit. 2021-17-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cogsc.2018.04.013.

[31] I. Hochel a K. Demnerová. Antimikrobiální látky. [cit. 2021-17-03]. Dostupné z: http://old-biomikro.vscht.cz/vyuka/fm/L9_Antimikrobialni_latky.pdf

[32] M. M. Cowan. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews,* [online]. 1999, 12, no. 4, pp. 564, [cit. 2021-15-03]. Dostupně z: doi: 10.1128/cmr.12.4.564.

[33] R. M. Abdelhameed, E. Alzahrani, A. A. Shaltout a H. E. Emam. Temperature-controlled-release of essential oil via reusable mesoporous composite of microcrystalline cellulose and zeolitic imidazole frameworks. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry,* [online]. 2021, 94, pp. 134-144, [cit. 2021-15-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jiec.2020.10.025.

[34] P. Figueiredo, K. Lintinen, J. T. Hirvonen, M. A. Kostiainen a H. A. Santos. Properties and chemical modifications of lignin: Towards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science,* [online]. 2018, 93, pp. 233-269, [cit. 2021-19-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.pmatsci.2017.12.001.

[35] T. V. Lourencon *et al.* Antioxidant, antibacterial and antitumoural activities of kraft lignin from hardwood fractionated by acid precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules,* [online]. 2021, 166, pp. 1535-1542, [cit. 2021-16-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.11.033.

[36] M. Z. Li a C. D. Zhang. Are silver nanoparticles better than triclosan as a daily antimicrobial? Answers from the perspectives of gut microbiome disruption and pathogenicity. *Science of the Total Environment,* [online]. 2021, 756, no. 143983, p. 14, [cit. 2021-23-03]. Dostupné z: 143983, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.143983.

[37] J. K. Shim *et al.* Antimicrobial agent triclosan suppresses mast cell signaling via phospholipase D inhibition. *Journal of Applied Toxicology,* [online]. 2019, 39, no. 12, pp. 1672-1690, [cit. 2021-23-03]. Dostupné z: doi: 10.1002/jat.3884.

[38] A. Bialk-Bielinska *et al.* Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. *Chemosphere,* [online]. 2011, 85, no. 6, pp. 928-933, [cit. 2021-29-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.06.058.

[39] A. Cuesta *et al.* Influence of adding terminal tags on the structural and antimicrobial properties of the peptide caerin 1.1. *Aquaculture,* [online]. 2021, 532, no. 736035, p. 10, [cit. 2021-30-03]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.aquaculture.2020.736035.

[40] R. Večeřová. Koloidní stříbro a jeho biologická aktivita. Ústav mikrobiologie LF UP, Olomouc, [online]. 2016, [cit. 2021-30-05]. Dostupné z: https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2016/03/04.pdf

[41] L. Kvítek. Studium přípravy a aplikačních možností nanočástic stříbra. Habilitační práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, [online]. 2008, [cit. 2021-30-03]. Dostupné z: http://www.zdravestribro.cz/admin/data/img/uploads/HP_Kvitek.pdf

[42] L. Kvítek, R. Prucek, A. Panáček a J. Soukupová. Nanočástice stříbra - příprava, vlastnosti a aplikace. Nanocon, Rožnov pod Radhoštěm, [online]. 2009, [cit. 2021-30-03]. Dostupné z: http://www.nanocon.eu/files/proceedings/nanocon_09/Lists/Papers/008.pdf

[43] U. F. Gunputh, H. R. Le, A. Besinis, C. Tredwin a R. D. Handy. Multilayered composite coatings of titanium dioxide nanotubes decorated with zinc oxide and hydroxyapatite nanoparticles: controlled release of Zn and antimicrobial properties against Staphylococcus aureus. *International Journal of Nanomedicine,* [online]. 2019, 14, pp. 3583-3600, [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: doi: 10.2147/ijn.s199219.

[44] H. X. Wu *et al.* Highly Efficient Antibacterial Surface Grafted with a Triclosan-Decorated Poly(N-Hydroxyethylacrylamide) Brush. *Acs Applied Materials & Interfaces,* [online]. 2015, 7, no. 12, pp. 7008-7015, [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: doi: 10.1021/acsami.5b01210.

[45] M. Chylinska, H. Kaczmarek, A. Burkowska-But a M. Walczak. Novel biocidal N-halamine plastic based on poly(vinyl chloride): Preparation and characteristics. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry,* [online]. 2015, 28, pp. 124-130, [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.jiec.2015.02.007.

[46] F. Bilek *et al.* Preparation of active antibacterial LDPE surface through multistep physicochemical approach II: Graft type effect on antibacterial properties. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,* [online]. 2013, 102, pp. 842-848, [cit. 2021-05-04]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.colsurfb.2012.08.026.

[47] Y. Zhong, P. Godwin, Y. Jin a H. Xiao. Biodegradable polymers and green-based antimicrobial packaging materials: A mini-review. *Advanced Industrial and Engineering Polymer Research,* [online]. 2020, 3, no. 1, pp. 27-35, [cit. 2021-15-03]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.aiepr.2019.11.002.

[48] M. A. Del Nobile, A. Conte, G. G. Buonocore, A. L. Incoronato, A. Massaro a O. Panza. Active packaging by extrusion processing of recyclable and biodegradable polymers. *Journal of Food Engineering,* [online]. 2009, 93, no. 1, pp. 1-6, [cit. 2021-04-04]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.12.022.

[49] G. K. P. de Araujo *et al.* Physical, antimicrobial and antioxidant properties of starch-based film containing ethanolic propolis extract. *International Journal of Food Science and Technology,* [online]. 2015, 50, no. 9, pp. 2028-2080, [cit. 2021-05-04]. Dostupné z: doi: 10.1111/ijfs.12869.

[50] C. R. Rech *et al.* Biodegradation of eugenol-loaded polyhydroxybutyrate films in different soil types. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering,* [online]. 2020, 2, p. 100014, [cit. 2021-06-04]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.cscee.2020.100014.

[51] S. Thanner, D. Drissner a F. Walsh. Antimicrobial Resistance in Agriculture. *Mbio,* [online]. 2016, 7, no. 2, p. 7, [cit. 2021-06-04]. Dostupné z: doi: 10.1128/mBio.02227-15.

[52] S. Bandopadhyay, L. Martin-Closas, A. M. Pelacho a J. M. DeBruyn. Biodegradable Plastic Mulch Films: Impacts on Soil Microbial Communities and Ecosystem Functions. *Frontiers in Microbiology,* [online]. 2018, 9, no. 819, p. 7, [cit. 2021-07-04]. Dostupné z: doi: 10.3389/fmicb.2018.00819.

[53] F. A. Mustapha, J. Jai, N. H. Nik Raikhan, Z. I. M. Sharif a N. M. Yusof. Response surface methodology analysis towards biodegradability and antimicrobial activity of biopolymer film containing turmeric oil against Aspergillus niger. *Food Control,* [online]. 2019, 99, pp. 106-113, [cit. 2021-07-04]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.12.042.

[54] K. Moraczewski *et al.* Composting of Polylactide Containing Natural Anti-Aging Compounds of Plant Origin. *Polymers,* [online]. 2019, 11, no. 10, p. 19, [cit. 2021-16-05]. Dostupné z: doi: 10.3390/polym11101582.

[55] M. Latos-Brozio a A. Masek. The Effect of Natural Additives on the Composting Properties of Aliphatic Polyesters. *Polymers,* [online]. 2020, 12, no. 9, p. 15, [cit. 2021-16-05]. Dostupné z: doi: 10.3390/polym12091856.

[56] S. Khanna a A. K. Srivastava. Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry,* [online]. 2005, 40, no. 2, pp. 607-619, [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: doi: https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.01.053.

[57] J. B. Emerson *et al.* Schrödinger's microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. *Microbiome,* [online]. 2017, 5, no. 1, p. 86, [cit. 2021-01-05]. Dostupné z: doi: 10.1186/s40168-017-0285-3.

[58] S. Ghosh, R. Chowdhury a P. Bhattacharya. Mixed consortia in bioprocesses: role of microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology,* [online]. 2016, 100, no. 10, pp. 4283-4295, [cit. 2021-10-05]. Dostupné z: doi: 10.1007/s00253-016-7448-1.

[59] S. J. Schink, E. Biselli, C. Ammar a U. Gerland. Death Rate of E. coli during Starvation Is Set by Maintenance Cost and Biomass Recycling. *Cell Systems,* [online]. 2019, 9, no. 1, p. 64, [cit. 2021-15-05]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.cels.2019.06.003.

[60] J. E. Kemnitzer, S. P. McCarthy a R. A. Gross. POLY(BETA-HYDROXYBUTYRATE) STEREOISOMERS - A MODEL STUDY OF THE EFFECTS OF STEREOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL VARIABLES ON POLYMER BIOLOGICAL DEGRADABILITY. *Macromolecules,* [online]. 1992, 25, no. 22, pp. 5927-5934, [cit. 2021-10-05]. Dostupné z: doi: 10.1021/ma00048a011.

[61] J. Sera, L. Serbruyns, B. De Wilde a M. Koutny. Accelerated biodegradation testing of slowly degradable polyesters in soil. *Polymer Degradation and Stability,* [online]. 2020, 171, no. 109031, p. 10, [cit. 2021-15-05]. Dostupné z: doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2019.109031.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

CO_2	Oxid uhličitý
D_c	Procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
PBAT	Polybutylen adipát tereftalát
PHA	Polyhydroxyalkanoáty
PHB	Polyhydroxybutyrát
PHBV	Kopolymer polyhydroxybutyrátu a hydroxyvalerátu
PHV	Polyhydroxyvalerát
SEM	Rastrovací elektronový mikroskop
UV	Ultrafialové záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Vzorec PHB [10]. 13

Obr. 2: Bacillus megaterium [11]. 13

Obr. 3: Životní cyklus PHB [16]. 14

Obr. 4: Vzorec PLA [18]. 15

Obr. 5: Schéma biodegradace polymerů [25]. 19

Obr. 6: Monomery ligninu [34]. 24

Obr. 7: Biodegradace fólií PHB s obsahem antimikrobiálních látek. Fólie PHB v zemědělské, písčité a skládkové půdě (a, b, c); fólie PHB připravené s 20 % eugenolu a zakopané v zemědělské, písčité a skládkové půdě (d, e, f); fólie PHB připravené s 40 % eugenolu a zakopané v zemědělské, písčité a skládkové půdě (g, h, i) [50]. 28

Obr. 8: Graf závislosti mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO_2 na počtu dní. 43

Obr. 9: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 1. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 200x. 44

Obr. 10: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 2. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace (C). Zvětšeno 200x. 44

Obr. 11: Fluorescenční mikroskopie, vzorek 3. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B). Zvětšeno 200x. Fólie po 90 dnech biodegradace (C). Zvětšeno 500x. 45

Obr. 12: Fluorescenční mikroskopie, fólie čistého PHB. Fólie po 14 dnech biodegradace (A), po 28 dnech biodegradace (B), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 200x. 45

Obr. 13: SEM snímky, vzorek 1. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 3000x. 46

Obr. 14: SEM snímky, vzorek 2. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace (D). Zvětšeno 3000x. 47

Obr. 15: SEM snímky, vzorek 3. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace (D). Zvětšeno 3000x. 48

Obr. 16: SEM snímky, fólie čistého PHB. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 1000x. 48

Obr. 17: SEM snímky, fólie čistého PHB. Fólie před biodegradací (A), po 14 dnech biodegradace (B), po 28 dnech biodegradace (C), po 90 dnech biodegradace nebylo již možno fólii odebrat, jelikož byla zcela rozložená. Zvětšeno 3000x. 49

SEZNAM TABULEK

Tab. 1: Výsledné hodnoty mineralizace (D_c) pro jednotlivé vzorky. 42
Tab. 2: Výsledky z měření koncentrace DNA vzorků a blanku. 50