

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Ústav pro životní prostředí

Studijní program: Ekologie a ochrana prostředí

Studijní obor: Ochrana životního prostředí



Bc. Pavel Hušek

Biodegradace nových typů lehčených polyuretanů v různých environmentálně relevantních mikrokosmech

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

Diplomová práce

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

Praha, 2020

Prohlášení:

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

V Praze dne

Podpis

Poděkování

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

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Seznam zkratk	8
1. Úvod.....	9
2. Teoretická část.....	10
2.1. Polyuretany.....	10
2.1.1. Biodegradace polyuretanů.....	12
2.2. Metody určování biodegradability plastů v půdě.....	16
2.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin.....	16
2.4. Vlastnosti půd z pohledu biodegradace polyuretanů.....	18
3. Cíle a hypotézy.....	20
4. Metodika.....	21
4.1. Použité chemikálie a laboratorní technika.....	21
4.1.1. Chemikálie a materiály.....	21
4.1.2. Laboratorní technika.....	21
4.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě.....	21
4.2.1. Charakteristika testovaného materiálu.....	22
4.2.2. Analýza použitých půd.....	22
4.2.3. Stanovení biodegradace.....	22
4.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin.....	23
4.3.1. Extrakce lipidů.....	24
4.3.2. Frakcionace lipidů.....	24
4.3.3. Mírná alkalická methanolýza (transesterifikace).....	24
4.3.4. Vyhodnocení mastných kyselin.....	25
5. Výsledky.....	26
5.1. Statistické zpracování dat.....	26
5.1.1. Biodegradační experiment.....	26
5.1.2. Analýza mastných kyselin.....	26
5.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě.....	26
5.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin.....	30
6. Diskuze.....	35
7. Závěr.....	37
8. Zdroje.....	38
9. Přílohy.....	43

Abstrakt

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

Testovaný materiál PUR BIO-10 byl podroben testu biodegradovatelnosti dle standardizované metody ASTM D5988-03 v laboratorních mikrokosmech. Biodegradovatelnost byla testována ve dvou opakováních a dvou odlišných půdních prostředích – lesním a polním, která byla vybrána s ohledem na předpokládané budoucí využití materiálu jakožto pachového ohradníku. Dle metodiky byla biodegradovatelnost měřena jako mineralizace materiálu záchytem oxidu uhličitého. V případě prvního experimentu byla naměřena mineralizace materiálu v lesní půdě $10,65 \pm 2,54 \%$ a $20,48 \pm 9,18 \%$ v půdě polní; při opakování byla naměřena v lesní půdě míra rozložení materiálu $3,88 \pm 3,42 \%$ a v půdě polní $8,96 \pm 1,79 \%$. V tomto opakování je rozdíl rozložitelnosti mezi půdami statisticky signifikantní.

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

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

Abstract

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

The examined material, PUR BIO-10, was tested for biodegradability in laboratory microcosms according to standardized method ASTM D5988-03. Biodegradability was tested in two separate soil types – forest soil and agricultural soil, which have been selected with the future use of the material in mind. According to the method biodegradability was measured as mineralization of the material by capturing evolved carbon dioxide. During the first trial the mineralization of polyurethane foam was 10.65 ± 2.54 % in the forest soil and 20.48 ± 9.18 % in the agricultural soil. During the second trial the mineralization was 3.88 ± 3.42 % in the forest soil and 8.96 ± 1.79 % in the agricultural soil. In the second trial the difference between the soils was statistically significant.

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

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

Seznam zkratek

ANOVA – Analýza variance

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Úvod

O plastech se hovoří od počátku 20. stol, kdy v roce 1907 Leo Baekeland vytvořil bakelit a ten se stal prvním masově vyráběným plastem a odstartoval tak éru plastů, ve které nyní žijeme (ACS.org, 1993). Plasty jsou v posledních desetiletích materiálem, který se stal díky svým vlastnostem a téměř nekonečné modifikovatelnosti nenahraditelným pro každodenní život nás všech a de facto pro každý průmysl. Nicméně s tímto obrovským nástupem jejich užívání se plasty staly i nejpálčivějším problémem odpadového hospodářství – díky jejich nerozložitelnosti a obecně velké odolnosti na vlivy okolního prostředí. Každoročně se produkce plastů zvyšuje a v roce 2018 celosvětová produkce plastů dosáhla 360 milionů tun. Evropská poptávka po plastech se také meziročně zvyšuje a v roce 2018 dosáhla 51 tun (PlasticsEurope, 2019). S plasty a plastovým odpadem je spojeno mnoho kontroverzí. Nejznámější je zcela jistě znečištění oceánů, ale plasty nekončí pouze v oceánech a v našich podmínkách jsou jejich nejčastějším odbytištěm skládky (ČSÚ, 2019) a půdní prostředí obecně.

Polyuretany jsou relativně populárním materiálem a v evropské poptávce jsou na 5. místě s 7,9 % ze všech poptávaných plastů (PlasticsEurope, 2019). Jednou z možností jejich využití výroba pěnových pachových ohradníků pro použití v zemědělské krajině, které pokud by se zajistila biodegradovatelnost materiálu, by se po skončení jejich životnosti mohly ponechat v půdním prostředí přirozenému rozkladu. Jedná se o jedno z vhodných využití biodegradovatelných plastů, které díky svým vlastnostem nemohou vstupovat do konvenčního toku nakládání s odpady a recyklace a jsou vhodné právě pro specifické aplikace např. v zemědělství (polyethylenové mulčovací fólie) nebo medicíně (kapsule na léky) (Brodhagen et al., 2014, Shen et al., 2020).

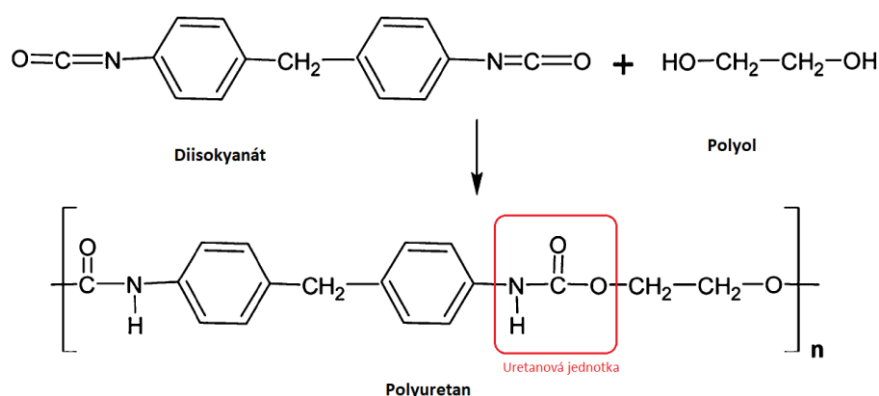
V půdním prostředí je složení a stav mikrobiální komunity klíčovým ukazatelem a introdukce plastů, potencionálních mikroplastů nebo látek, které mohou vznikat při rozkladu biodegradovatelných plastů, by mohla toto složení ovlivnit a mít tak negativní dopad na půdní vlastnosti a funkce (Zhang, et al., 2020). Pro zjištění složení a charakterizaci půdního mikrobiálního společenstva se může použít metoda PLFA, kterou lze stanovit zastoupení jednotlivých skupin mikroorganismů v půdě bez nutnosti jejich kultivace (Frostegård, et al., 2011). Byly pozorovány kmeny půdních bakterií a hub, které používaly polyuretan jako svůj jediný zdroj uhlíku (Barratt et al., 2003, Shah et al., 2008a) a existuje tedy předpoklad, že půdní mikroorganismy se biodegradace polyuretanového pachového ohradníku budou účastnit.

2. Teoretická část

2.1. Polyuretany

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

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



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

U isokyanátů se v současné době při výrobě polyuretanů využívají hlavně diisokyanáty s aromatickým jádrem, které jsou značně levnější surovinou než ostatní formy isokyanátů, ale s rizikem toho, že výsledný materiál může časem zažloutnout (Rahman et al., 2019). Při výrobě isokyanátů je používán prudce jedovatý plyn fosgen a samotné isokyanáty jsou pak taktéž velmi toxické. Z těchto a dalších důvodů je v posledních letech snaha o výrobu environmentálně šetrnějších polyuretanů, tzv. NIPU (non isocyanate polyurethane) – tedy ne-isokyanátových polyuretanů např. nahrazením isokyanátů ve výrobě polycyklickými uhličitany (Blattmann et al., 2014).

Polyoly lze pak rozdělit na dvě hlavní skupiny, jejichž použití má vliv mimo jiné i na biodegradaci vlastnosti polyuretanu – i) polyestery a ii) polyethery. Polyetherové polyuretany jsou zpravidla hůře biodegradovatelné (Darby a Kaplan, 1968). Další častou uvažovanou proměnnou při použití polyolů je jejich molekulární hmotnost – lehčí polyoly se používají pro syntézu tvrdších, tužších polyuretanů, zatímco těžší polyoly pro syntézu poddajnějších a pružnějších materiálů (Akindoyo et al., 2016). I v případě polyolů existují snahy o environmentálně šetrnou výrobu a existuje řada

studií, kde vědci připravují různé druhy polyolů z různých přírodních olejů – např. ze sojového oleje (Özşeker et al., 2019), slunečnicového oleje (Kahlerras et al., 2020) nebo palmového oleje (Marcovich et al., 2017). Tento trend se snažila objektivně zhodnotit nová LCA studie zaměřená právě na tyto druhy polyolů – konkrétně na polyoly z řepkového oleje. Ve studii vyšly řepkové polyoly, ve srovnání s petrochemicky připravenými polyoly, značně lépe co se týče GWP dopadů výroby jako takové, nicméně po započtení všech externalit výroby řepkových polyolů – např. degradace půdy, ekotoxicita pro půdní a vodní prostředí, acidifikace a dalších se řepkové polyoly tak jednoznačně jako lepší řešení nejeví (Fridrihsone et al., 2020).

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

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

Nejčastěji užívané isokyanáty a polyoly jsou uvedeny v tabulce č. 1. Záměna těchto vstupních surovin má značný dopad jednak na vlastnosti výsledného materiálu a jednak na jeho biodegradovatelnost (Howard, 2011).

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

Díky této vysoké flexibilitě při výrobě materiálu jsou polyuretany vysoce vyhledávanou surovinou napříč průmyslovými odvětvími – např. jako pěnové materiály do sedaček automobilů, jako přídavek do postřiků a impregnací, jako vlákna pro výrobu oblečení, jako balící fólie, jako široké spektrum izolačních pěn, jako antikoroziční nátěry a postřiky pro lodě a celé spektrum dalších užití, ze kterého je patrné o jak multifukční plast se jedná (Akindoyo, et al., 2016). Zajímavou aplikací je použití v medicíně, kde díky dobré biokompatibilitě s lidskou tkání jsou polyuretany používány např. jako aditivum do zubních výplní nebo při léčbě zlomenin (Alves et al., 2014).

2.1.1. Biodegradace polyuretanů

Biodegradace polyuretanů je komplexní proces, na jehož konci stojí zcela mineralizovaný plastový materiál, který byl rozložen až na jednotlivé anorganické produkty rozkladu – vodu a oxid uhličitý, případně i methan, pokud došlo k rozkladu v anaerobním prostředí (Gu, 2007). Spolu s procesy biodegradace probíhají i procesy degradace fyzikálně-chemické, které mají taktéž důležitou roli hlavně během prvních stádií degradace, kdy napomáhají rozpadu polymeru na menší jednotky tzv. oligomery nebo jinak narušují stavbu polymeru a činí jej tak více náchylným k působení biodegradace. Mezi tyto procesy patří hlavně fotodegradace UV složkami slunečního záření, mechanická degradace, termální degradace a oxidativní degradace (Singh a Sharma, 2008). Další neméně důležitou složkou jsou faktory prostředí, ve kterém biodegradace probíhá s ohledem na složení a fitness mikrobiálního společenstva, které vyžaduje ke správnému fungování konkrétní podmínky. Jedná se zejména o parametry jako je vlhkost prostředí, teplota, přítomnost nebo naopak nepřítomnost kyslíku, pH nebo dostatek živin (Artham a Doble, 2008). Přítomnost kyslíku pro biodegradaci polyuretanových pěn se pak zdá být klíčová, např. tým Urgun-Demirtas et al., 2007 při biodegradčních pokusech v anaerobním prostředí nezaznamenal žádnou biodegradční aktivitu.

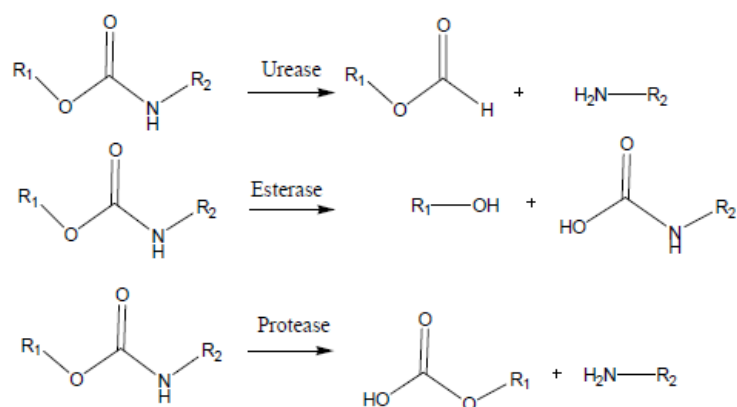
Samotná biodegradace je proces enzymaticky katalyzované depolymerizace, při které dochází k redukci polymerů na jednotlivé mono- nebo dimery, příp. jiné dostatečně malé části, které mohou projít membránou mikroorganismů a být dále rozloženy intracelulárními enzymy a použity jako zdroj uhlíku (Shah et al., 2008b). Samotný materiál je pak různě odolný k biodegradaci na základě svých fyzikálně-chemických vlastností. Jednou z důležitých vlastností je krystalinita polymeru, kterou v případě polyuretanu ovlivňuje typ a množství použitých polyolů a isokyanátů. Isokyanáty, především ty s aromatickým jádrem, tvoří ve výsledném polymeru oblasti s vyšší

krystalinitou, tzv. tuhé segmenty, které mají negativní vliv na biodegradabilitu materiálu (Mahajan a Gupta, 2015). Existuje pak celá řada fyzikálně-chemických faktorů, které ovlivňují biodegradabilitu, mezi hlavní patří; i) molekulární hmotnost a velikost molekul obecně, kdy těžší a větší polymery degradují hůře; ii) chemická struktura polymeru, tj. množství a typ funkčních skupin a vazeb; iii) aditiva, které se do polymerů mohou přidávat a jejichž efektem je větší odolnost vůči biodegradaci (Singh a Sharma, 2008).

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

Dva hlavní mechanismy pro biodegradaci polyuretanů jsou i) biologická oxidace a ii) biologická hydrolýza. Oxidační mechanismus je spojován spíše s degradací polyetherových PUR konkrétně jejich měkkých segmentů. Tento mechanismus popsali například Christenson et al. 2004, kteří provedli *in vivo* studii na krysách a přisuzují počátek biodegradace reaktivním formám kyslíku (ROS). Tento mechanismus u polyesterových PUR nebyl příliš zkoumán, protože se u nich ve velké míře aplikuje mechanismus hydrolytického štěpení (Nakajima-Kambe et al., 1999). Proces hydrolytického štěpení by se dal shrnout do třech kroků i) rozštěpení esterových a amidových vazeb v řetězci polymeru, ii) snížení molekulární hmotnosti a viskozity a iii) štěpení jednotlivých polymerních řetězců (Mahajan a Gupta, 2015).

Loredo-Treviño v roce 2012 ve své studii zmiňuje, že velkou část štěpení manifestují enzymy, konkrétně depolymerázy. Ty se dají rozdělit na dva hlavní druhy: extracelulární a intracelulární – první zmíněný se účastní rozkladu polymeru vně mikroorganismu a druhý pak uvnitř mikroorganismu. Po zapojení enzymu do štěpení proběhnou typicky dva kroky – nejprve se enzym naváže na polymer a ve druhém kroku katalyzuje hydrolytické štěpení. Podmínkou pro úspěšné štěpení je přítomnost nějaké hydrolázy, ta v případě biodegradace polyuretanů může být ve formě proteázy, esterázy nebo ureázy. Ve své studii pak představili tři předpokládaná místa, kde probíhá štěpení polyuretanů v závislosti na typu mikroorganismem použitého enzymu (viz obrázek č. 2).



Obrázek č. 2 – Navrhovaná místa štěpení polyuretanů v závislosti na typu enzymu (upraveno dle Loreda-Treviño, 2012)

Studii, které se zabývají biodegradací polyuretanů, je velká řada. Nicméně, vzájemné porovnání studií je velmi složité, jelikož se testované polyuretany často liší vstupními surovinami pro jejich výrobu a nelze tak zajistit jejich srovnatelnost (Shah et al., 2008b). Vědecké práce by se daly rozdělit na dvě hlavní skupiny a to práce, které zkoumají biodegradaci za přítomnosti bakterií a práce, ve kterých figurují houby. Velkou osobností na poli biodegradace polyuretanů je Gary Howard a jeho tým, který se zabývá bakteriální biodegradací polyuretanů již od 90. let. V roce 2012 izoloval z půdy gramnegativní bakterii *Acinetobacter gernerii*, u které zaznamenal růst na čistém polyuretanu jako jediném zdroji uhlíku. Dále u ní pozoroval enzym, který se funkčně podobal enzymu „Polyuretanázy“ tj. extracelulárnímu enzymu podobnému esteráze, kterou již dříve identifikoval u bakterií rodu *Pseudomonas* a díky kterému tyto kmeny bez problému PURy degradují. Aktivitu extracelulárních esteráz pak označuje jako klíčovou pro růst mikroorganismů na polyuretanech (Howard et al., 1999 & 2012). Tým pákistánských vědců identifikoval a izoloval z půdy již několik bakteriálních kmenů, které se prokázaly jako schopné biodegradovat polyuretany. V roce 2013 identifikovali v půdě v oblasti dvou různých skládek odpadů dva odlišné kmeny bakterií - *Bacillus subtilis* a *Pseudomonas aeruginosa* (MZA-85). Podobně jako Howard et al. (1999 a 2012) pozorovali zvýšenou aktivitu esteráz. Během pokusu identifikovali i několik produktů rozpadů polyuretanu např. 1,4-butandiol nebo kyselinu adipovou, u kterých pozorovali jejich užití jako zdroje uhlíku pro další mineralizaci polyuretanu (Shah et al., 2013a & 2013b).

Biodegradace za přítomnosti hub je pravděpodobně známějším případem, jelikož jedna z prvních velkých studií na biodegradaci polyuretanů vůbec se právě zabývala jejich náchylností k degradaci houbami. V roce 1968 Darby a Kaplan připravili 100 různých polyuretanů a vystavili je působení šesti různých kmenů hub. Tato studie popisuje jako jedna z prvních dnes již známá fakta – např. že polyetherové polyuretany jsou hůře biodegradovatelné než polyesterové nebo že polyuretany s menší molekulární hmotností jsou lépe degradovatelné (Darby a Kaplan, 1968). Co se týče půdních hub, dnes je již známa řada organismů, které jsou schopné biodegradovat polyuretany. Cosgrove a jeho kolegové v roce 2007 provedli *in situ* studii v zahradní půdě a do půdy

umístili polyuretanové destičky. Po 5 měsících provedli analýzu mikrobiálního společenstva z destiček. Nejčastěji se na destičkách vyskytovaly kmeny *Alternaria*, *Geomyces* a *Nectria sp.* a destičky ztratily až 95 % síly v tahu, což je jeden z uváděných parametrů pro proběhnuvší biodegradaci materiálu (Cosgrove et al., 2007). Zafar et al. zkoumali náchylnost polyuretanů k biodegradaci za různých teplot v prostředí kompostu. Destičky 4x4 cm umístili do různých částí kompostu na 12 týdnů při teplotách 25°C, 45°C a 50°C. Po 12 týdnech ve vyšších teplotách byly patrné povrchové praskliny a u všech teplot došlo u destiček ke značné ztrátě síly v tahu. Při teplotě 25°C identifikovali jako nejčastějšího zástupce *Geomyces pannorum* u vyšších teplot pak dominovala *Scytalidium thermophilum* (Zafar et al., 2013). Výběr několika studií, které identifikovaly bakteriální nebo houbové kmeny pak znázorňuje tabulka č. 2. Podstatně méně studií se zabývá degradací polyetherových polyuretanů díky jejich všeobecně dobře známé odolnosti vůči biodegradaci. V roce 2010 např. Matsumiya et al., 2010 identifikovala houbu *Alternaria sp.*, která degradovala polyetherový polyuretan a na základě vzniklých produktů štěpení se domnívá, že k degradaci dochází za pomoci enzymu ureázy.

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

Bakterie		
Organismus	Typ PUR	Studie
<i>Acinetobacter gernerii</i> P7	Polyester PUR	Howard et al., 2012
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Polyester PUR	El-Sayed et al., 1996
<i>Arthrobacter globiformis</i>		
<i>Bacillus subtilis</i>	Polyester PUR	Shah, Z. et al., 2013b
<i>Corynebacterium sp.</i>	Polyester PUR	Shah, A. A. et al., 2008a
<i>P. Aeruginosa strain MZA-85</i>	Polyester PUR	Shah, Z. et al., 2013a
<i>Pseudomonas putida</i>	Polyester PUR	Peng et al., 2014
<i>Rhodococcus equi</i>	Polyester PUR	Akutsu-Shigeno et al., 2006
Houby		
<i>Alternaria sp. strain 18-2</i>	Polyester PUR	Cosgrove et al., 2007
<i>Alternaria solani</i>	Polyester PUR	Ibrahim et al., 2009
<i>Aspergillus sp. S45</i>	Polyester PUR	Osman et al., 2017
<i>Aspergillus flavus</i>	Polyester PUR	Mathur a Prasad, 2012
<i>Aspergillus tubingensis</i>	Polyester PUR	Khan, S. et al., 2017
<i>Exhophiala jeanselmei</i> REN-11A	Polyester PUR	Owen et al., 1995
<i>Fusarium oxysporum</i>	Polyester PUR	Zafar et al., 2013
<i>Geomyces pannorum</i>	Polyester PUR	Barratt et al., 2003
<i>Nectria sp. strain BC-11</i>	Polyester PUR	Cosgrove et al., 2007
<i>Volutela ciliata</i>	Polyester PUR	Zafar et al., 2013
<i>Scytalidium thermophilum</i>		

2.2. Metody určování biodegradability plastů v půdě

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

- i) ISO 14855 - *Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials under controlled composting conditions*. Jedná se o test, který se snaží kvantifikovat biodegradabilitu plastů v areobním prostředí kompostu. Rozklad plastu soudí pomocí zachytávání vyvíjeného CO₂ a stupně rozložení materiálu po konci testu.
- ii) EN 17033 - *Biodegradable mulch films for use in agriculture and horticulture*. Jedná se o metodiku, která posuzuje biodegradabilitu mulčovacích fólií z plastových materiálů, které jsou určeny po skončení jejich životnosti k ponechání na poli / v půdě. Aby materiál vyhověl metodě, musí proběhnout >90 % rozklad testovaného materiálu do dvou let.
- iii) ASTM D5988-03 - *Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation in Soil of Plastic Materials or Residual Plastic Materials After Composting*. Jedná se o metodu, u které je deklarováno, že je shodná s metodou ISO 17556, nicméně podle metodiky ISO nelze materiál proklamat za biodegradovatelný – slouží pouze k posouzení materiálu nikoliv k proklamaci biodegradability. Ve standardu ASTM lze v případě dosažení 70% teoretické biodegradability po 6 měsících materiál proklamat za biodegradovatelný. Jinak se metody liší už jen v detailech.

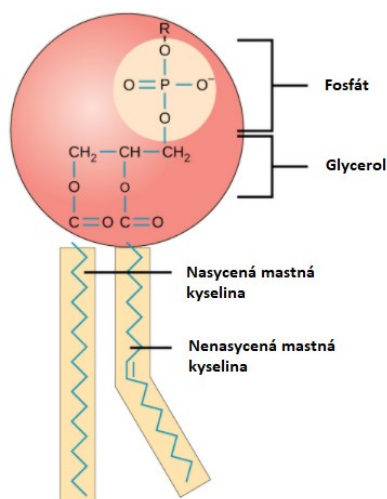
Poslední zmíněný standard byl na základě literární rešerše a již dříve realizovaného pokusu (Tošovská, 2016) zvolen jako vhodná metoda pro použití v této práci. Metoda není omezena typem ani předpokládaným užitím plastu (tak jako metoda EN 17033) a je vhodná i pro laboratorní podmínky mikrokosmu. Oproti metodice ISO 14855 ji lze použít i pro půdu, a nikoliv pouze pro kompost nebo půdu s inokulem z kompostu. Jelikož je u materiálu PUR BIO10 předpokládaným využitím pachový ohradník v zemědělské krajině, jeví se metoda ASTM 5988-03 jako vhodná varianta. Tuto metodu zvolil i Goméz et al., 2014 pro posouzení biodegradability polyesterové PUR pěny ve třech různých prostředích – půdním, kompostu a v anaerobním prostředí. Pro test v půdě zvolil mix polní půdy, písku a pěstitelského substrátu. Po skončení testu pozoroval u polyuretanu připraveného z přírodních polyolů biodegradaci $11,2 \pm 4,3$ %, což bylo v porovnání s materiálem z petrochemické výroby signifikantně více. Tento materiál vykazoval v následných analýzách i největší strukturální degradaci.

2.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin

Analýza fosfolipidových mastných kyselin se v posledních 30 letech stala jednou z nejpoužívanějších metod v ekologických studiích pro kvantifikaci půdních mikroorganismů (Frostegård et al., 2011). Je tomu zejména proto, že mikrobiologické studie často zahrnují kultivaci mikroorganismů, ale v případě půdních mikroorganismů lze kultivovat kolem 1 % bakterií a pouze 17 % hub a nelze pak mluvit o reprezentativním, reálném složení půdní mikrobiální komunity (Watzinger, 2015).

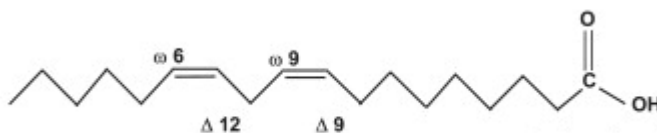
Metoda analýzy PLFA nepotřebuje ke svému provedení izolaci ani kultivaci mikroorganismů z půdy. Principem metody je extrakce fosfolipidů z membrán mikroorganismů a následná saponifikace lipidů, která uvolní mastné kyseliny. Ty jsou v posledním kroku transesterifikací převedeny na methylestery těchto mastných kyselin a následně stanoveny plynovou chromatografií s hmotnostní spektrometrií (Zelles, 1999).

Fosfolipidové mastné kyseliny, které tvoří součást fosfolipidů, se nacházejí v buněčných membránách organismů. Konkrétně se jedná o dva řetězce mastných kyselin, které jsou esterovou vazbou navázány na glycerolový skelet fosfolipidu (viz obrázek č. 3).



Obrázek č. 3 – Obecná struktura fosfolipidu (upraveno dle Lumenlearning.com)

Jejich pojmenování souvisí s pozicí a přítomností vazeb a funkčních skupin. Například v případě mastné kyseliny spojované se skupinou hub - 18:2 ω 6,9 (Kyselina linolová) – je pojmenování odvozeno následovně: číslo 18 značí počet atomů uhlíku, číslo 2 je počet dvojných vazeb v molekule a 6 a 9 jsou umístění dvojných vazeb od methylového konce, který značí symbol ω . Při analýze PLFA se pak lze ještě setkat s předponami „cy“, „Me“, „a“ a „i“, které značí, jestli se jedná o kyselinu cyklopropylovou (cy) nebo jestli kyselina obsahuje methylovou skupinu (Me). Předpony „a“ a „i“ pak značí „anteiso-“, a „iso-“, větvení (Reuss & Chamberlain, 2010). Struktura kyseliny linolové je uvedena na obrázku č. 4.



Obrázek č. 4 – Struktura kyseliny cis,cis-oktadeka-9,12-dienové (Kyselina linolová)

Tyto membránové mastné kyseliny se používají jako markery pro konkrétní skupiny organismů zejména proto, že jsou obsaženy pouze v živých buňkách a po jejich smrti rychle degradují (Hill et al., 2000). Užití PLFA jako markerů má několik omezení, např. pro určení bakterií se používá několik druhů PLFA, ale pro houby pouze již zmíněná

Kyselina linolová, která se také vyskytuje v rostlinných membránách a může tak docházet ke zkreslení výsledků. Je proto vhodné kombinovat metodu se stanovením ergosterolu, který je specifickým markerem pro skupinu hub (Klamer & Bååth, 2004).

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

V environmentálních studiích jsou analýzy PLFA užívány spíše pro analýzu prostředí, ve kterém daná studie probíhá nebo pouze ve studiích, které prostředí jako takové zkoumají (Fichtner et al., 2014, García-Orenes et al., 2015, Lange et al., 2014) a existuje velmi málo studií, které by metodu PLFA použili pro analýzu např. biofilmu na materiálu. Vinten a kol., 2011 použili analýzu PLFA pro zkoumání biofilmu, který se vytvořil na hliněných cihlách v prostředí skotských potoků a analýza PLFA se prokázala jako dobrou volbou pro tento typ studie. Biodegradční studie na polymerech nejčastěji používají pro analýzu mikrobiálních společenstev metody zaměřené na DNA organismů – pyrosekvenování nebo PCR metody, které dokážou určit konkrétní degradující organismus (Barratt et al., 2003, Cosgrove et al., 2007, Zafar et al., 2013).

2.4. Vlastnosti půd z pohledu biodegradace polyuretanů

Je známo mnoho mikroorganismů z řad bakterií i hub, které jsou schopny v půdním prostředí biodegradovat polyuretanové materiály (Akutsu-Shigeno et al., 2006, Cosgrove et al., 2007, Khan, S. et al., 2017). Jak již bylo zmíněno v předešlých kapitolách, environmentální vlivy hrají významnou roli jednak na schopnost mikroorganismů úspěšně biodegradovat (Artham a Doble, 2008) a jednak jsou důležité i pro nezkrácené výsledky analýzy PLFA (Leckie, 2005).

Důležitými faktory, které významně ovlivňují složení mikrobiální komunity, jsou mimo jiné: pH, dostupnost dusíku, půdní vlhkost, půdní zrnitost (Bååth a Anderson, 2003, Brockett, et al., 2012, Högberg et al., 2007, Lauber et al., 2008). Uvedené faktory mají různé vlivy na skupiny mikroorganismů.

Zástupci bakterií jsou více náchylní na změny v pH a půdní zrnitosti než zástupci hub (Lauber et al., 2008). Bååth a Anderson v roce 2003 provedli studii, ve které srovnávali složení mikrobiálního společenstva v půdách při různých hodnotách pH. Ve své studii měli k dispozici celkem 53 lesních půd v rozmezí pH 3 – 7,2. Ve svých výsledcích zjistili značnou lineární závislost ($R^2 = 0,708$) mezi půdním pH a respirací bakterií; v půdách s nejnižším pH bakteriální respirace dosahovala pouze kolem 10 % celkové respirace půdy a s rostoucím pH se lineárně zvyšovala. Podobné výsledky ukazuje i studie Högberg et al. (2007), ve které bylo provedeno srovnání tří lesních půd s rozdílnými hodnotami pH a autoři pozorovali rostoucí trend zastoupení bakteriálních PLFA s rostoucí hodnotou pH.

Brockett et al. v roce 2012 testovali 7 různých lesních půd a zkoumali mimo jiné vliv půdní vlhkosti na složení mikrobiálního společenstva. Na základě výsledků PLFA zjistil kladnou signifikantní korelaci půdní vlhkosti a celkové mikrobiální biomasy. Ve své studii dále srovnávali enzymatickou aktivitu vybraných enzymů včetně některých hydroláz, které pozitivně korelovaly s pH (Beta-1,4-xylosidáza, Beta-1,4-glukosidáza).

Vliv teploty na půdní respiraci a růst bakterií a hub zkoumala Pietikäinen et al. (2004) ve dvou půdách – lesní a polní. Polní půda měla výrazně vyšší pH (pH = 7,8) než půda lesní (pH = 4,1). Pro obě společenstva ve studii se zdála být optimální teplota mezi 25 a 30°C, ale zatímco některé bakterie vykazovaly aktivitu dokonce až při 45°C, houby při teplotách nad 30°C přestaly být aktivní. Půdy mezi sebou nevykazovaly významné rozdíly.

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

Zafar et al., 2013 zkoumali vliv teploty na biodegradaci polyesterových a polyetherových PUR destiček houbami v kompostu a půdě při různých teplotách (25°C, 45°C a 50°C) po dobu 12 týdnů. U polyesterových PUR destiček po 4 týdnech pozorovali v obou případech vizuální degradaci již při 25°C. U vyšších teplot dokonce pokrývalo povrch destiček houbové mycelium. Při testu síly v tahu po 12 týdnech autoři zaznamenali pokles vyšší než 75 %. U polyetherových destiček autoři nepozorovali žádné změny. Množství hub na polyuretanových destičkách se mezi prvním a čtvrtým týdnem mírně zvýšilo a pak zůstalo víceméně stejné.

3. Cíle a hypotézy

Cíle

- 1) Stanovit biodegradaci polyuretanového materiálu PUR BIO 10 pomocí standardizované metody ASTM D5988-03.
- 2) Stanovit mikrobiálního společenstva z biofilmu vytvořeného na povrchu materiálu během biodegradčního pokusu pomocí analýzy PLFA
- 3) Zjistit, jestli existuje rozdíl v biodegradaci mezi prostředími lesní a polní půdy.

Hypotézy

- 1) V lesní půdě bude probíhat biodegradace PUR lépe, jelikož houby jsou často citovaným organismem, který rozkládá PUR a je předpoklad pro větší zastoupení hub v lesní půdě.
- 2) Při použití litterbagu v testu dojde k přesnějším výsledkům analýzy PLFA biofilmů na povrchu PUR.

4. Metodika

4.1. Použité chemikálie a laboratorní technika

4.1.1. Chemikálie a materiály

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

4.1.2. Laboratorní technika

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

4.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě

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

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

4.2.1. Charakteristika testovaného materiálu

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

4.2.2. Analýza použitých půd

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

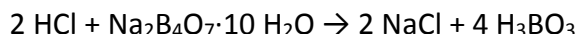
4.2.3. Stanovení biodegradace

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

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

Uvolněný oxid uhličitý byl zachytáván do hydroxidu draselného. Doba zachytávání CO₂ se během pokusu měnila s ohledem na aktivitu půdních organismů zhruba v týdenních

intervalech. Před každou titrací proběhlo stanovení faktoru kyseliny titrací roztoku dekahydrátu tetraboritanu sodného s indikátorem methylovanž dle rovnice:



Stanovení faktoru kyseliny proběhlo dle následujícího vztahu:

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

k ... stechiometrický koeficient ($k = 2$)

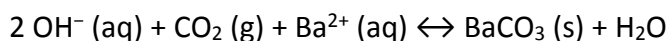
m ... navážka $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ (0,2 g)

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

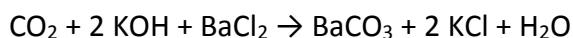
V ... spotřeba HCl (L)

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

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



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



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

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

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

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

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

f ... faktor kyseliny

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

4.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin

Analýza PLFA je metoda, která zkoumá přítomnost methylesterů mastných kyselin ve vzorku. K těmto methylesterům se v několika krocích dopravuje skrze extrakci fosfolipidů v membránách mikroorganismů a na jejich základě pak dále určí základní funkční skupiny jednotlivých mikroorganismů. Principem metody je z buněčných membrán a stěn mikroorganismů vyextrahovat fosfolipidy, z nichž se v dalším kroku uvolní mastné kyseliny. Mastné kyseliny jsou následně převedeny transesterifikací na myethylestery, dojde k jejich detekci a stanovení za použití plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií.

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

4.3.1. Extrakce lipidů

Do vypálené zkumavky bylo naváženo přibližně přesně 0,1 g vzorku lyofilizované polyuretanové pěny. Ke vzorku bylo přidáno 0,5 mL fosfátového pufru (50 mM KH_2PO_4), 1,25 mL methanolu a 0,625 mL chloroformu. Poté byl vzorek vortexován po dobu jedné minuty a následně extrahován ve tmě při laboratorní teplotě po dobu 1 hodiny. Po skončení extrakce byl vzorek centrifugován po dobu 5 minut na 3500 rpm. Vzniklý supernatant byl pomocí Pausterovy pipety odebrán do nové vypálené zkumavky a umístěn do tmy v pokojové teplotě. Ke vzorku bylo opět přidáno 1,25 mL methanolu a 0,625 mL chloroformu a vzorek byl vortexován po dobu 1 minuty a opět ponechán k extrakci za stejných podmínek. Po hodině byl vzorek opět centrifugován po dobu 5 minut na 3500 rpm a bylo provedeno odebrání supernatantu, který byl spojen s předchozím. Tento postup extrakce byl za stejných podmínek opakován ještě jednou.

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

4.3.2. Frakcionace lipidů

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

4.3.3. Mírná alkalická methanolýza (transeterifikace)

Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku. K odparku bylo přidáno 0,5 mL toluenu a 0,5 mL methanolu. Směs byla následně vortexována po dobu 1 minuty a ke vzorku byl následně přidán 1 mL čerstvě připraveného 0,2 M roztoku KOH v bezvodém methanolu. Poté by vzorek inkubován po dobu 15 minut ve vodní lázni o teplotě 37°C. Po skončení inkubace bylo ke vzorku přidáno 1,6 mL hexanu, 0,4 mL chloroformu, 0,3 mL 1 M kyseliny octové (která je uchovávána v lednici) a 2 mL čerstvě destilované vody. Tato směs byla vortexována po dobu 1 minuty. Následně byla provedena centrifugace po dobu 10 minut na 2500 rpm. Vzniklá horní fáze byla přenesena Pasteurovou pipetou do nové vypálené vialky a ke vzorku bylo opět přidáno 1,6 mL

hexanu a 0,4 mL chloroformu. Směs byla opět vortexována (1 minuta) a centrifugována (2500 rpm, 10 minut). Vzniklá horní fáze byla opět odebrána a spojena s předchozí. Extrakce proběhla ještě jednou za stejných podmínek. Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a následně do vialky bylo přidáno 950 µL hexanu a vzorek byl vortexován po dobu 30 sekund. Následně byl vzorek přenesen do krimpovací vialky a bylo k němu přidáno 50 µL vnitřního standardu (C13:0 methyl tridekanoát v hexanu o konc. 200 ppm).

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

4.3.4. Vyhodnocení mastných kyselin

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

Houby: 18:2 ω 6,9

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

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

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

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

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

5. Výsledky

5.1. Statistické zpracování dat

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

5.1.1. Biodegradační experiment

Pro biodegradační experiment byl zvolen spojnicový graf, na kterém byla kumulativně zaznamenávána dosažená mineralizace za uplynulý čas. Jednotlivá měření jsou vždy průměrem z pěti různých půd daného typu, tj. lesní nebo polní půda a tato variabilita je na grafu znázorněna směrodatnou odchylkou.

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

5.1.2. Analýza mastných kyselin

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

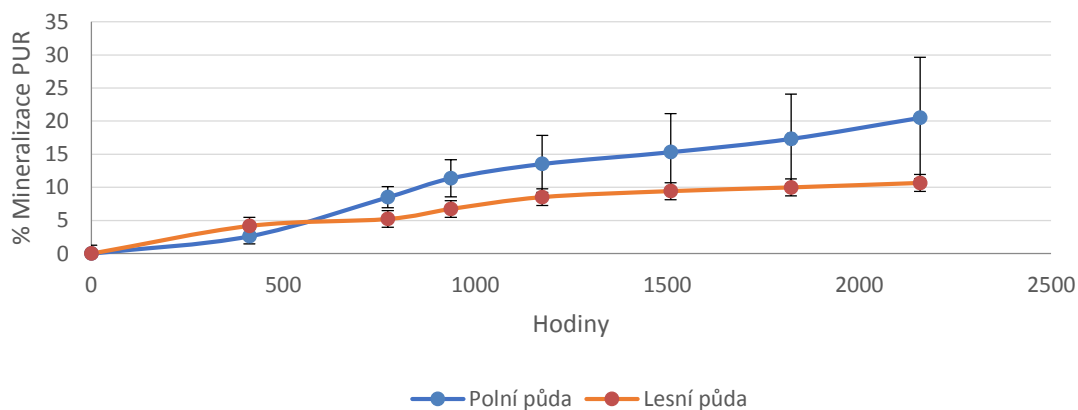
5.2. Biodegradace lehčených polyuretanů v půdě

Půdní charakteristiky jsou uvedeny v tabulce č. 3. Na obrázku č. 5 je uvedena křivka biodegradace v závislosti na čase a na obrázku č. 6 je pak uvedeno srovnání biodegradace mezi jednotlivými půdami po skončení biodegradačního pokusu. Po skončení pokusu byla naměřena mineralizace materiálu v lesní půdě $10,65 \pm 2,54$ % a $20,48 \pm 9,18$ % v půdě polní. Výsledky z druhého pokusu jsou uvedeny obdobně na obrázcích č. 7 a č. 8. Po skončení druhého pokusu byla naměřena v lesní půdě míra rozložení materiálu $3,88 \pm 3,42$ % a v půdě polní $8,96 \pm 1,79$ %. Na obrázcích č. 9 a č. 10 je pak srovnána biodegradace materiálu ve stejný okamžik po skončení druhého, kratšího, pokusu.

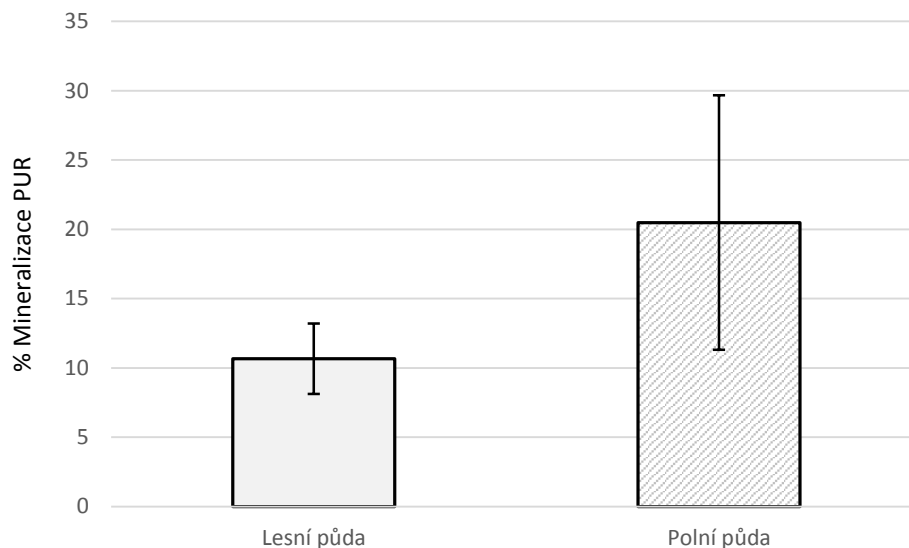
Tabulka č. 3 – Půdní charakteristiky testovaných půd

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

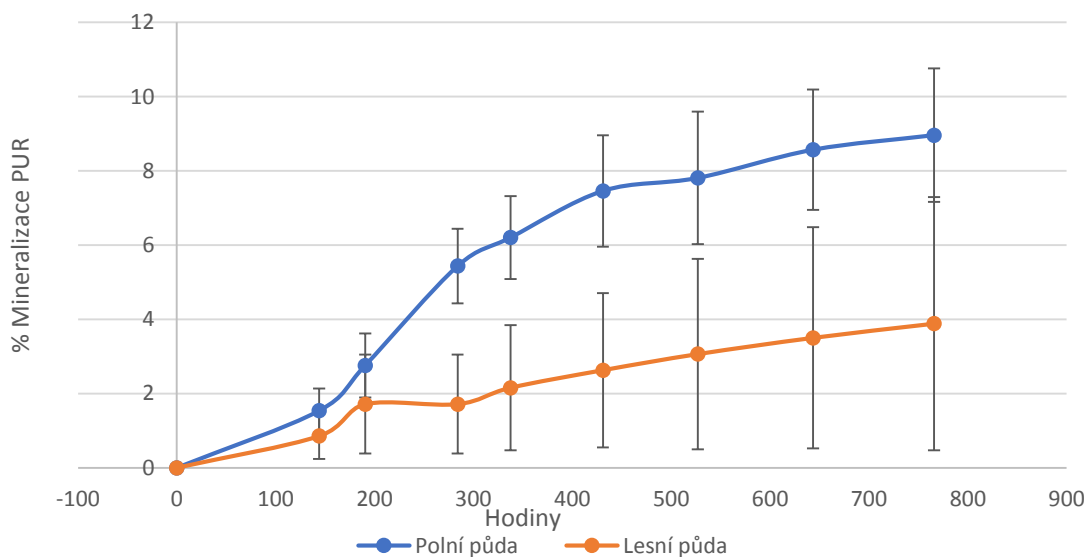
Polní půda	pH	WHC	Ztráta žiháním %
Zvole	6,83 ± 0,12	33,5 ± 0,70	1,67
Bratřínov	6,60 ± 0,11	37,5 ± 2,12	1,02
Nesvačily	6,95 ± 0,04	34,5 ± 0,71	1,54
Sloup	6,84 ± 0,07	35,5 ± 0,81	0,70
Leč	6,62 ± 0,04	34,5 ± 0,70	1,23



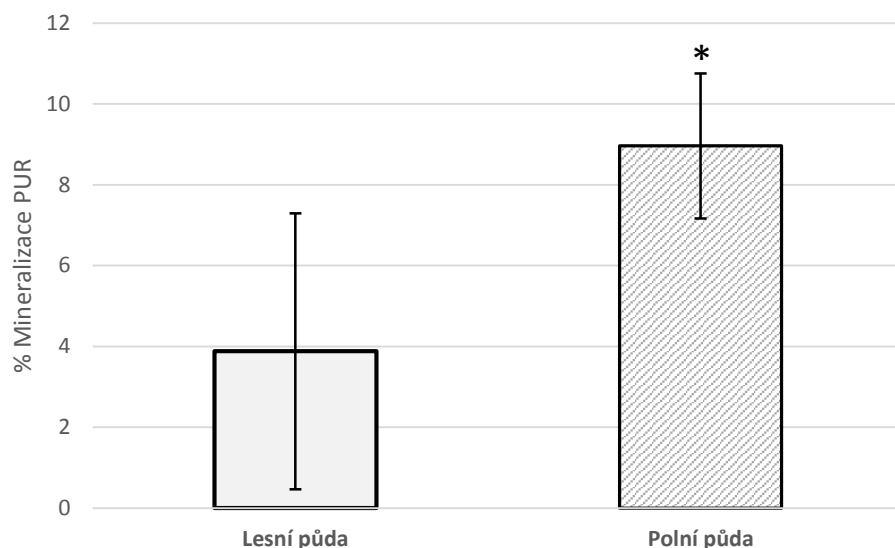
Obrázek č. 5 – Průběh mineralizace lehčené polyuretanové pěny BIO 10 v polní a lesní půdě během prvního pokusu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu).



Obrázek č. 6 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 po skončení prvního biodegradačního pokusu v lesní a polní půdě. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem a nebyl statisticky signifikantní ($p > 0,05$).



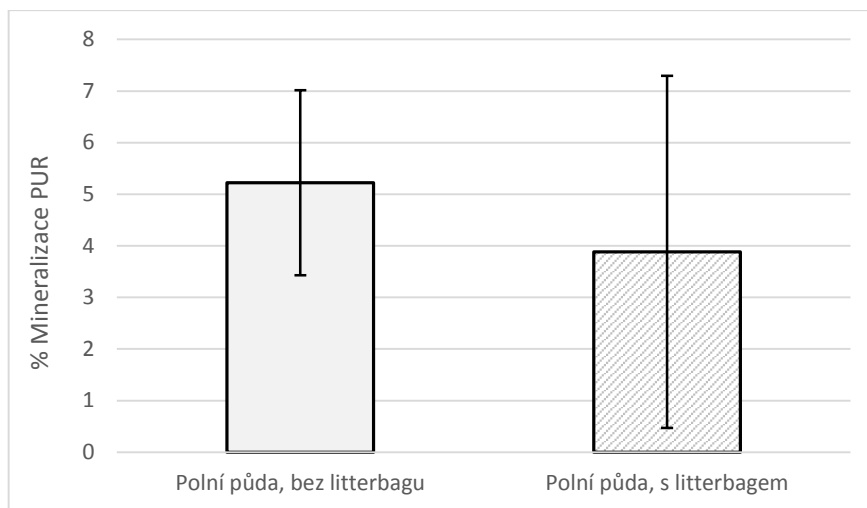
Obrázek č. 7 - Průběh mineralizace lehčené polyuretanové pěny BIO 10 v polní a lesní půdě během druhého pokusu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu).



Obrázek č. 8 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 po skončení druhého biodegradačního pokusu v lesní a polní půdě. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem a byl statisticky signifikantní ($p > 0,05$).



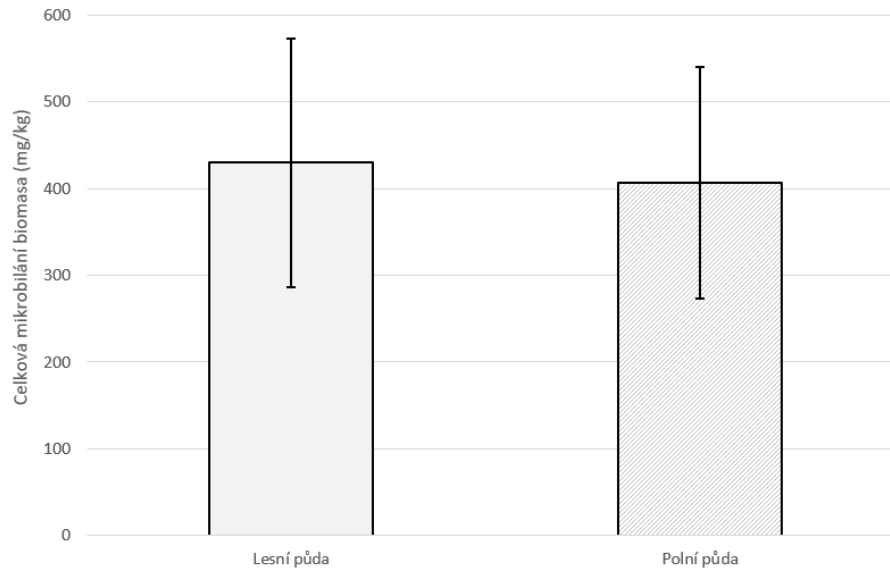
Obrázek č. 9 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 v lesní půdě po uplynutí 31 dní. Srovnání mezi dvěma uskutečněnými treatmenty – s a bez litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem a nebyl statisticky signifikantní ($p > 0,05$).



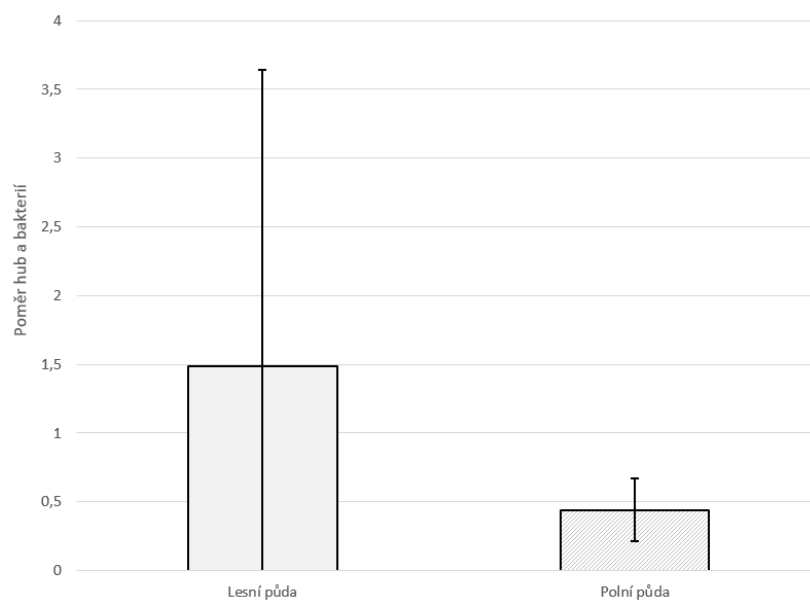
Obrázek č. 10 – Celková mineralizace materiálu PUR BIO 10 v polní půdě po uplynutí 31 dní. Srovnání mezi dvěma uskutečněnými treatmenty – s a bez litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 půd daného druhu). Rozdíl mezi soubory dat byl testován dvouvýběrovým t-testem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

5.3. Stanovení fosfolipidových mastných kyselin

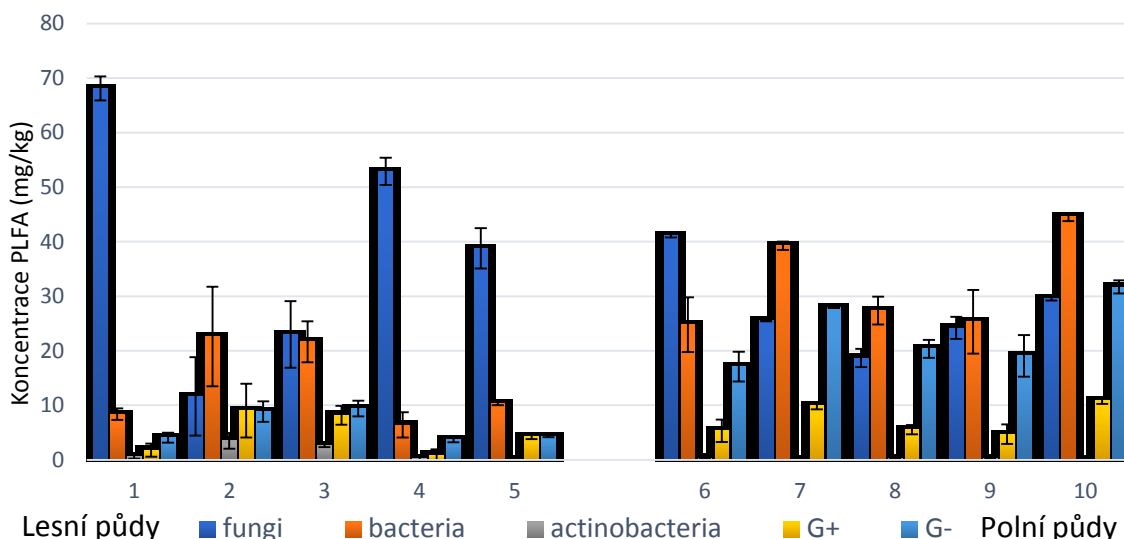
V prvním pokusu byla polyuretanová pěna přimíchána přímo do půdy. Zastoupení fosfolipidových mastných kyselin, které byly extrahovány a jejich rozdělení do funkčních skupin organismů je znázorněno na obrázku č. 11. V rámci vyhodnocení výsledků ANOVA bylo zjištěno, že ve vzorcích z lesní půdy se nachází statisticky významně více hub než ostatních skupin, nicméně při dalším testování bylo zjištěno, že mezi vzorky z polní a lesní půdy v obsahu hub není signifikantní rozdíl. Naopak u polní půdy bylo při srovnání zjištěno, že obsahuje signifikantně více bakterií než půda lesní. Dále byl spočítán poměr hub a bakterií (obrázek č. 12) a určena celková mikrobiální biomasa, která se ve vzorcích z lesní a polní půdy signifikantně nelišila (obrázek č. 13).



Obrázek č. 11 – Celková mikrobiální biomasa ve vzorcích ze vzorků polyuretanu z lesní a polní půdy během prvního pokusu, kdy byl polyuretan přimíchán přímo do půdy. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z dané půdy).

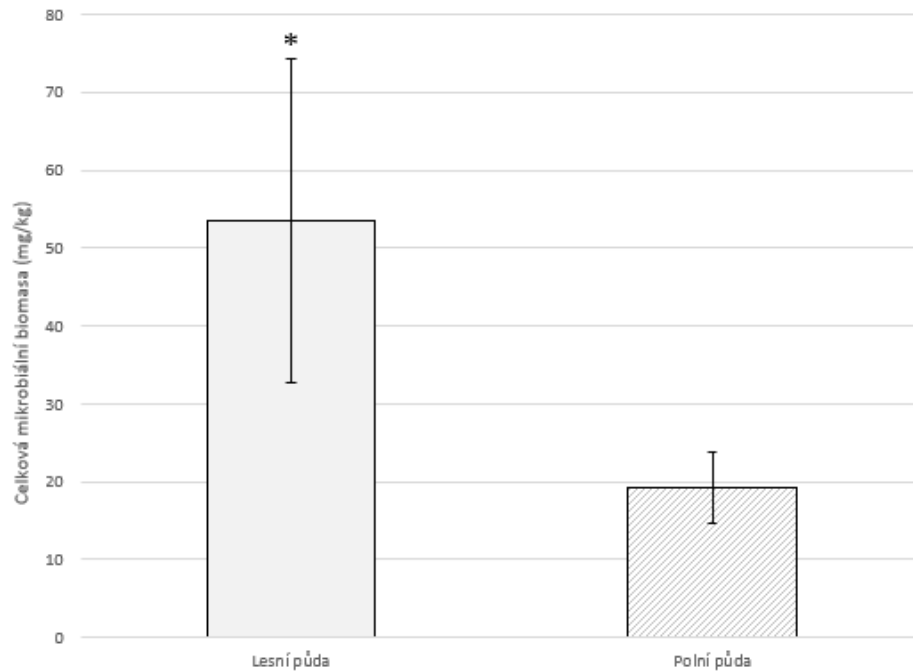


Obrázek č. 12 – Poměr hub a bakterií v polní ze vzorků polyuretanu z lesní a polní půdy během prvního pokusu, kdy byl polyuretan přimíchán do půdy. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z dané půdy).

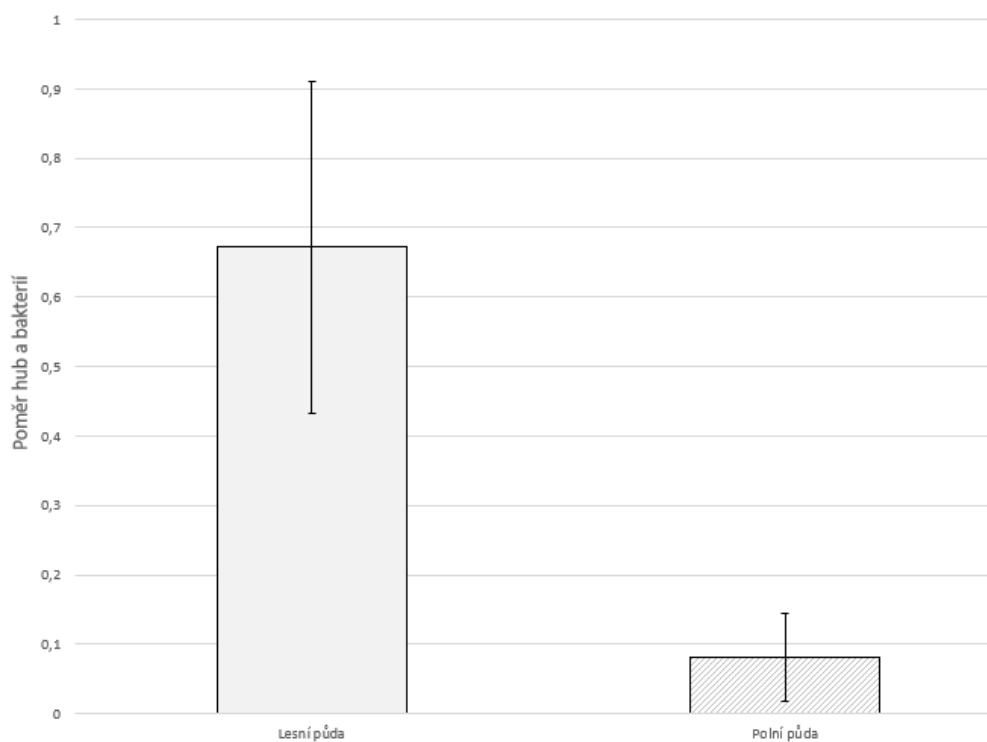


Obrázek č. 13 – Celkové koncentrace PLFA ze vzorků polyuretanu, rozdělené dle funkčních skupin mikroorganismů během prvního pokusu, kdy byl polyuretan přimíchán do půdy. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).

V druhém pokusu nebyla polyuretanová pěna umístěna přímo v půdě, ale byla uzavřena v litterbagu. Zastoupení PLFA, které byly extrahovány a jejich rozdělení do funkčních skupin organismů je znázorněno na obrázku č. 14. V rámci vyhodnocení výsledků ANOVA bylo zjištěno, že ve vzorcích z lesní půdy není mezi houbami a bakteriemi významný rozdíl. U vzorků z polní půdy bylo zjištěno významně více bakterií oproti houbám. Dále bylo zjištěno, že ve vzorcích z lesní půdy je významně více hub než z půdy polní. Dále byl spočítán poměr hub a bakterií (obrázek č. 15) a určena celková mikrobiální biomasa, která se ve vzorcích z polní a lesní půdy signifikantně lišila (obrázek č. 16).

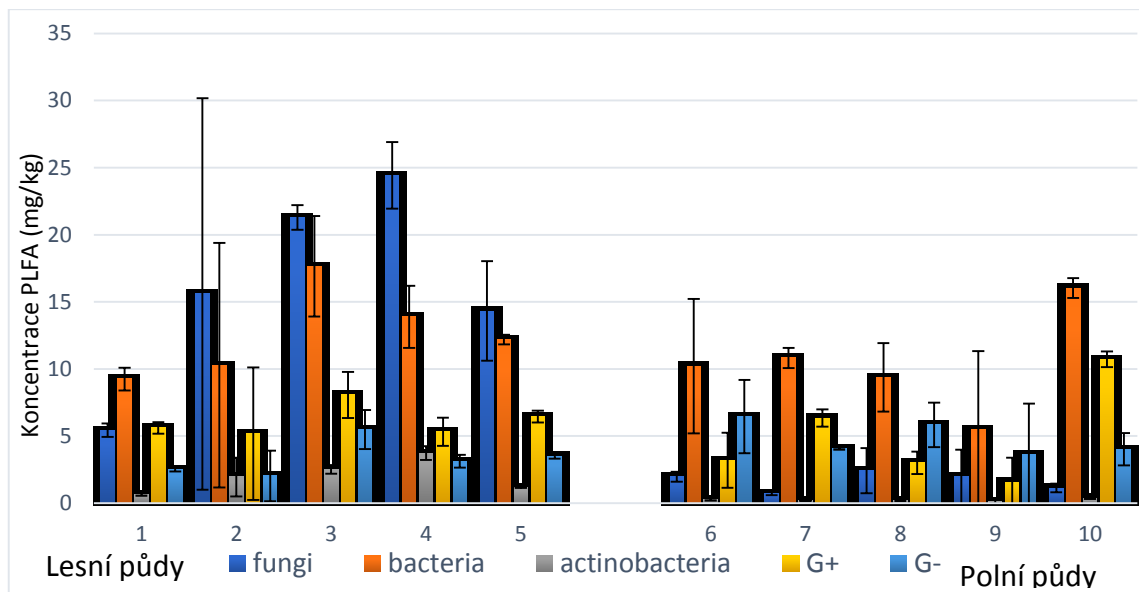


Obrázek č. 14 – Celková mikrobiální biomasa ve vzorcích ze vzorků polyuretanu z lesní a polní půdy během druhého pokusu, kdy byl polyuretan v půdě uzavřen do litterbagu. Dvouvýběrovým t-testem bylo zjištěno, že soubory se statisticky signifikantně mezi sebou liší ($p < 0,05$). Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z dané půdy).



Obrázek č. 15 – Poměr hub a bakterií v polní ze vzorků polyuretanu z lesní a polní půdy během druhého pokusu, kdy byl polyuretan v půdě uzavřen v litterbagu. Chybovými

úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (5 vzorků polyuretanu z dané půdy).



Obrázek č. 16 – Celkové koncentrace PLFA ze vzorků polyuretanu, rozdělené dle funkčních skupin mikroorganismů během druhého pokusu, kdy byl polyuretan v půdě uzavřen v litterbagu. Chybovými úsečkami je znázorněna směrodatná odchylka stanovení (2 paralely).

6. Diskuze

Testovaný materiál PUR BIO 10 je polyuretanová pěna na polyester-polyetherové bázi s plnivem škrobem. Tento materiál byl vybrán na základě biodegradačního pokusu, který provedla s materiály PUR BIO 8 – 10 v polní půdě Pražanová (2018). Předpokládaným využitím materiálu je pachový ohradník v zemědělské krajině. Vzhledem k tomuto využití byl biodegradační test podle normy ASTM D5988-03 opakován na dvou typech půdy – lesní a polní. Řada studií (Cosgrove et al., 2007; Ibrahim et al., 2009; Mathur a Prasad, 2012 Osman et al., 2017) identifikovala zástupce hub, kteří polyesterový polyuretan rozkládají a vzniká tak předpoklad, že lesní půdy budou lepší prostředí pro biodegradaci. Na základě biodegradačních testů v rámci méj diplomové práce se tento předpoklad neprokázal.

Testované lesní půdy se pohybovaly v rozmezí pH 5,36 – 6,35, což je dle výsledků Högberg et al. (2007) již oblast, ve které jsou houby na ústupu. Álvarez-Barragán et al., 2016 ve své studii pozorovali, že k proběhnutí biodegradace testovaného plastu je nutný i další jednodušší zdroj uhlíku. Dalším důvodem tedy může být vyšší podíl organického uhlíku v lesních půdách oproti půdám polním (Niemi & Vepsäläinen, 2005; Pietikäinen et al., 2004), který mikroorganismy upřednostňují před biodegradací polyuretanové pěny a vzhledem ke kratší verzi pokusu se potenciál lesní půdy degradovat polyuretan nestihl projevit. Rozdíl v obsahu organických látek v mnou testovaných půdách se projevil vyššími také hodnotami ztrát žíháním, které ukazují na větší zastoupení organické hmoty v půdě.

Nicméně další abiotické faktory jako teplota, živiny nebo WHC, které mají vliv na fitness mikrobiálního společenstva (Lauber et al., 2008) a tedy případnou biodegradaci byly v rozmezí, které by nemělo průběh biodegradace inhibovat. Teplota v termoboxu během pokusu byla $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Zafar et al. (2013) pozoroval úspěšnou biodegradaci polyuretanu v půdě při 25°C . Půda byla nasycena na 70 % WHC, která ve studii Barratt et al. (2003) jeví jako ideální. Následně byla vlhkost udržována kádinkou s vodou, která byla přítomna v mikrokosmu po celou dobu biodegradace. Živiny zejména v podobě dusíku a fosforu, byly do půdy dodány roztokem dihydrogenfosforečnanu amonného dle užití metodiky tak, aby nedocházelo k jejich nedostatku během pokusu. Možným omezením během pokusu mohl být nedostatek kyslíku, zejména u lesních půd, které vzhledem k objemu vyplňovaly velkou část sklenice a mohlo tak dojít k vyčerpání kyslíku mezi jednotlivými titracemi. Tím mohlo dojít k inhibici biodegradace polyuretanové pěny, pro kterou je přítomnost kyslíku klíčová (Urgun-Demirtas et al., 2007).

Žádnou studii, která by použila metodu PLFA k analýze mikrobiálního společenstva na polyuretanech se mi nepodařilo dohledat. A není možné provést porovnání výsledků. Z mých výsledků se zdá, že docházelo k znehodnocení výsledků analýzy PLFA půdou, která ulpěla na testovaném materiálu a byla také spolu s biofilmem extrahována. Proto byl při druhém opakování testu použit litterbag. Výsledky PLFA se poměrně změnily a lze usuzovat, že odrážejí realističtější skladbu mikrobiálního společenstva biofilmu.

V rámci pokusu bylo použito přibližně třetinové množství půdy a testovaného materiálu oproti doporučenému provedení dle užití metodiky. Bylo tak učiněno z neúměrného nárůstu potřeby místa a chemikálií. Tento fakt mohl mít vliv zejména na analýzu PLFA, kde pro možnou extrakci bylo možné použít pouze 0,1 g polyuretanu. Běžná hodnota navážky testovaného materiálu se pohybuje od 0,5 g (Quideau et al., 2016.). Do budoucna se tento postup nejeví jako vhodný pro získání co nejpřesnějších dat.

7. Závěr

Byly uskutečněny dva testy biodegradability materiálu PUR BIO 10 v laboratorních mikrokosmech dle metodiky ASTM D5988-03 pro dvě půdní prostředí – lesní a polní. V prvním testu byl materiál umístěn přímo do půdy a po 4 měsících byl mineralizován z $10,65 \pm 2,54$ % v lesní půdě a z $20,48 \pm 9,18$ % v půdě polní. Test byl ukončen a byla provedena analýza PLFA z biofilmů polyuretanové pěny za účelem zjištění participujících skupin mikroorganismů na biodegradaci polyuretanu. Výsledky z analýzy PLFA, ale neukázali signifikantní rozdíl mezi složením mikrobiálního společenstva na biofilmu PUR z půdy lesní a z půdy polní.

Test byl proto opakován a testovaný materiál byl umístěn do litterbagu. V druhém testu biodegradability došlo k mineralizaci materiálu z $3,88 \pm 3,42$ % v lesní půdě a $8,96 \pm 1,79$ % v půdě polní. Po ukončení testu proběhla analýza PLFA, ze které bylo zjištěno, že vzorky lesní půdy obsahují signifikantně více mastných kyselin značící celkovou mikrobiální biomasu (t-test, $p < 0,05$) a stejně tak lesní půda obsahovala signifikantně více mastných kyselin značící houbovou biomasu (t-test, $p < 0,05$).

Lesní půda se na základě mých výsledků nejeví jako vhodnější prostředí pro biodegradaci testované polyuretanové pěny. Polní půda se zdá být vhodnějším prostředím, což je s ohledem zamýšlené užití materiálu jako pachového ohradníku v zemědělské krajině vyhovující scénář.

8. Zdroje

ACS.org, 1993. Leo Hendrick Baekeland and the Invention of Bakelite. [cit. 10.8.2020] dostupné z: <https://www.acs.org/content/acs/en/education/whatischemistry/landmarks/bakelite.html>

Alves, P. et al., 2014. Biomedical polyurethane-based materials. [cit. 10.8.2020] dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/235348389_Biomedical_Polyurethane-Based_Materials

Álvarez-Barragán, J. et al., 2016. Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82 (17) pp. 5225 - 5235

Akindoyo, J. O. et al., 2016. Polyurethane types, synthesis and applications – a review. *Royal society of chemistry advances*, 2016, 6, 114453

Akutsu-Shigeno et al., 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 70, pp. 422–429

Artham, T. & Doble, M. Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates. *Macromolecular bioscience*, 2008, 8.1: 14-24.

Barratt, S. R. et al., 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *Journal of Applied Microbiology* 2003, 95, 78–85

Bååth, E. & Anderson, T. H., 2003. Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 (7), pp. 955-963

Blattmann, H. et al., 2014. Isocyanate- and Phosgene-Free Routes to Polyfunctional Cyclic Carbonates and Green Polyurethanes by Fixation of Carbon Dioxide. *Macromolecular rapid communications*, 2014, 35(14), 1238-1254

Brockett, B. et al., 2012. Soil moisture is the major factor influencing microbial community structure and enzyme activities across seven biogeoclimatic zones in western Canada. *Soil Biology and Biochemistry*, 2012, 44 (1) pp. 9-20

Brodhagen, M. et al., 2014. Biodegradable plastic agricultural mulches and key features of microbial degradation. *Applied Microbiology and Biotechnology* (2015) 99:1039–1056

- Christenson, E. M. et al., 2004. Poly(carbonate urethane) and poly(ether urethane) biodegradation: In vivo studies. *Journal of Biomedical Materials research*, 2004, 69A (3), pp. 407-416
- Cosgrove, L. et al., 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and environmental microbiology*, 2007, 73 (18) pp. 5817-5824.
- Český statistický úřad, 2019. Produkce, využití a odstranění odpadů za rok 2018 [cit. 10.8.2020] dostupné z: <https://www.czso.cz/csu/czso/produkce-vyuziti-a-odstraneni-odpadu-2018>
- García-Orenes, F. et al., 2015. Prolonged irrigation with municipal wastewater promotes a persistent and active soil microbial community in a semiarid agroecosystem. *Agricultural Water Management* 149, 115–122.
- Goméz, E. F. et al., 2014. Biodegradability of crude glycerol-based polyurethane foams during composting, anaerobic digestion and soil incubation. *Polymer Degradation and Stability*, 2014, 102, pp. 195-203
- Darby, R.T. & Kaplan, M., 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Applied microbiology*, 16(6), pp.900–905.
- El-Sayed et al., 1996. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1996, 37 (1–2), pp. 69-79
- Fichtner, A. et al., 2014. Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology Biochemistry*, 70, 79–87.
- Fridrishone, A. et al., 2020. Life Cycle Assessment of vegetable oil based polyols for polyurethane production. *Journal for Cleaner Production*, 2020, 266, 121403
- Frostegård, Å., Tunlid, A. & Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 43(8), pp.1621–1625.
- Gautam, R., Bassi, A. S. & Yanful, E.K., 2007. A Review of Biodegradation of Synthetic Plastic and Foams. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141(2), pp.85–108.
- Gu, J.D., 2007. Microbial colonization of polymeric materials for space applications and mechanisms of biodeterioration: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 59(3 SPEC. ISS.), pp.170–179.
- Hill, G.T. et al., 2000. Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15(1), pp.25–36.
- Howard, G. T. et al., 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 1999, 43, pp. 7-12
- Howard, Gary T., 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2002, 49.4: 245-252.

- Howard, G. T. et al., 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation*, 2012, 23, pp. 561-573
- Högberg, M. N. et al., 2007. Is microbial community composition in boreal forest soils determined by pH, C-to-N ratio, the trees, or all three? *Oecologia*, 2007, 150, pp. 590–601
- Ibrahim, N. I. et al., 2009. Polyester-polyurethane biodegradation by *Alternaria solani*, isolated from Northern Jordan. *Advances in Environmental Biology*, 2009, Vol. 2, pp. 162-170.
- Kahlerras, Z. et al., 2020. Elaboration and Characterization of Polyurethane Foams Based on Renewably Sourced Polyols. *Journal of Polymers and The Environment*, 2020
- Klamer, M. & Bååth, E., 2004. Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2 ω 6,9. *Soil Biology and Biochemistry*, 2004, 36 (1), pp. 57-65
- Khan, S. et al., 2017. Biodegradation of polyester polyurethane by *Aspergillus tubingensis*. *Environmental Pollution*, 2017, 225, pp. 469-480
- Lange, M. et al., 2014. Biotic and abiotic properties mediating plant diversity effects on soil microbial communities in an experimental grassland. *PLoS ONE* 9, e96182. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096182>
- Lauber, C. L. et al., 2008. The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry*, 2008, 40 (9), pp. 2407-2415
- Leckie, S. E., 2005. Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management*, 2005, 220 (1-3), pp. 88-106
- Lumenlearning.com, 2020. Biology for majors; module 5 Cell membranes. [cit online 13.8.2020], *volně dostupné pod licencií CC BY 4.0 dostupné z:* <https://courses.lumenlearning.com/wm-biology1/chapter/reading-phospholipids/>
- Mahajan, N. & Gupta, P., 2015. New insights into the microbial degradation of polyurethanes. *Royal society of chemistry advances*, 2015, 5, 41839-41854
- Mathur, G. & Prasad, R., 2012. Degradation of Polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) Isolated from Soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 167, pp. 1595–1602
- Matsumiya, Y. et al., 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp.1946–1953.
- Marcovich, N. E. et al., 2017. Open cell semi-rigid polyurethane foams synthesized using palm oil-based bio-polyol. *Industrial crops and products*, 2017, 102, pp. 88-96

Niemi, R. M. & Vepsäläinen, M. 2005. Stability of the fluorogenic enzyme substrates and pH optima of enzyme activities in different Finnish soils. *Journal of Microbiological Methods*, 2005, 60 (2), pp. 195-205

Özşeker, A. et al., 2019. Intrinsically Flame Retardant Polyurethane Prepared with Epoxidized Soybean Oil and Vinylphosphonic Acid. *Croatia chemica acta*, 91(4), 589–597

Osman, M. et al., 2018. Degradation of Polyester Polyurethane by *Aspergillus* sp. Strain S45 Isolated from Soil. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018, 26, pp.301–310

Owen, S. et al., 1996. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1996, 60(2), pp. 244-248.

Peng, Y. H. et al., 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environmental Science and Pollution Research*, 2014, 21(16)

Pietikäinen, J. et al., 2004. Comparison of temperature effects on soil respiration and bacterial and fungal growth rates. *FEMS Microbiology Ecology*, 2005, 52, pp. 49–58

PlasticsEurope, 2019. Plastics – the Facts 2019: An analysis of European plastic production, demand and waste data. [cit. 10.8.2020] dostupné z: <https://www.plasticseurope.org/en/resources/publications/1804-plastics-facts-2019>

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

Quideau, S. A. et al., 2016. Extraction and Analysis of Microbial Phospholipid Fatty Acids in Soils. *Journal of Visualized Experiments*, 2016, 114, 1–9.

Rahman M.M., Rabbani M.M. & Saha J.K., 2019. Polyurethane and Its Derivatives. *Functional Polymers*, pp. 1-16.

Ruess, L. & Chamberlain, P. M., 2010. The fat that matters: Soil food web analysis using fatty acids and their carbon stable isotope signature. *Soil Biology and Biochemistry*, 2010, 42 (11), pp. 1898-1910

Shah, A. A., et al., 2008a. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Annals of Microbiology*, 58 (3) 381-386

Shah, A.A. et al., 2008b. Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances*, 26(3), pp.246–265.

Shah, Z. et al., 2013a. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GCeMS, *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013, 77, pp. 114-122

Shah, Z. et al., 2013b. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation*, 2013, 24(6), pp.865-77

Shen, M. et al., 2020. Are biodegradable plastics a promising solution to solve the global plastic pollution? *Environmental Pollution Volume 263, Part A, August 2020*, 114469

Singh, B. & Sharma, N., 2008. Mechanistic implications of plastic degradation. *Polymer Degradation and Stability*, 93 (3), pp. 561-584

Šnajdr, J. et al., 2008. Spatial variability of enzyme activities and microbial biomass in the upper layers of *Quercus petraea* forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(9), 2068–2075.

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

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

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

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

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

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

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

9. Přílohy

Seznam příloh:

Příloha 1: Struktura použitého polyuretanu BIO 10

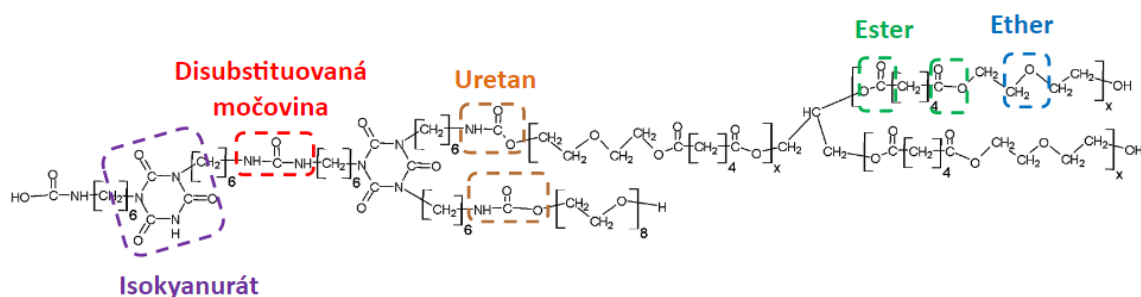
Příloha 2: Látky použité pro výrobu testovaného polyuretanu BIO 10

Příloha 3: Mapa míst ze kterých byly odebrány půdy

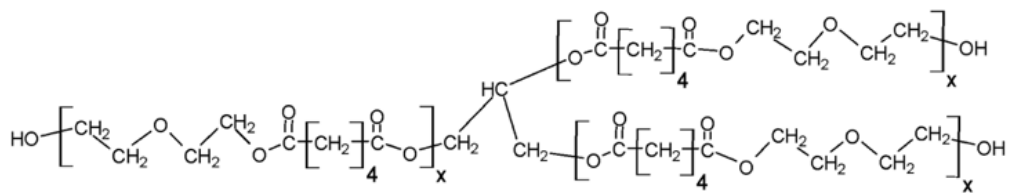
Příloha 3: Vizuální srovnání použité lesní a polní půdy

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

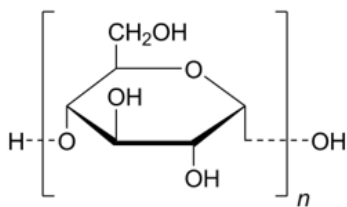
Příloha 5: Litterbag s polyuretanem použitý v pokusu



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



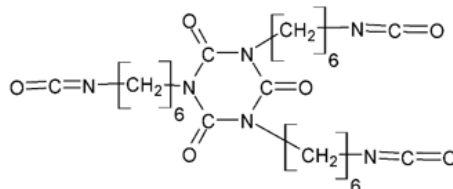
POLYESTER TRIOL



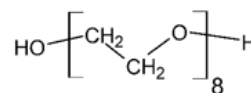
α -1,4

$2 < n < 20$

ŠKROB

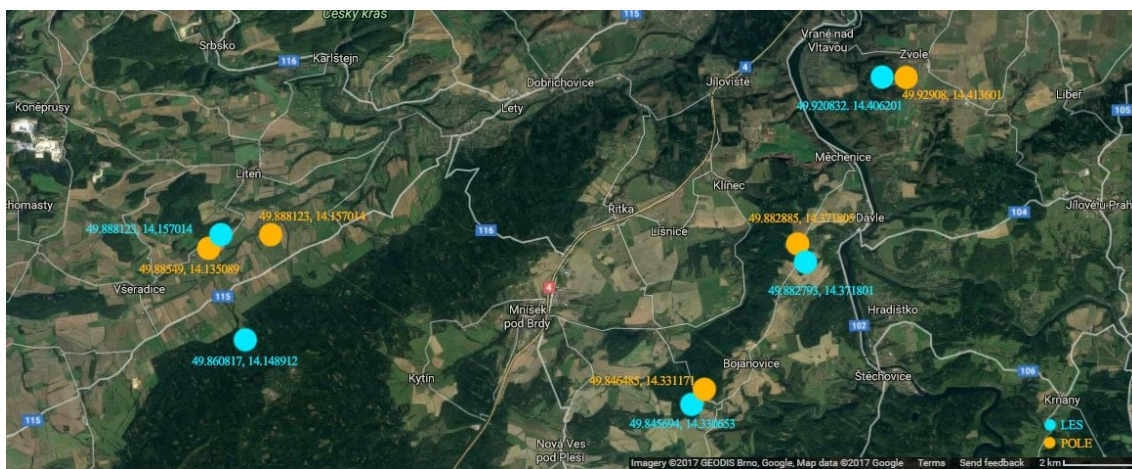


ISOKYANÁT



PEG 400

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



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



Příloha 4: Vizuální srovnání použité lesní a polní půdy



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



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