

Předpoklady mikrobiálního rozkladu polyvinylpyrrolidonu

Bc. Martina Vyoralová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina VYORALOVÁ**
Osobní číslo: **T10344**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Předpoklady mikrobiálního rozkladu
polyvinylpyrrolidonu**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární studii týkající se možnosti předúpravy PVP či využití speciálních (potenciálně vhodných heterogenních či čistých kultur produkujících gama-laktamázy) pro biologický rozklad.
2. Navrhněte využití vhodných testů biologického aerobního nebo půdního rozkladu a případně analytických postupů pro stanovení uvedeného polymeru a jeho rozkladných produktů.
3. Proveďte příslušné zkoušky a analýzy s ohledem na výsledky předešlých dvou bodů (přístroje MicroOxymax, spektrální analýza aj.). Naměřené výsledky zpracujte s využitím vhodných programů, kriticky zhodnoťte a vyvoďte relevantní závěry.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Primární prameny podle dispozic vedoucího práce. Vybrané dostupné databáze.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Jan Kupec, CSc.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

13. února 2012

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

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 3.5.2012



.....

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 přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá možnostmi mikrobiálního rozkladu polymerní sloučeniny polyvinylpyrrolidonu K15 za aerobních podmínek. Rozklad byl prováděn v prostředí aerobního aktivovaného kalu, p dních organismů zahradního kompostu, zemědělské půdy, komerčního kompostu a směsné půdy. Dále v prostředí čisté mikrobiální kultury, u níž byla zjištěna schopnost produkce enzymu β -laktamázy a pomocí mycelia z výroby penicilinu. Testy probíhaly na přístroji Micro-Oxymax a biologická rozložitelnost byla hodnocena podle biologické spotřeby kyslíku (BSK), případně podle poměru BSK/TSK.

Úkolem práce bylo potvrdit pozitivní výsledky, kterých bylo dříve dosaženo v půdním prostředí. Tento cíl byl dosažen pouze u použití zemědělské půdy s nevýrazným rozkladem.

Klíčová slova:

Polyvinylpyrrolidon, PVP, biodegradace, mikrobiální rozklad

ABSTRACT

This diploma work describes possibilities of microbial decomposition of polyvinylpyrrolidone K 15 in aerobic conditions. The decomposition was tested in the activated sludge, in the soils of garden compost, agricultural soil, commercial compost and in the mixed soil. Next, it was tested in clear microbial culture with production of enzymes - lactamase and in the mycelium from penicillin production. The tests were performed help of the Micro-Oxymax. Biodegradability was evaluated by biological oxygen demand (BOD) or by ratio BOD/TOD (theoretical oxygen demand).

The aim of diploma work was to confirm positive biodegradation in soils. That achieved only in used agricultural soil but with not very significant biodegradation.

Keywords:

Polyvinylpyrrolidone, PVP, biodegradation, microbial decomposition

Na tomto místě bych chtěl poděkovat vedoucímu práce panu Prof. Ing. Janu Kupcovi, Csc. za ochotu, zájem a cenné rady poskytnuté v průběhu práce, paní Ing. Markétě Julinové, Ph.D. a panu doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D. za vstřícnost a odborné rady i při laboratorní realizaci.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ÁST	11
1 POLYVINYLPIRROLIDON	12
1.1 VÝROBA	12
1.2 POUÍTÍ.....	13
1.3 VLIV NA ZDRAVÍ LOV KA A NA ÍVOTNÍ PROST EDÍ	13
1.4 STANOVENÍ.....	14
2 1-OCTYL-2-PYRROLIDON	15
2.1 VLASTNOSTI.....	15
2.2 POUÍTÍ.....	15
2.3 VLIV NA ZDRAVÍ LOV KA A NA ÍVOTNÍ PROST EDÍ	15
3 BIOLOGICKÝ ROZKLAD	17
3.1 BIODEGRADACE PVP	17
3.2 BIODEGRADACE PVP VE VODNÉM PROST EDÍ	20
3.3 BIODEGRADACE PVP V P DNÍM PROST EDÍ.....	22
4 CÍL PRÁCE	24
II PRAKTICKÁ ÁST	25
5 EXPERIMENTÁLNÍ ÁST	26
5.1 POUÍTÉ CHEMIKÁLIE	26
5.2 POUÍTÉ P ÍSTROJE	27
5.3 POUÍTÝ BIOLOGICKÝ MATERIÁL	27
Aktivovaný kal z ístírny komunálních odpadních vod.....	27
P dy	27
P dní inokulum dle normy ISO 14851:1999.....	28
Penicilinová kultura	28
5.4 TESTOVANÉ VZORKY	29
5.5 POUÍTÁ MINERÁLNÍ MÉDIA.....	29
Biomédium pro aktivovaný kal.....	29
Minerální médium pro p ípravu p dního inokula	30
Minerální médium pro p du.....	30
6 METODY STANOVENÍ	31

6.1	HODNOCENÍ ÚPLNÉ AEROBNÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ORGANICKÝCH LÁTEK VE VODNÍM A PŮDNÍM PROSTŘEDÍ STANOVENÍM SPOTŘEBY KYSLÍKU V UZAVŘENÉM RESPIROMETRU	31
6.2	MIKROBIOLOGICKÉ ROZBORY	33
	Příprava fluvných pŮd a médií	33
6.2.1	Zkouška růstu kultur rodu <i>Microbacterium</i> na vytipovaných substrátech.....	34
6.2.2	Mikrobiologický rozbor poufitých pŮd.....	35
6.3	DALŠÍ STANOVENÍ	35
	Stanovení celkového organicky vázaného uhlíku	35
	Stanovení sušiny	36
7	VÝSLEDKY	38
	Test 1: Rozklad PVP v prostředí AK a PI zahradního kompostu	38
	Test 2 : Rozklad v prostředí zahradního kompostu.....	42
	Test 3: Rozklad v prostředí zahradního kompostu, směsné pŮdy a PI zahradního kompostu.....	45
	Test 4: Rozklad v prostředí PI zemědělské pŮdy, PI komerčního kompostu, v prostředí mycelia a prostředí mikrobiální kultury <i>Microbacterium</i> <i>keratolyticum</i>	48
8	DISKUSE.....	54
8.1	BIODEGRADACE V PROSTŘEDÍ AK	54
8.2	BIODEGRADACE POMOCÍ PŮDNÍCH MIKROORGANISMŮ	54
8.2.1	Biodegradace v půdním prostředí.....	55
8.2.2	Biodegradace v prostředí půdních inokul.....	56
8.2.3	Biodegradace za pomoci čisté mikrobiální kultury 4375.....	57
8.2.4	Biodegradace v prostředí odpadního mycelia.....	58
8.3	MIKROBIOLOGICKÉ TESTY	58
	ZÁVĚR	59
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	64
	SEZNAM OBRÁZKŮ	66
	SEZNAM TABULEK	67

ÚVOD

Polymery jsou v téměř všech oblastech lidského života nepostradatelnou součástí. S rychle rostoucí tendencí produkce polymerních materiálů a jejich hromadění v prostředí, bylo nutné začít řešit otázky jejich likvidace, protože jejich stálost a zároveň množství by mohlo mít pro prostředí negativní vliv. Zájem o degradaci polymerů se rozvíjí především ve směru biologického rozkladu. Biodegradace je vhodná hlavně pro polymery ve vodě rozpustné.

Významné místo v řešení problematiky rozkladu polymerních látek zaujímá například polyvinylpyrrolidon (PVP). Tato látka je zajímavá nejen díky široké škále fyzikálních, chemických i biologických vlastností, ale hlavně díky rozsáhlému spektru využití.

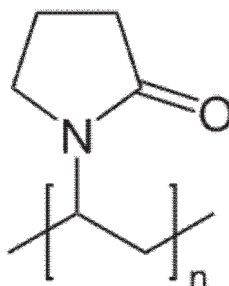
PVP není toxický, ale při hromadění díky své inertnosti představuje zátěž pro životní prostředí. Do prostředí se dovstává výhradně antropogenní činností a jelikož je ve vodě rozpustný, představuje problém hlavně pro vodní a podzemní prostředí. O celkovém dopadu tohoto polymeru na životní prostředí je známo poměrně málo. Předpokládá se, že biodegradace v podzemí je účinnější než degradace ve vodách, protože je vlivem přítomnosti kyslíku odolnější, a tak celková degradace polymeru je poměrně nízká. Vzhledem k tomu je potřeba hledat jiné cesty úpravy, jako například použití vhodných enzymů i mikrobiálních kultur, které napomohou jeho odstranění.

Tato práce navazuje svým zaměřením na sérii prací prováděných na Ústavu inženýrství životního prostředí fakulty technologické UTB ve Zlíně.

I. TEORETICKÁ ÁST

1 POLYVINYLPYRROLIDON

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je díky svým vlastnostem široce používanou látkou v mnoha průmyslových odvětvích. Tuto látku (Obr. 1) můžeme nalézt pod komerčními názvy Kollidon, Polyvidon, Povidone, Plasdone, Krosopovidon, PNVP atd.



Obr. 1 - Chemická struktura polyvinylpyrrolidonu [1]

PVP je amfoterní syntetická látka složená z laktamových kruhů s amidovými vazbami. Z chemického hlediska můžeme tento polymer zařadit mezi poly-N-vinylamidy.

Jedná se o syntetický polymer s mírným amoniakálním nebo aminovým zápachem, který je určen pro domácí výrobu. Je distribuován jako bílý nebo bílo-žlutý amorfní prášek s širokou molekulární distribucí. Molekulové hmotnosti se pohybují od 2,5 do 1200 kDa. Dle průměrné molární hmotnosti jsou jednotlivé polymery PVP značeny K číslem (K 12, 15, 17, 25, 30, 90). K číslo je průměrná hodnota vypočtená z relativní viskozity, se kterou molekulová hmotnost souvisí [1, 2].

Výjimečnou vlastností PVP je jeho rozpustnost. Je schopen rozpouštět jak v hydrofilních rozpouštědlech tak i v rozpouštědlech hydrofóbních. Další zajímavou vlastností je schopnost tvořit komplexní sloučeniny [2].

Viskozita vodných roztoků PVP závisí na jeho molekulové hmotnosti. Kromě viskozity na molekulové hmotnosti závisí také samotná rozpustnost PVP, která s rostoucí hmotností klesá.

1.1 Výroba

PVP byl poprvé syntetizován kolektivem německého chemika Waltera Reepa roku 1939.

Tento polymer je produktem radikálové polymerizace vinylpyrrolidonu. Lze jej vyrobit dvěma způsoby; použitím organických rozpouštědel nebo vody. Jako organické rozpouštědlo lze použít například isopropanol [1, 3].

Dle použitého rozpouštědla pak vzniká PVP nízkomolekulární, střední nebo vysoce molekulární PVP. Výrobci je dodáván buď v práškové formě nebo jako vodné roztoky.

1.2 Použití

První použití rozpustného PVP se datuje v období II. světové války, kde zaujímal úlohu krevní plasmy; později se však od tohoto využití PVP opustilo.

V dnešní době PVP nachází uplatnění v mnoha průmyslových odvětvích.

Ve farmaceutickém průmyslu se kromě výroby léků a kapek používá také jako desinfekční prostředek (PVP-iodin). Při přípravě léků se využívá hlavně kvůli tomu, že dokáže upravit jejich rozpustnost a usnadnit jejich pohyb v těle a u některých léků snižuje jejich nepříznivé vlastnosti. V medicíně a biomedicíně jej lze najít také ve formě hydrogelu, díky schopnosti zadržovat v 3D síti tekutiny [1, 2].

V kosmetickém průmyslu je využíván hlavně jako součást různých detergentů, dále pak vlasových přípravků – ampóny, spreje na vlasy, krém na obličej, zubních past atd.

Kromě těchto průmyslových odvětví, nalézá PVP aplikaci také v potravinářství, kde se pod označením E 1201 používá jako stabilizátor, plnidlo, nosič a emulgátor. Lze jej nalézt v umělých sladidlech, potravinářských barvivech, vitamínech, slazených nápojích, cukrovinkách atd.

Mimo jiné našel tento polymer uplatnění také jako aditivum cementu, papírové plnivo, při výrobě fotografií a v litografii [1].

1.3 Vliv na zdraví člověka a na životní prostředí

Vliv PVP na člověka je téměř nulový, jak plyne z jeho široké škály aplikací. V nadměrném množství může způsobovat podráždění nebo nadýmání.

Díky jeho aplikacím a využívání v potravinářském a farmaceutickém průmyslu bylo nutno stanovit jeho denní dávku, která se pohybuje v rozmezí 0-50 mg/kg váhy. Rozpustný PVP není metabolizován, přesto (jak ukázaly studie), je jeho malé množství schopno po

intravenózní aplikaci zstat v organismu. Při orálním požití PVP je jakákoliv toxicita (chronická, subchronická i akutní) pro organismus nízká. Nebyly prokázány ani mutagenní ani teratogenní dopady na organismus [1].

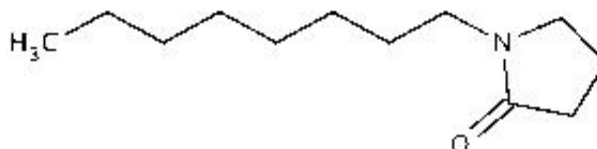
PVP je obecně považován za biologicky nerozložitelnou látku. Jeho vliv na život byl studován zatím jen okrajově, ale z veškerých získaných informací lze usoudit jeho možná akumulace v prostředí. Jak plyne z literatury je zejména inertní v životním prostředí a tedy prochází životními procesy beze změny.

1.4 Stanovení

Nejjednodušším způsobem stanovení kvality PVP je IR spektroskopie. Dále lze tento polymer stanovit díky jeho komplexaci s jódem pomocí fotometrie případně chromatografickými metodami - GPC i GC [1, 2].

2 1-OCTYL-2-PYRROLIDON

Octylpyrrolidon - $C_{12}H_{23}NO$ (OP) je jedna z dalších pyrrolidonových sloučenin. Tuto povrchově aktivní látku můžeme také nalézt pod názvy jako je Caprylyl pyrrolidon; 2-Pyrrolidone, 1-octyl; 1-Octyl-2-pyrrolidone



Obr. 2 - Chemická struktura

1-octyl-2-pyrrolidonu [4]

2.1 Vlastnosti

Jedná se o nevodnou olejovitou kapalinu bílé nebo mírně nažloutlé barvy. Za normálních podmínek je oktylpyrrolidon stabilní. Rozpustnost ve vodě je téměř minimální. Nejvýhodnější vlastností, kterou se tato látka vyznačuje je její povrchová aktivita [4 - 6].

2.2 Použití

Uplatnění nachází tato sloučenina hlavně v kosmetickém průmyslu. Můžeme ji nalézt v různých detergentech nebo například v šampánech. Dále se jako pyrrolidonová sloučenina může použít k syntéze agrochemikálií, v plastickém průmyslu a v výrobě speciálních barviv.

2.3 Vliv na zdraví člověka a na životní prostředí

OP může vstoupit do organismu člověka dermálně, orálně nebo skrz oči. Je klasifikován jako flammable kapalina, tudíž ve vysokých koncentracích může trvale poškozovat kůži a oči, při požití je schopný leptat dutinu ústní, jícen a žaludek případně dýchací cesty. Při orálním podání se může navíc akumulovat v organismu. Mutagenita ani karcinogenita této látky není prokázána [4 - 7].

OP je poměrně dobře degradovatelný a biologicky odbouratelný; přesto nemá příznivé účinky na životní prostředí. Toxicky působí zejména na vodní organismy a jeho toxický efekt může ve vodním prostředí dlouhodobě přetrvávat [5, 6].

3 BIOLOGICKÝ ROZKLAD

Biodegradace i biotická degradace je biochemická degradace materiálů způsobená působením přirozeně se vyskytujících mikroorganismů, hub i algaí v prostředí, kde degradace probíhá. Součástí biodegradace je mineralizace. Tyto pochody mohou probíhat jak v aerobním, tak anaerobním prostředí.

Produkty biodegradace (v ideálním případě) probíhající za přítomnosti vzduchu (v aerobním prostředí), je oxid uhličitý a voda. Při biodegradaci probíhající bez přítomnosti vzduchu (anaerobním prostředí) jsou hlavními produkty methan, oxid uhličitý, voda. Při obou typech biodegradace k nárůstu biomasy [8,9].

Biodegradaci podléhají jak přírodní látky, tak i některé látky syntetické. U syntetických látek platí, čím vyšší je molekulová hmotnost, tím obtížnější je její biodegradace. Rychlost biodegradace je ovlivněna řadou aspektů jako je například mikrobiální zastoupení v prostředí, charakter daného prostředí, charakter rozkládané látky, dostupné množství biogenních prvků a kyslíku, jde-li o aerobní rozklad atd.

Pro vlastní degradaci proces je v podstatě potřeba několik druhů mikroorganismů navazujících na sebe svou činností. Tyto rozkládanou látku nejprve rozloží pomocí produkovaných enzymů na monomery a ty dále mineralizují.

Zahájení samotné biodegradace může být v různých časových horizontech. K urychlení zahájení biodegradace a ke zvýšení samotné kvantity rozkladu je dobré využít fyzikálních, chemických nebo fyzikálně-chemických metod předúprav. Lze použít například oxidace nebo fotooxidace procesů [10, 11]. Kromě předúpravných metod lze v některých případech podpořit biodegradaci i přidáním vhodné podpůrné látky - kosubstrátu.

Účinnost biologického rozkladu můžeme stanovit pomocí sledování biologické spotřeby kyslíku, stanovení TOC, sušiny, produkce oxidu uhličitého, methanu, koncentrací stanovení atd. [9, 10].

3.1 Biodegradace PVP

Podle dostupných studií patří samotné PVP k nesnadno biologicky degradovatelným polymerům. Zatím nebyla možnost mikrobiálního rozkladu více zdroji potvrzena ani zcela

vyložená. Složitost biologického rozkladu je závislá na obsahu laktamového kruhu ve struktuře PVP [12]. Míra biologické rozložitelnosti PVP může být, jak ukazují studie, v různých podmínkách různá, v aktivovaném kalu [11, 12, ...].

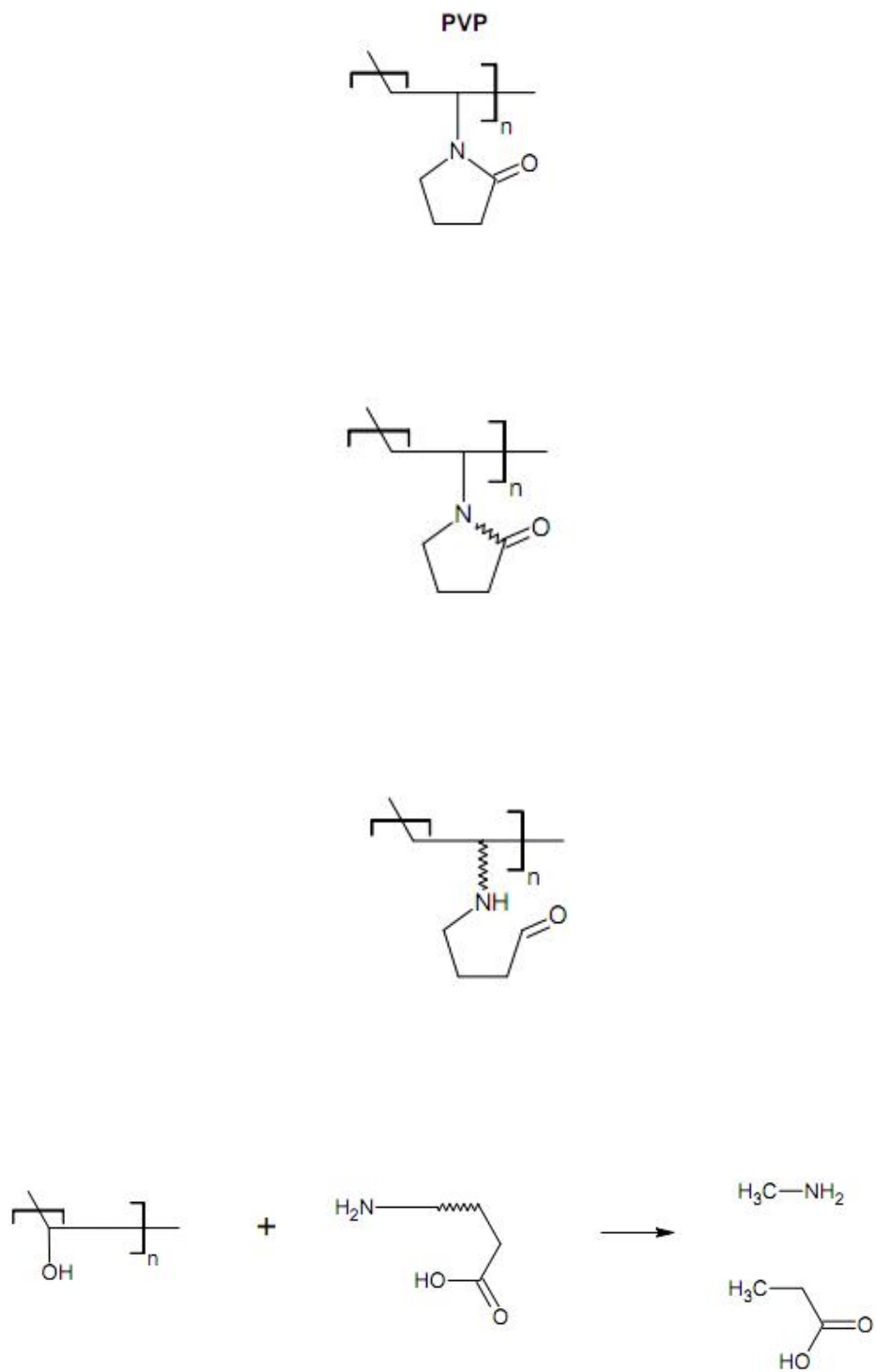
Samotná biodegradace PVP je bez předúprav poměrně nízká. Při předúpravách dochází k depolymeraci PVP a vzniku sloučenin, které jsou za vhodných podmínek biologicky snáze rozložitelné. Ovšem z výsledků plyne, že realizace předúprav před samotným biologickým rozkladem je v praxi, především na úrovni, hlavně kvůli finanční náročnosti víceméně jen na teoretické úrovni.

Přesný mechanismus rozkladu PVP není znám. Hlavním krokem v předpokládaném mechanismu biodegradace je otevření samotného laktamového kruhu v místě amidové vazby tohoto heterocyklu. V dalším kroku biodegradace PVP dojde k rozkladu vzniklého sekundárního aminu. Toto dění probíhá za pomoci enzymu aminooxidas. Posledním krokem je rozklad vzniklých konečných produktů [11]; předpokládaný mechanismus biologického rozkladu PVP je na Obr. 3.

K narušení laktamového kruhu pravděpodobně dochází díky enzymům α -laktamas. Tyto enzymy se řadí do skupiny amidas; α -laktamasa existuje v podobě enantiomer (+) i (-).

Producenty enzymu α -laktamasy jsou většinou bakterie, ale její produkce jsou schopná i některá archea [13].

Možnost produkce tohoto enzymu funguje u bakterií schopných využívat *N*-acylu jako jediného zdroje uhlíku a energie [13]. Dle dostupných studií se jedná hlavně o bakterie rodu *Microbacterium*. V dřívější literatuře je možné tento rod nalézt pod názvem *Aureobacterium*, později byla zjištěna shodnost těchto rodů bakterií a dále jsou vedeny pod názvem *Microbacterium* [15, 16]. Dále byla možnost produkce tohoto enzymu zjištěna u *Sulfobus soltataricus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Brevibacterium sp.*, *Escherichia coli rosetta* [12, 13, 14]. Na které studie se zabývají immobilizací vyprodukovaných enzymů α -laktamas. Například enzym izolovaný z druhu *Microbacterium hydrocarbonoxydans* po purifikaci a immobilizaci vykazoval větší stabilitu než volný enzym, a navíc kinetika a enzymová aktivita se immobilizací výrazně snížila [17]. Podobný jev lze očekávat i u izolace a immobilizace těchto enzymů z jiných druhů bakterií.



Obr. 3 - Předpokládaný mechanismus biodegradace PVP[11]

O biodegradaci PVP se pokoušelo několik studií, a však bez předchozích předuprav nebyly zaznamenány kladné výsledky. Jedinou publikovanou studií, která prezentuje pozitivní

výsledky byly testy provedené Ghanem a El-Mohdym [12]. Dále bylo ur itých pozitivních výsledk dosafeno také v p edchozích diplomových pracích [18].

3.2 Biodegradace PVP ve vodném prost edí

Samotná biodegradace PVP ve vodném prost edí aktivovaného kalu nebyla prokázána. Úbytky PVP jsou p i azovány spí-e schopnosti sorpce PVP na kaly [19, 20]. Sorpce PVP byla zkoumána v p edchozích DP . *Testovala* se sorpce PVP na aerobní i anaerobní kaly a také na aktivní uhlí. Ú innost byla hodnocena dle úbytku TOC. Nejv t-ího odstran ní se dosahovalo p i sorpci na aktivní uhlí. Zde bylo dosafeno 90% odstran ní množství TOC cca po 30 minutách od smíchání vzorku se sorbentem. PVP také dob e sorbuje také na aerobní AK; docházelo po 30 minutách k úbytku TOC o 15%. Naopak p i zkou-kách sorpce PVP na anaerobní kal se kladných výsledk nedocílilo. Nejlep-ích výsledk se dosahovalo p i níř-ích koncentracích PVP. Obecn z prací plyne, že % sorpce na pevné materiály i na biologicky aktivovaný kal roste s klesající koncentrací PVP [19, 20].

Pozitivních výsledk , jak již bylo d íve zmín no, se dostává po p edchozích úpravách. P i t chto p edúpravách dochází k depolymeraci PVP a tím i ke snížení molekulové hmotnosti a vzniku látek biologicky lépe degradovatelných. P edúpravy mohou být ryze fyzikálního, chemického nebo fyzikáln -chemického charakteru.

Jako mofnou p eúpravu lze poufít fotooxida ní degradaci pomocí vhodného pom ru kombinace UV/H₂O₂. Dal-í mofností chemické p edúpravy je Fentonova reakce (H₂O₂/Fe³⁺). Tyto p eúpravy vzork PVP byly provedeny v pracích [11, 19]. U takto upravených látek byla zaznamenána vy-í biodegradace jak v aerobním, tak i anaerobním prost edí. Docházelo zde k cca 45 % rozklad m. Míra degradace se zde hodnotila dle produkce methanu u biodegradace v anaerobním prost edí, v aerobním prost edí dle BSK. [10, 19].

Dal-í mofností p edúpravy chemickým zp sobem je basická hydrolyza. Testována byla biologická rozlořitelnost vzniklých hydrolyzát v aerobním prost edí AK z OV Biotika a.s., Slovenská republika. Hydrolyza vzork PVP byla vhodná pro vzorky o níř-ích koncentracích. M ení se provád lo na p ístroji Micro-Oxymax a hodnotícím kritériem byla produkce CO₂. Testován zde byl vliv doby hydrolyzy a zvlá-te vliv pH b hem hydrolyzy. Biodegradace hydrolyzát nabývala vy-ích hodnot neř samotné PVP a v-ak ukázalo se, že

ani doba hydrolyzy ani pH během hydrolyzy nemá významný vliv na výsledky následné biodegradace hydrolyzát [11].

Kromě rozkladu vzniklých produktů předúpravných metod byla testována i rozložitelnost PVP aktivovaným kalem a kalem laboratorně adaptovaným na NMP. Testy probíhaly za aerobních podmínek s různými typy aktivovaných kalů. K testování byly použity kaly z OV Zlín a Malenovice, Česká republika, z OV farmaceutického závodu vyrábějícího léčiva morfolinového typu Zentiva a.s., Hlohovec, Slovenská republika, z OV napojené na farmaceutický závod Biotika a.s., Slovenská Lúpa a v době výroby penicilinu a v době, kdy penicilin nebyl vyráběn.

U těchto kalů vykazovaly kladné výsledky BSK pouze biorozklady provedené za specifických podmínek v kálech z penicilinové výroby. Pozitivní výsledky lze přisoudit možná indukci *Penicilinas*. Ostatní hodnoty BSK se pohybovaly pod hodnotami endogenní respirace.

Dále byly tyto kaly laboratorně adaptovány na NMP. U všech rozkladů v adaptovaném kalu bylo dosaženo kladných hodnot BSK samotného PVP, jen u AK získaného v době výroby penicilinu docházelo k potlačení biodegradace. Nejvyššímu rozkladu o cca 14% za 350 h, došlo u kalu z mstské čistírny. Respirační hodnoty byly získány pomocí přístroje Bial BOD 10 [11, 18, 19].

Kromě rozkladu samotného PVP byl zkoumán i rozklad kombinace PVP s kosubstráty a kombinace PVP a odpadního mycelia. Jako kosubstráty byly zvoleny akrylamid, NMP, APhA. Testování probíhalo na přístroji Micro-Oxymax. Hlavním hodnotícím kritériem byla BSK, jako kontrola sloužil úbytek TOC. Dle získaných výsledků je nejvhodnější variantou kombinace PVP a mycelia, u které bylo v kalu z penicilinové výroby dosaženo hodnot rozkladu cca 25 % za 211 h. Ovšem jednoznačný vliv kosubstrátu i mycelia na biodegradaci nelze určit, záleží spíše na mikrobiálním zastoupení v rozkladném prostředí a na vhodné kombinaci PVP s špodičnou látkou [18].

Při srovnání účinnosti odstranění PVP z odpadních vod se u předložených metod jeví jako nejvhodnější metoda odstranění sorpce, případně sorpce v kombinaci s jinou metodou [11, 18 - 20].

3.3 Biodegradace PVP v p dním prost edí

Dle dostupných znalostí se biodegradace PVP pomocí p dních bakterií jevila jako jeden z možných způsobů rozkladu PVP s pozitivním výsledkem. Jediná publikovaná studie [12] s pozitivním biorozkladem PVP byla provedena v p dním prost edí. V tomto testu byla zkoumána biodegradace hydrogelu PVA/PVP pomocí soil burial test . Hydrogely byly připraveny pomocí -zá ení v % zastoupení PVA/PVP 100/0, 90/10, 80/20, 70/30, 50/50 a 0/100. Byly použity dva typy p dy: jílovitá p da a p da pís itého charakteru. Krom biologického rozkladu byla zkoumána i antimikrobiální účinnost a vlastnosti připravených gel .

Testy ukázaly, že čím větší je poměr PVP v hydrogelech, tím menší je degradace. U vzorku hydrogelu s poměrem PVA/PVP 0/100, tedy hydrogelu pouze s PVP bylo v t-ího stupně degradace hydrogel docíleno v jílovité p d , kde došlo k 13% rozkladu samotného PVP za p l roku. V p d pís itého charakteru došlo k 10% degradaci PVP během stejného období. Míra degradace se zde hodnotila podle váhového úbytku hydrogel [12].

Na konci test byly z reaktor izolovány bakterie pro jejich identifikaci. Izolované bakterie z p d byly identifikovány jako *Pseudomonas* a *Alcaligenes*. Z jílovité p dy bylo izolováno 5 druhů bakterií rodu *Pseudomonas* a 3 druhy bakterií rodu *Alcaligenes*, z pís ité p dy 3 druhy *Pseudomonas* a 2 *Alcaligenes*. Patří vliv na biodegradaci PVA/PVP hydrogel bude mít nejspíše i způsob přípravy hydrogel [12].

Na základ této pozitivní biodegradace, byl v předchozí diplomové práci [18] zapsán test rozkladu PVP v p dním prost edí a prost edí p dního inokula. Pro tyto testy byla použita p da lesního charakteru o sušiny 28,5%. Míra biodegradace zde byla hodnocena podle BSK a kontrolována podle úbytku TOC.

Samotný p dní test trval 39 dní a byl prováděn na o ístroji MicroOxymax. Na konci experimentu byly hodnoty BSK nad hodnotami slepého pokusu, z čehož lze usoudit možný rozklad PVP v tomto p dním prost edí. Hodnota % biologického rozkladu se pohybovala kolem cca 7%.

Krom toho bylo jako prost edí použito p dní inokulum získané ze stejné p dy. Tento test trval 29 dní. Krom vzorku samotného PVP byly testovány i vzorky PVP s kosubstrátem, což byl akrylamid, 1-methyl-2-pyrrolidon, N-acetylphenylalanin, i v kombinaci PVP s

myceliem. Hodnoty BSK vzorku samotného PVP se pohybovaly taktéž mírně nad hodnotami endogenní respirace, z čehož lze odvodit, že dochází k primárnímu rozkladu. Při použití kompostu jako substrátu docházelo k vyšším hodnotám rozkladu než u samotného PVP. Nejvyšší hodnoty biologického rozkladu (cca 17%) nabývala kombinace PVP s myceliem. Stejně jako u odstranění PVP pomocí kalu se i u pěstování stanovení nedá určit jednoznačný trend účinku kompostu na biodegradaci [18].

4 CÍL PRÁCE

I přes předpokládanou biologickou resistenci PVP doposud provedené testy biodegradaci nevyšly úspěšně. Aerobní rozklad ve vodných prostředí provedený v minulých pracích měl sice pozitivní výsledky, ale byl málo přesvědčivý. Přesvědčivější byly testy provedené v pevných prostředí.

Tato práce navazuje na předchozí diplomové práce. Cílem této je sledování míry biologické rozložitelnosti PVP hlavně v pevných prostředí za aerobních podmínek a potvrzením výsledků experimentů provedených El-Mohdym a Ghanem [12] a Vaňkovou [18]. Pro testování biodegradace bude použito také vlastní pevné inokulum. Experimenty budou provedeny pro různé PVP, kosubstráty a mycelium a kombinace kosubstrátů, případně mycelia s PVP. Dále se pokusíme o nalezení bakteriální kultury rodu *Microbacterium* produkující enzym β -laktamázy a případně mikrobiologické stanovení mikroorganismů, které mají vliv na biodegradaci PVP.

II. PRAKTICKÁ ÁST

5 EXPERIMENTÁLNÍ ÁST

5.1 Poufíté chemikálie

Chemikálie pot ebné k experiment m byly vyrobeny firmami Lachema a.s., R, Penta, Sigma-Aldrich s.r.o. istota jednotlivých slou enin byla p.a.

KH_2PO_4	dihydrogenfosfore nan draselný
K_2HPO_4	hydrogenfosfore nan draselný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	hydrogenfosfore nan sodný dihydrát
NH_4Cl	chlorid amonný
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu ho e natého
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu vápenatého
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu flelezitého
MgSO_4	síran ho e natý
CaCl_2	chlorid vápenatý
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	síran amonný
NH_4NO_3	dusi nan amonný
NaCl	chlorid sodný
H_3BO_3	kyselina boritá
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu fleleznatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zine natého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu manganatého
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu m natého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdenanu amonného

5.2 Použití přístroje

Mikrorespirometr Micro-Oxymax, Columbus Ins., Ohio, USA

Analyzátor organicky vázaného uhlíku Shimadzu TOC-5000 A, Rakousko

pH metr pH/mV/ION metr 735, IonLab WTW

Laboratorní centrifuga Jouan MR23i

Laboratorní váhy Santorius, Německo

Sušárna Memmert, SRN

Laboratorní autokláv LAM-3-20-MCS-J Sonoclav, Německo

Aseptický laminární box Telstar Bio II A, Itálie

5.3 Použití biologický materiál

Aktivovaný kal z čistírny komunálních odpadních vod

AK byl po transportu z ČOV zbaven hrubých nečistot filtrací přes síto, 3x dekantován pitnou vodou a 24 h provzdušněn ve fermentorech. K samotnému experimentu bylo nutné získat požadovanou koncentraci sušiny kalu. Vypočtené množství kalu se nechalo po dobu 10 minut centrifugovat při 3000 ot/min a získaná biomasa byla poté suspendována v biomédii tak aby byla získána požadovaná koncentrace.

Podle

Zastoupení biogenních prvků v jednotlivých podmínkách je uvedeno v *Tab. 1*.

Zahradní kompost

Zahradní kompostová půda byla odebrána z lokality Zlín- Malenovice na podzim 2011. Jedná se o vyzrálý domácí kompost o stáří 2-3 roky, sušina se v jednotlivých experimentech pohybovala kolem 50 %.

Zem d lská p da

Zem d lská p da pocházela z lokality Zadve ic. Su-ina této p dy byla stanovena na 89 %.

Komer ní kompost

Dále byl poufít komer ní kompost firmy Agro CS a.s. Kompost obsahoval su-inu 46 %.

Sm sná p da

Sm sná p da byla slofená ze zem d lské p dy a komer ního kompostu v pom ru 1:5.

Su-ina p ipravené sm sné p dy byla 57%.

P dní inokulum dle normy ISO 14851:1999

Z t chto p d bylo p ipraveno p dní inokulum. PI bylo p ipraveno dle normy ISO 14851:1999 - odváfené mnofství zeminy obsahující 100 g su-iny bylo vyt epáváno po dobu 30 minut v minerálním médiu. Po 30 minutovém odstání byla získaná suspenze p eced na p es ídkou tkaninu a v d li kách 24 hodin provzdu- ována (TOC < 20 mg/l). Takto p ipravené p dní inokulum bylo poufíváno pro dal-í práci.

Tab. 1 - Zastoupení prvku v p dách stanovené elementární analýzou

Prvek	Zahradní kompost		Zem d lská p da		Komer ní kompost	
	Obsah [%]	SD	Obsah [%]	SD	Obsah [%]	SD
C	11,203	0,59	2,221	0,04	20,398	0,74
H	1,378	0,07	0,504	0,01	2,314	0,08
N	1,096	0,07	-	-	1,356	0,32
S	0,144	0,03	-	-	0,229	0,02

SD sm rodatná odchylka

Penicilinová kultura

Krom zmín ných biodegrada ních kultur bylo poufíto také odpadní mycelium z výroby antibiotik Biotika a.s. (Slovenská republika). Jednalo se o sm s odpadní biomasy mikrobiálního kmene *Penicillium chrysogenum* a zbytek substrátu a penicilínu. Su-ina mycelia byla 21,86%. CHSK_{Cr} bylo stanoveno na 1023 mgO₂/g. Elementární analýza: 42,45% ± 0,34 C, 6,899% ± 0,05 H, 7,879% ± 0,05 N a 0,719 % ± 0,04 S. [18]

5.4 Testované vzorky

Ve které testované vzorky byly získány od firmy Sigma-Aldrich

polyvinylpyrrolidon (PVP 15)	TOC = 64,84 % C $M_w = 10\,000$ g/mol TSK = 2020 mg O ₂ /g
1-methyl-2-pyrrolidon (1M-2P, MP)	TOC = 60,58 % C TSK = 2020 mg O ₂ /g
1-octyl-2-pyrrolidon (1O-2P)	TOC = 73,10 % C TSK = 2680 mg O ₂ /g
G sodná s 1 penicilínu (PNa)	TOC = 53,92 % C TSK = 1662 mg O ₂ /g
N-acetyl-phenylalanin (APhA)	TOC = 63,76 % C TSK = 2007 mg O ₂ /g

Teoretické spotřeby kyslíku byly vypočteny podle rovnice /4/, která je uvedena dále v textu.

5.5 Použitá minerální média

Biomedium pro aktivovaný kal

A)	MgSO ₄	22,5	g do 1l
B)	CaCl ₂	27,5	g do 1l
C)	FeCl ₃ · 6 H ₂ O	0,25	g do 1l
D)	(NH ₄) ₂ SO ₄	10	g do 1l
E)	KH ₂ PO ₄	8,5	g do 1l
	K ₂ HPO ₄	21,75	g do 1l
	Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	33,4	g do 1l

	NH_4Cl	0,5	g do 1l
F)	H_3BO_3	0,75	g do 1l
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	3g	do 1l
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g do 1l
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,5	g do 1l
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,1813	g do 1l
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05	g do 1l
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,7	g do 1l

1l biomédia pro AK byl p ípraven smícháním 1ml zásobních roztok A, B, C a stopových prvk - F, 5ml zásobního roztoku D, 20ml fosfátového pufru ó roztok E a destilované vody. Destilovaná voda pro p ípravu tohoto minerálního média byla 24 hodin provzdu– ovaná. Biomédium bylo p ípraveno dle normy SN EN ISO 9408 [21].

Minerální médium pro p ípravu p dního inokula

A)	KH_2PO_4	8,5	g do 1l
	K_2HPO_4	21,75	g do 1l
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	33,4	g do 1l
	NH_4Cl	0,5	g do 1l
B)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22,5	g do 1l
C)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	36,4	g do 1l
D)	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,25	g do 1l

1 l p ípraveného minerálního média obsahoval 10 ml zásobního roztoku A a 1ml zásobních roztok B, C a D a zbytek destilované vody [22].

Minerální médium pro p du

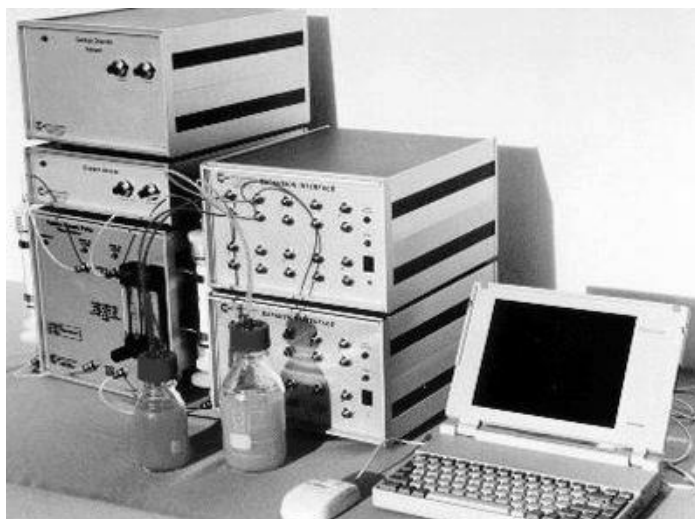
Biomédium pro p du bylo p ípraveno z 1g NH_4NO_3 a 0,2g KHPO_4 do 1l destilované vody.

6 METODY STANOVENÍ

6.1 Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním a p dním prostředí stanovením spot eby kyslíku v uzav eném respirometru

Stanovení biologické rozložitelnosti bylo provád no v samotném p dním prostředí, v prostředí p dního inokula a v prostředí aerobního kalu.

Samotné stanovení biologické rozložitelnosti probíhalo na respirometru Micro-Oxymax. Jedná se o uzav ený systém, ve kterém je kontinuáln zaznamenáván úbytek O_2 a množství vyprodukovaného CO_2 [23]. Míra degradace byla hodnocena hlavn dle celkové BSK, jako kontrolní ukazatel u kapalných vzork sloužil úbytek TOC. Procento biologického rozkladu /2/ sledované látky bylo vypo teno jako pom r substrátové biologické spot eby kyslíku /1/ a teoretické spot eby kyslíku /4/.



Obr. 4 - Ilustra ní foto uspo ádání respirometru

MicroOxymax [23]

Objem respira ního reaktoru byl v p ípad bidegradace v kapalném inokulu 50 ml, v p ípad rozkladu v p d bylo navaflováno 10 g p dy o 50% su-in . Testované vzorky byly do reaktor dávkovány tak, aby byla koncentrace PVP v ur ených reaktorech cca 200 mg/l a

koncentrace zvolených kosubstrátů cca 200 mg/l, při kombinaci PVP/kosubstrát byl poměr PVP:kosubstrát 1:1. V případě biodegradace v této mikrobiální kultuře 4375 byly použity sterilní roztoky.

Všechny vzorky byly měřeny několikrát vedle sebe. Kromě samotných vzorků byly připraveny i slepé pokusy. Slepým pokusem pro samotné kosubstráty i samotné PVP byl vzorek bez přítomnosti sledovaných látek, slepým pokusem pro kombinace PVP/kosubstrát byla respirace samotného kosubstrátu.

V průběhu testu byla udržována pomocí vodní lázně konstantní teplota $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Kapalné vzorky byly kontinuálně míchány.

V respiračním experimentu nebyl dáván přídatek *N*-allylthiomoviny (ATM), jelikož v předchozích diplomových pracích [18] se prokázal negativní vliv ATM na primární rozklad PVP.

U jednotlivých vzorků rozkládaných a kapalném prostředí bylo na začátku a na konci experimentu stanoveno pH a množství celkového organicky vázaného uhlíku (TOC). U testovaných vzorků rozkládaných v prostředí samotné pody byla na začátku a na konci stanovena sušina a na konci změněno pH.

Výpočet substrátové biologické spotřeby kyslíku [mg/g]:

$$B_S = \frac{(B_t - B_{Bt})}{m_t} \quad / 1/$$

kde: B_S je specifická BSK zkoušené látky [mg/g]

B_t je změněná BSK zkoušené látky F_t vase t [mg]

B_{Bt} je změněná BSK slepého pokusu stanovení F_B vase t [mg]

m_t je hmotnostní zkoušené látky [g]

Výpočet procenta biologického rozkladu [%]:

$$D_{TSK} = 100 \frac{B_S}{TSK} \quad / 2/$$

$$D_{CHSK} = 100 \frac{B_S}{CHSK_{Cr}} \quad / 3/$$

kde: D_{TSK} ó procento biologického rozkladu dle TSK v ase t [%]

$D_{CHSK_{Cr}}$ ó procento biologického rozkladu dle $CHSK_{Cr}$ v ase t [%]

B_S ó specifická BSK zkou-ené látky [mg/g]

TSK ó teoretická spot eba zkou-ené látky [mg/g]

$CHSK_{Cr}$ ó chemická spot eba zkou-ené látky [mg/g]

Výpo et teoretické spot eby kyslíku [mg/g]:

$$TSK = \frac{16 \cdot \left[2 \cdot C + \frac{1}{2} \cdot (H - 3 \cdot N) + 3 \cdot S + \frac{1}{2} \cdot Na - O \right]}{M_r} \quad / 4/$$

kde: TSK ó teoretická spot eba kyslíku [mg/g]

C ó po et atom uhlík [1]

H ó po et atom vodík [1]

N ó po et atom dusík [1]

S ó po et atom síry [1]

Na ó po et atom sodíku [1]

O ó po et atom kyslíku [1]

6.2 Mikrobiologické rozborý

Úkolem mikrobiologické ásti bylo ur it kultury rodu *Microbacterium*, které jsou schopné teoretické produkce enzymu -lactamasy a p i nalezení této kultury ji poufít pro samotné respira ní testy. Dále byly u vzork p d provedeny mikrobiologické rozborý.

P íprava fivných p d a médií

Fyziologický roztok byl p ipraven smícháním 8,6 g NaCl do 1l destilované vody. Pro mikrobiologickou práci byl sterilizován.

Minerální agar (MA) s kvasni ným autolyzátem (KVA) byl p ipraven z 3,9 g základu, 6 mg KVA a 0,3 ml stopových prvk do 200 ml destilované vody.

MA s APhA byl p ipraven z 3,9 g základu, 6 mg KVA, 0,3 ml stopových prvk a 180 ml destilované vody. Po sterilizaci bylo p i teplot 50°C p idáno k roztoku 20 ml sterilního p edeh átého roztoku APhA o koncentraci 5 g/l. Získaná koncentrace NAF v p ipravené fivné p d tedy byla 500 mg/l.

MA s MP byl p ipraven z 3,9 g základu, 6 mg KVA, 0,3 ml stopových prvk a 197 ml destilované vody. K takto p ipravené suspenzi se po sterilizaci p i teplot 50°C p idalo 6 ml sterilního roztoku 2 MP o koncentraci. Koncentrace p ipravené fivné p dy byla 3 g 2MP/l.

MA s OP byl p ipraven z 3,9 g základu, 6 mg KVA, 0,3 ml stopových prvk do 199 ml destilované vody. Po sterilizaci této suspenze bylo p i teplot 50°C p idáno 0,5 ml koncentrovaného 1O-2P. Koncentrace 1O-2P v získané fivné p d byla 2 g/l.

Agar pro p dní bakterie (ABP) byl p ipraven z 5,8 g základu, 150 mg KVA, 150 mg tryptonu a 0,3 ml stopových prvk do 300 ml destilované vody.

TYA agar se sojovým extraktem byl p ipraven smícháním 2,1 g TYA agaru, g sojového extraktu a 100 ml destilované vody.

Takto p ipravená fivná média byla sterilizována v autoklávu po dobu 20 minu a poté rozlita na petriho misky. Dále byly jednotlivé misky zao kovány a za tmy kultivovány p i 25°C. Doba kultivace se u jednotlivých mikrobiologických stanovení li-ila. U mikrobiologického rozboru p d byla doba kultivace cca 30 dní. U zkou-ky r stu kultur rodu *Microbacterium* byla doba kultivace cca 10 dní.

6.2.1 Zkou-ka r stu kultur rodu *Microbacterium* na vytipovaných substrátech

Úkolem této zkou-ky bylo identifikovat kultury rodu *Microbacterium*, které jsou schopny produkce -lactamasy, tedy -t pení *N*-acylového zbytku.

Vytipované kultury byly zakoupeny z eské sbírky mikroorganism . Jednalo se o následující kultury:

CCM 2634^T *Microbacterium terregens*

CCM 2299^T *Microbacterium testaceum*

CCM 4373 ^T	<i>Microbacterium trichothecenolyticum</i>
CCM 4523 ^T	<i>Microbacterium dextranolyticum</i>
CCM 4370 ^T	<i>Microbacterium arabinogalactanolyticum</i>
CCM 1928 ^T	<i>Microbacterium barkeri</i>
CCM 4375 ^T	<i>Microbacterium keratanolyticum</i>
CCM 4364 ^T	<i>Microbacterium schleiferi</i>
CCM 4374 ^T	<i>Microbacterium terrae</i>

Dříve jmenované kultury byly naočkovány na zvolené živné prostředí MA, OP, APhA, 2MP - a kultivovány při teplotě 25°C po dobu cca 5-10 dní.

Koncentrace substrátů na MA byly 3 g/l APhA, 3 g/l MP a 2 g/l 1O-2P. Později byla koncentrace APhA snížena 500 mg/l, protože při vodní dávce se ukázala pro zkoumané kultury jako toxická. Hlavním kritériem růstu byly rozdíly růstu dané kultury na MA a na živném prostředí s APhA.

6.2.2 Mikrobiologický rozbor použitých prostředí

1g prostředí byl suspendován a vylisován v 10 ml fyziologického roztoku. Poté byl pomocí desetinného ředění naředěn ve fyziologickém roztoku po koncentraci 10⁻⁶ a poté byly vybrané koncentrace naočkovány na specifické živné prostředí MA, ABP, a ve tm a při teplotě 25°C kultivovány. Kultivace probíhala cca 3 týdny. Během kultivace byly vykořevané misky sledovány a odešitány po čty bakterii a aktinomycet. Odešty se prováděly ušední s nejlepší pošitelností kolonií. Odešty aktinomycet se prováděly za pomoci mikroskopu.

6.3 Další stanovení

Stanovení celkového organicky vázaného uhlíku

Stanovení celkového organicky vázaného uhlíku se provádělo na analyzátoru TOC 5000A, Shimadzu. Analyzátor pracuje na principu oxidace celkového uhlíku, vznikajícího spalováním vzorku v trubici s platinovým drátem v proudu kyslíku. Vzniklý oxid uhlíkový je detekován na I⁻ detektoru.

Stanovení sušiny

Sušina vzorku se stanovovala u aktivovaného kalu i u pedy jak na počátku, tak i na konci experimentu.

Stanovení sušiny AK:

10 ml suspenze AK byly pod tlakem přefiltrovány přes zvážený filtrační papír a sušeny při 105°C po dobu cca 3 hodiny do konstantní hmotnosti a po vychladnutí v exikátoru znovu zváženy s přesností na 10 mg. Stanovená sušina byla poté vypočítána dle vzorce:

$$X = \left(\frac{m_n - m_0}{m_n} \right) \cdot \frac{1}{V_{pip}} \quad / 5/$$

kde: X – sušina [g/l]

m_n – hmotnost kalu po vysušení [g]

m_0 – hmotnost filtračního papíru [g]

V_{pip} – pipetovaný objem [l]

Stanovení sušiny pedy:

5 g pedy bylo odváženo s přesností na 10 mg na předem vysušenou misku (při 105°C po dobu 30 min) a sušeno při 105°C po dobu cca 3 hodin do konstantní hmotnosti. Po vysušení se petriho miska se sušeným vzorkem pedy zakrytá víčkem vložila do exikátoru a po vychladnutí se opět zvážila s přesností na 10 mg. Sušina pedy se poté vypočítala pomocí konstantní hmotnosti vysušené pedy a hmotností pedy před vysušením a vyjádřila se v procentech.

Stanovení pH

pH bylo stanoveno pomocí přístroje pH/mV/ion metrem 735, InoLab, byl před vlastním stanovením nakalibrován pomocí kalibračních pufrů 4 a 7.

Stanovení pH_{KCl} ó stanovení p dní vým nné kapacity

pH u vzork p dy se m ilo pomocí tzv. vým nné kapacity - pH_{KCl} . Vzorky byly smíchány s 0,5M roztokem KCl, po 24 hodinách p efiltrovány a bylo zm eno jejich pH.

V-echny hodnoty byly tabelárn a graficky zpracovány pomocí po ita ových program Microsoft Word s Microsoft Excel.

7 VÝSLEDKY

Test 1: Rozklad PVP v prostředí AK a PI zahradního kompostu

Inokulum : aktivovaný kal (AK, cca 500 mg/l)

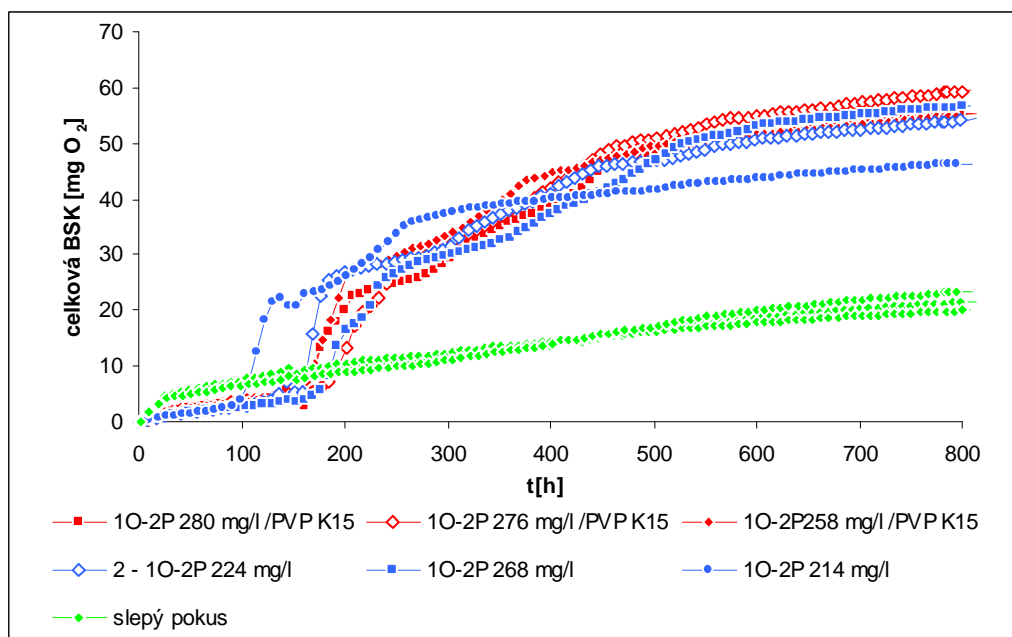
p dní inokulum o zahradního kompostu (PI-ZK)

Tab. 2 - Koncentrace rozkládaných sloučenin v baktériích, čas lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu vzork

		$C_{kosubstratu}$ [mg/l]	C_{PVP} [mg/l]	t_{lag} [h]	BSK_{max} [mgO ₂]	$D_{BSK/TSK}$ [%]
AK	Slepý pokus	-	-	-	22,64	-
	1O-2P	224	-	145	53,83	100
		268	-	178	56,43	100
		214	-	98	46,24	100
	1O-2P/PVP	280	222,3	185	54,91	15
		276	222,3	185	59,16	31
		258	222,3	165	54,95	20
	PNa	202,4	-	77	44,82	100
PNa/PVP	202,4	222,3	82	43,95	7-13	
PI-ZK	Slepý pokus	-	-	-	37,64	-
	1O-2P	216	-	89	68,49	100
		268	-	130	71,07	100
		202	-	89	58,49	100
	1O-2P/PVP	214	232,2	80	70,59	0
		248	232,2	82	74,81	47
		252	232,2	89	66,87	27
	PNa	201,9	-	218	70,47	100
PNa/PVP	201,9	232,2	218	76,98	10-36	

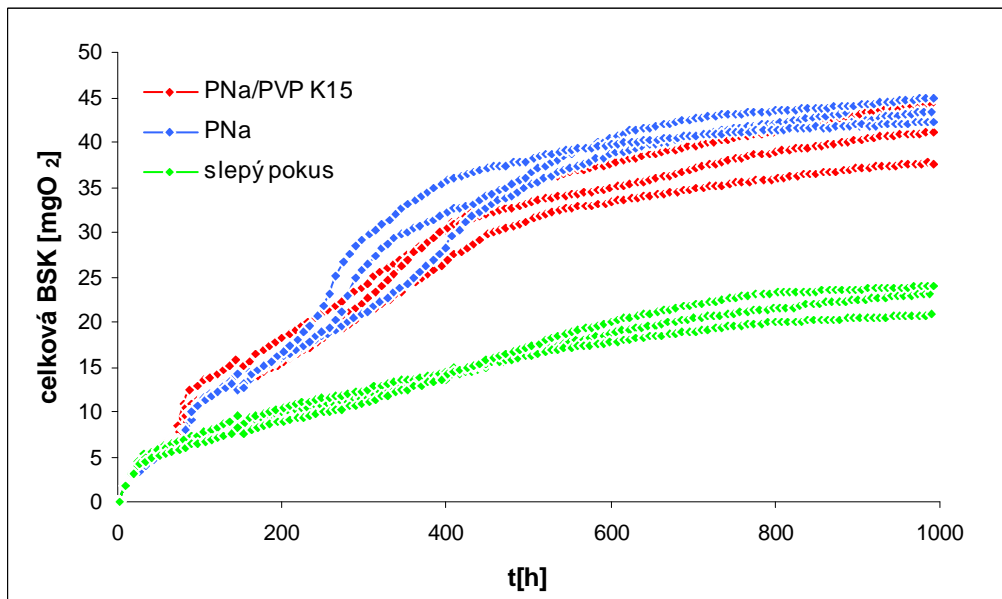
Tab. 3 - Stanovené vstupní hodnoty pH a TOC a výstupní TOC

		pH _{vstup} [1]	TOC _{vstup} [mg/l]	TOC _{výstup} [mg/l]
AK	Slepý pokus	7,45	10,24	9,854
	1O-2P	7,47	-	-
	1O-2P/PVP	7,47	-	-
	PNa	7,46	114,9	72,84
	PNa/PVP	7,48	122,5	23,02
PI	Slepý pokus	7,15	96,86	18,03
	1O-2P	7,16	-	-
	1O-2P/PVP	7,16	-	-
	PNa	7,15	169,9	149,7
	PNa/PVP	7,17	115,4	-

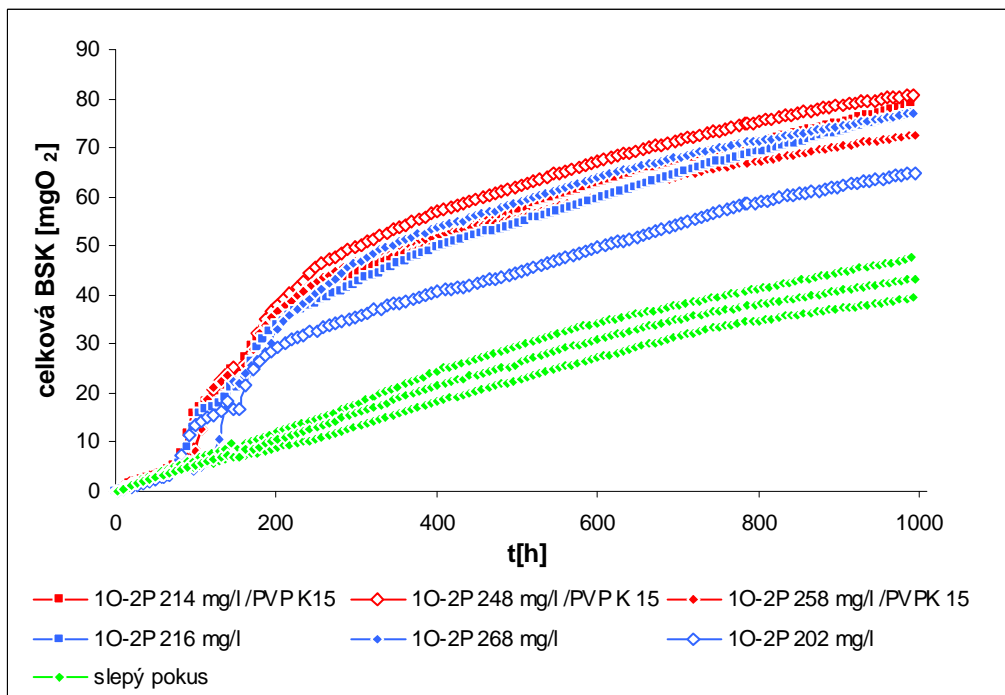


Obr. 5 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s 1O-2P

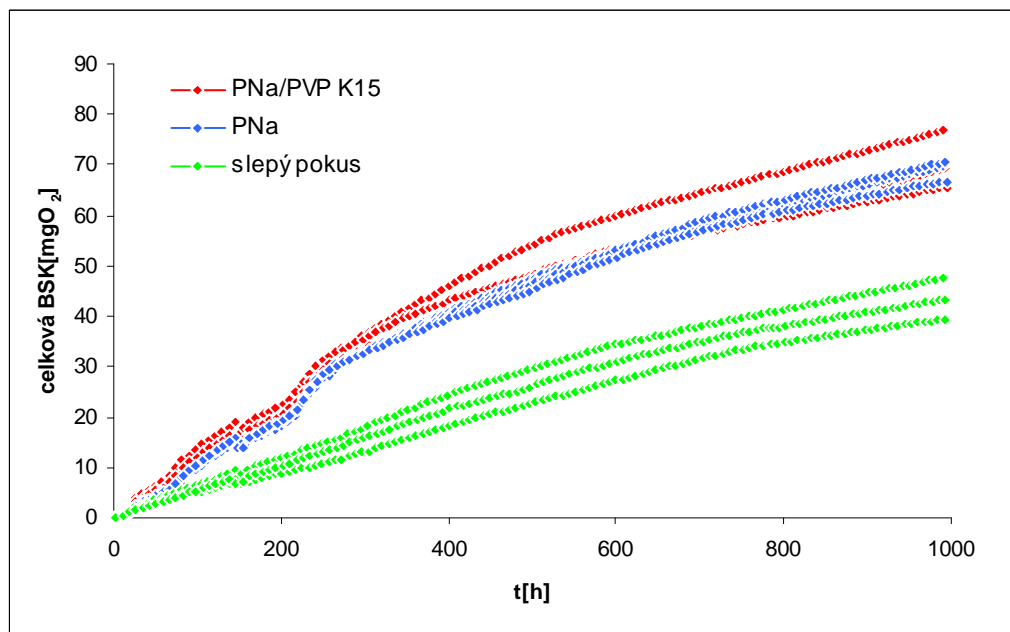
v prost edí AK



Obr. 6 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s PNa
v prostředí AK



Obr. 7 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s IO-2P
v prostředí PI - ZK



Obrázek 1 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s PNa
v prostředí PI - ZK

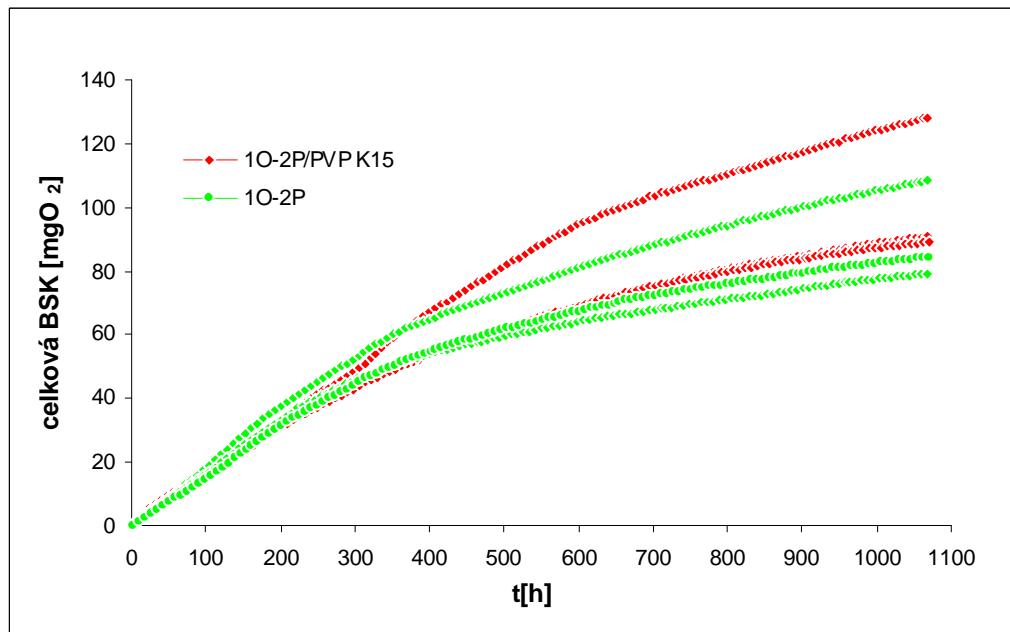
Test 2 : Rozklad v prost edí zahradního kompostu

Inokulum: zahradní kompost (ZK)

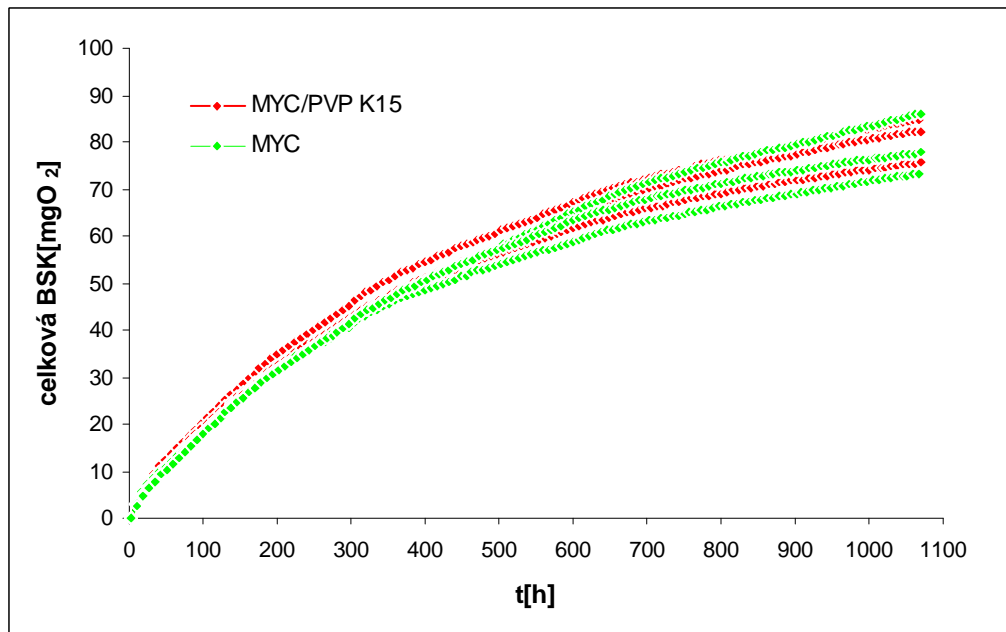
Tab. 4 - Koncentrace a množství sloučenin v b a kách, as lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu

	$C_{kosubstrat}$ [mg/l]	C_{PVP} v b a ce [mg/l]	t_{lag} [h]	BSK_{max} [mgO ₂]	$D_{BSK/TSK}$ [%]
MYC	208,58	-	-	79,03	-
MYC/PVP	206,05	200,01	-	80,93	3-27
1O-2P	184,00	-	-	108,58	100
1O-2P/PVP	184,00	200,01	-	128,28	2-8
PNa	226,08	-	-	104,85	100
PNa/PVP	211,84	210,76	-	85,93	16-30
APhA	199,40	-	-	85,43	100
APhA/PVP	206,12	203,26	-	119,17	10-49

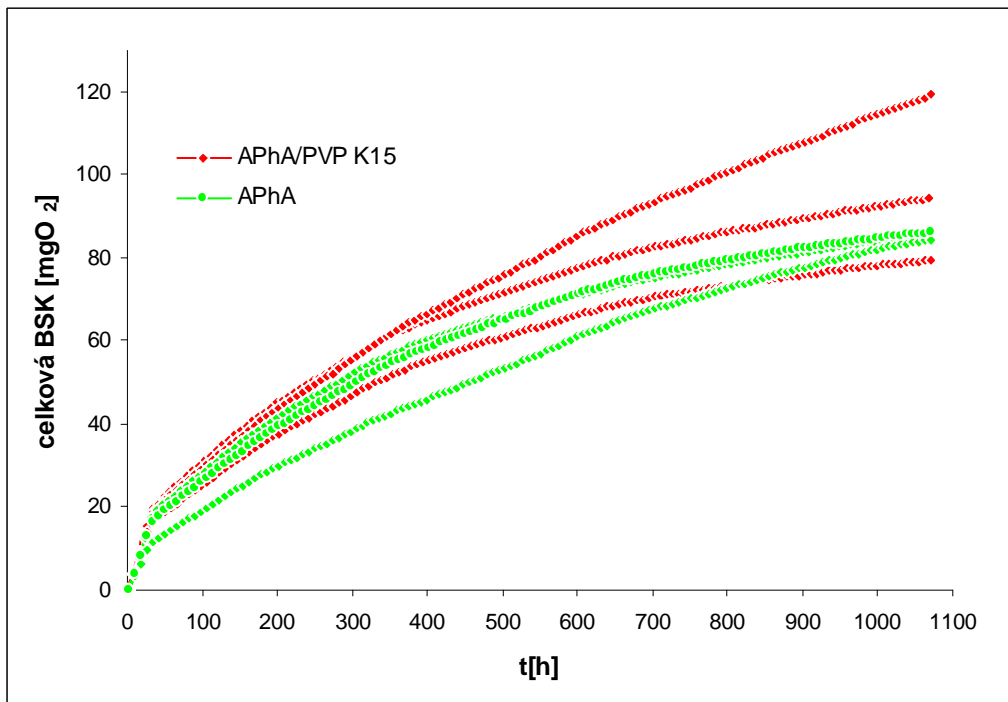
Po áte ní pH bylo 6,68, po experimentu se pH pohybovalo kolem 6,7 ó 6,8. Byly také zm eny hodnoty su-in, ty ale kv li problém m s vysou-ením nelze prezentovat.



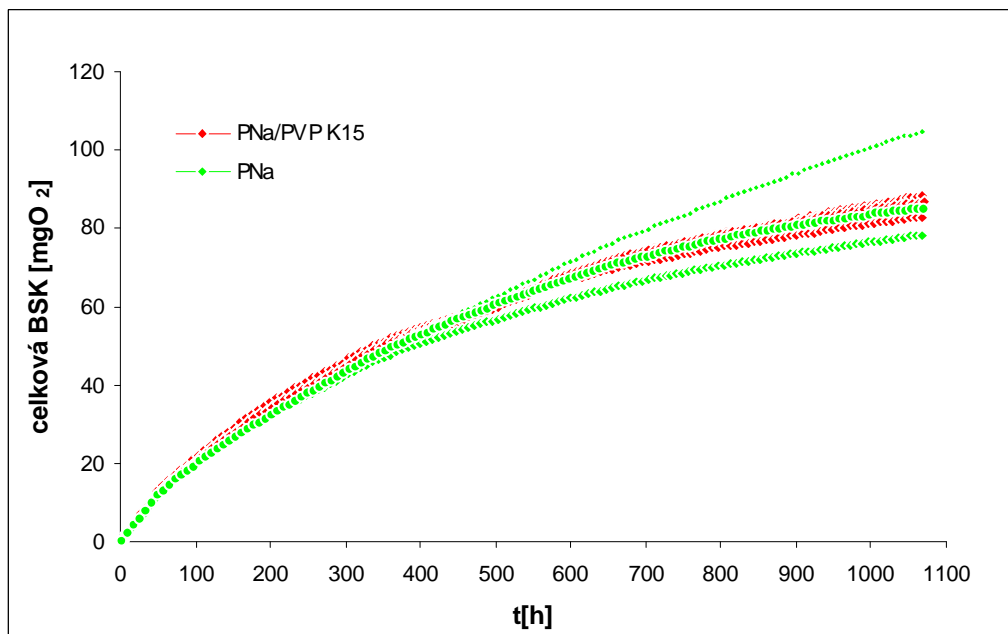
Obr. 8 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s 1O-2P
v prostředí ZK



Obr. 9 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s MYC
v prostředí ZK



Obr. 10 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s APhA
v prostředí ZK



Obr. 11 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s PNa
v prostředí ZK

Test 3: Rozklad v prostředí zahradního kompostu, směsná pasta a PI zahradního kompostu

Inokulum: zahradní kompost (ZK)

směsná pasta (SP)

přední inokulum zahradního kompostu (PI o ZK)

Tab. 5 - Množství testovaných látek v bádách, čas lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu

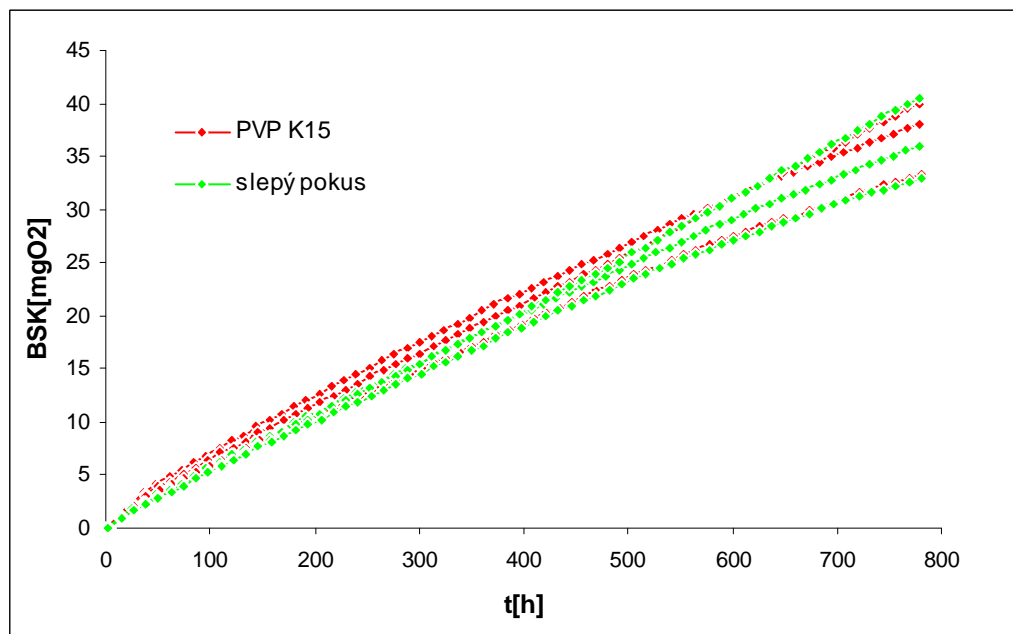
	$C_{vba\ ce}$ [mg/l]	t_{lag} [h]	BSK_{max} [mgO ₂]	$D_{BSK/TSK}$ [%]
Slepý pokus - ZK	-	-	36,48	-
PVP - ZK	209,57	-	37,12	1,4
Slepý pokus - SP	-	-	42,58	-
PVP - SP	209,57	14	45,95	4-24
Slepý pokus . PI - ZK	-	-	9,30	-
PVP . PI - ZK	204,00	15	10,69	2

Tab. 6 - Stanovené hodnoty množství TOC vzorků rozkládaných v PI ZK na začátku a na konci experimentu

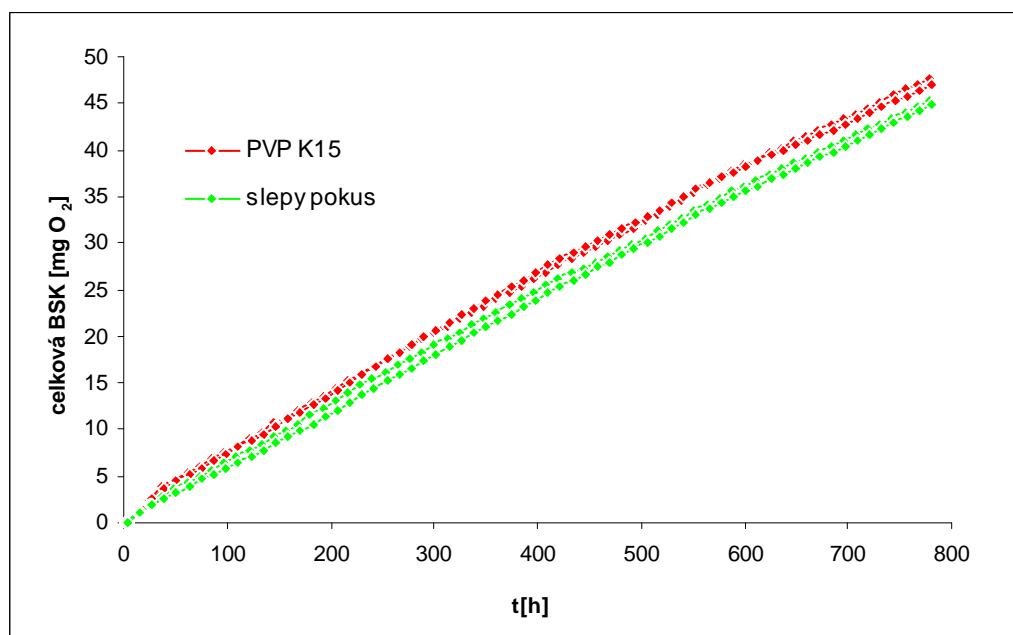
	TOC_{vstup} [mg/l]	$TOC_{výstup}$ [mg/l]
slepý pokus - PI	54,81	30,06
PVP - PI	109,9	34,2

Tab. 7 - Stanovené hodnoty sušiny a pH na konci experimentu

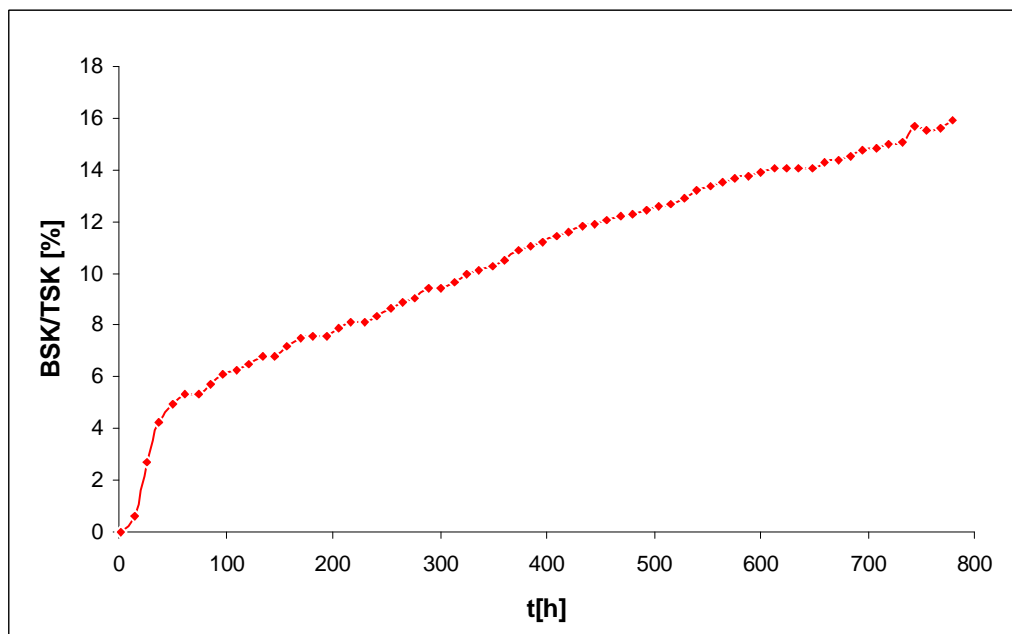
	$Suzina_{vstup}$ [%]	$Suzina_{výstup}$ [%]	pH_{vstup} [1]	$pH_{výstup}$ [1]
slepý pokus - ZK	52,5	62,51	6,68	6,616
PVP - ZK		62,36		6,640
slepý pokus - SP	57,3	64,03	6,7	6,300
PVP - SP		65,64		6,370
slepý pokus . PI - ZK	-	-	6,6	6,397
PVP . PI - ZK				6,429



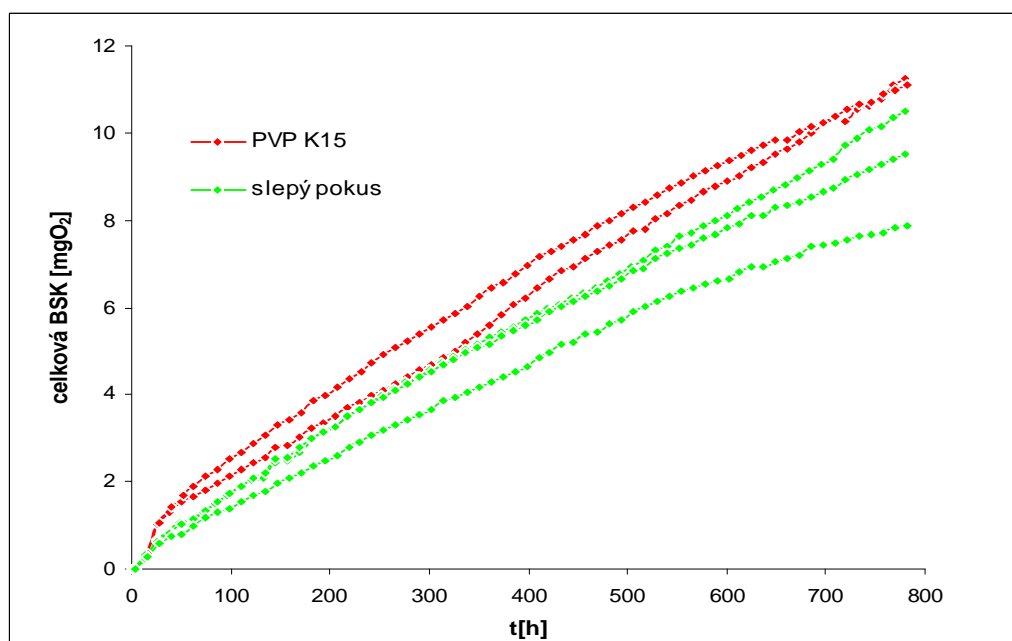
Obr. 12 časová závislost celkové BSK PV v prostředí ZK



Obr. 13 časová závislost celkové BSK PVP v prostředí SP



Obr. 14 časová závislost rozkladu PVP v prostředí SP



Obr. 15 časová závislost celkové BSK PVP v prostředí PI - ZK

Test 4: Rozklad v prostředí PI zemědělské půdy, PI komerčního kompostu, v prostředí mycelia a prostředí mikrobiální kultury *Microbacterium keratolyticum*

Inokulum: odpadní mycelium (MYC, cca 500 mg/l vztaženo na sušinu)

p dní inokulum zemědělské půdy (PI o ZP)

p dní inokulum komerčního kompostu (PI o KK)

mikrobiální kultura 4375

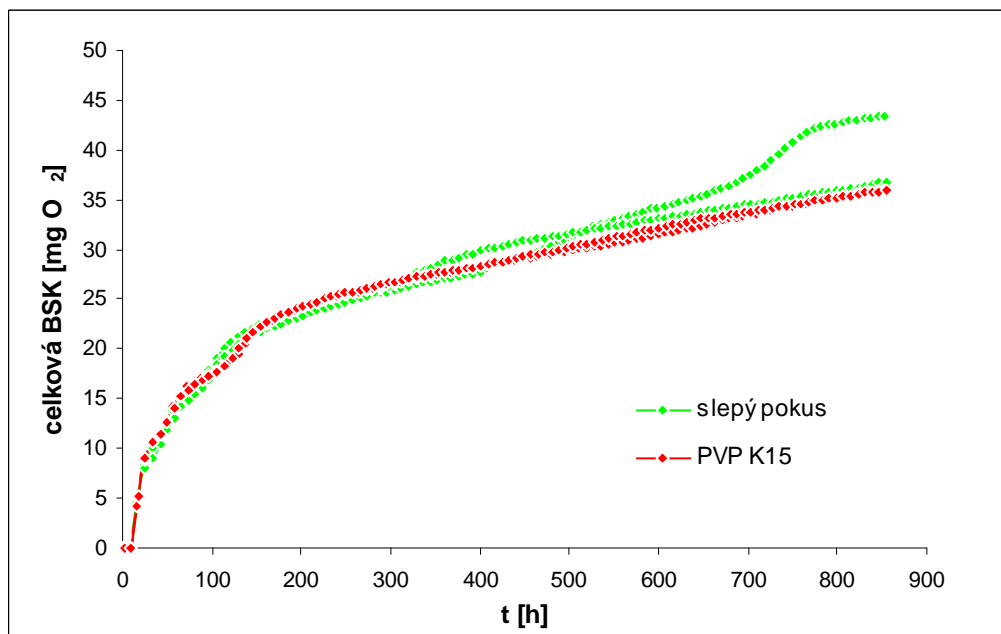
Tab. 8 - Koncentrace testovaných látek v respiračních látkách, lagová fáze, BSK_{max} a procento rozkladu

	$C_{kosubstrat}$ v ba ce [mg/l]	C_{PVP} v ba ce [mg/l]	t_{lag} [h]	BSK_{max} [mgO ₂]	$D_{BSK/TSK}$ [%]
MYC	500,113	-	9,54	43,41	-
MYC/PVP	500,113	201	9,54	36,000	0
PVP PI - ZP	-	210,2	-	14,51	12 - 40
PVP PI - KK	-	202,8	-	13,37	0
APhA	99,96	-	195	4,38	
APhA/PV P	99,54	202	195	5,41	12 - 26
PVP	-	207,4	140	6,22	5

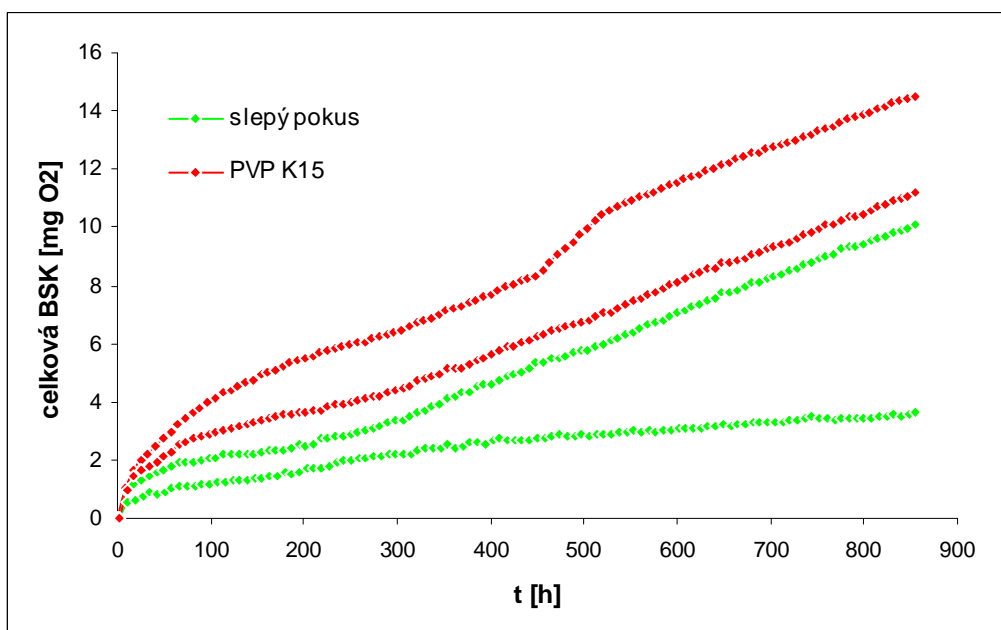
Tab. 9 - Stanovené hodnoty TOC a pH na začátku pokusu

	TOC vstup [mg/g]	pH _{vstup} [1]
PI - ZP	23,29	6,757
PI . ZP PVP	76,24	6,788
PI - KK	50,35	6,597
PI - KK PVP	139,62	6,695
MYC	128,30	7,379
MYC/PVP	240,60	7,372
APhA	65,10	7,227
APhA/PVP	119,26	7,235
PVP	177,24	7,459

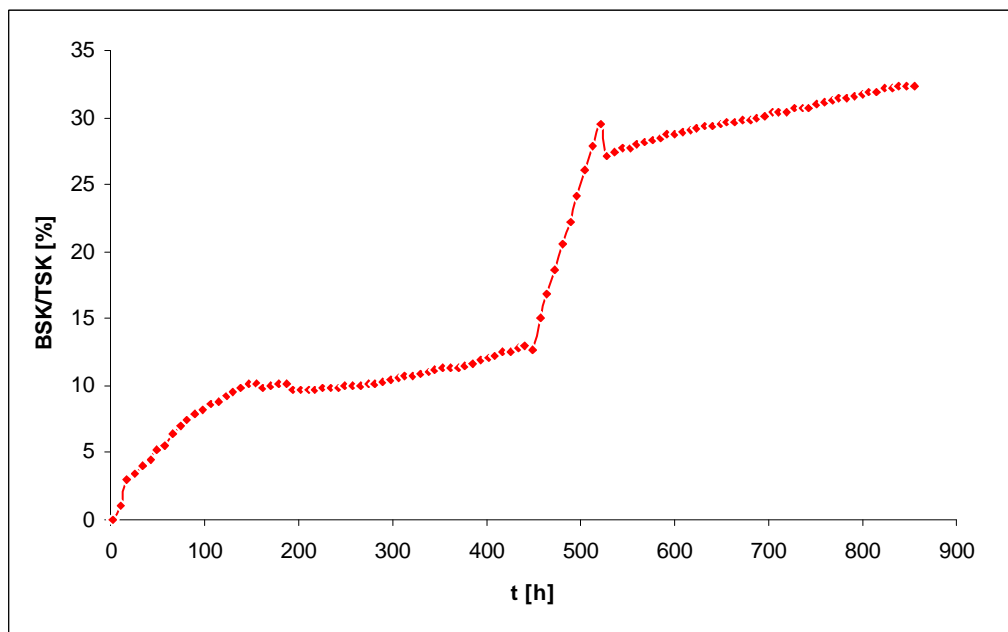
(Hodnoty TOC a pH na výstupu nejsou uvedeny kvůli pokračování experimentu).



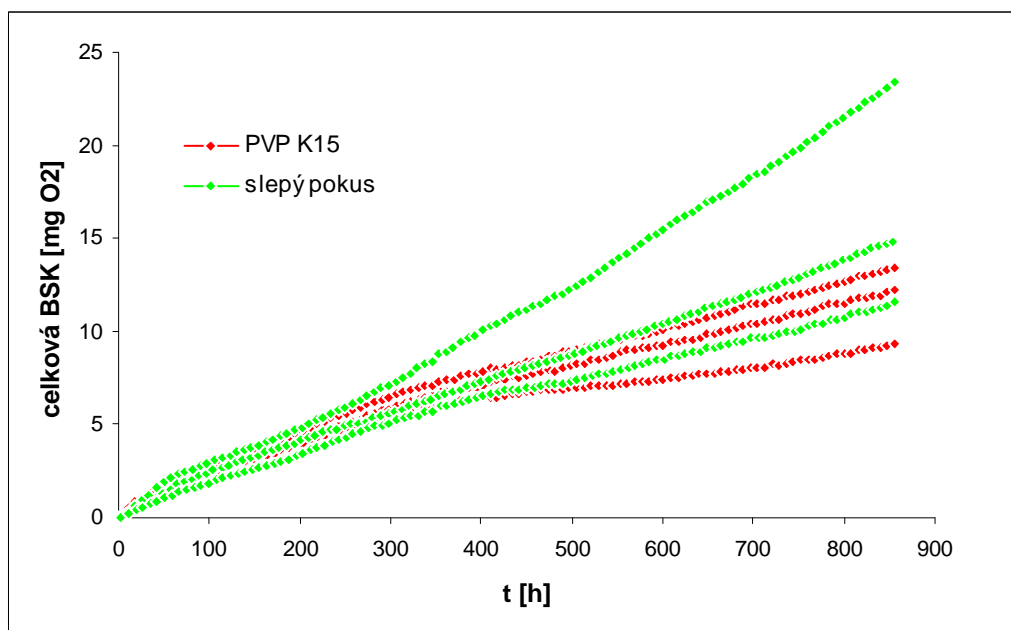
Obr. 16 časová závislost celkové BSK PVP v prostředí mycelia



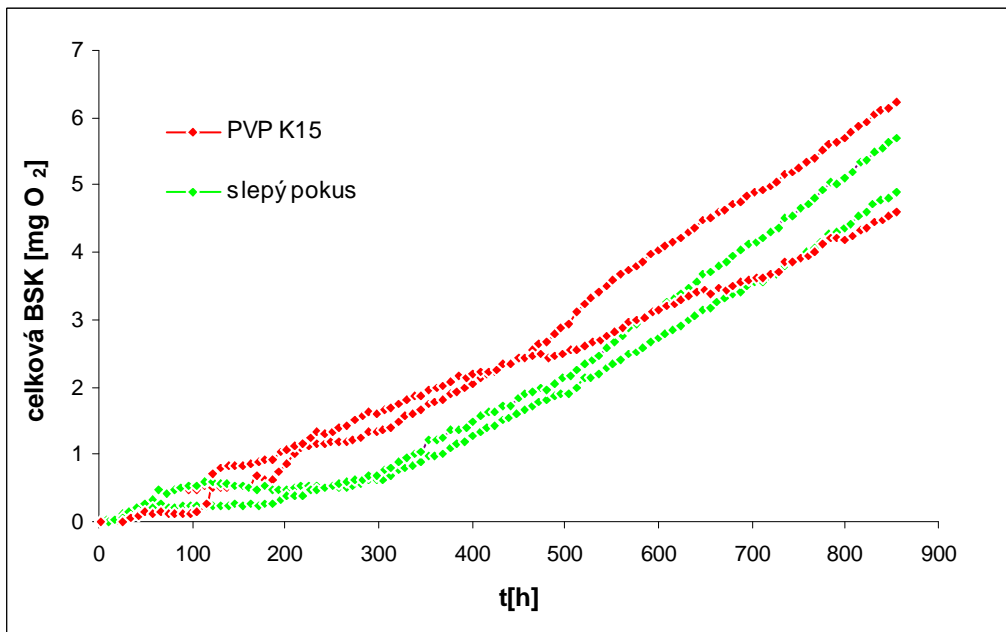
Obr. 17 časová závislost celkové BSK PVP v prostředí PI a ZP



Obr. 18 - časová závislost rozkladu PVP v prostředí PI-ZP

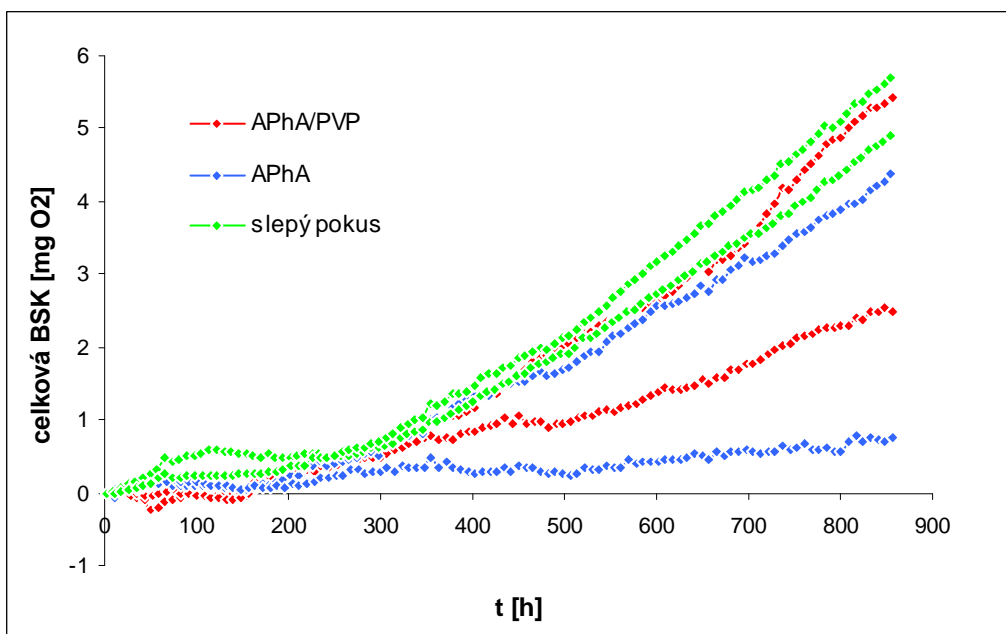


Obr. 19 - časová závislost celkové BSK PVP v prostředí PI a KK



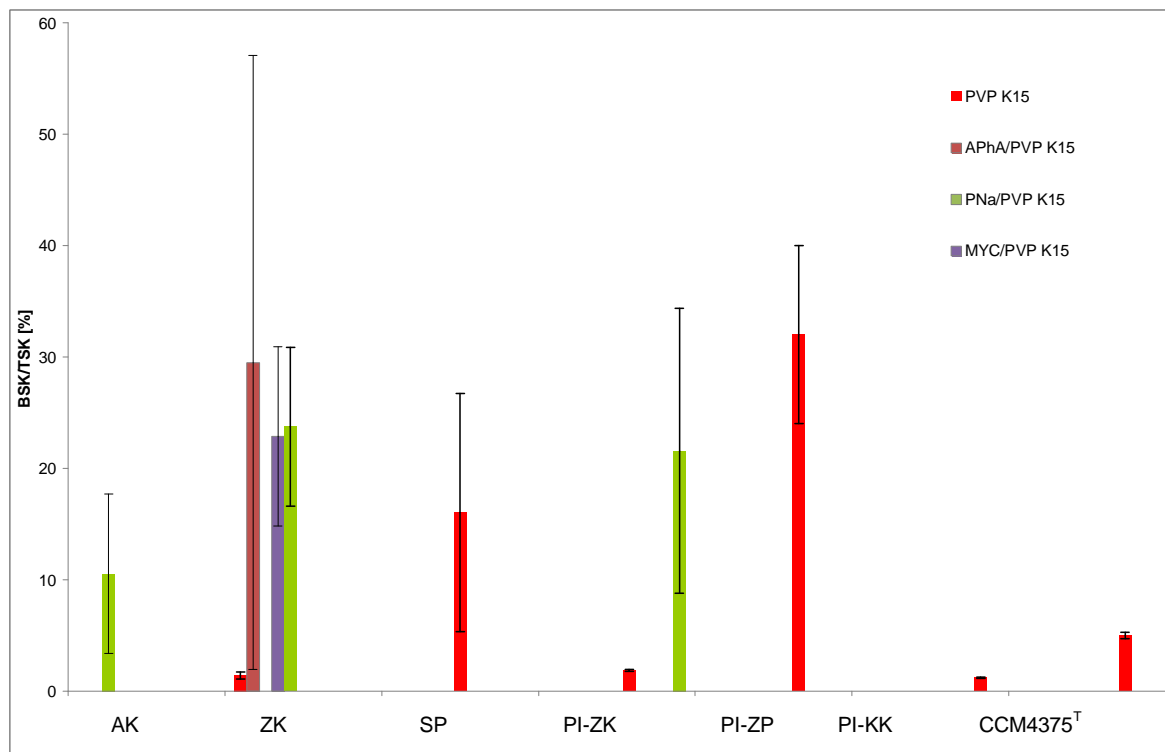
Obr. 20 časová závislost celkové BSK PVP

v prostředí kultury CCM 4375^T



Obr. 21 časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s APhA

v prostředí mikrobiální kultury CCM 4375^T



Obr. 22 - Srovnání % rozklad PVP (PVP/kosubstrát) ve sledovaných prost edích

(Kombinace PVP s 1O-2P zde není uvedena kv li rozdílným naváfkám v testu 1.)

Mikrobiologické testy:

Zkoušky růstu kultur rodu *Microbacterium* na vytipovaných substrátech

Tab. 10 - Růst jednotlivých kultur na vytipovaných substrátech

kultura	organický substrát			
	MA	APhA	2 MP	O 2P
CCM 4370 ^T	+	+	+	-
CCM 1928 ^T	+	-	+	-
CCM 4375 ^T	+	++ Oluté kolonie	+	-
CCM 4364 ^T	+	-	+	-
CCM 4374 ^T	+	+	+	-
CCM 2634 ^T	-	-	-	-
CCM 2299 ^T	+	-	+	-
CCM 4373 ^T	++	+	+	-
CCM 4523 ^T	++	+	+	-

--- bez růstu

+ slabý růst

+++ bohatý růst

Mikrobiologický rozbor půdy

Tab. 11 Stanovené počty bakterií

	celkový počet bakterií [CFU/g půdy]	počet aktinomycet [CFU/g půdy]
Zahradní kompost	$6 \cdot 10^7$	$9 \cdot 10^5$
Zemědělská půda	$22 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^5$
Komerční kompost	$55 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^6$

8 DISKUSE

Pro testování biodegradace byly jako kosubstráty zvoleny 1O-2P, PNa a APhA a odpadní produkt (mycelium) z výroby penicilinu. Jmenované sloučeniny byly zvoleny pro jejich snadnou rozložitelnost, mycelium vzhledem k předchozím výsledkům [18].

Hlavním hodnotícím kritériem biologického rozkladu byla celková BSK testovaných vzorků, druhou velmi důležitou hodnotou BSK/TSK.

8.1 Biodegradace v prostředí AK

Jako jedno z inokul, v nichž byla sledována rozložitelnost byl AK z komunální čistíreny odpadních vod OV Zlín u Malenovic. Jednotlivé roztoky vzorků byly připraveny v biomédii pro AK a koncentrace sledovaných látek v respiračních nádobách je uvedena v Tab. 2.

Sledován byl biologický rozklad PVP v kombinaci s 1O-2P a PNa (v poměru 1:1). Oba zvolené kosubstráty dosahovaly samostatně během experimentu (995 hodin) 100 % rozkladu. U vzorku obsahujícího 1O-2P (ať uflisté nebo v kombinaci s PVP) byla zaznamenána poáteční lagová fáze (98 - 177 hodin), která se lišila dle množství 1O-2P v respirační nádobě. Kromě vlivu na lagovou fázi mělo množství vlivu i na dobu úplné rozložitelnosti této látky (242 - 463 hodin). Dle Obr. 5 a Obr. 6 lze usoudit, že k degradaci během 995 hodin nedošlo a zvolené kosubstráty tedy nemají vliv na rozklad PVP v tomto prostředí, jelikož hodnoty celkové BSK PVP se pohybovaly v rámci slepých pokusů (hodnot celkové BSK jednotlivých kosubstrátů).

Na začátku a na konci experimentu bylo u vzorků změno množství TOC, ovšem díky mošné sorpci PVP na částice AK, která byla prokázána v předchozích diplomových pracích [17, 18] byly tyto hodnoty brány pouze orientačně.

8.2 Biodegradace pomocí pěstných mikroorganismů

Hlavní pozornost (vzhledem k předchozím výsledkům) byla věnována sledování biodegradace prostředími pěstnými mikroorganismy. Testování probíhalo v samotných pěstnách a jím pěstných pěstných inokulech.

Podnětem pro tyto testy byly pozitivní výsledky [12, 18] rozkladu PVP v pěstném prostředí.

8.2.1 Biodegradace v p dním prost edí

Koncentrace jednotlivých sledovaných látek rozkládaných v prost edí ZK a SP jsou v *Tab. 4* a *Tab. 5*. Roztoky sledovaných látek byly p ípraveny v biomédium pro p dy.

P í sledování biologické rozložitelnosti v zahradním kompostu byl mimo rozklad samotného PVP sledován i rozklad zvolených kosubstrátů a kombinace PVP s kosubstráty (1O-2P, PNa a APhA) a myceliem. Zvolené kosubstráty byly za daných podmínek zcela rozložitelné.

Ur ité pozitivní výsledky rozkladu se podle p edchozí DP [16] očekávaly u kombinace MYC/PVP. U provedeného testu se ale hodnoty celkové BSK pohybovaly na úrovni biologické spot eby kyslíku samotného mycelia (*Obr. 9*) a tudíž za podmínek provedeného testu nem la p ítomnost MYC na rozklad fládný vliv.

U kombinací PVP/1O-2P, PVP/PNa a PVP/APhA bylo dosaženo stejných výsledků jako p í sledování biodegradace PVP/MYC. Z jednotlivých závislostí (*Obr. 8 - Obr. 11*) celkových BSK PVP v kombinaci s kosubstráty na ase plyne, že k rozklad m PVP b hem experimentu (1070 hodin) nedocházelo. Jak ukazuje *Obr. 12*, pozitivního výsledku nebylo dosaženo ani u sledování biologického rozkladu samotného PVP v tomto prost edí.

U jednotlivých vzorků se nacházely v t-í odchylky v hodnotách respirace, p í ina byla hlavn ě heterogenita p dy, nerovnom rné zm ěny vlhkosti p dy a u vzorků, kde bylo použito MYC jeho nehomogenita.

U vzorků sledovaných v testu 2 (sledovala se biodegradabilita jednotlivých látek v prost edí ZK) byly problémy s nerovnom rným vysou-ením p d, což mohlo mít vliv na míru % odstran ění; proto je reprodukovatelnost výsledků podle BSK/TSK (*Obr. 22*) omezená. P ístroj Micro-Oxymax nebyl d íve pro dlouhodob ější testy rozklad v p dním prost edí použit, proto nebyly problémy s v t-ími zm ěnami vlhkosti p edpokládány. Pro ostatní testy probíhající v samotné zemin ě byly proto voleny del-í asové intervaly mezi jednotlivými stanoveními spot ebovaného kyslíku.

U vzorků byla po experimentu stanovena su-ina a pH. Su-ina na po átku byla stanovena orienta ěn ě.

V prost edí SP byla sledována pouze respirace samotného PVP. Jak je vid ět na *Obr. 13*, hodnoty celkové BSK PVP se pohybují nad hodnotami endogenní respirace p dy, což lze

usoudit, že docházelo ke snížení pení polymerního esteru zce PVP. Dle BSK/TSK docházelo k cca 16 % rozkladu za 780 hodin. Při ukonění tohoto experimentu měla BSK stále rostoucí tendenci, což potvrzuje i Obr. 14.

Na konci testu byla u vzorků rozkládaných v prostředí SP stanovena sušina a pH.

Pro vzorky PVP se podle provedených testů jeví jako nejlepší prostředí pro rozklad SP (ZP:KK 1:5). Ze získaných výsledků plyne, že zvolené kosubstráty nemají vliv na rozklad PVP v prostředí ZK a tudíž nebylo možno určit nejvhodnější kosubstrát, který by samotný rozklad PVP podpořil.

8.2.2 Biodegradace v prostředí p dních inokul

Dalším vodným prostředím, ve kterém byla biodegradace sledována byla p dní inokula připravená z poufřitých pídk podle předepsané normy [22]. Zásobní roztoky testovaných vzorků byly připraveny v samotném PI. Koncentrace rozkládaných látek v prostředí PI o ZK, ZP a KK jsou uvedeny v Tab. 2 a v Tab. 8 ve výsledkové části.

V prostředí PI o ZK byla testována biologická rozložitelnost PVP a PVP v kombinaci se zvolenými kosubstráty (1O-2P a PNa). Samotné kosubstráty opět dosahovaly během doby experimentu (995 hodin) 100 % rozkladu. U testovaných vzorků, kde byl přítomen 1O-2P se objevila lagová fáze, jejíž délka (82 - 113 hodin) zde závisela na množství dávkovaného 1O-2P. Celková BSK PVP v kombinacích s 1O-2P a PNa byla v rámci celkové BSK samotných substrátů. I přes zdanlivý rozklad dle BSK/TSK (Obr. 22) k rozkladu PVP nedocházelo; zvolené kosubstráty tedy nemají vliv na rozklad PVP v prostředí PI o ZK.

Respirační hodnoty samotného PVP jsou mírně nad hodnotami endogenní respirace, ale spotřebované množství kyslíku je minimální a dle procenta BSK/TSK docházelo k 2 % rozkladu, což je v rámci chyby měření. Biologický rozklad PVP v prostředí PI o ZK tedy také neprobíhal.

V prostředí PI o ZP byla sledována biodegradace samotného PVP. Hodnoty celkové BSK PVP se pohybovaly nad samotnou endogenní respirací p dního inokula (Obr. 17), tudíž lze tvrdit, že biodegradace zde do v rozhodného stupně probíhala. Podle poměru BSK/TSK docházelo k cca 30 % rozkladu za 857 hodin. Tento výsledek zároveň potvrzuje i získaný pozitivní rozklad PVP v SP. Z těchto výsledků plyne, že PVP degradéry ve SP pocházely

z prostředí zemědělské půdy. Konečné procento rozkladu nelze určit, jelikož test nebyl před odevzdáním práce ukončen (probíhá).

Jako rozkladné prostředí bylo použito také PI ó KK. Rozkládaným vzorkem bylo i stejné PVP. V tomto prostředí rozklad neprobíhal, jelikož podle OBR. respirační hodnoty sledovaného polymeru byly na úrovni endogenní respirace PI ó KK.

U vzorků rozkládaných v prostředí PI - ZK bylo na počátku a na konci experimentu měřeno pH a množství TOC, v PI - KK a PI - ZP byly hodnoty měřeny pouze na začátku, protože test nebyl ukončen. Získané hodnoty množství TOC v jednotlivých vzorcích jsou brány pouze orientačně, protože nelze vyloučit, že nedocházelo k sorpci PVP na pevné částice v pevném inokulu.

8.2.3 Biodegradace za pomoci i stejné mikrobiální kultury 4375

Samotným respiračním testem s použitou i stejnou mikrobiální kulturou předcházelo mikrobiologické testování; zakoupené mikrobiální kultury byly naočkovány na vytipované fluvné půdy a byl sledován jejich růst (Tab. 10). Sledován byl hlavně rozdíl růstu na fluvné půdě APhA (500 mg/l) a MA, jelikož jak již bylo dříve zmíněno, kultury, které jsou schopny produkce β -laktamasy vyuffívají jako jediný zdroj uhlíku N-acylu, který APhA poskytuje. Jedinou kulturou, která jevila podstatné rozdíly růstu na jmenovaných fluvných půdách byla 4375 *Microbacterium keratolyticum*. Kultura byla poté namnožena, suspendována a použita pro samotný respirační test.

Test probíhal za stejných podmínek jako ostatní testy, pouze p íprava sledovaných respiračních ban k probíhala za sterilních podmínek se sterilními prostředíky. Koncentrace testovaných látek jsou uvedeny v Tab. 8 - *Koncentrace testovaných látek v respiračních látkách, lagová fáze, BSK_{max} a procento rozkladu.*

Kromě rozložitelnosti samotného PVP byla testována i rozložitelnost PVP v kombinaci s APhA, který N-acyl obsahuje a měl by napomoci indukci β -laktamas. Sledována i byla také rozložitelnost samotného APhA.

Zkouška biodegradace pomocí i stejné mikrobiální kultury na p ístroji Micro-Oxymax byla spíše ov ovací, protože tento p ístroj nebyl zatím pro takovéto experimenty použit. Výsledky tohoto testu jsou rozporné. P í testech na agarových fluvných půdách daná kultura vyuffívala N-acylu z APhA, zde tomu tak za dobu experimentu nebylo.

Přímý závěr z průběhu tohoto testu nelze udělat, jelikož v současně době stále pokračuje. V době odečtu dat (860 hodin) se celková BSK samotného PVP pohybovala mírně nad hodnotami samotné endogenní respirace. Z respiračních hodnot lze říci, že případná biodegradace PVP pomocí pouflité kultury je možná, a v-ak bylo by třeba delší doby experimentu (pokračuje). Dle hodnot BSK/TSK došlo k cca 5 % rozkladu PVP za 860 hodin, lze předpokládat, že tato hodnota je mimo rozsah chyby přístroje.

Během experimentu k rozkladu samotného APhA ve jmenované kultuře nedocházelo. Hodnoty celkové BSK APhA se nacházely v oblasti endogenní respirace. Rovněž kombinace APhA/PVP nedosáhla kladných výsledků (Obr. 21 *časová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s APhA*

v prostředí).

8.2.4 Biodegradace v prostředí odpadního mycelia

Biologická rozložitelnost byla sledována také v prostředí odpadního mycelia. Přesná koncentrace sušiny MYC a rozkládaného PVP je uvedena v Tab. 8.

Křivka celkové BSK rozkládaného PVP je pod hodnotami BSK MYC. K rozkladu PVP tedy nedocházelo. Kromě PVP bylo v tomto prostředí rozkládáno také PVA (rovněž o koncentraci cca 200 mg/l), průběh křivek celkové BSK byl stejný jako v případě PVP. Z těchto výsledků lze usoudit, že samotné MYC nemá biodegradaci schopnosti, což se zjistilo i v jedné z předchozích prací [11].

8.3 Mikrobiologické testy

U pouflitých půd (zahradní kompost, komerční kompost a zemědělská půda) byl proveden mikrobiální rozbor a byl zjištěn celkový počet bakterií a počet aktinomycet (Tab. 11). Bakteriálně nejbohatšími půdami byly komposty, zahradní kompost měl počet $6 \cdot 10^6$ CFU/g půdy, kompost komerční $2,2 \cdot 10^6$. Zemědělská půda byla oproti kompostům chudší cca o 1/3 bakteriálních kolonií. Z hlediska počtu aktinomycet byl opět nejbohatší zahradní kompost, počet byl $9 \cdot 10^5$. Počet aktinomycet v komerčním kompostu a zemědělské půdě byl téměř totožný.

ZÁV R

PVP je bohat vyuffivanou látkou ve farmaceutickém, kosmetickém a potraviná ském pr myslu. Díky jeho inertnosti je mofná akumulace polymeru ve slofkách flivotního prost edí a mofnost vzniku problému v budoucnosti; proto se hledají mofné cesty jeho odstran ní.

Tato práce navazuje na sérii prací provád ných na Ústavu inženýrství flivotního prost edí fakulty technologické na UTB ve Zlín zabývajících se mofnostnostmi odstran ní polyvinylpyrrolidonu.

Biodegradace PVP byla sledována v prost edí AK, p dního prost edí zahradního kompostu, zem d lské p dy, komer ního kompostu a sm sné p dy vytvo ené smícháním zem d lské p dy a komer ního kompostu v pom ru 1:5, v prost edí mycelia odpadajícího p i výrob penicilinu a zakoupené ísté mikrobiální kultury, u nífl byla zji-t na schopnost produkce enzymu ó lactamasy. Krom samotného PVP byla sledována i rozloflitelnost zvolených kosubstrát a PVP v kombinaci s nimi.

V prost edí AK z OV Zlín ó Malenovice byla sledována rozloflitelnost PVP v kombinaci se zvolenými kosubstráty. PVP nebyl mikroorganismy pouffitého AK rozkládán ani p i p ídavku zvolených látek, které teoreticky mohly samotný rozklad podpo it.

Z provedených m ení plyne, fl k rozkladu polymerní struktury PVP docházelo pouze v prost edí sm sné p dy, kde bylo dosafleno cca 16% rozkladu za 780 hodin; a v p dním inokulu zem d lské p dy, kde bylo PVP odstran no z cca 30% b hem 860 hodin. Degrada ní mikroorganismy pro PVP obsahovala zem d lská zemina. Prost edí jiných pouffitých substrát ó zahradní kompost a komer ní kompost, nep sobilo na PVP degrada n .

P i kombinaci PVP s kosubstráty není mofné ur it trend vlivu jednotlivých kosubstrát , jelikofl p i jejich pouffití nedocházelo k jednozna ným rozklad m ani v prost edí aktivovaného kalu, ani v zahradním kompostu.

Z minulých prací z stává otev ená otázka mofného rozkladu laktamového kruhu pomocí enzym jej -t pícih, které produkovala pouffitá mikrobiální kultura 4375. Sledován byl rozklad samotného PVP i PVP s APhA. I p es pom n minimální rozklad vzorku

samotného PVP (5% za 860 hodin) v isté mikrobiální kultu e, lze stále za hlavní mechanismus rozkladu považovat –tepení laktamového kruhu PVP.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BÜHRER, V., *Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals*, Povidone, Crospovidone and Copovidone. Springer Berlin Heidelberg New York, (2005), ISBN 3-540-23412-8
- [2] TRIMPIN, S.; EICHHORN, P.; RADER, H.; aj.: Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, vol. 938, no.1-2, 2001: pp. 67677, ISSN 0021-9673, doi:10.1016/S0021-9673(01)01153-0, 10th Symposium on Handling of Environmental and Biological complex in Chromatography.
- URL <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967301011530>
- [3] HAAF, F., SANNER, A. a STRAUB, F. Polymers of N-vinylpyrrolidone: Synthesis Characterization and Uses. *Polymer J.* 1985.
- [4] 1-octyl-2-pyrrolidone. *ChemSynthesis: Chemical Database* [online]. 2008 [cit. 2012-05-01]. Dostupné z: <http://www.chemsynthesis.com/base/chemical-structure-19893.html>
- [5] N-octyl pyrrolidone. *Chemicaland21* [online]. 2010 [cit. 2012-01-22]. Dostupné z: <http://chemicalland21.com/industrialchem/IUH/N-OCTYL%20PYRROLIDONE.htm>
- [6] Material safety data sheet, [online]. [cit. 2012-01-20]
- URL http://worldaccount.basf.com/wa/NAFTA/Catalog/ChemicalsNAFTA/doc4/BASF/PRD/30036600/.pdf?title=&asset_type=msds/pdf&language=EN&validArea=US&urn=urn:documentum:ProductBase_EU:09007af8800937b1.pdf
- [7] ANSELL, J., M., FOWLER, J., A. The acute oral toxicity and primary ocular and dermal irritation of selected N-alkyl-2-pyrrolidones. *Fd Chem. Toxic.* 1988, . 26
- [8] BRIASSONLI a KYRIKOV. Biodegradation of Agricultural Plastic Film: a Critical review. *J. Polym. Environ.* 2007, . 15.

- [9] HOFFMANN, J., EZNÍ KOVÁ, I. a R FÍI KA, J. *Technologická cvičení z ochrany životního prostředí: část II.* 1. vyd. Zlín: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta technologická ve Zlíně, 2000. ISBN 8021417099.
- [10] LORAINÉ, G. A. Oxidation of polyvinylpyrrolidone and ethoxylate surfactant in phase inversion wastewater. *Water Environ. Res.* 2008, . 80.
- [11] Červenáková, L. *Předúprava polyvinylpyrrolidonu před biologickým rozkladem.* Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
- [12] ABD EL-MOHDY, H. L. a GHANEM, S. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by γ -irradiation. *Springer Science.* 2009, . 16. DOI: 10.1007/s10965-008-9196-0.
- [13] LINE, K., M. N. ISUPOVA a J. A. LITTECHILD. The crystal structure of a (-) - lactamase from an *Aureobacterium* species reveals a tetrahedral intermediate in the active site. *J. Mol. Biol.* 2004, . 338.
- [14] HICKEY, A. M., NGAMSOM, B., WILES, Ch., GREENWAY, G., WATTS, P., LITTLECHILD, J. Development and use of a microreactor for the study of biotransformations by cross-linked β -lactamase enzyme. *Biotechnology Journal* [online]. 2009, ro . 4, . 4, s. 28 [cit. 2012-01-28]. DOI: 10.1002/biot.200800302. Dostupné z: http://peer.ccsd.cnrs.fr/docs/00/47/77/76/PDF/PEER_stage2_10.1002%252Fbiot.200800302.pdf
- [15] TAKEUCHI, M., HATATO, K. Union of the genera *Microbacterium* Orla-Jensen and *Aureobacterium* Collins et al. in a redefined genus *Microbacterium*. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1998, . 48
- [16] YOKOTA, A., M. TAKEUCHI, T. SAKANE a N. WEISS. Proposal of six new species in the genus *Aureobacterium* and transfer of *Flavobacterium esteraromaticum* Omelianski to the genus *Aureobacterium* as *Aureobacterium esteraromaticum* comb. *International Journal of Systematic Bacteriology.* 1993, . 43.

- [17] WANGA, J. a kol. Single-step purification and immobilization of β -lactamase and on column transformation of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. *Process Biochem.* 2011, . 46.
- [18] VAŤKOVÁ, M. *Mofnosti odstra ování polyvinylpyrrolidonu biologickou cestou.* Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomá-e Bati ve Zlín , fakulta technologická.
- [19] MARUŤINCOVÁ, H. *Studie mofností biologického odstra ování polyvinylpyrrolidonu.* Zlín, 2009. Diplomová práce. Univerzita Tomá-e Bati ve Zlín , fakulta technologická.
- [20] KLÍVAR, S. *Mofnosti sorpce PVP na biologické kaly.* Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomá-e Bati ve Zlín , fakulta technologická.
- [21] SN EN ISO 9408. *Jakost vod - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prost edí stanovením spot eby kyslíku v uzav eném respirometru.* Praha: eský normaliza ní institut, 2000.
- [22] SN EN ISO 14851. *Stanovení úplné aerobní biodegradibility plast ve vodném prost edí - Metoda m ení spot eby kyslíku v uzav eném respirometru.* Praha: eský normaliza ní institut, 2005.
- [23] D ÍMAL, P. a J. HOFFMANN. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním a p dním prost edí. *Chemické listy.* 2008, . 102.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

1O-2P	1-octyl-2-pyrrolidon
APhA	N-acetyl phenylalanin
B _s	Substrátová BSK
BSK, BOD	Biologická spotřeba kyslíku
BSK _{max}	Nejvyšší množství biologicky spotřebovaného kyslíku
c	Koncentrace
C	Uhlík
OV	očištěná odpadních vod
H	Vodík
KK	Komerční kompost
KVA	Kvasničný autolyzát
m	Hmotnost
MA	Minerální agar
MP	N-methylpyrrolidon
MYC	Mycélium
N	Dusík
pH _{KCl}	Výmnožovací kapacita
PI-KK	P dní inokulum komerčního kompostu
PI-ZK	P dní inokulum zahradního kompostu
PI-ZP	P dní inokulum zemědělské půdy
PNa	Sodná sůl penicilínu
PVP	Polyvinylpyrrolidon
S	Síra
SD	Směrodatná odchylka

SP	Směsná půda
t_{lag}	Lagová fáze
TOC	Celkový organicky vázaný uhlík
TSK, TOD	Teoretická spotřeba kyslíku
TYA	Tryptone Yeast Extract Agar
V_{pip}	Pipetovaný objem
X	Sušina
ZK	Zahradní kompost
ZP	Zemědělská půda

SEZNAM OBRÁZK

<i>Obr. 1 - Chemická struktura polyvinylpyrrolidonu [1].....</i>	12
<i>Obr. 2 - Chemická struktura</i>	15
<i>Obr. 3 - P edpokládaný mechanismus biodegradace PVP[11]</i>	19
<i>Obr. 4 - Ilustra ní foto uspo ádání respirometru.....</i>	31
<i>Obr. 5 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s IO-2P</i>	39
<i>Obr. 6 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s PNa.....</i>	40
<i>Obr. 7 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s IO-2P</i>	40
<i>Obr. 8 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s IO-2P</i>	43
<i>Obr. 9 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s MYC.....</i>	43
<i>Obr. 10 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s APhA.....</i>	44
<i>Obr. 11 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s PNa.....</i>	44
<i>Obr. 12 ó asová závislost celkové BSK PV v prost edí ZK.....</i>	46
<i>Obr. 13 ó asová závislost celkové BSK PVP v prost edí SP</i>	46
<i>Obr. 14 ó asová závislost rozkladu PVP v prost edí SP</i>	47
<i>Obr. 15 ó asová závislost celkové BSK PVP v prost edí PI - ZK.....</i>	47
<i>Obr. 16 ó asová závislost celkové BSK PVP v prost edí mycelia</i>	49
<i>Obr. 17 ó asová závislost celkové BSK PVP v prost edí PI ó ZP</i>	49
<i>Obr. 18 - asová závislost rozkladu PVP v prost edí PI-ZP</i>	50
<i>Obr. 19 ó asová závislost celkové BSK PVP v prost edí PI ó KK.....</i>	50
<i>Obr. 20 ó asová závislost celkové BSK PVP</i>	51
<i>Obr. 21 ó asová závislost celkové BSK PVP v kombinaci s APhA.....</i>	51
<i>Obr. 22 - Srovnání % rozklad PVP (PVP/kosubstrát) ve sledovaných prost edích.....</i>	52

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1 - Zastoupení prvků v p dách stanovené elementární analýzou</i>	<i>28</i>
<i>Tab. 2 - Koncentrace rozkládaných sloučenin v ba kách, as lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu vzorků</i>	<i>38</i>
<i>Tab. 3 - Stanovené vstupní hodnoty pH a TOC a výstupní TOC</i>	<i>39</i>
<i>Tab. 4 - Koncentrace a množství sloučenin v ba kách, as lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu.....</i>	<i>42</i>
<i>Tab. 5 - Množství testovaných látek v ba kách, as lagové fáze, BSK_{max} a procento rozkladu</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 6 - Stanovené hodnoty množství TOC vzorků rozkládaných v PI ZK na začátku a na konci experimentu.....</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 7 - Stanovené hodnoty sušiny a pH na konci experimentu</i>	<i>45</i>
<i>Tab. 8 - Koncentrace testovaných látek v respiračních látkách, lagová fáze, BSK_{max} a procento rozkladu.....</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 9 - Stanovené hodnoty TOC a pH na začátku pokusu</i>	<i>48</i>
<i>Tab. 10 - Růst jednotlivých kultur na vytipovaných substrátech</i>	<i>53</i>
<i>Tab. 11 Stanovené počty bakterií.....</i>	<i>53</i>