

Biodegradabilita materiálů na bázi přírodních, modifikovaných a syntetických polymerů

Bc. Eva Lušovjanová

Diplomová Práce
2016



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2015/2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Eva Lušovjanová**
Osobní číslo: **T14462**
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Biodegradabilita materiálů na bázi přírodních, modifikovaných
a syntetických polymerů**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární rešerši na dané téma.
2. Osvojte si metodiku sledování biodegradace pomocí GC.
3. Přizpůsobte metodiku charakteru zkoumaných vzorků.
4. Charakterizujte vzorky pomocí dalších metod.
5. Výsledky přehledně zpracujte do formy DP.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Články v odborných periodících dostupných v databázích Web of Science, Scopus, případně dalších.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

2. února 2016

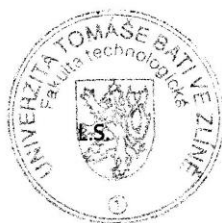
Termín odevzdání diplomové práce:

16. května 2016

Ve Zlíně dne 2. února 2016



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



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

Příjmení a jméno: Lušňovjanová Eva

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně 13.5.2016

Eva Lušňovjanová

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

³⁾ 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá vlivem organického plniva, modifikace a použitých plastifikátorů na biologickou rozložitelnost materiálů na bázi plastifikovaného škrobu. V praktické části byla sledována biodegradace těchto materiálů v aerobním prostředí kompostu. Pro testování byly použity vzorky o různých stupních modifikace s použitím celulózy jako plniva a dále pak tří druhů plastifikátorů. Důvodem úpravy plastifikovaných škrobů je vylepšení fyzikálně-mechanických a užitných vlastností výrobků z biopolymeru, například snížení adsorpce vlhkosti. S výsledků plyne, že obsah plniva neovlivnil významně rychlost biodegradace, naproti tomu stupeň modifikace biodegradaci významně zpomaloval.

Klíčová slova: plastifikovaný škrob, celulóza, modifikace, biodegradace

ABSTRACT

The thesis deals with the influence of the organic fillers, modification and plasticizers used for biodegradability of materials based on plasticized starch. In the practical part biodegradation of these materials in an aerobic environment compost was monitored. For the testing, samples of various levels of modification with the use of cellulose as a filler and then three kinds of plasticizers were used. The reason for the modification of starches is to improve the physical-mechanical properties of the products, such as reducing moisture adsorption. The results showed that the filler content did not significantly affect the rate of biodegradation, whereas the degree of modification significantly slowed the biodegradation.

Keywords: plasticized starch, cellulose, modifications, biodegradation

Touto cestou bych ráda poděkovala vedoucímu diplomové práce prof. Mgr. Marku Koutnému, Ph.D. za odborné vedení a cenné připomínky při zpracovávání diplomové práce. Rovněž bych ráda poděkovala své konzultantce Ing. Silvii Pekařové za trpělivost a ochotu. Za přípravu polymerních vzorků, které zde byly testovány, děkuji oddělení Morfologie a reologie polymerních materiálů ÚMCH AV ČR v.v.i.

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

OBSAH

ÚVOD.....	12
I. TEORETICKÁ ČÁST	13
1 BIODEGRADACE	14
1.1 BIODETERIORACE	15
1.2 DEPOLYMERIZACE.....	15
1.3 ASIMILACE	15
1.4 MINERALIZACE.....	15
1.5 ABIOTICKÉ FAKTORY	16
1.5.1 Mechanická degradace	16
1.5.2 Světelná degradace	16
1.5.3 Tepelná degradace	17
1.5.4 Chemická degradace a abiotická hydroláza	17
2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI POLYMERŮ	18
2.1 MOLEKULOVÁ HMOTNOST.....	18
2.2 KRYSTALINITA A POHYBLIVOST POLYMERNÍCH ŘETĚZCŮ.....	18
2.3 SPECIFICKÝ POVRCH.....	19
2.4 ADITIVA	19
3 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY	21
3.1 LEGISLATIVA UPRAVUJÍCÍ PROSTŘEDÍ TÝKAJÍCÍ SE BIODEGRADABILNÍCH PLASTŮ 21	
3.2 KLASIFIKACE BIODEGRADABILNÍCH POLYMERŮ	22
3.3 ŠKROB A JEHO MODIFIKACE.....	25
3.3.1 Modifikace organickými kyselinami a jejich deriváty	26
<i>Acetylace škrobu.....</i>	<i>26</i>
<i>Sukcinylace škrobu</i>	<i>27</i>
<i>Modifikace kyselinou oktenyl-jantarovou.....</i>	<i>27</i>
3.3.2 Plastifikace škrobu	28
3.3.3 Retrogradace škrobu.....	29
3.3.4 Použití materiálů s obsahem plastifikovaného škrobu	29
II. PRAKTICKÁ ČÁST	30
4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJE.....	31
4.1 CHEMIKÁLIE.....	31
4.1.1 Příprava minerálního média	32
4.2 PŘÍSTROJE A ZAŘÍZENÍ	34
4.3 VZORKY	35
5 METODY PRO CHARAKTERIZACI VZORKŮ.....	37
5.1 SLEDOVÁNÍ AEROBNÍ BIODEGRADACE V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU	37
5.1.1 Obsah bioreaktorů	37
5.1.2 Příprava substrátu	37
5.1.3 Příprava perlitu	37
5.1.4 Příprava minerálního média	37
5.1.5 Aerobní biodegradace.....	37
5.1.6 Postup odběru a analýza oxidu uhličitého plynovou chromatografií	38
5.1.7 Provdzušňování bioreaktorů.....	38
5.1.8 Vyhodnocení naměřených dat	39

5.2	INFRAČERVENÁ SPEKTROMETRIE S FOURIEROVOU TRANSFORMACÍ.....	40
5.3	MOLEKULÁRNÍ METODY VYUŽITÉ K IDENTIFIKACI VZORKŮ	41
5.3.1	Lyze buněk degradérů	41
5.3.2	PCR	42
5.3.3	Agarózová elektroforéza	42
5.3.4	DGGE.....	43
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	45
6.1	STUDIUM AEROBNÍ BIODEGRADACE V PROSTŘEDÍ KOMPOSTU	45
6.2	INFRAČERVENÁ SPEKTRA (FTIR - ATR)	52
6.3	IZOLACE DNA DEGRADÉRŮ A JEJICH IDENTIFIKACE	54
	ZÁVĚR.....	58
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	59
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	63
	SEZNAM OBRÁZKŮ	64
	SEZNAM TABULEK.....	66
	PŘÍLOHY	67

ÚVOD

V současné době je používání výrobků a obalů z plastických hmot neoddelitelnou součástí každodenního života. Uvádí se, že ročně je v zemích Evropské unie průměrně vyprodukováno kolem 70 milionů tun obalových materiálů, což je přibližně třetina veškerého komunálního odpadu.

Obaly poskytují ochranu zboží před poškozením znečištěním nebo jiným znehodnocením, a také optimalizují nároky na skladování, případně distribuci výrobku. Tyto obaly představují obrovský zdroj znečištění, vzhledem k jejich nesnadné recyklaci, neboť jejich složení není jednotné, ale jsou vyrobeny z rozmanitého množství polymerů (především z ropných zdrojů) a přísad, jako jsou plniva, barviva nebo plastifikační přísady. Z tohoto důvodu je v České republice v současnosti recyklována pouze pětina veškerých vyrobených plastů a zbytek končí na skládkách, kde tyto obaly mohou v nezměněné podobě přetrvat bez větších změn desítky i stovky let.

Vzhledem k výše uvedeným aspektům, a také v důsledku likvidace neobnovitelných zdrojů energie, je zaměřena pozornost na vylepšení recyklovatelnosti a snížení doby rozložitelnosti polymerních materiálů. Díky tomu, do popředí zájmu mnoha výzkumů a institucí vstupují biorozložitelné materiály, které bývají syntetizovány z obnovitelných zdrojů, především škrobu a které lze ekologicky degradovat účinkem běžných biologických faktorů na biomasu vodu a oxid uhličitý.

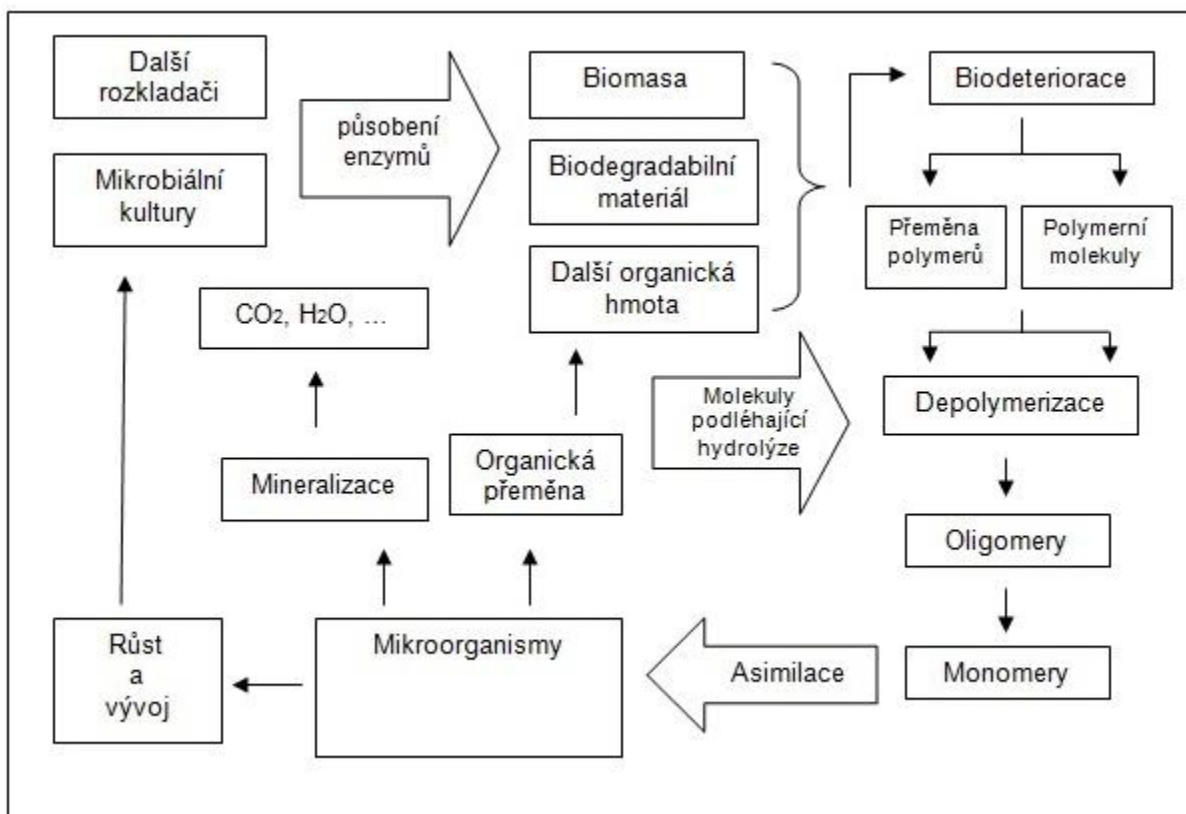
Biorozložitelné polymery v posledním desetiletí zaznamenávají velký rozmach jak v oblasti obalových materiálů, medicíny nebo agrohodopářství, jelikož jsme schopni vyrobit fólie s životností několika dní, až po několik let. V oblasti výzkumu je stále věnován velký důraz na zlepšení mechanických a bariérových vlastností přidáváním nejrůznějších plniv a plastifikátorů.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BIODEGRADACE

Biodegradace je rozklad organického materiálu pomocí mikroorganismů, jako jsou bakterie houby nebo plísně za aerobních či anaerobních podmínek. Za aerobních podmínek jsou konečnými produkty oxid uhličitý, voda a přírůstek biomasy. Za anaerobních podmínek i metan.

Definice biodegradace podle ISO (mezinárodní organizace pro normalizaci) a CEN (Evropský výbor pro normalizaci) je následující: biodegradace je degradace způsobená biologickou aktivitou, zejména enzymatickou činností, což vede k výrazné změně chemické struktury materiálu. Dochází k produkci oxidu uhličitého, vody, minerálních solí a nové mikrobiální biomasy. Biodegradace představuje komplex pochodů, mezi které patří: biodeteriorace, depolymerizace, asimilace a mineralizace. V přírodě pak biotické i abiotické faktory působí společně při rozkladu organické hmoty [1].



Obrázek 1 Schéma biodegradace polymerů [2]

1.1 Biodeteriorace

Při biodeterioraci dochází k rozkladu materiálu výsledkem činnosti mikroorganismů rostoucích na povrchu nebo přímo uvnitř daného materiálu. Jedná se o kombinované působení mechanických, chemických a enzymatických prostředků, kdy dochází k rozkladu materiálů o vysoké molekulové hmotnosti na menší fragmenty. Samotný rozklad je pak závislý především na složení a vlastnostech polymerních materiálů, dále pak vlhkosti, počasí nebo atmosférických polutantech. Mikroflóra podílející se na biodeterioraci je velmi různorodá, od bakterií, přes prvoky, řasy až po mikroskopické houby [3,4].

Vliv na rozklad polymerního materiálu mají také fyzikální síly jako je ohřev/chlazení, zmrazení/tání, které mohou vyvolat mechanické poškození materiálu. Polymer může také bobtnat v důsledku růstu mikroorganismů pronikajících do struktury rozkládané hmoty [4,5].

1.2 Depolymerizace

Depolymerizace je proces, kdy vlivem štěpení polymerních řetězců dochází ke snižování jejich molekulové hmotnosti až na monomery, dimery a oligomery. K tomuto rozkladu dochází v důsledku extracelulárních enzymů případně volných radikálů vylučovaných mikroorganismy do prostředí a/nebo vlivem abiotických faktorů jako jsou různé chemické látky, světlo případně teplota. Enzymy katalyzující štěpení řetězců jsou především z tříd hydroláz, lipáz a esteráz [6,7].

1.3 Asimilace

Procesem asimilace dochází k začlenění atomů z fragmentů polymerního materiálu dovnitř mikrobiálních buněk. Principem je přechod ve vodě rozpustných oligomerních a monomerních molekul přes buněčnou cytoplasmatickou membránu a získáním tak potřebných zdrojů energie, elektronů a prvků. Takto získané látky jsou následně oxidovány přes katabolickou dráhu vedoucí k výrobě ATP a stavebních prvků struktury buněk.

Asimilace je důležitá pro růst mikroorganismů a schopnost reprodukovat se za spotřeby živin a substrátů z okolního prostředí [3,8].

1.4 Mineralizace

Jednoduché i složité metabolity (např. organické kyseliny, aldehydy, terpeny, antibiotika, atd.) mohou být vyloučeny do extracelulárního prostředí. Jednoduché molekuly jako oxid uhličitý, dusík nebo voda, případně různé soli z intracelulárních metabolitů podléhají oxidaci a uvolnění do prostředí [3].

1.5 Abiotické faktory

V přirozeném prostředí dochází k biodegradaci vlivem biotických faktorů ovlivněných do značné míry abiotickými. Tyto faktory ovlivňují nebo i zahajují samotný proces biodegradace a depolymerizace, nesmějí být tedy opomenuty. Mezi abiotické faktory řadíme mechanickou degradaci, světelnou degradaci, tepelnou degradaci a chemickou degradaci.

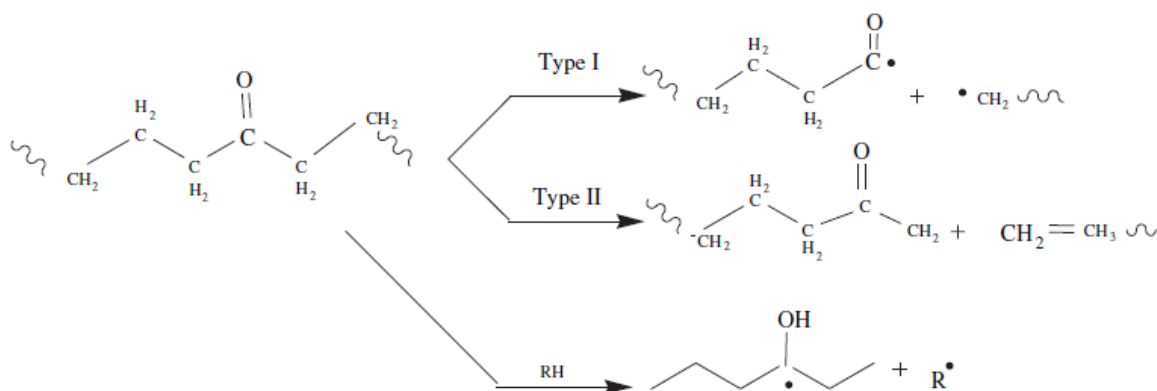
Z hlediska životnosti polymerních materiálů v podobě různých výrobků je sledování vlivu abiotických vlivů velmi důležité, jelikož pokud jsou vystaveny venkovním podmínkám, mohou podléhat transformacím, které mění jejich vlastnosti [9,10].

1.5.1 Mechanická degradace

Mechanická degradace je popisována fyzikálními veličinami, zahrnuje procesy vedoucí k rozpadu polymeru, jako je tlak, napětí nebo smykové síly vznikající vlivem počasí, v důsledku poškození zvířaty nebo stárnutím materiálu. Mechanické síly v procesu biodegradace nejsou majoritní, avšak mohou iniciovat či urychlovat samotný proces [11].

1.5.2 Světelná degradace

Světelná degradace je z abiotických vlivů jedna z nejdůležitějších, jelikož většina polymerních materiálů podléhá v důsledku světelného záření degradaci projevující se ztrátou barevnosti, křehkostí a lámavostí. Ve venkovním prostředí kde je silná intenzita světla ze slunce je fotodegradace polymerních materiálů velmi urychlena. Mechanismus fotodegradace probíhá díky tvorbě nestabilního radikálu absorpcí energie fotonu, což může následně vést k rozštěpení řetězce, a to buď přes Norrish I, anebo Norrish II mechanismus, oxidativní procesy, anebo síťovací reakce v důsledku rekombinace volných radikálů vytvořených z Norrish I mechanismu [12,13].



Obrázek 2 Schéma Norrish I a Norrish II mechanismů a abstrakce atomu vodíku [14]

1.5.3 Tepelná degradace

Obecně platí, že při zvyšující se teplotě se zvyšuje také rychlost degradace. Tepelná degradace termoplastických polymerů nastává při teplotě tání, kdy je polymer transformován z pevného do kapalného skupenství v závislosti na molekulové hmotnosti a krystalizaci. Mechanismem tepelné degradace je oxidace atomů uhlíku v řetězci iniciovaná tepelnou energií, podobně jako u světelné degradace. Při dosažení teploty nižší, než je teplota tání polymeru dochází také k urychlení jiných forem degradace, například oxidativních a hydrolytických [15,16].

1.5.4 Chemická degradace a abiotická hydroláza

Chemická degradace je vzhledem k výskytu atmosférických polutantů a agrochemikálií významným činitelem abiotické degradace polymerů. Mezi jednu z nejsilnějších látek způsobujících degradaci materiálu patří atmosférické formy kyslíku napadajících kovalentní vazby za vzniku volných radikálů, které způsobují zesíťování nebo štěpení řetězců.

Abiotická hydrolýza je závislá na hydrofilitě polymeru, teplotě, pH prostředí, čase a dále na přítomnosti hydrolyzovatelné kovalentní vazby, které se nacházejí ve skupinách esterových, etherových, anhydridových, amidových, karbamidových (močovina), esteramidových (uretan), aj, proto při výrobě materiálů s kontrolovanou životností je třeba volit specifické monomery za účelem získání kopolymeru s požadovanými vlastnostmi, jelikož oxidativní a hydrolytické degradace probíhají snadněji v amorfních částech molekuly [17].

2 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ BIODEGRADACI POLYMERŮ

Mechanismus biodegradace je ovlivňován mnoha faktory, jako jsou například chemické a fyzikální vlastnosti polymerů, plocha povrchu, hydrofilní a hydrofobní vlastnosti, chemická struktura, molekulová hmotnost a její distribuce, teplota skelného přechodu a tání, modul pružnosti nebo krystalinita a krystalová struktura [13].

Nemalý vliv na biodegradabilitu polymeru mají také environmentální faktory, především vlhkost, teplota, pH, přítomnost nebo absence kyslíku, salinita a obsah nutrientů potřebných pro enzymatické reakce mikroorganismů. Při testování biodegradace polymerů musejí být všechny tyto parametry zohledněny [14].

2.1 Molekulová hmotnost

Rychlost biodegradace může být zásadně ovlivněna molekulovou hmotností a její distribucí. U makromolekul závisí biodegradabilita na jejich velikosti a větvení, tedy zvýšením molekulové hmotnosti se snižuje biodegradabilita polymeru, podobně jako rozvětvenost polymeru má za následek zhoršenou dostupnost enzymů mikroorganismů, které často působí specificky vůči konfiguraci a chemické struktuře řetězce polymeru. Rozklad polymerních látek tvořených řetězcí opakujících se základních jednotek probíhá postupně od konců odštěpováním příslušných monomerů, případně jiných nízkomolekulárních fragmentů [15,16].

2.2 Krystalinita a pohyblivost polymerních řetězců

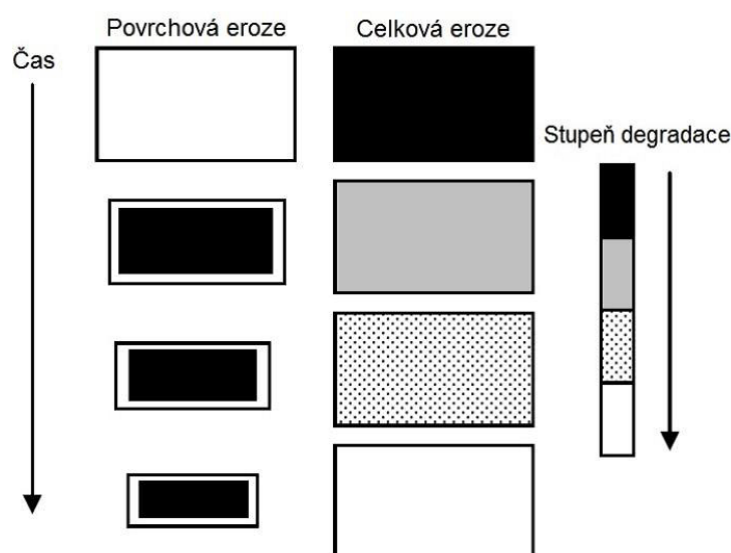
Mobilita polymerních řetězců je používána jako obecný kontrolní faktor při biodegradaci polyesterů. Jedná se o schopnost segmentů řetězce polymeru se dočasně vzdálit od tzv. „začleněného krystalu“. Jelikož enzymy vylučované mikroorganismy způsobující rozklad polyesterů jsou lipázového charakteru, musejí být řetězce polymerů značně pohyblivé k dosažení aktivního místa katalytického centra, obvykle situovaného hluboko v dutině proteinové struktury [17].

Pohyblivost polymerních řetězců je závislá především na krystalinitě polymerů a rozdílem mezi teplotou degradace a teplotou tání krystalické struktury. Vysoce mobilní řetězce polymerů se vyskytují především v amorfních částech polymeru nad teplotou skelného přechodu, jsou tedy i rychleji degradovány. Oproti tomu vysoce organizované krystalické struktury zabraňují šíření molekul kyslíku a vody v polymeru, a tím dochází k výrazné retardaci biodegradace i chemické degradace [18].

2.3 Specifický povrch

Je obecně známo, že větší specifický povrch vede i k rychlejší biodegradaci, podobně jako hrubší materiály, umožňující lepší uchycení mikroorganismů na povrchu a pravděpodobně i snadnějšímu navázání enzymů [19].

Biodegradabilní materiály podléhají dvěma typům eroze. Homogenní, neboli celková eroze je způsobena rychlejším průnikem vody do polymeru než jeho povrchovou degradací, oproti tomu povrchová eroze se vyznačuje pomalejším průnikem vody do celkového průřezu polymeru, a tím dochází k rychlé degradaci povrchové části, zatímco jádro zůstává takřka neporušené. Velmi zřídka se však tyto mechanismy vyskytují samostatně, u většiny polymerních látek pozorujeme erozi obou mechanismů, přičemž specifický povrch je majoritním vlivem [20]. Rozdíl mezi oběma mechanismy je znázorněn na Obr 3.



Obrázek 3 Grafické znázornění povrchové a celkové eroze polymeru [21]

2.4 Aditiva

Polymerní látky vyrobené z čistých přírodních složek nevynikají dobrými mechanickými vlastnostmi a často jsou modifikovány přísadami polymerních aditiv, jako jsou kondenzační činidla, plnidla, změkčovadla, katalyzátory pigmenty a mnoho dalších. Tyto aditiva však mohou mít i vliv na biodegradabilitu materiálu [22].

V rozvoji plastických hmot hraje zlepšení vlastností biopolymerů aditiva podstatnou roli. V počátcích výroby plastických hmot byly nejrůznější aditiva používány především k udržení vlastností polymeru a k jeho zachování při transformačních tepelných procesech. Novější generace aditiv pro-

půjčila polymerům vyšší houževnatost zlepšením chemických a fyzikálních vlastností. Mezi tyto aditiva řadíme antioxidanty, tepelné stabilizátory, světelné stabilizátory a mnoho dalších. V současné době je na aditiva kladen vysoký nárok, vzhledem k novým technologiím zpracování a využití produktů nebo v otázkách týkajících se životního prostředí [23].

3 BIODEGRADABILNÍ POLYMERY

Biodegradabilní plasty jsou plastické hmoty vyráběné z biomasy většinou s přidavkem aditiv. Jejich vlastnosti jsou velmi podobné běžným plastickým látkám, avšak nejsou stejně odolné vůči dlouhodobým vlivům prostředí, jejich používání je tedy menší zátěží pro životní prostředí.

Evropským výborem pro normalizaci (CEN) jsou definovány jako: „rozložitelné plasty, ve kterých jsou výsledky degradace ve fragmentech s nižší molekulovou hmotností produkovány působením přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, jako jsou bakterie, houby a řasy [24].“

Jedná se tedy o skupinu polymerních látek, které jsou za stanovených podmínek zcela rozložitelných mikroorganismy. za aerobních či anaerobních podmínek na biomasu, oxid uhličitý, methan, vodu a minerální látky, beze zbytku potenciálně škodlivých látek [25].

Výhodou produktů vyrobených z BDP je právě biologická degradabilita a kompostovatelnost. K nejúčinnějšímu rozkladu dochází za působení půdních bakterií, vyšší teploty a vlhkosti, za dostatečného přístupu vzduchu. V průmyslových kompostárnách dochází k přeměně na kvalitní biomasu a humus, který je možné dále využít jako náhradu průmyslových hnojiv. Doba rozkladu je ovlivnitelná již zmíněnými podmínkami a tloušťkou stěny kompostovaného produktu. V průmyslových kompostárnách trvá v řádu několika týdnů.

3.1 Legislativa upravující prostředí týkající se biodegradabilních plastů

Biodegradabilní plasty a plastové obaly používané v ČR podléhají několika normám, zde je jejich výčet:

Česká technická norma ČSN EN ISO 20200 Plasty - Stanovení stupně rozkladu plastů za simulovaných podmínek kompostování v laboratorním měřítku.

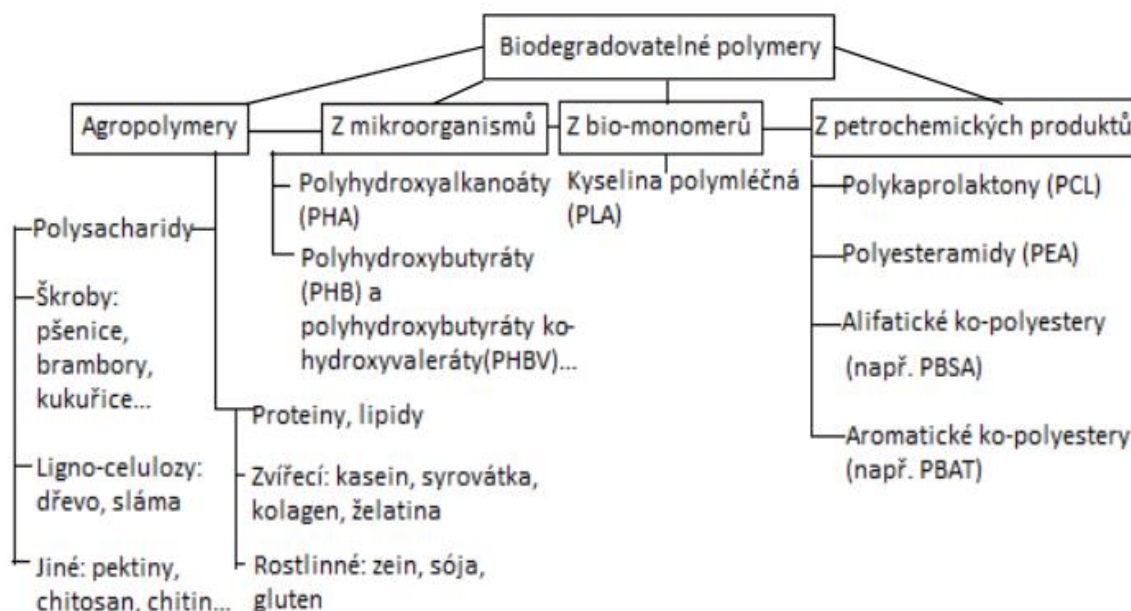
Česká technická norma ČSN EN 14806 Obaly - Předběžné hodnocení rozpadu obalových materiálů v modelových podmínkách kompostování v laboratorním měřítku.

Česká technická norma ČSN EN 14045 Obaly - Hodnocení rozpadu obalových materiálů pomocí prakticky zaměřených zkoušek při definovaných podmínkách kompostování.

Česká technická norma ČSN EN 13432 Obaly - Požadavky na obaly využitelné ke kompostování a biodegradaci - Zkušební schéma a kritéria hodnocení pro konečné přijetí obalu.

3.2 Klasifikace biodegradabilních polymerů

Biodegradabilní polymery mohou být děleny podle svého původu, a to na agropolymery, polymery získané z mikroorganismů, z bio-monomerů a z petrochemických produktů [25].



Obrázek 4 Klasifikace biodegradabilních polymerů [25]

Biodegradabilní agropolymery [2]:

- *Termoplastický škrob*

Modifikovaný škrob je látka s vysokým potenciálem pro obalový průmysl, získávaný z kukuřice, brambor nebo pšenice. Vzhledem k jeho hydrofilitě a nedostatečným mechanickým vlastnostem je nutno nativní škrob hydrofobizovat přísadami a modifikací.

- *Proteiny*

Bílkoviny jsou tvořeny polárními a nepolárními aminokyselinami spojenými peptidovou vazbou. Ve většině případů se jedná o látky nerozpustné a netavitelné a při jejich zpracování na bioplasty je používáno stejných technologií jako pro výrobu termoplastů syntetických, kdy se bílkoviny mísí se změkčovadly.

Biodegradabilní polymery z mikroorganismů [25]

- *Polyhydroxyalkanoát, polyhydroxybutyrát*

Polymery vyskytující se především u modrozelených řas, cyanobakterií a bakterií kmene *Alcaligenus*, uložené ve formě granulí v cytoplazmě. Jsou získávány separačními mechanicko-fyzikálními postupy za použití enzymů a následným propíráním v organickém rozpouštědle. Některé typy výsledných biopolymerů jsou díky svým vlastnostem používány jako elastomery a nahrazují tak kaučuk, např. 3-hydroxybutyrát má pak vlastnosti a chemickou strukturu spíše povahy polyesteru.

Biodegradabilní polymery z bio-monomerů

- *Kyselina polyléčná*

Nejrozšířenější karboxylová kyselina v přírodě vyskytující se v L+ a D- formě. Průmyslově je vyráběna dvěma způsoby, a to aerobní či anaerobní fermentací sacharidů pomocí mikroorganismů nebo chemickou syntézou kyseliny mléčné. Výsledný polymer má vlastnosti blízké polystyrenu nebo polyethylentereftalátu.

Biodegradabilní polymery z petrochemických produktů [26]:

- *Alifatické polyestery a kopolyestery*

Látky připravené z kombinace diolů a dikarboxylových kyselin. Jejich biodegradabilita je ovlivněna strukturou použitých výchozích látek. Pro snížení krystalinity, a tím i usnadnění degradace bývá při výrobě přidávána kyselina adipová.

- *Aromatické kopolyestery*

Aromáty oproti alifatickým polyesterům často obsahují kyselinu tereftalovou, které ovlivňuje některé fyzikální vlastnosti jako je teplota tání, avšak způsobuje i pokles rychlosti biodegradace.

- *Polykaprolaktony*

Jedná se o syntetické polyestery, které mohou být asimilovány a mineralizovány mikroorganismy. Díky svým dobrým zpracovatelským vlastnostem a biodegradabilitě nacházejí uplatnění ve velkém množství aplikací, jako jsou obalové materiály nebo kapsle s řízeným uvolňováním.

- *Polyesteramidy*

Polymery s vysokou krystalinitou polyamidů, které jsou hůře degradovatelné mikroorganismy. Pro zlepšení dostupnosti degradérů jsou do struktury zaváděny postranní skupiny např. hydroxylové, methylové a jiné.

Polymery z obnovitelných zdrojů se vyrábějí třemi způsoby [27]:

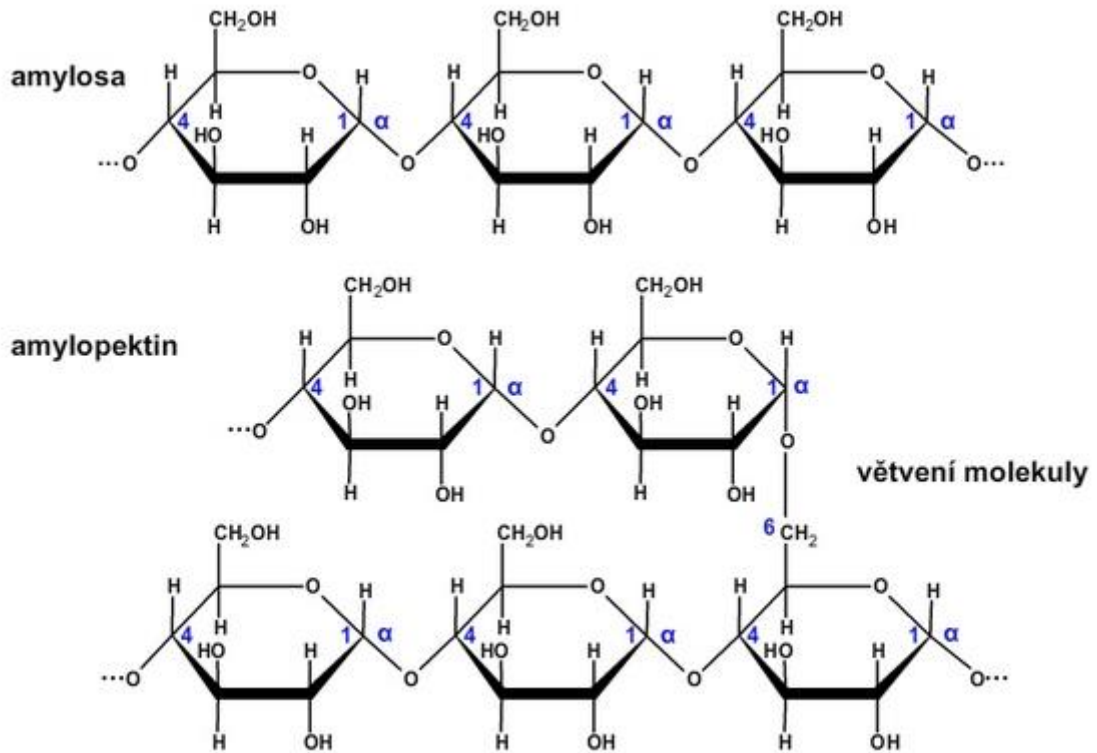
- Modifikací přírodních polymerů, které však z větší části zůstávají beze změny (polymery na bázi škrobu)
- Fermentací biomonomerů s následnou polymerací (PLA)
- Simulovanou produkcí biopolymerů v mikroorganismech nebo geneticky modifikovaných plodinách (polyhydroxyalkanoáty)

Biodegradabilní polymerní materiály mohou být připraveny pomocí následujících procesů [26]:

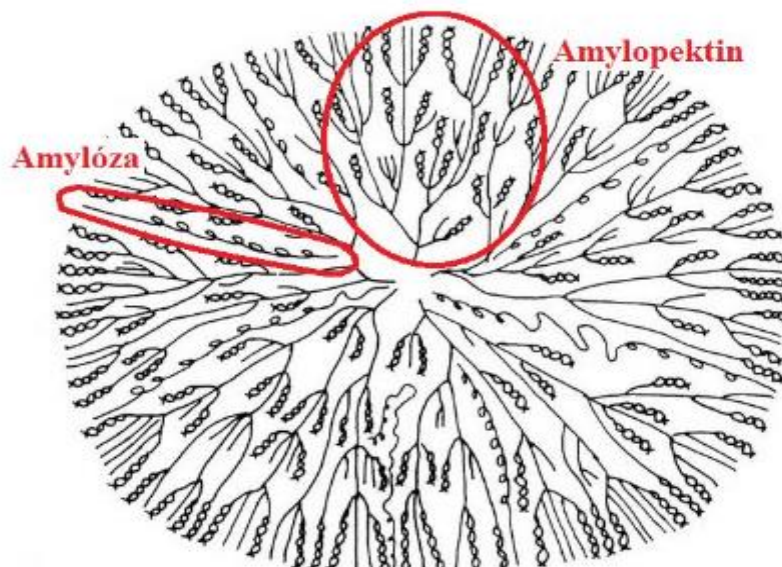
- Biotechnologická cesta (extrakce, fermentace)
- Míchání (např. škrob-polykaprolaktonové směsi)
- Příprava přímo z biomasy (např. extrakce škrobu)
- Konvenční syntéza
 - Polymerizace neobnovitelných monomerních surovin
 - Polymerizace obnovitelných vstupních surovin

3.3 Škrob a jeho modifikace

Škrob je přírodní polymer skládající se ze dvou polymerů D-glukózy- lehce rozvětvené amy-
lózy s malým počtem dlouhých řetězců a vysoce rozvětveného amylopektinu.



Obrázek 5 Základní stavební jednotky škrobu [28]



Obrázek 6 Struktura škrobového zrna [29]

Má široké využití v potravinářském a zpracovatelském průmyslu, díky jeho biologické rozložitelnosti, hygienické nezávadnosti a specifickým technologickým vlastnostem. Jedná se o snadno dostupný a levný polymer, bývá tedy přidáván do matric syntetických polymerů a snižuje tak výslednou cenu produktu [29].

V posledních letech se upírá pozornost na modifikace škrobu za účelem získání přírodního polymeru s vlastnostmi syntetického. Termoplastický škrob bývá vyráběn stejnou technologií jako umělé polymery, kdy v extrudéru dochází za vysoké teploty a tlaku k destrukci struktury nativního škrobu za přidání vody a glycerolu jako měkčidla. Následné tvarování tovaru pak probíhá běžnými postupy jako je lití, vstřikování nebo vyfukování [30].

Biodegradace škrobu je ovlivněna řadou faktorů, od samotného způsobu zpracování, především teploty skelného přechodu až po typ a množství přidaného změkčovadla. Obsah glycerolu může mít negativní vliv na poměr indexu rozpustnosti ve vodě a indexu absorpce vody. Ideálním stavem u TPS je pokud vykazují vyšší nasákavost a nižší rozpustnost. Poměr škrobu a glycerolu jako změkčovadla byl zkoumán v několika experimentech a v závěrech se uvádí ideální hodnota jako 80:60 (škrob: glycerol) s přídavkem 6 % vody [31,32].

Uplatnění obalů a jiných aplikací z TPS je omezeno špatnými bariérovými a mechanickými vlastnostmi a také poměrně silně hydrofilním charakterem škrobu. Fólie se pak vyznačují křehkostí, malou rozměrovou stabilitou, absorpcí vlhkosti a retrogradací (tento jev je vysvětlen níže).

3.3.1 Modifikace organickými kyselinami a jejich deriváty

Acetylace škrobu

Acetylované škroby mají hydroxylové skupiny glukozových jednotek substituovány acetylovými skupinami, jejichž počet je závislý na typu a podmínkách reakce, tj. koncentraci, pH a době reakce, popřípadě přítomnosti katalyzátorů.

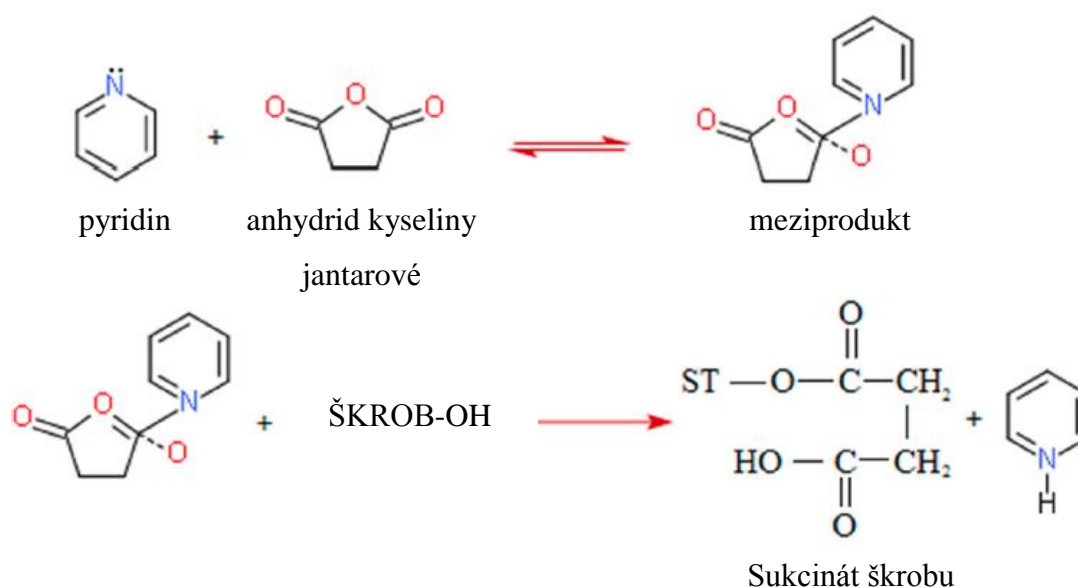
Vliv reakčního činidla zkoumali Bello-Perez et al., kteří vyrobili substituovaný acetylovaný škrob reakcí 8 ml anhydridu kyseliny octové na 1 g škrobu ve vodném prostředí s NaOH jako katalyzátorem. Zvýšení koncentrace reagujících složek pak pozitivně ovlivnilo účinnost reakce. Takto prováděné reakce však mají za následek nízký stupeň substituce hydroxylových skupin (SHS 0,01-0,2) [34].

Diop a kol. uvádějí, že acetylované škroby různými poměry kyseliny octové a anhydridu kyseliny octové (2:1 a 1:2) měly stejný SHS (2,656), zatímco ve směsi s poměrem kyseliny octové a jejího anhydridu 1:1 byl dosažen SHS 2,934. Nejnižší substituce pak nastala pouze za použití

anhydridu kyseliny octové a to SHS 1,837. Tyto výsledky ukazují, že typ činidla a jeho poměry mají vliv na acetylaci škrobu [35].

Succinylace škrobu

Modifikace škrobu succinylací probíhá reakcí anhydridu kyseliny jantarové a pyridinu zahříváním na teplotu 115 °C pod zpětným chladičem. Pyridin plní funkci katalyzátoru, neboť reaguje s anhydridem kyseliny jantarové za vzniku meziprojektu, který reaguje se samotným škrobem.



Obrázek 7 Modifikace škrobu succinylací [36]

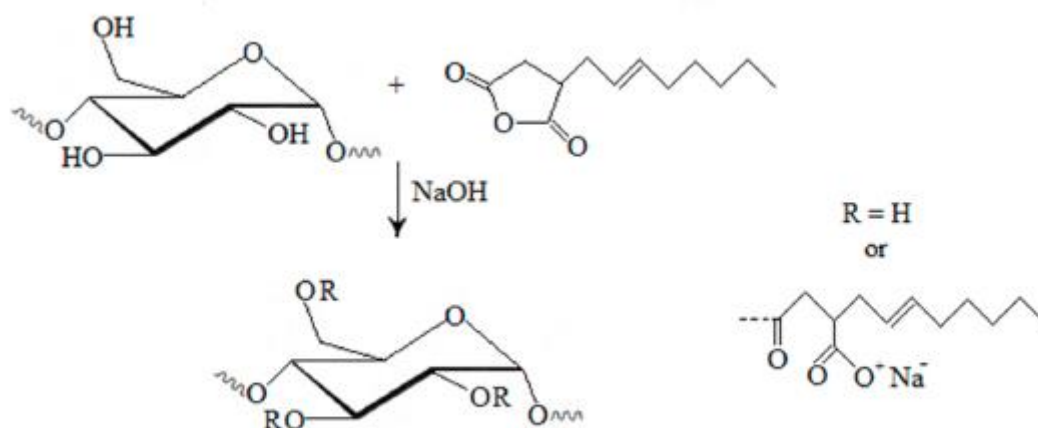
K dosažení úplné reakce pyridinu musí být jeho množství vzhledem ke škrobu v poměru 2:1 a také musí být zajištěny optimální podmínky reakce. Nevýhodou je neekonomičnost procesu, vzhledem k vysoké ceně pyridinu a také jeho toxicita.

Účinnost succinylace je ovlivněna několika faktory, především velikostí zrn použitého škrobu, činidly a reakční dobou [36].

Modifikace kyselinou oktenyl-jantarovou

Modifikované škroby jsou vyráběny esterifikací s kyselinou oktenyl-jantarovou ve vodném prostředí za alkalických podmínek, avšak takto prováděné reakce jsou poměrně málo účinné, proto byly prováděny alternativní postupy s pyridinem a chloridy kyselin, což však vedlo k vysoké tvorbě vedlejších produktů [37].

Wang et al. se zabýval studií, při níž byly škrobová zrna narušena ultrazvukem, čímž došlo k průniku kyseliny oktenyl-jantarové hluboko do struktury, a tím bylo zajištěno zvýšení účinnosti reakce a zlepšení mechanických vlastností takto připraveného modifikovaného škrobu [38,39].



Obrázek 8 Modifikace škrobu kyselinou oktenyl-jantarovou [37]

3.3.2 Plastifikace škrobu

Pro škrobové zrno je charakteristický výskyt krystalické i amorfni fáze. Průmyslové zpracování je usnadněno převedením této struktury pouze do homogenní amorfni matrice pomocí termomechanického zpracování. Nejběžnější průmyslovou metodou je extruze, kdy jsou škrobová zrna vystavena vysoké teplotě spolu s mechanickým působením za vzniku amorfni homogenní hmoty.

Plastifikaci škrobu je možné uskutečnit v rozmezí teplot 220-240 °C, avšak k jeho degradaci dochází již při 200-220 °C. Aby bylo možné škrob plastifikovat, je nutné snížit teplotu skelného přechodu pomocí tzv. plastifikátoru, jinak by docházelo k degradaci škrobu dříve, než by byl zcela zhomogenizován na amorfni produkt. Plastifikátor je charakterizován jako nízkomolekulární látka, která se přidává do termomechanického procesu zpracování škrobu za účelem zvýšení plastičnosti a zpracovatelnosti polymeru. V principu plastifikátor proniká mezi molekuly škrobu a rozrušuje jeho vodíkové vazby mezi jednotlivými řetězci, které se od sebe oddalují a tím zajistí vyšší plasticitu a modul pružnosti.

Jako plastifikátory jsou používány látky s hydroxylovou skupinou, nejběžněji je to voda, glycerol, sorbitol aj. Nejúčinnějším plastifikátorem je voda, avšak její obsah ve škrobu je závislý na podmínkách okolí, a tedy velmi nestálý. Proto se nejvíce používá plastifikace pomocí glycerolu, který není těkavý jako voda, avšak má oproti ní nižší plastifikační schopnosti [40].

3.3.3 Retrogradace škrobu

Je-li škrob zahříván v přítomnosti vody a následně ochlazen, dochází k přerušení amyložových a amylopektinových řetězců, které se postupně opět spojují do uspořádané struktury, tento proces se nazývá retrogradace. Jedná se o nevratný proces, probíhající zpočátku jako rychlá rekrytalizace molekul amyložy s následnou pomalou rekrytalizací amylopektinu. Obvykle je doprovázena řadou fyzikálních změn, např. zvýšením viskozity, zákalu nebo tvorbě výpotku vody [41,42].

3.3.4 Použití materiálů s obsahem plastifikovaného škrobu

Modifikované škroby mají širokou škálu využití. Nejčastěji bývají smíchány s jinými plasty, např. PE, PVC nebo PVA, čímž dochází ke snížení ceny komerčního produktu, ale i ke zvýšení jeho biorozložitelnosti. Společnost Novamont vyrábí směs termoplastického škrobu a PCL, pod komerčním názvem Mater-Bi®. Vzhledem k dobré zpracovatelnosti materiálu, je možné vyrábět především poháry, fólie či nákupní tašky metodou vyfukování, vstřikování a lisování.

Fólie vyrobené mísením škrobu a biodegradabilních materiálů vykazují velmi dobré mechanické vlastnosti, jsou propustné pro kyslík a vodní páry, mají velkou pevnost a odolnost vůči ohybu. Díky těmto vlastnostem jsou v posledních letech využívány v zemědělství a lesnictví, ať už jako mulčovací fólie, nebo nádoby na výsadbu rostlin.

Biopolymery na bázi škrobu nacházejí uplatnění i v medicínských aplikacích díky jejich biokompatibilitě s organismem, proto mohou být použity jako implantáty, matrice pro postupné uvolňování léků nebo absorbovatelné chirurgické nitě [40,43].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJE

4.1 Chemikálie

$(C_6H_{10}O_5)_n$	Škrob
C_2H_6O	Ethanol
H_2O	Destilovaná voda
KH_2PO_4	Dihydrogenfosforečnan draselný
$Co(NO_3)_2 \cdot 6 H_2O$	Dusičnan kobaltnatý hexahydrát
He	Helium
$Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$	Hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
NH_4Cl	Chlorid amonný
NaCl	Chlorid sodný
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	Chlorid vápenatý dihydrát
H_3BO_3	Kyselina boritá
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	Molybdenan amonný tetrahydrát
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	Síran hořečnatý heptahydrát
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	Síran manganatý pentahydrát
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	Síran měďnatý pentahydrát
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	Síran zinečnatý heptahydrát
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6 H_2O$	Síran železnato - amonný hexahydrát

Všechny použité chemikálie v laboratorních testech byly čistoty p.a. od firmy Fluka a PENTA

Dále byly pro molekulárně biologické metody použity tyto látky:

DNA Marker GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific)

Power Soil DNA Isolation Kit (Mo Bio)

Primery FD1, RD1, 341F, 907R (SIGMA)

Voda pro molekulárně biologické metody (Sigma – Aldrich®)

4.1.1 Příprava minerálního média

Pro přípravu minerálního média byla připravena série následujících zásobních roztoků.

Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,1 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,3 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok KH_2PO_4

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,9 g KH_2PO_4 a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 0,1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok NaCl

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 5 g NaCl a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 2,4 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok NH_4Cl

Do odměrné baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 3 g NH_4Cl a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Roztok stopových prvků

Pro přípravu zásobního roztoku o objemu 1 l bylo naváženo:

$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,025 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,040 g
H_3BO_3	0,057 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,043 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043 g

Všechny navážky byly nejprve rozpuštěny v příslušném množství destilované vody a důkladně promíchány.

Minerální médium

Pro přípravu 200 ml minerálního média bylo pipetováno:

Roztok $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2 ml
Roztok $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	2 ml
Roztok KH_2PO_4	4 ml
Roztok $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	2 ml
Roztok NaCl	2 ml
Roztok $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	16 ml
Roztok NH_4Cl	2 ml
Roztok stopových prvků	0,4 ml

Jednotlivé roztoky byly nejprve smíchány a poté doplněny destilovanou vodou na požadovaný objem 200 ml. Následovala sterilizace roztoku v autoklávu při teplotě 125 °C po dobu 30 minut.

4.2 Přístroje a zařízení

Analytické váhy KERN 770, Německo

Aseptický laminární box Bio II A

Automatické pipety, Nicciipet (Eppendorf AG) - 2, 10, 20, 100, 200, 500 a 1000 µl

Box Aura PCR BIOAIR MP-300N (Major Science)

Centrifuga MiniSpin plus (Eppendorf AG)

DGGE – Cipher genetic analysis systém 2401-110 (C.B.S. Scientific Company)

Infračervený spektrometr Nicolet IS 10

Laboratorní předvážky KERN 440-47

Mikrovlonná trouba (Electrolux)

Mikrozkumavky (Eppendorf AG)

Plynotěsná laboratorní injekční stříkačka Hamilton, Bonaduz, Švýcarsko

Plynový chromatograf 7890 A, Agilent Technologies

Sterilní špičky různých velikostí (Bioplastic)

Sterilní špičky s filtrem ExpellPlus (CAPP Aps)

Trouba Mora 524

Tedlarový vak o objemu 0,5

UV-Transiluminátor, InGeniusLHR (Syngene)

UV/VIS spektrometru TECAN Infinite® 200 PRO NanoQuant

Vortex Genie® 2 Vortex (MO BIO)

Vortex V-1 plus (Biosan)

Ostatní pomůcky, běžně dostupné v každé chemicko-analytické laboratoři.

4.3 Vzorky

Testované materiály byly připraveny ve spolupracující laboratoři lisováním vzniklého plastifikovaného materiálu do desek o tloušťce 2 mm.

Dodány byly ve třech sériích s různou modifikací termoplastického škrobu, obsahem plniv a plastifikátorů.

Tabulka 1 Charakteristika analyzovaných biodegradabilních vzorků

Série	Značení	Škrob [%]	G [%]	Plnivo M [%]	P1 [%]	P2 [%]	Celulosa [%]	SM
I.	ŠP-0	70	30	-	-	-	-	-
I.	ŠP-1	70	30	-	-	-	-	-
I.	ŠPM/LOW	70	20	-	10	-	-	0,8
I.	ŠPM/HIGH-1	70	20	-	10	-	-	1,2
I.	ŠPM/HIGH-2	70	20	-	10	-	-	1,5
I.	ŠP 10 % CELULOSY	63	27	-	-	-	10	-
I.	ŠP 20 % CELULOSY	55	24	-	-	-	21	-
I.	ŠPM 7,5 % CELULOSY	66	18	-	9	-	7	1,1
I.	ŠPM 15 % CELULOSY	61	16	-	8	-	15	0,7
II.	ŠPM-P2-1	100	-	-	-	30	-	2,5
II.	ŠPM-P2-2	100	-	-	-	30	-	2,6
II.	ŠPM-P2M-1	30	-	70	-	30	-	2,6
II.	ŠPM-P2M-2	50	-	50	-	30	-	2,6
II.	ŠPM-P1M	50	-	50	30	-	-	2,6
III.	ŠPM-30 % P1/DRY	x	-	---	30	-	-	---
III.	ŠPM-25 % P1/WET	x	-	---	25	-	-	---
III.	ŠPM-30 % P1-H	x	-	---	30	-	-	---
III.	ŠPM-30 % P2-H	x	-	---	-	30	-	---

Legenda:

G..... plastifikátor používaný u čistého nemodifikovaného škrobu

M.....plnivo na bázi oligosacharidu

P1, P2.....plastifikátory používané u modifikovaného škrobu

ŠP.....škrob plastifikovaný

ŠPM.....škrob plastifikovaný modifikovaný

SM.....stupeň modifikace

Vzorky byly rozděleny do tří sérií, kdy v první etapě byly připraveny polymery bez modifikace nebo s nízkým stupněm modifikace do 1,5. V této sérii byly také vyrobeny polymery s různými přísadami celulózy jako plniva.

Druhá série obsahuje vzorky s vyšším stupněm modifikace (2,5-2,6). Je zde použito plnivo na bázi oligosacharidu a plastifikátory.

K třetí sérii nebyly dodány podklady o úplném složení, proto je uveden pouze obsah některých látek a opět se jedná o plastifikované škroby s vyšším stupněm modifikace (obsažené látky o neznámém procentuálním zastoupení značí „x“ v tabulce).

5 METODY PRO CHARAKTERIZACI VZORKŮ

5.1 Sledování aerobní biodegradace v prostředí kompostu

Příprava bioreaktorů

Jako bioreaktory byly použity skleněné lahve o objemu 500 ml a objemu plynné fáze 580 ml, opatřené plastovým uzávěrem se septem pro odběr plynné fáze. Lahve byly před vlastním testováním důkladně vmyty roztokem kyseliny chlorovodíkové a vysušeny. Uzávěry byly sterilizovány pod UV zářením po dobu 30-ti minut.

5.1.1 Obsah bioreaktorů

- Kompost (vyzrálý zahradnický substrát)
- Agroperlit
- Minerální médium
- Vzorek fólie

5.1.2 Příprava substrátu

Jako substrát byl použit zahradnický kompost značky Agro (Agro CS a.s., Česká Skalice) s obsahem zkompostovatelných surovin rostlinného původu, humusu a přísadkem dolomitického vápence.

5.1.3 Příprava perlitu

Perlité byl použit značky AGROPERLIT (Perlité s.r.o., Šenov u Nového Jíčina). Jedná se o tepelně zpracovanou vulkanickou horninu, která slouží jako pomocná půdní látka. Před jeho aplikací do bioreaktorů byl řádně pomyt destilovanou vodou a následně vysušen v sušárně při 105 °C.

5.1.4 Příprava minerálního média

Minerální médium v bioreaktorech slouží jako zdroj živin a zároveň také zvlhčuje laboratorní prostředí pokusu. Jeho příprava je popsána v kapitole 4.1.1.

5.1.5 Aerobní biodegradace

Laboratorní testování aerobní biodegradace polymerů bylo provedeno v prostředí kompostu. Vzorky ve formě fólií byly nastříhány na kousky o velikosti cca 5x5 mm. Do aseptických reaktorů byl navážen vyzrálý kompost a perlité, každý v množství 5 g ± 0,01 g a foliované vzorky v množství 0,1

g vážené na analytických vahách s přesností $\pm 0,0001$ g. K obsahu bioreaktorů bylo přidáno 5 ml minerálního média.

Připravená biodegradace byla provedena pro každý vzorek paralelně 3x vedle sebe. Dále byly stejným způsobem měřeny i slepé pokusy a 4x paralelně vedle sebe pokusy se škrobem, které sloužili jako pozitivní kontrola. Inkubace takto připravených reaktorů probíhala bez přístupu světla při teplotě $58 \pm 2^\circ\text{C}$.

5.1.6 Postup odběru a analýza oxidu uhličitého plynovou chromatografií

Před samotným odběrem plynu byly inkubované lahve nejdříve ochlazeny na laboratorní teplotu. Následně bylo přes septum v uzávěru lahve pomocí injekční mikrostříkačky odebráno 100 μl plynu, který byl nastříknut do plynového chromatografu GC Agilent 7890 A. Analýza byla provedena na dvou skleněných náplňových kolonách délky 1,829 m zapojených do série. Jako první se analyzoval CO_2 na koloně s náplní Porapak Q (velikost částic 80/100 MESH) a následně došlo k přepnutí ventilu na druhou kolonu s molekulovým sítem (velikost částic 60/80 MESH), kde následovala analýza O_2 , která sloužila jako kontrola aerobních podmínek (obsah oxidu uhličitého nesmí převyšovat obsah kyslíku). K přepínání ventilů mezi kolonami docházelo pomocí tlakového dusíku resp. vzduchu. Jako nosný plyn sloužilo helium (He) čistoty 4,6. K detekci složek byl použit tepelně vodivostní detektor (TCD).

K vyhodnocení signálů byl použit program Agilent ChemStation a později Clarity. Vyhodnocení bylo prováděno metodou přímé kalibrace za použití plynného standardu.

5.1.7 Provzdušňování bioreaktorů

Po odběru plynu pro analýzu byly bioreaktory provzdušňovány vzduchem vháněným silikonovými trubičkami připojenými k čerpadlům. Vzduch byl čištěn pomocí série absorberů s 5M roztokem NaOH, kde docházelo k záchytu atmosférického CO_2 , dále pak absorber s destilovanou vodou a absorberem s 0,05 M $\text{Ba}(\text{OH})_2$, sloužící jako pojistka při vyčerpání veškerého roztoku hydroxidu sodného. Provzdušňování bylo prováděno po dobu 20 min. Následně byly inkubační lahve umístěny zpět do termoreaktoru.

5.1.8 Vyhodnocení naměřených dat

- Denní produkce C vyjádřená ve formě CO₂

$$m_{(d)c} = \frac{M_c \cdot p}{R \cdot T} \cdot \frac{V_g}{1000} \cdot w(CO_2) \cdot \frac{V_{St}}{S_{St}} \cdot \frac{S_{Vz}}{V_{Vz}} \quad (1)$$

Kde:

$m_{(d)c}$ množství vyprodukovaného uhlíku ve formě CO₂ [mg]

M_c atomární hmotnost uhlíku [g·mol⁻¹]

p atmosférický tlak v okamžiku provzdušování [kPa]

R molární plynová konstanta [J · K⁻¹ mol⁻¹]

T termodynamická teplota v okamžiku provzdušování [K⁻¹]

V_g plynný objem biometrické láhve [ml]

$w(CO_2)$ množství CO₂ v kalibračním plynu [%]

V_{St} dávkovaný objem plynné fáze standardu [μl]

S_{St} signál detektoru pro standard [μV · s]

V_{Vz} dávkovaný objem plynné fáze vzorku [mg]

S_{Vz} signál detektoru pro vzorek [mg]

- Kumulativní produkce C vyjádřená ve formě CO₂ (platí pouze v případě provzdušování lahví, v opačném případě ke kumulativní produkce shodná s produkcí denní)

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

Kde:

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

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

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

- Substrátová produkce C je vyjádřena jako kumulativní produkce CO₂ v bioreaktorech se vzorky snížené o produkci CO₂ ze slepých stanovení.
- Procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂

$$D_c = \frac{n_{(s)c}}{m_c \cdot TC} \quad (3)$$

Kde:

D_c procentuální mineralizace uhlíku z hlediska produkce CO₂ [%]

$n_{(s)c}$ substrátová produkce uhlíku ve formě CO₂ [mg]

m_c hmotnost testovaného materiálu [mg]

TC obsah celkového uhlíku v testovaném materiálu [kPa]

5.2 Infračervená spektrometrie s Fourierovou transformací

Infračervenou spektroskopií s Fourierovou transformací (FTIR) a technikou zeslabeného úplného odrazu (ATR) byly na přístroji Nicolet IS10 získány spektra vzorků v rozsahu vlnočtu od 500 do 4000 cm⁻¹.

Získaná spektra byla měřena při spektrálním rozlišení 4 cm⁻¹ u všech vzorků v původním stavu.

5.3 Molekulární metody využití k identifikaci vzorků

U pěti vzorků byla provedena identifikace degradérů za pomoci molekulárně biologických metod. Vzorky byly vybrány vzhledem k jejich chemickému složení tak, aby byla zajištěna nejvyšší pravděpodobnost rozmanitosti identifikovaných mikroorganismů podílejících se na degradaci materiálu.

5.3.1 Lyze buněk degradérů

Vytipované vzorky byly nastříhány na velikost cca 5 x 5 mm a kompostovány po dobu 8 dnů. Degradované zbytky pokryté biomasou byly lehce očištěny a vneseny do rozbíjecí zkumavky. K izolaci bakteriálních konsorcií byl použit komerční půdní kit PowerSoil™ DNA Isolation Kit, využívající mechanické a chemické denaturace.

Nejdříve bylo přidáno 60 μ l roztoku s označením C1 (převážně aniontový detergent SDS rozrušující mastné kyseliny a lipidy v buněčné membráně). Rozbíjecí zkumavka byla vortexována po dobu 10 minut, kdy došlo k celkové homogenizaci a buněčnému rozkladu. Získaný supernatant byl přenesen do čisté mikrozukavky a přidáno 250 μ l roztoku s označením C2 (komerční roztok srážející vnitrobuněční látky kromě DNA). Suspenze byla vortexována po dobu 5 sekund a inkubována 5 minut při teplotě 4 °C. Následovala 1 min centrifugace při 10 000 x g.

Čistý supernatant byl přenesen do čisté mikrozukavky a přidáno 200 μ l roztoku s označením C3 (srážedlo organických a anorganických látek) a krátce vortexován, inkubován a centrifugován jako v předešlém kroku.

Čistý supernatant (750 μ l) byl opět přenesen do 2 ml mikrozukavky, přidáno 1200 μ l roztoku C4 (koncentrovaný solný roztok srážející DNA) a krátce vortexován.

Do kolonky s křemičitou membránou bylo přeneseno celé množství získané suspenze, která byla následně 1 min při 10 000 x g centrifugována.

Dále bylo přidáno 500 μ l roztoku C5 (roztok na bázi ethanolu) pro odstranění zbývajících nečistot navázaných na membráně. Kolonka byla opět centrifugována a následně přenesena do čisté 2 ml mikrozukavky. Nakonec byla DNA navázaná na membráně eluována 30 μ l roztoku C6 a ponechána 5 min stát. Po centrifugaci byla kolonka vyjmuta a izolovaná DNA připravena k dalšímu použití.

5.3.2 PCR

Reakční PCR směs obsahovala vzorek templátové DNA získanou výše uvedenou metodou, sadu dvou primerů, sterilní vodu pro molekulární biologii a Master mix. Směs byla připravena v potřebných reakčních objemech dle následující tabulky.

Tabulka 2 Složení reakčních směsí pro PCR metodu na 20 μ l směsi

Komponenty reakční směsi	Objem [μ l]
Voda	7
Master mix	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
Templátová DNA	1

Každá reakční směs byla připravována v aseptickém prostředí PCR boxu. Nejprve byla připravena směs bez templátové DNA a krátce vortexována. Vzorky DNA byly naředěny 10 x pro zvýšení kvality signálu. Přichystané roztoky byly pipetovány do stripů, promíchány a centrifugovány. Vedle vzorků byla také provedena negativní kontrola pro následné ověření výsledku.

Následně byly suspenze podrobeny běžné PCR reakci s parametry:

Počáteční denaturace	94 - 95 °C	4 - 7 min
Denaturace	94 - 95 °C	1 min
Anealling	50 - 56 °C	1 min
Elongace	72 °C	1 min - 1 min 45 s
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min
Uskladnění	4 °C	∞

5.3.3 Agarózová elektroforéza

Agarózová elektroforéza slouží ke kontrole reakcí PCR. Nejdříve je připraven 1 % agarózový gel s ethidiumbromidem, do kterého je podle počtu vzorků vložen hřeben příslušné velikosti, ten po jeho vyjmutí vytvoří jamky pro aplikaci vzorků. Do první jamky je vždy nanášen DNA Maker (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder), sloužící pro standardizaci postupu. Do dalších jamek je pak aplikováno 5 μ l samotného vzorku. Takto připravený gel by umístěn do elektroforetické soustavy naplněné roztokem 1x TAE.

Sestava byla připojena k napětí 100 V po dobu 25 minut, čímž došlo k migraci záporně nabitých nukleových kyselin od anody ke katodě. Výsledný gel byl umístěn do UV-transluminátoru a osvětlen UV zářením. Roztok ethidiumbromidu navázaný na fragmenty DNA emitoval světlo, čímž zviditelnil výsledek PCR reakce.

5.3.4 DGGE

Příprava vzorů byla provedena pomocí Nested PCR. Nejdříve byly požitý primery FD1 a RD1. V dalším kroku byly zvoleny primery – 341F a 907R, zvolený PCR cyklus je uveden výše. Takto zhotovené PCR produkty mohly být dále použity pro zpracování pomocí DGGE metody.

Před samotným provedením DGGE bylo třeba správné sestavení skel jako formy pro aplikaci gelu, které byly důkladně očištěny a omyty ethanolem. Po jeho odpaření bylo na jedno ze skel aplikováno těsnění, spacersy zajišťující dostatečnou tloušťku gelu, na něž byla nanesena vazelína a forma byla uzavřena přiložením druhého skla upevněného pomocí svorek po stranách.

Složení gelu pro přípravu 30 ml

	30%	70%
Močovina [g]	3,6	8,4
Formamid [ml]	3,78	8,82
50x TAE Buffer [ml]	0,6	0,6
40% Akrylamid [ml]	5,64	5,64
Destilovaná voda [ml]	Pro doplnění každého na 30 ml.	

Gely byly připraveny ve dvou koncentracích a to 30 % a 70 % dle výše uvedeného rozpisu. Po rozpuštění všech složek byly převedeny do propojených dávkovacích válců opatřených hadičkou s ventilem, zakončenou jehlou (vložená do připravené formy). Samotné čerpání roztoků bylo zajištěno peristaltickým čerpadlem. Dávkování probíhalo 5 až 10 minut. Poté byla vyjmuta dávkovací jehla a zasunut hřebínek, pro tvorbu jamek. Takto připravený gel byl ponechán při laboratorní teplotě v klidu po dobu asi 2 hodiny, dokud nebylo dosaženo úplné polymerace gelu.

Vyhotovený gel i s formou byl umístěn do plastové kazety nutné pro stabilitu gelu v kolmé poloze. Dále bylo vyjmuta těsnění z důvodu kontaktu obou stran gelu s pufrem a zajištěn průchod vloženého napětí. Kazeta s gelem byla poté umístěna do termostatu přístroje. Další napojení kazety na přístroj bylo prováděno pomocí návodu.

Po umístění kazety do prostoru termostatu byl vytažen hřebínek z gelu. Vytvořené jamky byly promyty pomocí mikrostříkačky Hamilton příslušným pufrům. Následovalo nadávkování 20 μ l markeru (Marker-Quick-Load 100bp DNA Ladder) a příslušných vzorků (PCR produktů).

Podmínky DGGE:

Vložené napětí: 120 V
Vložený proud: 36 mA
Doba: 900 minut
Teplota v termostatu: 60 °C
Použitý pufr: 1x TAE

Po proběhnutí elektroforézy byl gel s kazetou vytažen z pufru. Forma byla oddělena od kazety, odejmuto těsnění a spacery. Pomocí vstříkovaní destilované vody a tlakem kopisti byla skla oddělena. Gel s obdélníkovým sklem dále umístěn do barvicího roztoku - 450 ml destilované vody, 50 ml 10x TAE a 50 μ l GelStar™ Nucleic Acid Gel Stain, po dobu 2 hodin za stálého třepání při 450 RPM/min.

K zobrazení výsledného gelu byl využit transluminátor. Dále pak došlo k vyřezávání bandů z gelu a jejich umístění do mikroskopavek.

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

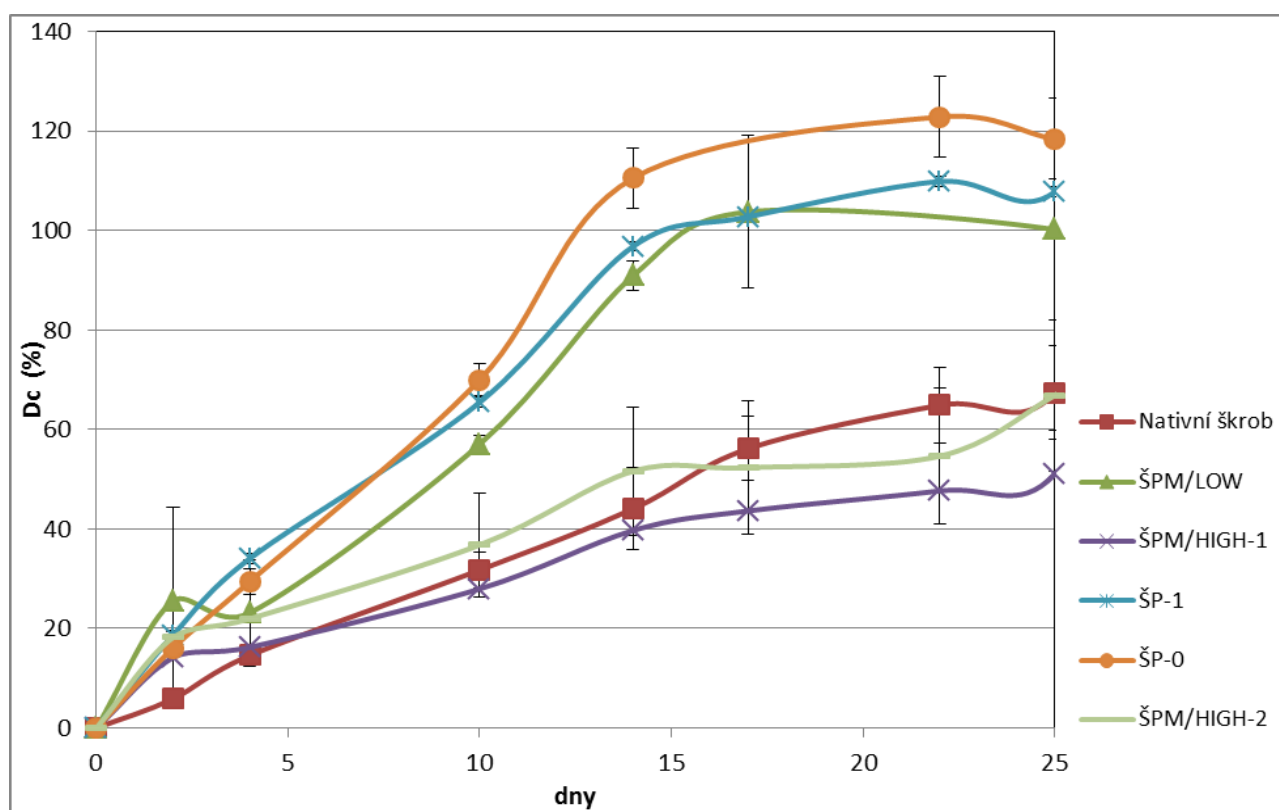
Tato práce měla za cíl analyzovat biorozložitelnost plastických folií na bázi škrobu s různými stupni modifikace, přísady celulózy jako plniva a plastifikátorů, poskytnutých spolupracujícími laboratoři. Přesné složení vzorků nebylo známo neboť je součástí know-how spolupracující laboratoře. Stupeň modifikace vzorků je naznačen čísly vyjadřující průměrný počet modifikujících skupin na jednu monomerní jednotku, vyšší číslo tedy znamená vyšší stupeň modifikace. Dále pak pomocí mikrobiologických a molekulárně biologických metod izolovat a následně identifikovat biodegradéry u pěti vzorků s nejvíce odlišným složením tak, aby byla zajištěna i diverzita mikroorganismů podílejících se na degradaci polymerů.

6.1 Studium aerobní biodegradace v prostředí kompostu

Vzorky byly připraveny a analyzovány dle návodu popsaného v kapitole 5.1 Chemické složení a stupeň modifikace sledovaných materiálů, podstatné pro vyhodnocení degradačních pokusů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Na následujících grafech (*Obr. 9-15*) jsou zobrazeny výsledky biodegradačních procesů v prostředí kompostu, které jsou porovnávány se škrobem, jakožto pozitivní kontrolou, jelikož tato látka je 100 % biorozložitelná a tvoří základ všech kompostovaných vzorků. V některých případech, biologický rozklad škrobu dosáhl nad 100 %. Tato situace není ojedinělá a bývá vysvětlena jako nadměrné pomnožení degradérů v kompostu vlivem dobře rozložitelné organické biomasy a následným zvýšením obsahu uhlíku při jejich úhynu a zvýšené tvorbě endogenního uhlíku (priming effect).

Z pozorování průběhu simulace kompostování a měření uvolněného oxidu uhličitého bylo zjištěno několik okolností ovlivňujících kvalitu naměřených dat. Kromě praxe pracovníka provádějícího měření má nemalý vliv na kvalitu naměřených dat i samotná manipulace s kompostovaným materiálem. Byl vyzorován vliv intenzity mísení kompostu po provzdušňování- čím intenzivnější bylo mísení, tím byl i obsah uvolněného oxidu uhličitého vyšší. Je tedy důležité věnovat pozornost stejné intenzitě promísení, a také sledovat, do doby kdy rozklad polymeru není v příliš pokročilé fázi, zda jsou všechny kompostované segmenty vzorků pod povrchem kompostu.

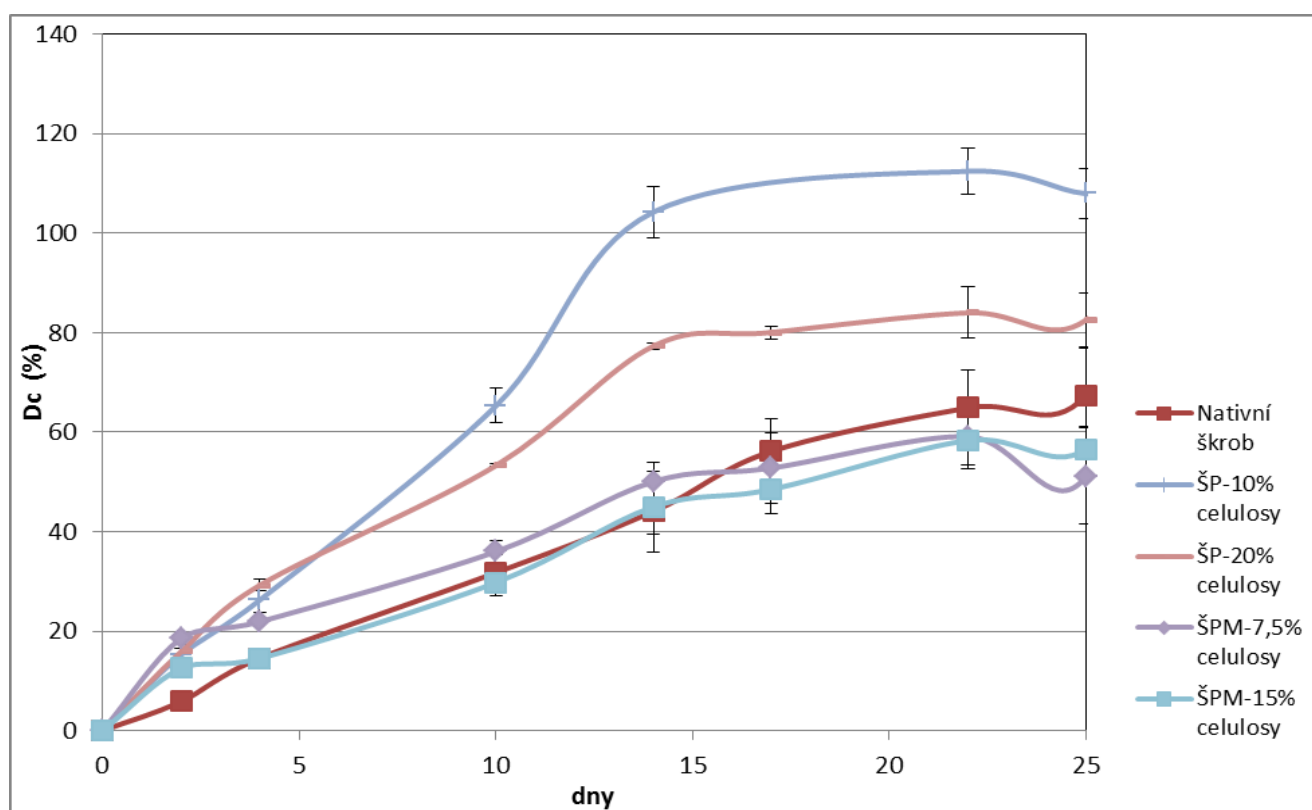


Obrázek 9 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu bez přídavku plniva, pokus I.

Inkubační lahve simulující proces kompostování byly v tomto případě naplněny cca 200 mg vzorku. Díky tomu pokus vykazuje u tří vzorků plastifikovaných škrobů 100 % biodegradaci již do 20. dne od založení kompostů. Jedná se o vzorky ŠP-0 a ŠP-1, tedy vzorky vzniklé plastifikací 70 % nativního škrobu a 30 % plastifikátoru G, bez jakéhokoliv plniva či modifikace a vzorek ŠPM/LOW, který má podobné složení (70 % nativního škrobu, 20 % plastifikátoru G, 10 % plastifikátoru P1) a nízký stupeň modifikace 0,8.

Můžeme také pozorovat, že nativní škrob podléhá biodegradaci pomaleji, než škroby plastifikované. Důvodem je semikrystalické uspořádání škrobových zrn, tvořených kompaktní terciální strukturou řetězců, které zpomalují proces biodegradace, oproti amorfní struktuře termoplasticky upraveného škrobu.

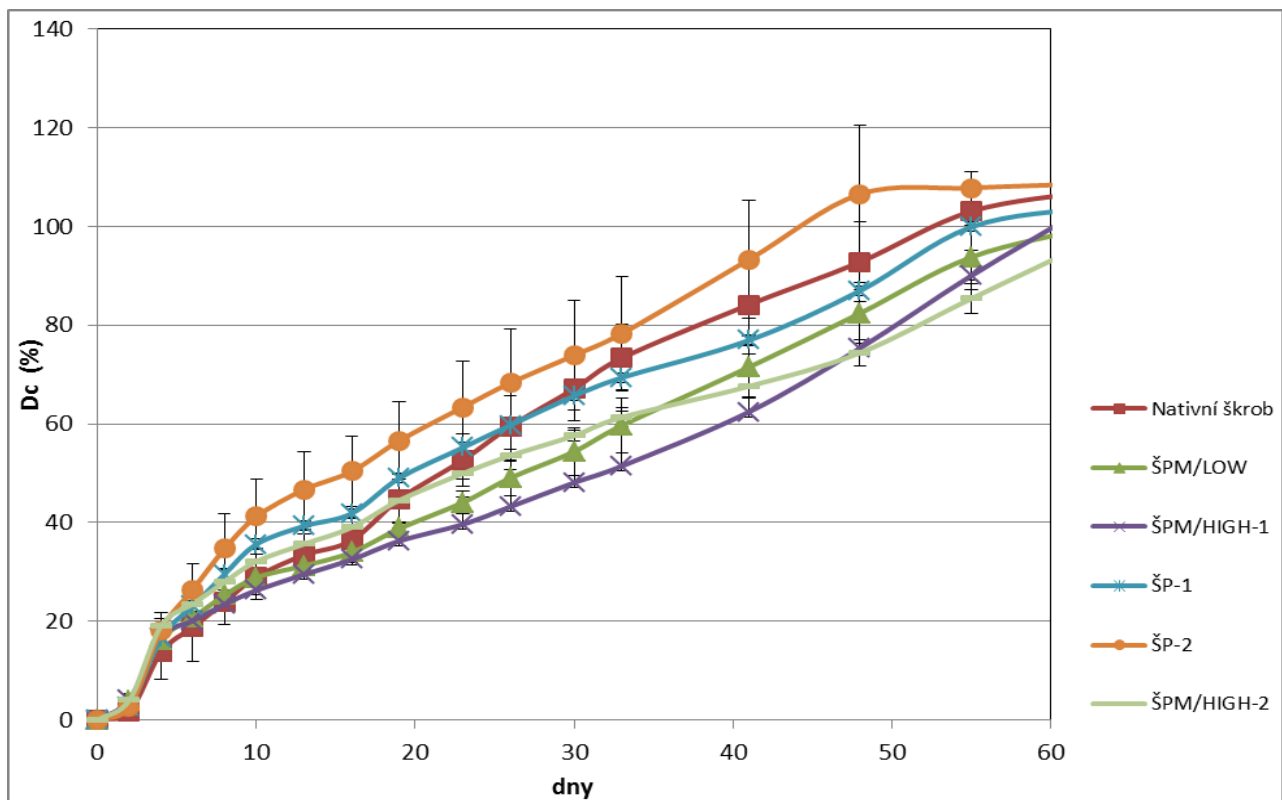
Oproti tomu vzorky ŠPM/HIGH-1 a ŠPM/HIGH-2 se blíží hodnotám biodegradace nativního škrobu. Jejich stupeň modifikace dosahuje hodnot 1,2 a 1,5. Domnívám se tedy, že vyšší stupeň modifikace má za následek zpomalení celkového procesu biodegradace.



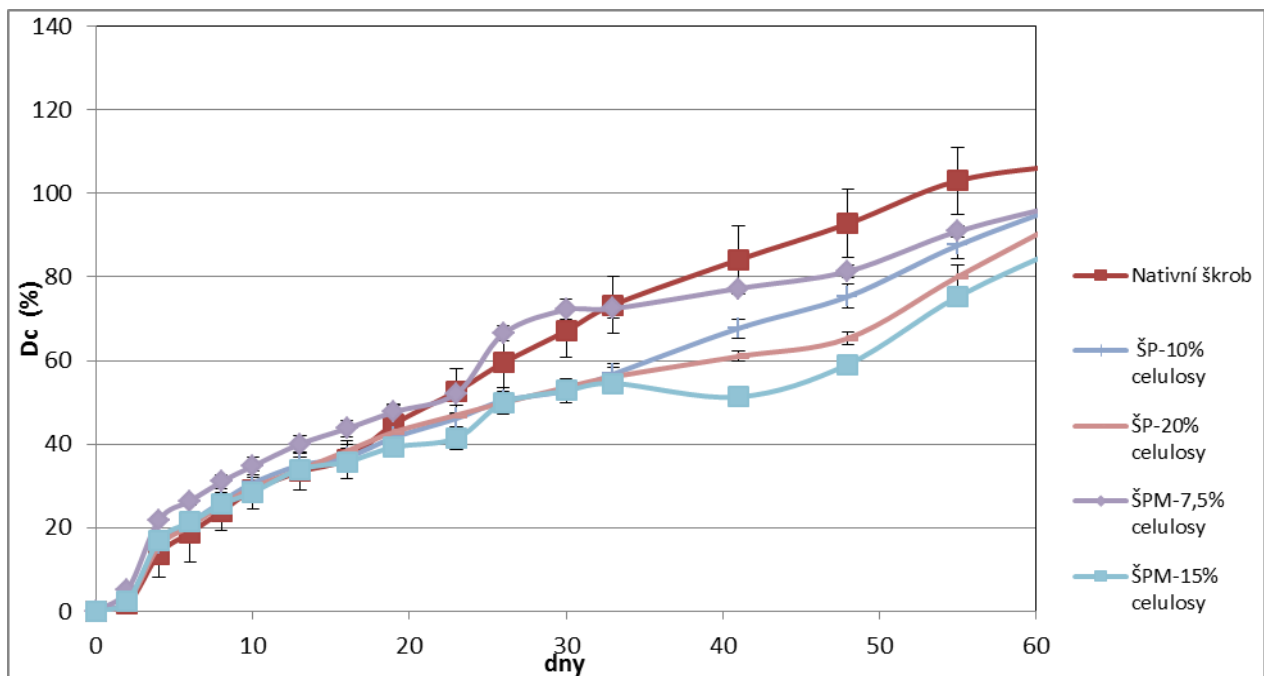
Obrázek 10 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přidávkou celulózy jako plniva, pokus I.

Množství navážky kompostovaných materiálů bylo i v tomto případě dvojnásobné oproti pokusům následujícím, tedy 200 mg. 100 % rozkladu dosáhl z této série pouze vzorek obsahující 10 % celulózy jako plniva, 63 % škrobu a 27 % plastifikátoru G, a to do 15. dne od založení pokusu. Nižších hodnot, avšak podobného průběhu biodegradace jako u předchozího vzorku dosahuje fólie škrob plastifikovaný s 20 % celulózy (55 % škrobu, 24 % plastifikátoru G). Oba tyto materiály jsou stejného složení látek v jiných poměrech a bez modifikace, která jak se již zmiňují výše, má vliv na dobu rozkladu.

U vzorků škrobů plastifikovaných a modifikovaných s obsahem celulózy 7,5 a 15 % je pozorován stejný průběh rozkladu. Jsou připraveny s přidáním plastifikátoru P1, tedy stejně jako ŠPM/HIGH-1 a ŠPM/HIGH-2, avšak dosahují nižšího stupně modifikace (ŠPM 7,5 % CELULOSY 1,1, ŠPM 15 % CELULOSY 0,7) což při porovnání průběhu degradace zobrazené na *Obrázku 11*, vede opět nižší stupeň modifikace k mírně lepší degradaci polymeru.



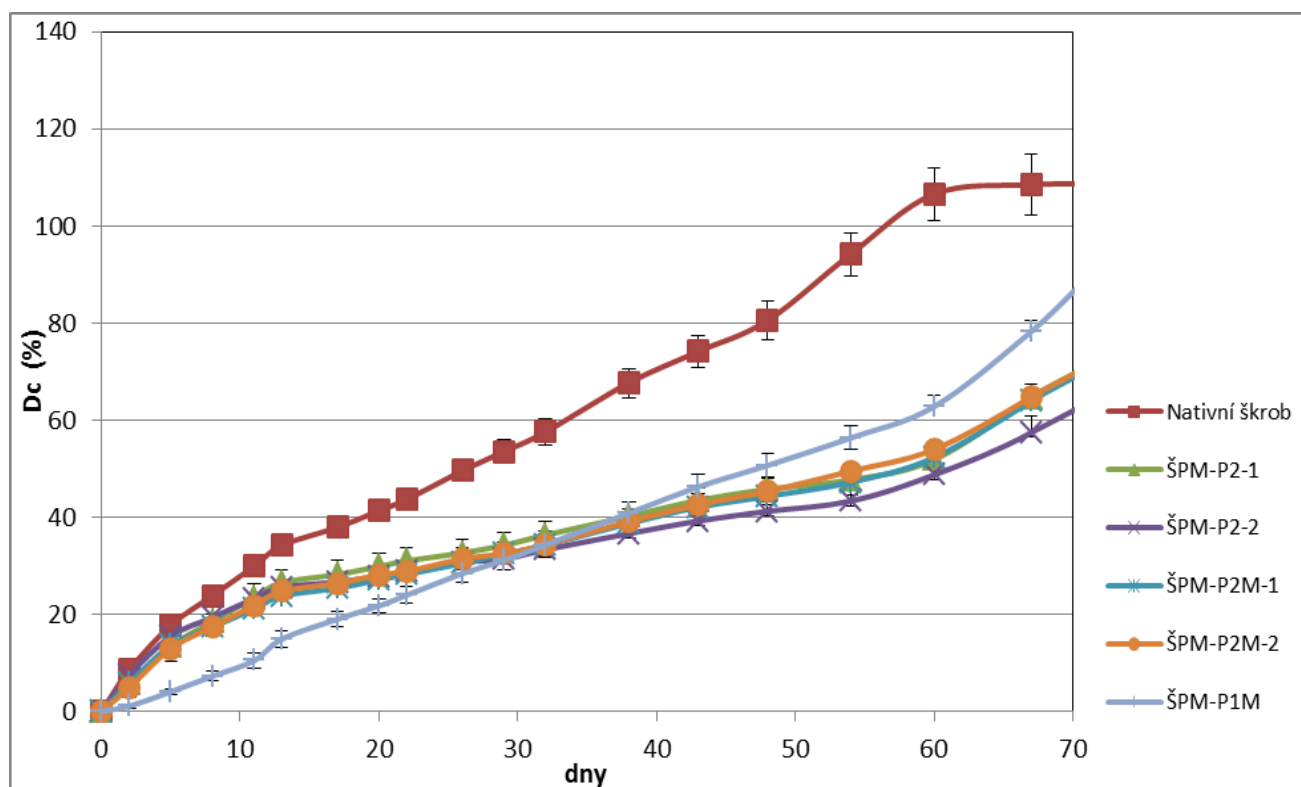
Obrázek 12 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu bez přídavku plniva, pokus II.



Obrázek 13 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavkem celulózy jako plniva, pokus II.

Vzhledem k velmi rychlé degradaci polymerů z I. série při navážce 200 mg, bylo měření provedeno opakovaně s poloviční navážkou 100 mg. Nevýhodou bylo, že pokus byl proveden po určité době a u vzorků zřejmě došlo ke změnám struktury.

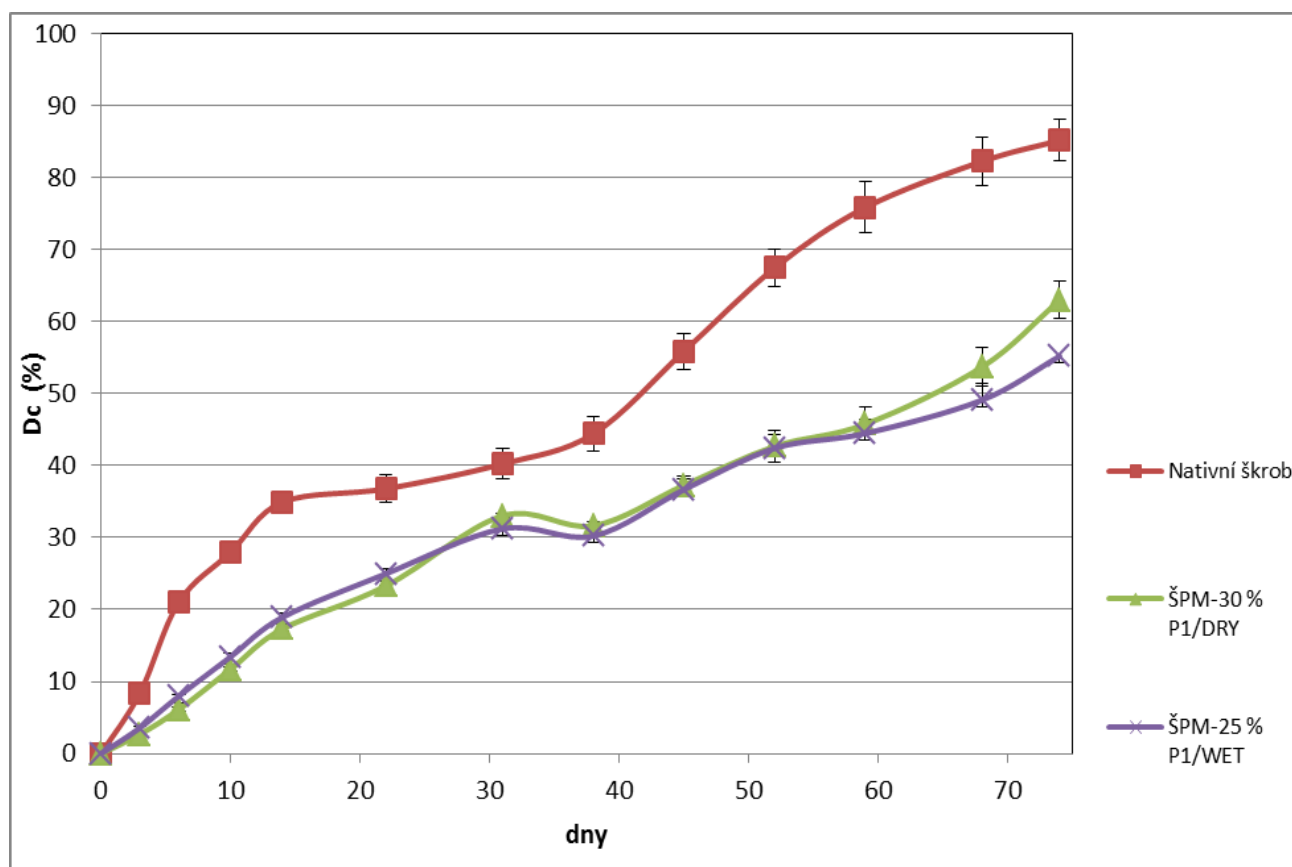
Z Obrázku 11 a 12 je patrné, že již nedochází k výraznější separaci výsledků u polymerů s odlišným složením, jako tomu bylo u Obrázku 9 a 10. Tento jev může být způsoben tzv. „retrogradací polymerů“ kdy dochází k přestupu amorfni struktury plastifikovaných škrobů zpět do semikrystalické fáze, čímž je utlumen vliv plniv a plastifikátorů na případnou biodegradaci, jelikož dochází ke změnám fyzikálních i chemických vlastností degradovaných polymerů.



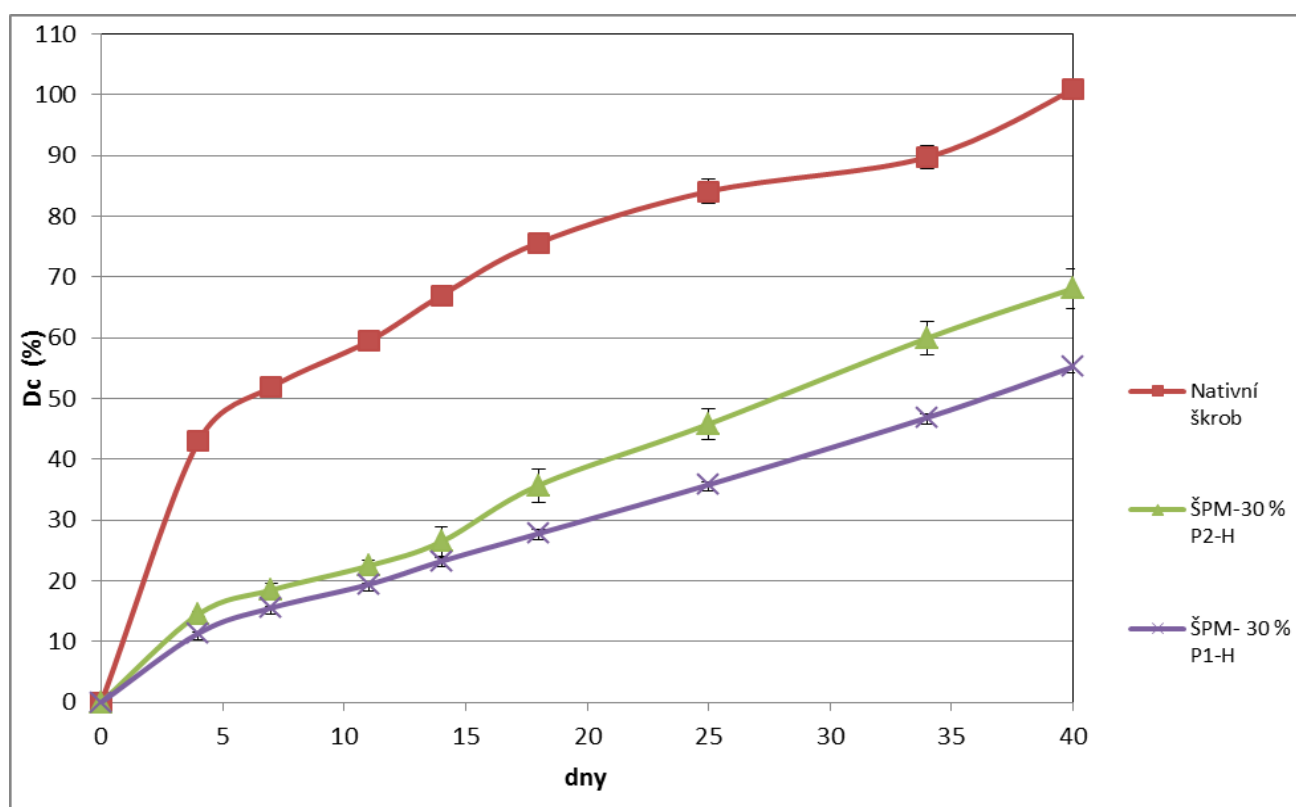
Obrázek 14 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přísady plniva a plastifikátorů o stupni modifikace 2,5-2,6.

Druhá série vzorků obsahovala plastifikované škroby o vysokém stupni modifikace (2,5-2,6) s přidavky plniva M (oligosacharid) a plastifikátory P1 a P2 v 30 % zastoupení. Jak je patrné z *Obrázku 15*, nejvýraznější vliv na biodegradaci má právě stupeň modifikace, jelikož křivky stupně degradace jsou téměř totožné a vliv odlišného plniva a plastifikátorů je zanedbatelný. Lehce odlišná průběh vykazuje křivka ŠPM-P1M, na jehož výrobu byl použit plastifikátor P1, oproti ostatním vzorkům obsahujícím plastifikátor P2.

Při srovnání se sérií I (*Obrázek 11*) dochází i k prodloužení doby degradace, což může být způsobeno právě vyšším stupněm modifikace, ale i stářím materiálu, ze kterého je připravován experimentální kompost.



Obrázek 16 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přidavky plniva M a plastifikátorů o vysokém stupni modifikace I



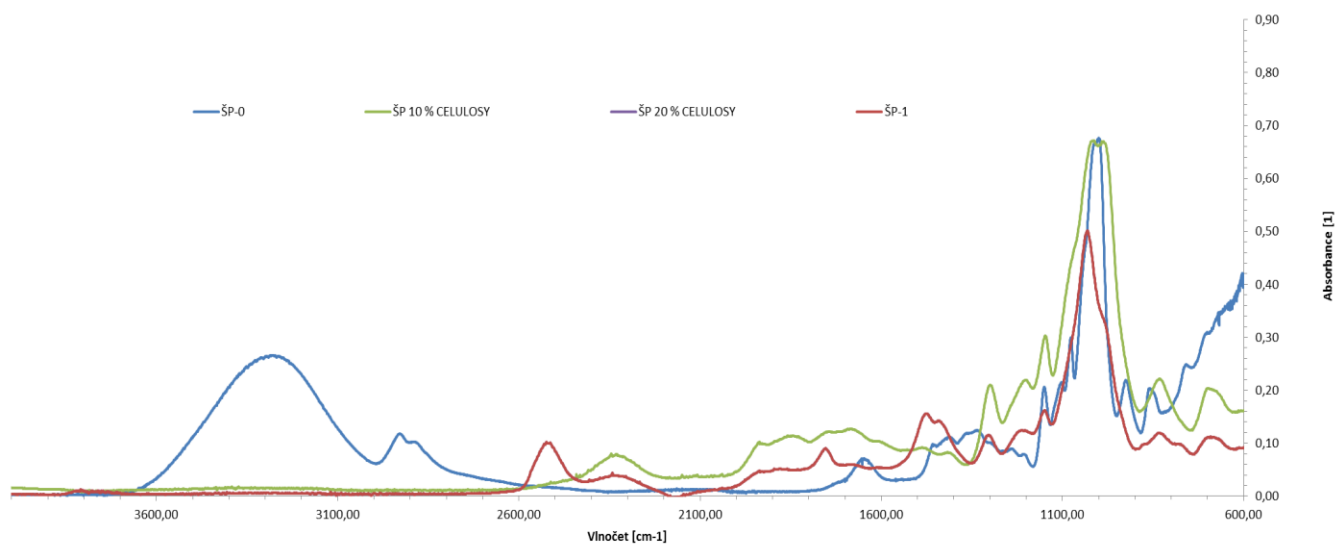
Obrázek 17 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přidavky plniva M a plastifikátorů o vysokém stupni modifikace II

Třetí série vzorků opět zahrnuje vysoce modifikované plastifikované škroby s přidavky plastifikátorů P1 a P2 v množství 25-30 %. Jedná se o vzorky s vysokým stupněm modifikace, předpokládáme tedy podobný průběh jako u série č II (Obrázek 13).

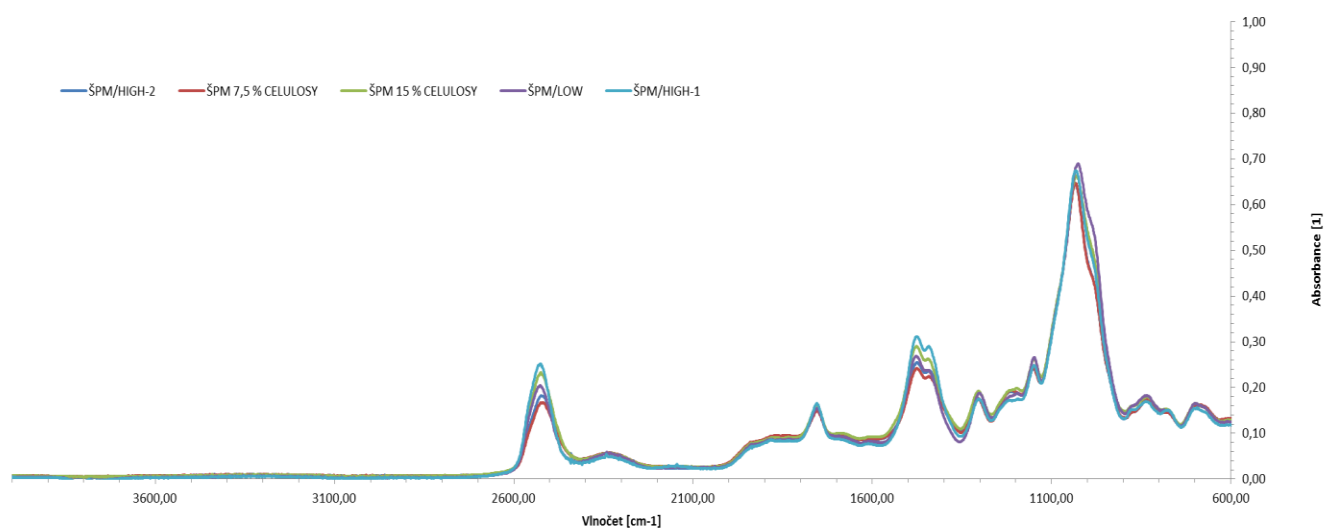
Rozklad polymerů označených jako ŠPM-30 % P2-H a ŠPM-30 % P2-H je stále monitorován i po odevzdání diplomové práce, ale průběh degradačních křivek v počátečních 40 dnech je lehce rychlejší než tomu bylo u vzorků ŠPM-30 % P1/DRY a ŠPM-25 % P1/WET. Nicméně tato situace může být způsobena i čerstvým substrátem s vyšším mikrobiologickým oživením, který byl pro tuto sérii použit, což by odpovídalo i 100 % degradaci nativního škrobu ji v průběhu těchto 40 dnů.

6.2 Infračervená spektra (FTIR - ATR)

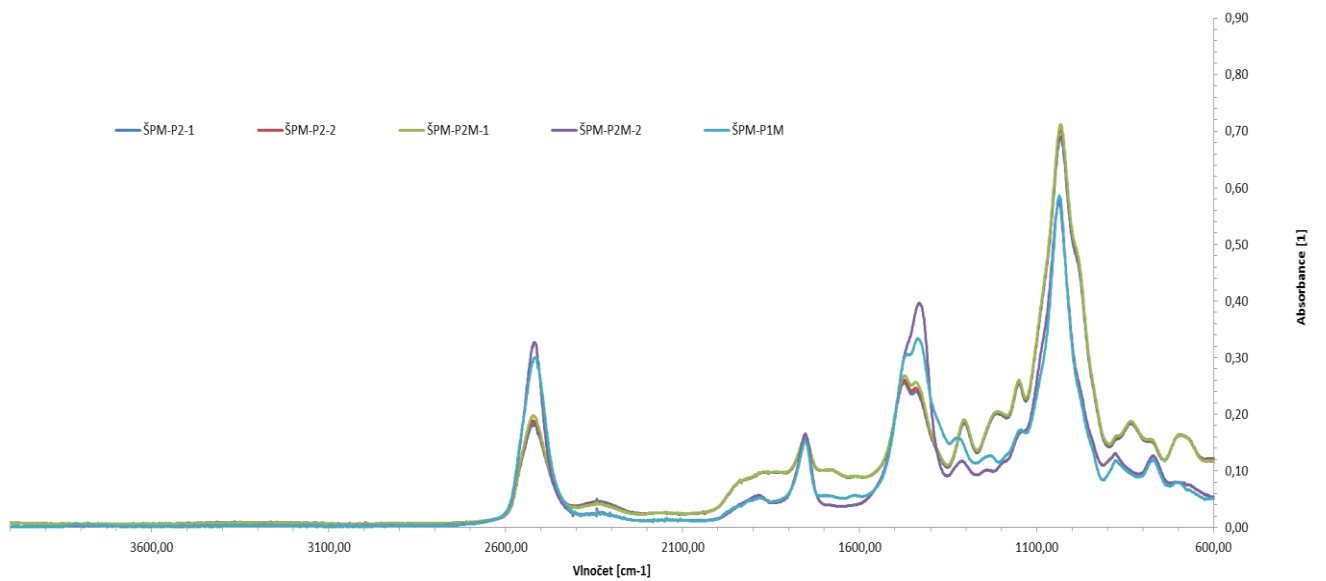
Infračervená spektra analyzovaných biopolymerů byla měřena za účelem rozšíření metodiky diplomové práce a také pro potvrzení identického složení těchto materiálů. Spektra byla rozdělena do série grafů podle podobnosti složení vzorků pro lepší přehlednost a porovnání.



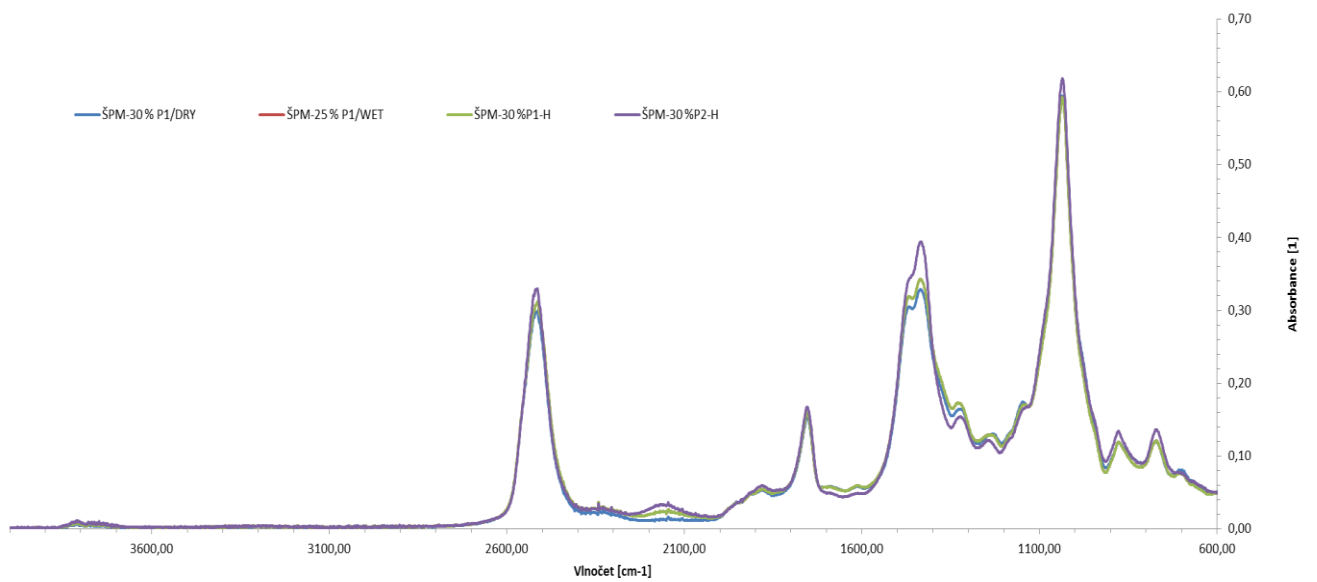
Obrázek 16 ATR spektra vybraných vzorků série I.



Obrázek 17 ATR spektra vybraných vzorků série I.



Obrázek 18 ATR spektra vybraných vzorků série II.



Obrázek 19 ATR spektra vybraných vzorků série III.

Původním záměrem měření FTIR spekter bylo pokusit se charakterizovat některé rozdíly ve spektrech vzorků. Vzhledem k velké podobnosti spekter se však původní záměr podařilo uskutečnit pouze z malé části.

U *Obrázku 16* je v oblasti 3600 až 3000 cm^{-1} patrný pás charakterizující OH vazby u vzorku ŠP-0. Pravděpodobně se jedná o vodu navázanou ve struktuře plastifikovaného škrobu, jejíž výskyt je u dalších vzorků s plnivy a modifikací potlačen. U toho vzorku můžeme také pozorovat výskyt C-H vazeb ($3000\text{--}2800\text{ cm}^{-1}$). Na záznamech FTIR spekter je možné pozorovat absenci esterové vazby ($1750\text{--}1730\text{ cm}^{-1}$) u nemodifikovaných vzorků.

6.3 Izolace DNA degradérů a jejich identifikace

Izolace DNA degradérů byla provedena u vybraných vzorků doporučených spolupracující laboratoří, která i dodala samotné vzorky. Výběr byl uskutečněn tak, aby byla zajištěna největší pravděpodobnost různosti mikroorganismů podílejících se na degradaci polymerních materiálů.

Tabulka 3 Vzorky vybrané pro izolaci DNA degradérů a jejich charakteristika

Č. vz	Značení	Škrob [%]	G [%]	Plnivo M [%]	P1 [%]	P2 [%]	Celulosa [%]	SM
1.	ŠP-0	70	30	-	-	-	-	-
2.	ŠPM/LOW	70	20	-	10	-	-	0,8
3.	ŠPM/HIGH-2	70	20	-	10	-	-	1,5
4.	ŠPM-P2-2	100	-	-	-	30	-	2,6
5.	ŠPM-P1M	50	-	50	30	-	-	2,6

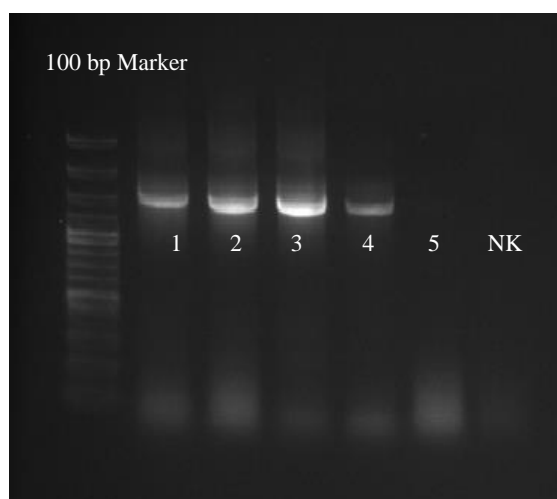
Vybrané vzorky byly kompostovány po dobu 8 dnů s následnou izolací DNA blíže popsanou v kapitole 5.3.1. Koncentrace izolované DNA byla změřena na UV/VIS spektrometru pro zjištění, zda je dostatečná.

Jako první byly připraveny roztoky pro PCR s použitím primerů FD1 a RD1. Roztoky byly v ředěné (10x) a neředěné formě. PCR cyklus byl volen jako klasická PCR.

Parametry PCR:

Počáteční denaturace	94 - 95 °C	4 - 7 min
Denaturace	94 - 95 °C	1 min
Anealling	50 - 56 °C	1 min
Elongace	72 °C	1 min - 1 min 45 s
Závěrečná amplifikace	72 °C	10 min
Uskladnění	4 °C	∞

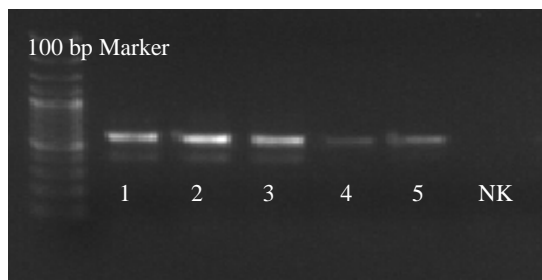
Suspenze byly aplikovány do připraveného agarózového gelu a ponechány migrovat pod napětí 100 V po dobu 25 minut pro kontrolu průběhu reakce a čistoty produktů.



Obrázek 18 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí komerčního kitu, 10 x ředěná, klasická PCR, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, NK- negativní kontrola

Interpretována byla ředěná varianta, avšak výsledek nebyl uspokojivý, jelikož ve všech vzorcích lze pozorovat bandy nezreagovaných pigmentů ve spodní části gelu včetně negativní kontroly. To může být způsobeno špatnou lyzí nebo volbou programu PCR. Bohužel nebyla použita pozitivní kontrola, nejde tedy přibližně určit důvod negativního výsledku PCR reakce

Následovala amplifikace pomocí primerů 341 F a 907 R u 10 x ředěné DNA a pětovná kontrola pomocí elektroforézy.



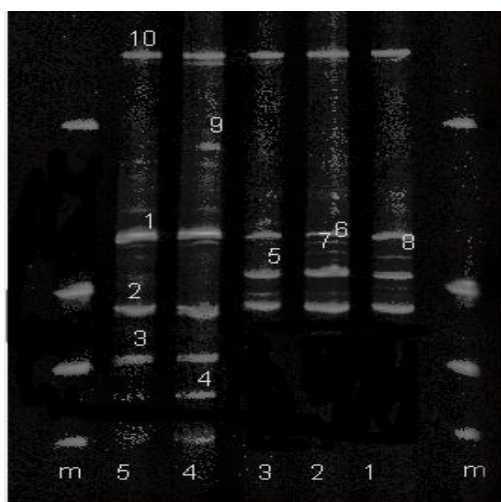
Obrázek 21 Amplifikovaná DNA primery 341F a 907 R, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, NK- negativní kontrola

Pro identifikaci konsorcia degradérů byla provedena metoda DGEE, kdy byly vzorky dávkovány do polyakrylamidového gelu a přidavkem močoviny a formamidu jako denaturačních činidel.

Byly nastaveny podmínky metody:

Vložené napětí: 120 V
 Vložený proud: 36 mA
 Doba: 900 minut
 Teplota v termostatu: 60 °C
 Použitý pufr: 1x TAE

K zobrazení výsledného gelu byl požit transluminátor a bandy byly vyřezány z gelu a rozpuštěny přidavkem sterilní vody a skleněných kuliček. Směs nebyla dále analyzována z časových důvodů a bude v ní pokračováno v navazující práci.



Obrázek 22 Záznam polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, m-marker

Vyhodnocení záznamu polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE bude uskutečněno v navazující diplomové práci. Ze zobrazovací metody je však patné, že u vzorků ŠP-0, ŠPM/LOW a ŠPM/HIGH-2 dochází k degradaci odlišnými mikroorganismy než u zbývajících vzorků (sekvence označená č. 5). Důvodem může být obsah plastifikátoru G, použitého při výrobě všech jmenovaných vzorků. Tyto vzorky také vykazovaly vyšší stupeň degradace po 8 dnech inkubace, a to značným nabobtnáním polymeru.

Dále je možné pozorovat jistou odlišnost mezi polymery ŠPM-P2-2 a ŠPM-P1M. Plastifikovaný škrob ŠPM-P2-2 má jako jediný výrazný bend (9), jedná se o vzorek, u kterého bylo použito plastifikátoru P2. Sekvence bendů 1,2 a 10 se nacházejí u všech analyzovaných biopolymerů, jedná se tedy pravděpodobně o mikroorganismy nejhojněji zastoupené v půdě.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit biorozložitelnost polymerních materiálů na bázi škrobu s různými stupni modifikace, přísady škrobu jako plniva a přidanými plastifikátory. Biorozložitelnost byla posuzována v simulovaném prostředí kompostu za upravených podmínek pro urychlení rozkladu.

Z naměřených dat vyplývá, že nejlépe degradovatelné jsou plastické hmoty obsahující pouze plastifikovaný škrob. Avšak jeho použití na výrobu trvalejších produktů není příliš vhodné, vzhledem k jeho vysoké hydrofilitě. Dále pak bylo vyzorováno, že na rychlost degradace má značný vliv stupeň modifikace. Látky dosahující vysokého stupně modifikace byly degradované podstatně pomaleji než nízko-modifikované polymery. Z grafů degradací je také možné pozorovat, že stupeň modifikace hraje primární roli, jelikož látky lišící se ve složení, avšak se stejným nebo podobným stupněm modifikace podléhaly biorozložitelnosti velmi podobně.

U vzorků první série byl pozorován vliv retrogradace na rozložitelnost polymerů. U čerstvě vyrobených vzorků, byl průběh rozkladu odlišný, vzhledem k jejich složení a stupni modifikace, zatímco při opakování pokusu za stejných podmínek, avšak s časovým odstupem 3 měsíců, docházelo k sjednocení průběhu degradace u všech kompostovaných vzorků.

Pro rozšíření metodiky a potvrzení identického složení testovaných materiálů byla provedena měření FTIR spekter. Zde byl potvrzen hydrofilní charakter plastifikovaného škrobu výskytem pásu v oblasti 3600 až 3000 cm^{-1} , charakteristickým pro OH vazby, tedy i vodu, který se u ostatních měřených vzorků neprojevil, jelikož modifikací a přidáním plniv je hydrofilita potlačena.

Dále pak byl potvrzen u modifikovaných plastifikovaných škrobů výskyt pásu 1750 - 1730 cm^{-1} , charakteristického pro esterové vazby.

Na závěr byla provedena identifikace degrarérů u vybraných vzorků s odlišným složením a stupni modifikace. Identifikace nebyla vyhodnocena, ale ze získaného záznamu polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE je patrné, že u polymerů s použitím plastifikátorem G dochází k degradaci i jinými mikroorganismy než je tomu u vzorků, kde tento plastifikátor použit nebyl.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ISO 17088:2012. *Specifications for compostable plastics*. Switzerland: International Organization for Standardization, [cit. 2015-08-03]
- [2] STLOUKAL. *Studium vlastností biodegradabilních materiálů na bázi polyesteru*. Zlín, 2013
- [3] LUCAS, Nathalie, Christophe BIENAIME, Christian BELLOY, Michèle QUENEUDEC, Françoise SILVESTRE a José-Edmundo NAVA-SAUCEDO. *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques – A review*. *Chemosphere* [online]. 2008, vol. 73, issue 4, s. 429-442 [cit. 2015-09-07]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.06.064.
- [4] SHAH, Aamer Ali, Fariha HASAN, Abdul HAMEED a Safia AHMED. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. *Biotechnology Advances* [online]. 2008, vol. 26, issue 3, s. 246-265 [cit. 2015-09-07]. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.005.
- [5] PILLA, Srikanth. *Handbook of bioplastics*. Salem, Mass., 2011, 588 p. ISBN 978-047-0626-078.
- [6] MUELLER, R.-J. *Biological degradation of synthetic polyesters—Enzymes as potential catalysts for polyester recycling*. *Process Biochemistry* 2006, vol. 41, p. 2124–2128.
- [7] LEJA, Katarzyna a Grażyna LEWANDOWICZ. *Polymer biodegradation and biodegradable polymers - a review*. *Polish J. of Environ. Stud* [online]. 2010, č. 2 [cit. 2015-08-03].
- [8] BRIASSOULIS, D. *Analysis of the mechanical and degradation performances of optimised agricultural biodegradable films*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2007, vol. 92, issue 6, s. 1115-1132 [cit. 2015-08-03]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.01.024.
- [9] WILES, David M. a Gerald SCOTT. *Polyolefins with controlled environmental degradability*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2006, vol. 91, issue 7, s. 1581-1592 [cit. 2015-08-03]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2005.09.010.
- [10] SINGH, Baljit a Nisha SHARMA. *Mechanistic implications of plastic degradation*. *Polymer Degradation and Stability* [online]. 2008, vol. 93, issue 3, s. 561-584 [cit. 2015-08-03]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2007.11.008.

-
- [11] OJUMU, T. V., J. YU, B. O. SOLOMON a Guo-Qiang CHEN. English. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2004, vol. 3, issue 1, s. 155-166 [cit. 2015-08-03]. DOI: 10.1007/978-1-4419-9240-6_11.
- [12] AMMALA, Anne, Stuart BATEMAN, Katherine DEAN, Eustathios PETINAKIS, Parveen SANGWAN, Susan WONG, Qiang YUAN, Long YU, Colin PATRICK a K.H. LEONG. *An overview of degradable and biodegradable polyolefins. Progress in Polymer Science* [online]. 2011, vol. 36, issue 8, s. 1015-1049 [cit. 2015-08-03]. DOI: 10.1016/j.progpolymsci.2010.12.002.
- [13] TOKIWA, Yutaka, Buenaventurada P. CALABIA, Charles U. UGWU a Seiichi AIBA. *Biodegradability of Plastics. International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, vol. 10, issue 9, s. 3722-3742 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.3390/ijms10093722.
- [14] ARTHAM, Trishul a Mukesh DOBLE. *Biodegradation of Aliphatic and Aromatic Polycarbonates. Macromolecular Bioscience* [online]. 2008-01-09, vol. 8, issue 1, s. 14-24 [cit. 2016-02-20]. DOI: 10.1002/mabi.200700106.
- [15] ZICHOVÁ, Miroslava. Možnosti odbourávání syntetických makromolekulárních látek se zaměřením na biodegradace. Brno, 2008. [cit. 2015-08-06].
- [16] SIRACUSA, Valentina, Pietro ROCCULI, Santina ROMANI a Marco Dalla ROSA. *Biodegradable polymers for food packaging: a review. Trends in Food Science* [online]. 2008, vol. 19, issue 12, s. 634-643 [cit. 2015-08-06]. DOI: 10.1016/j.tifs.2008.07.003.
- [17] MARTEN, Elke, Rolf-Joachim MÜLLER a Wolf-Dieter DECKWER. *Studies on the enzymatic hydrolysis of polyesters. II. Aliphatic–aromatic copolyesters: effect of molecular weight. Polymer Degradation and Stability* [online]. 2005, vol. 88, issue 3, s. 371-381 [cit. 2015-09-06]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2004.12.001.
- [18] HERZOG, K., R.-J. MÜLLER a W.-D. DECKWER. *Mechanism and kinetics of the enzymatic hydrolysis of polyester nanoparticles by lipases. Polymer Degradation and Stability* [online]. 2006, vol. 91, issue 10, s. 2486-2498 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.polymdegradstab.2006.03.005.
- [19] SAUNDERS, G. F. Moore and S. M. *Advances in biodegradable polymers* [online]. Shrewsbury, Shrewsbury: Rapra Technology Ltd, 1997 [cit. 2016-02-24]. ISBN 978-185-9571-187.
- [20] WINZENBURG, Gesine, Carsten SCHMIDT, Stefan FUCHS. *Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems. Advanced Drug De-*

livery Reviews [online]. 2004, vol. 56, issue 10, s. 1453-1466 [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/j.addr.2004.02.008.

- [21] BURKERSRODA, Friederike von, Luise SCHEDL, Achim GÖPFERICH Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. *Biomaterials* [online]. 2002, vol. 23, issue 21, s. 4221-4231 [cit. 2015-09-06]. DOI: 10.1016/S0142-9612(02)00170-9
- [22] *Biodegradable plastics developments and environmental impacts* / prepared by Nolan-ITU Pty Ltd in association with ExcelPlas Australia. [online]. Canberra, 2002 [cit. 2015-01-06].
- [23] REN, Jie. *Biodegradable poly (lactic acid) synthesis, modification, processing and applications*. Beijing: Tsinghua University Press, 2011. [cit. 2015-11-06]. ISBN 978-364-2175-961.
- [24] ISO 17088:2012. *Specifications for compostable plastics*. Switzerland: International Organization for Standardization, 2012 [cit. 2016-04-03].
- [25] AVEROUS, L. *Biodegradable polymers (Biopolymers)* [online]. 2007 [cit. 2015-12-03]. Dostupné z: <http://www.biodeg.net/biopolymer.html>
- [26] RUDNIK, Ewa. *Compostable polymer materials* [online]. 1st ed. Boston: Elsevier, 2008, xii, 211 p. [cit. 2016-03-06]. ISBN 00-804-5371-6.
- [27] AVÉROUS, L. Biodegradable Multiphase Systems Based on Plasticized Starch: A Review. *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews* [online]. 2004-12-30, vol. 44, issue 3, s. 231-274 [cit. 2015-08-06]. DOI: 10.1081/MC-200029326
- [28] TEPLÁ, M. *Přírodní látky-Sacharidy*, [Online], Dostupné z http://www.studiumbiochemie.cz/prirodni_latky.html#2.
- [29] TAYLOR, Steve a Marjorie P. PENFIELD a Ada Marie CAMPBELL. *Experimental food science*. [online] 3. Vyd. Oxford: Elsevier Science, 2005 [cit. 2016-04-24]. ISBN 978-032-3140-041.
- [30] Chi, H.; Xu, K.; Wu, X.; Chen, Q.; Xue, D.; Song, C.; Zhang, W.; Wang, P. *Effect of acetylation on the properties of corn starch*. *Food Chem.* 2008, 106, 923–928.
- [31] BeMiller, J.N. *Pasting, paste, and gel properties of starch–hydrocolloid combinations* *Carbohydr. Polym.* 2011, 86, 386–423.
- [32] DOGOSSYL, G. a T. CZIGANL. *Thermoplastic starch composites reinforced by agricultural by-products: properties, biodegradability, and application..* In *Reinforced Plastics and Composites* č. 30, s. 1819-1825

-
- [33] Kaur, B.; Ariffin, F.; Bhat, R.; Karim, A. *Progress in Starch Modification in the last decade Food Hydrocool*. 2012, 26, 398–404.
- [34] Bello-Perez, L.A.; Agama-Acevedo, E.; Zamudio-Flores, P.B.; Mendez-Montecalvo, G. Rodriguez- Ambriz, S.L. *Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. Food Sci. Technol.* 2010, 43, 1434–1440.
- [35] Diop, C.I.K.; Li, H.L.; Xie, B.J.; Shi, J. *Effects of acetic acid/acetic anhydride ratios on the properties of corn starch acetates. Food Chem.* 2011, 126, 1662–1669.
- [37] Bhandari, P.N.; Singhal, R.S. Studies on the optimisation of preparation of succinate derivatives from corn and amaranth starches. *Carbohydr. Polym.* 2002, 47, 277–283.
- [38] Xu, J.; Zhou, C.W.; Wand, R.Z.; Yang, L.; Du, S.S.; Wang, F.P. *Lipase-coupling esterification of starch with octenyl succinic anhydride. Carbohydr. Polym.* 2012, 87, 2137–2144.
- [39] Wang, C.; He, X.; Fu, X.; Luo, F.; Huang, Q. *High-speed shear effect on properties and octenylsuccinic anhydride modification of corn starch. Food Hydrocoll.* 2015, 44, 32–39
- [40] BERTOLINI, Andréa C. *Starches: characterization, properties, and applications*, [online]. Boca Raton: CRC Press, 2010 [Cit. 2016-04-23]. ISBN 978-1-4200-8023-0.
- [41] CHANDRA, R., RUSTGI, R., 1998. *Biodegradable polymers*, Science Direct: Progress in Polymer Science, Volume 23, Issue 7, November 1998, Pages 1273-1335.
- [42] Hoover R, Hughes T, Chung HJ, Liu Q. 2010. *Composition molecular structure, properties, and modification of pulse starches: a review. Food Res. Int.* 43:399-413
- [43] AVÉROUS, Luc, Eric POLLET a Wan A RAHMAN. *Environmental silicate nanobiocomposites biocomposites* [online]. Oxford: Elsevier Science [distributor], 2012, vi, 447 pages [cit. 2015-09-06]. ISBN 978-144-7141-013.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATP	Adenosintrifosfát
BDP	Biodegradabilní polymery
CEN	Evropský výbor pro normalizaci
ISO	Mezinárodní organizace pro normalizaci
PCL	Polykaprolaktony
PLA	Kyselina polyléčná
PVA	Polyvinylalkohol
PVC	Polyvinylchlorid
SHS	Substituce hydroxylových skupin

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obrázek 19 Schéma biodegradace polymerů [2]</i>	12
<i>Obrázek 20 Schéma Norrish I a Norrish II mechanismů a abstrakce atomu vodíku [14]</i>	14
<i>Obrázek 21 Grafické znázornění povrchové a celkové eroze polymeru [21]</i>	17
<i>Obrázek 22 Klasifikace biodegradabilních polymerů [25]</i>	20
<i>Obrázek 23 Základní stavební jednotky škrobu [28]</i>	23
<i>Obrázek 24 Struktura škrobového zrna [29]</i>	23
<i>Obrázek 25 Modifikace škrobu sukcylnací [36]</i>	25
<i>Obrázek 26 Modifikace škrobu kyselinou oktenyl-jantarovou [37]</i>	26
<i>Obrázek 27 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu bez přídavku plniva, pokus I</i>	44
<i>Obrázek 28 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavkem celulózy jako plniva, pokus I</i>	45
<i>Obrázek 29 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu bez přídavku plniva, pokus II</i>	46
<i>Obrázek 30 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavkem celulózy jako plniva, pokus II</i>	46
<i>Obrázek 31 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavky plniva a plastifikátorů o stupni modifikace 2,5-2,6</i>	47
<i>Obrázek 32 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavky plniva M a plastifikátorů o vysokém stupni modifikace I</i>	48
<i>Obrázek 33 Průběh biodegradace materiálů na bázi plastifikovaného škrobu s přídavky plniva M a plastifikátorů o vysokém stupni modifikace II</i>	49
<i>Obrázek 16 ATR spektra vybraných vzorků série I</i>	50
<i>Obrázek 17 ATR spektra vybraných vzorků série I</i>	50
<i>Obrázek 18 ATR spektra vybraných vzorků série II</i>	51
<i>Obrázek 19 ATR spektra vybraných vzorků série III</i>	51
<i>Obrázek 34 PCR reakce s izolovanou DNA pomocí komerčního kitu, 10 x ředěná, klasická PCR, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, NK- negativní kontrola</i>	53

Obrázek 21 Amplifikovaná DNA primery 341F a 907 R, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, NK- negativní kontrola.....54

Obrázek 22 Záznam polyakrylamidového gelu z provedené metody DGGE, 1- ŠP-0, 2- ŠPM/LOW, 3- ŠPM/HIGH-2, 4- ŠPM-P2-2, 5- ŠPM-P1M, m-marker.....54

SEZNAM TABULEK

<i>Tabulka 1 Charakteristika analyzovaných biodegradabilních vzorků</i>	<i>35</i>
<i>Tabulka 2 Složení reakčních směsí pro PCR metodu na 20 µl směsi</i>	<i>42</i>
<i>Tabulka 3 Vzorky vybrané pro izolaci DNA degradérů a jejich charakteristika.....</i>	<i>54</i>

PŘÍLOHY

Data z měření jednotlivých pokusů jsou přiložena na CD.