

Vliv specifických abiotických látek na biodegradaci PVA v půdním prostředí

Radka Žáková

Bakalářská práce
2014



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
akademický rok: 2013/2014

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Radka Žáková**
Osobní číslo: **T11681**
Studijní program: **B2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Vliv specifických abiotických látek na biodegradaci PVA v půdě**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma se zaměřením na faktory ovlivňující biologický rozklad PVA.
2. Realizujte testy biologického rozkladu PVA v půdním prostředí za přítomnosti vybrané abiotické látky pomocí respirometru BI2000 (Bioscience corp., USA).
3. Naměřená a vypočtená data zpracujte a dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vědecké zdroje zahrnuté v databázích Web of Science, ScienceDirect, SciFinder Scholar, Medline aj.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Markéta Julinová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

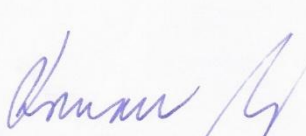
Datum zadání bakalářské práce:

10. února 2014

Termín odevzdání bakalářské práce:

23. května 2014

Ve Zlíně dne 10. února 2014


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




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

Příjmení a jméno: RADKA Štáková

Obor: 102P

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 23.5.2014

Štáková

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 nevydávalečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledek 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 užit 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

Tato práce se zabývá studií biologického rozkladu polyvinylalkoholu (PVA) v půdním prostředí za aerobních podmínek. Nejprve byla připravena směsná půda obsahující zemědělskou zeminu a komerční kompost, a následně byl zvolen neoptimalnější poměr těchto složek v ní (1:1). Dále byly provedeny tři různé pokusy na degradaci PVA. První pokus zkoumal vlastní biodegradaci PVA v připravené půdě. Za 60 dní bylo rozloženo 24 % PVA. Druhý pokus byl zaměřen na degradaci PVA za přítomnosti fosforečnanů. Z tohoto pokusu nebylo možno určit účinek fosforečnanů na degradaci PVA. V třetím pokusu byla zkoumána degradace PVA za přítomnosti pyrolochinolinchinonu (PQQ). Bylo zjištěno, že přítomnost PQQ neovlivnila rozklad PVA.

Klíčová slova: polyvinylalkohol, biodegradace, PQQ, fosforečnany

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the study aimed at biodegradation of polyvinyl alcohol (PVA) in soil environment under aerobic conditions. Firstly, a mixed soil was prepared by mixing agricultural soil with commercial compost. After the soil was prepared, the most optimal ratio of these components was determined (1:1). Three different assays for degradation of PVA were performed after. The first one examined biodegradation of PVA in the prepared soil. After 60 days, 24 % of PVA was broken down. The second assay was focused on degradation of PVA in presence of phosphates. An effect of phosphates on degradation of PVA could not be determined by this assay. Degradation of PVA in presence of PQQ was examined in third assay. It was found that the presence of PQQ did not affect the level of decomposition of PVA.

Keywords: polyvinylalcohol, biodegradation, PQQ, phosphates

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce paní Ing. Markétě Julinové Ph.D. za ochotu, za cenné rady a připomínky, které mi pomohly k vypracování této práce. Dále mé díky patří celému kolektivu ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za vytvoření dobrých pracovních podmínek a rodině, kamarádům za všestrannou pomoc při studiu.

Souhlasím s tím, že s výsledky mé práce může být naloženo podle uvážení vedoucího bakalářské práce a ředitele ústavu. V případě publikace budu uvedena jako spoluautor.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné a že jsem na bakalářské práci pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala

Ve Zlíně, 23. 05. 2014

.....

podpis

OBSAH

ÚVOD	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 POLYVINYLALKOHOL	11
1.1 VÝROBA	11
1.2 POUŽITÍ	12
2 DEGRADACE PVA	13
2.1 CHEMODEGRADACE	13
2.2 FOTODEGRADACE.....	14
2.3 TERMICKÁ DEGRADACE.....	14
2.4 BIODEGRADACE	15
2.4.1 Vlastnosti polymeru	15
2.4.2 Faktory ovlivňující činnost mikroorganismů	16
2.5 SYMBIOTICKÁ DEGRADACE PVA A PŘÍTOMNOST PQQ	21
3 NÁVAZNOST A CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1 TESTOVANÝ VZOREK, CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	25
4.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26
4.3 HODNOCENÍ ROZLOŽITELNOSTI	26
4.3.1 Respirometr BI 2000 (uzavřený respirometr)	26
4.3.2 Princip měření	28
4.4 VÝPOČET BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI	29
4.5 ANALÝZY A POSTUPY	30
4.5.1 Stanovení sušiny půdy.....	30
4.5.2 Stanovení pH půdy (pH_{KCl})- půdní výměnná kapacita	30
4.5.3 Měření pH	31
5 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST	32
5.1 PŘÍPRAVA SMĚSNÉ PŮDY	32
5.2 BIODEGRADACE PVA VE SMĚSNÉ PŮDĚ	35
5.3 BIODEGRADACE PVA ZA PŘÍTOMNOSTI FOSFOREČNANŮ	37
5.4 BIODEGRADACE PVA ZA PŘÍTOMNOSTI PQQ.....	39
ZÁVĚR	41
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	42
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	44
SEZNAM OBRÁZKŮ	45
SEZNAM TABULEK	46

ÚVOD

V současné době hraje důležitou roli v životním prostředí řada syntetických látek, které se uplatňují zejména v průmyslových odvětvích. Produkce těchto látek je vysoká, avšak biodegradace je špatná a tak dochází k persistenci a akumulaci těchto látek v životním prostředí. Mezi nejvýznamnější zástupce patří polyvinylalkohol (PVA) používaný mimo jiné v zemědělství a agrochemii. Polyvinylalkohol se v půdním prostředí degraduje velmi pomalu, protože má schopnost sorbovat se na půdní částice. Hledají se proto vhodnější a účinnější metody k jeho odstranění z prostředí.

Bakalářská práce navazuje na výzkum sledování biologického rozkladu PVA v prostředí za aerobních podmínek a sledování vlivu přítomných látek. V literární části jsou shrnuty dosavadní výsledky prací realizovaných na ústavu inženýrství ochrany životního prostředí (UIOŽP).

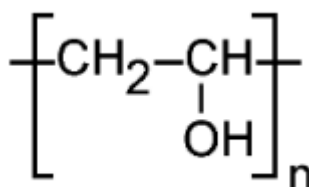
I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYVINYLALKOHOL

PVA je syntetický polymer dobře rozpustný ve vodě i kyselinách. Rozpustnost polyvinylalkoholu závisí na jeho stupni polymerace a stupni hydrolýzy. Tyto vlastnosti, které jsou navíc ovlivnitelné přidavkem změkčovadel (např. glycerol, stearin), závisí především na obsahu hydroxylových skupin –OH a zbytkových acetátových skupin. Při obsahu 70-80 % zbytkových acetátových skupin je ve vodě nerozpustný, ale rozpustný v aromatických uhlovodících a cyklických esterech. Je-li v polymeru obsaženo 35 % zbytkových acetátových skupin, přestává polymer být rozpustný v organických rozpouštědlech, ale rozpustí se ve studené vodě. Působením tepla se sráží. Jestliže zastoupení zbytkových acetátových skupin klesne pod hranici 35 %, bude se PVA rozpouštět v teplé i studené vodě [1].

Optimální rozpustnost v teplé i studené vodě je při obsahu 12 % zbytkových acetátových skupin. Při teplotách 140- 160 °C polymer mění barvu, rychle tmavne a nad touto teplotou se rozkládá. Při obsahu okolo 5 % acetátových skupin polymer jen bobtná ve studené vodě, ale zahříváním se rozpouští [1].

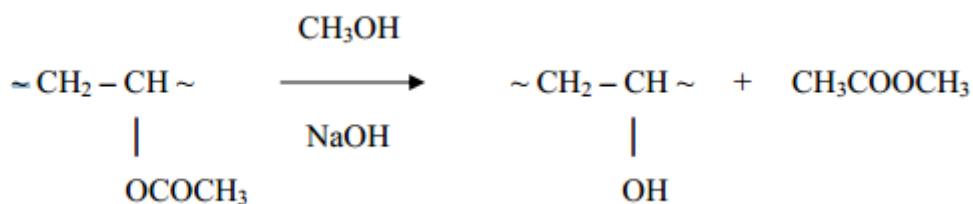
Převážně se vyskytuje v podobě práškovité bílé hmoty krystalického charakteru. Nejčastěji se vyskytuje ve struktuře 1,3- glykolu s cca 12 % acetátových skupin. Je bez zápachový a netoxický [2-4]. Na Obr. 1 je znázorněn strukturní vzorec.



Obr. 1. Strukturní vzorec PVA [2]

1.1 Výroba

Připravuje se hydrolýzou polyvinylacetátu (PVAc) v kyselém nebo zásaditém prostředí (viz. Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc). Nepřipravuje se přímou syntézou, protože jeho monomer (vinylalkohol) je nestabilní a přechází na stabilnější acetaldehyd. Pokud máme kyselé prostředí, samotná reakce probíhá pomaleji než v prostředí zásaditém. Tehdy vznikají nežádoucí etherové vazby, při nichž reagují dvě –OH skupiny [2,3].



Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc [3]

1.2 Použití

V současnosti má PVA využití v řadě průmyslových odvětví. Z hlediska potravinářského průmyslu se používá na přípravu ovocného želé, dále do různých hmot, kdy samotný materiál odolává olejům, rozpouštědlům, tukům apod. tedy jako impregnace. PVA se dále uplatnil i v textilním průmyslu na výrobu vláken, v kosmetickém průmyslu se přidává do krémů a do přípravků na vlasy. Další jeho uplatnění nalezneme ve zdravotnictví a farmaceutickém průmyslu pro výrobu chirurgických nití a jako potahový materiál na tablety. Tento polymer má své využití i při výrobě hadic, těsnění nebo jako obalový materiál apod. [5].

Pokud se na něj podíváme z environmentálního hlediska je důležitý v zemědělství a agroprůmyslu na výrobu repelentů proti škůdcům (švábi, roztoči), také jako součást pesticidních přípravků (hnojiva) s postupným uvolňováním, i jako secí pásy (příprava vodorozpuštěných folií) a různá mořidla na semena. Po aplikaci v zemědělství dochází k akumulaci PVA v půdě (vysoká schopnost sorbovat se na půdní částice, špatně biologicky rozložitelný). Tyto procesy mohou vést ke změnám fyzikálních a chemických vlastností dané půdy [6].

2 DEGRADACE PVA

Na eliminaci polymerních látek v přírodních podmínkách se podílí především atmosférický kyslík, světelné a ionizující záření a mikroorganismy. Nejvyšší mírou se z uvedených vlivů podílí ultrafialové záření, které přispívá ke snížení molekulové hmotnosti a s tím souvisí i změna fyzikálních a mechanických vlastností. Biologická rozložitelnost účinkem mikroorganismů se uplatňuje jako závěrečná fáze po předchozích rozkladných procesech fyzikální a chemické podstaty [7].

2.1 Chemodegradace

Je proces, který využívá prostředí jako zdroj chemicky účinných látek indukujících degradaci plastu, většinou v kombinaci s nějakým dalším vlivem (fyzikálním, biologickým). Chemodegradace je účinná především u plastických hmot, které mají ve svém řetězci zavedeny funkční skupiny. Zatímco polyetylén je díky svojí jednoduché stavbě z etylénových jednotek relativně odolný vůči chemickým vlivům, je v případě přítomnosti hydroxylových skupin odolnost plastické hmoty s těmito skupinami snížena. Polyvinylalkohol, který obsahuje tyto funkční skupiny reaguje dokonce s vodou a rozpouští se v ní. Podobně jsou méně chemicky odolné plasty, u kterých jsou vodíky etylénové jednotky nahrazeny acetátovými funkčními skupinami jako například polyvinylacetát nebo polyakrylové kyseliny. Obecně lze říci, že čím víc je na molekule polymeru funkčních skupin tím snadněji u nich může probíhat degradace [8].

Tu Kim Dung se ve své diplomové práci zabývala [9] hledáním optimálních podmínek Fentonovy degradace PVA, obsaženého v odpadní vodě, za laboratorních podmínek při teplotě 25 °C, pH 4 a při denním světle. Testován byl optimální poměr přídavku železnaté soli a peroxidu vodíku. Byla připravena modelová substance o koncentraci 200 mg PVA na litr roztoku simulující odpadní vodu. V průběhu experimentu byly odebírány vzorky, k nimž byl přidáván 1M NaOH pro zastavení reakce. Pro zhodnocení účinnosti reakcí bylo prováděno měření celkového organického uhlíku (TOC). Testován byl také anaerobní rozklad produktů vznikajících po Fentonově degradaci PVA. Při anaerobní degradaci byl pozorován vznik methanu v menší míře než oxidu uhličitého, z čehož plyne, že anaerobní rozklad nebyl efektivní.

Na práci Tu Kim Dung navazovala práce Gerykové [10] jejichž cílem bylo připravit samotný polyvinylalkohol Fentonovou reakcí a tím urychlit biologickou degradaci aktivova-

ným kalem za aerobních podmínek. Degradace polyvinylalkoholu byla nejdříve prováděna Fentonovou reakcí za laboratorních podmínek a denního světla se vzorky PVA při různých koncentracích jejich vodných roztoků. Produkty po Fentonové reakci byly podrobeny aerobní degradaci aktivovaným kalem z čistírny komunálních odpadních vod. Bylo prokázáno, že produkty Fentonovy reakce nebyly pro kal toxické, a že se rozkládají téměř okamžitě. Je zřejmé, že kombinovaná metoda rozkladu PVA, která následuje po jeho samotné přípravě Fentonovou reakcí je vhodnou možností k nakládání s odpadními vodami obsahující polyvinylalkohol.

2.2 Fotodegradace

Fotodegradace je skupinou fyzikálních procesů uplatňující se při degradaci plastů se zkrácenou životností. Zdrojem světelného záření majícího vliv na degradační procesy je sluneční svit. Světelné záření dopadající na ozařovaný plast může být jeho povrchem odraženo, rozptýleno, propuštěno, absorbováno. Fotochemické změny probíhají tehdy, je-li světelné záření o určité vlnové délce. Například karbonylová skupina C=O absorbuje záření o vlnové délce 195 nm a v rozmezí délek od 280 nm do 320 nm. Vazba C-C pak absorbuje záření o vlnové délce 195 nm a 230 nm až 250 nm. V polymerech, které obsahují výše uvedené skupiny, budou při ozařování těmito vlnovými délkami indukovány fotochemické reakce. Absorpcí světelného záření se zvětší obsah energie makromolekuly, která se dostává do vyššího energetického stavu. Největší část absorbované energie se spotřebuje na převod elektronového systému do vyššího kvantového stavu. Zbytek této energie je využit na tvorbu radikálů v makromolekulách indukovaných rozklad některých plastů [8].

2.3 Termická degradace

Teplota má na polymery vliv chemický a fyzikální. Tyto vlivy se podílejí na rozrušování chemických vazeb a na změně konformace molekul. Obecně platí, že k roztržení molekuly dojde v místě nejslabší vazby. Se zvyšujícím stupněm teploty se zvyšuje stupeň desintegrace molekuly plastu se zkrácenou životností. Sloučeniny obsahující aktivní skupiny odštěpují při zahřívání nízkomolekulární produkty [8]. K termické hydrolýze PVA dochází při teplotách nad 150 °C.

2.4 Biodegradace

Je speciálním případem degradace, při níž dochází k rozkladu polymerů působením biologických činitelů. Známa je biodegradace mikroorganismy, plísněmi, hmyzem a hlodavci. Biodegradace je většinou zapříčiněna enzymy produkovanými mikroorganismy, ale podporují ji i další procesy, např. abiotická hydrolýza, fotodegradace apod. Mikrobiální aktivita mění zároveň strukturu látek kultivačního média. V anaerobních podmínkách dochází většinou ke snížení pH vlivem organických kyselin produkovaných mikroorganismy. Naproti tomu v aerobním prostředí může pH i vzrůst (při kompostování dochází obvykle ke zvýšení pH na 8-9) Vlivem ohromných rozdílů v přírodních podmínkách biodegradabilita polymerů silně kolísá jak v globálním měřítku, tak i v rámci malého ekosystému. To je mimo jiné zapříčiněno i druhy mikroorganismů vyskytujících se v dané lokalitě.

Podmínkou jejich růstu je vysoká vzdušná vlhkost. Kromě výše uvedených podmínek hrají důležitou roli i další faktory, jako jsou kombinace materiálů, stupeň stáří polymeru, mikroklima a podobně. Rychlost biologického odbourávání je také ovlivněna koncentrací a chemickou strukturou testované látky (délka řetězce, přítomnost vícenásobných vazeb, druh, počet a postavení substituentů) [8, 11]. Biologická rozložitelnost látek závisí na fyzikálních a chemických podmínkách procesu degradace, ale i na vlastnostech polymeru.

2.4.1 Vlastnosti polymeru

- Molekulová hmotnost – Hraje důležitou roli zda-li je daný polymer biodegradabilní. Pokud má polymer velkou molekulovou hmotnost je rychlost degradace menší. Díky své molekulové hmotnosti polymer zůstává odolný vůči působení mikroorganismů [12]. S rostoucí molekulovou hmotností PVA klesá rychlost jeho rozkladu ve vodném aerobním prostředí.
- Morfologie polymerů a krystalinita – Biodegradace amorfních polymerů probíhá lépe než u krystalických [12].
- Stupeň hydrolýzy- V případě PVA bylo zjištěno, že polymer s nižším stupněm hydrolýzy degraduje lépe. U vyššího stupně byla patrná redukce aktivity enzymu PVA-dehydrogenas. Různé stupně hydrolýzy mají vliv na degradační rychlost [13].

- Stereoregularita – výrazně lepší rozklad polyvinylalkoholu enzymem PVA-oxigenázou produkovaným druhem *Pseudomonas* byl zaznamenán v kulturách doplněných o isotaktický polymer. Nižší rozklad je tedy u ataktických polymerů. Vliv takticity polymeru na PVA biodegradaci byl připsán citlivosti enzymu PVA-oxidázy na stereochemické omezení [13].
- Aditiva- biocidní přípravky zeslabují účinky mikroorganismů. Přípravky, které naopak jejich účinek zesilují, jsou změkčovadla nebo různé typy biopolymerů[12].

Například v diplomové práci Moravcové [14] byly testovány vodorozpustné směsi na bázi škrobu a polyvinylalkoholu. Bylo zjištěno, že nezáleží na typu použitého škrobu, ale na jeho procentuálním zastoupení ve směsi. S rostoucím množstvím škrobu ve vzorku se zvyšuje stupeň rozkladu. Dále bylo také zjištěno, že s rostoucím obsahem dobře rozložitelných komponent roste i relativní podíl biodegradace PVA. Vodorozpustné směsi byly na bázi škrobu, PVA a glycerolu. Testy byly ukončeny po 73 dnech. Nejlépe se rozložil vzorek bez obsahu PVA. Vzorky obsahující 13 a 23 % PVA se rozložily ze 74,5 % a 83,5 %. Testované směsi se dají považovat za dobře rozložitelné.

V diplomové práci Bernkopfové [15] bylo zjištěno, že modifikace polysacharidy (škrob, gellan, xanthan) a přítomnost změkčovadla glycerolu příznivě ovlivňuje biorozložitelnost PVA v půdním prostředí, ale snižují se mechanické vlastnosti konečných produktů.

2.4.2 Faktory ovlivňující činnost mikroorganismů

Přítomnost mikroorganismů v daném prostředí ovlivňuje řada faktorů, ty ovlivňují jejich životní funkce a aktivitu. Mezi důležité faktory, které tyto procesy ovlivňují, patří:

- Teplota

Přítomnost mikroorganismů závisí na teplotě okolí. Daleko lépe probíhá rozklad při vyšších teplotách, kdy pro samotné mikroorganismy je degradovatelný materiál lépe dostupný. Pokud je teplota vyšší než 60 °C snižuje se rychlost rozkladu a to je důsledkem snížení rozmanitosti přítomných mikroorganismů. Na degradačních postupech se převážně podílí v převažující míře mezofilní organismy [11].

V diplomové práci Chromčákové [16] byl zkoumán vliv teploty na rychlost a průběh degradace PVA folií. Teplota 5°C byla zvolena s ohledem na biodegradaci při zimních pod-

mínkách, kdy jsou čistící pochody na čistírně odpadních vod zpomaleny. Průběh degradace PVA a metabolismus bakterií schopných tento polymer rozkládat byl při zvolené teplotě významně zpomalen. V průběhu pokusu byl proveden mikrobiologický rozbor na množství a přítomnost bakterií, které metabolizují PVA. Kultivace probíhala po dobu 30 dní při zvolené teplotě 5°C a za laboratorní teploty. Za snížené teploty byl metabolismus bakterií schopných rozkládat PVA významně zpomalen. Při kultivaci za laboratorní teploty došlo k nárůstu těchto bakterií již za 1 týden.

- **pH**

Většina biodegradací probíhá v prostředí neutrálním nebo slabě zásaditém a jeho hodnota ovlivňuje rozpustnost látek. Reakce mohou probíhat v širokém rozmezí, a to tehdy, pokud je při degradaci přítomno více druhů mikroorganismů. Mikroorganismy mohou samy hodnotu pH měnit [11].

- **Dostupnost kyslíku**

Biodegradace za přítomnosti kyslíku (aerobní) probíhá daleko lépe a rychleji, než bez kyslíku (anaerobní). Kyslík je využíván organismy jednak jako konečný akceptor protonů a elektronů při respiraci, ale také jako substrát v katabolických oxidačních reakcích. Pro plně aerobní podmínky by neměla koncentrace kyslíku klesnout pod 2 mg/l. V půdách je často kyslík limitujícím faktorem zejména proto, že dosahuje pouze do hloubky 20 – 30 cm [17].

Anaerobní biodegradace

Při anaerobní biodegradaci za nepřítomnosti kyslíku je organická hmota metabolizována organismy za vzniku methanu, vody, biomasy a energie. Jednotlivé stupně anaerobní biodegradace jsou: hydrolýza, acidogeneze, acetogeneze a metangeneze.

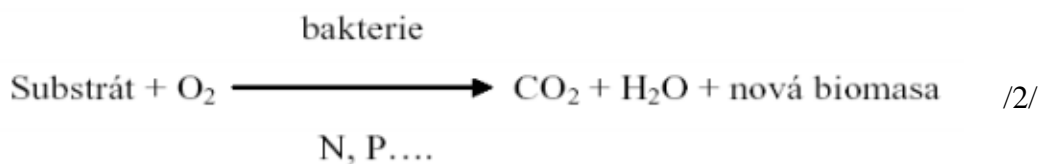
V diplomové práci Honsové [18] byla sledována anaerobní biodegradace PVA ve vodném prostředí u vzorku Sloviol 88-08 se stupněm hydrolýzy 88 % a samotných polysacharidů (gellan, xanthan). Polysacharidy byly rozložitelné snadněji než PVA, které se zadaných experimentálních podmínek rozložilo během 21 týdnů z 67 %.

Aerobní biodegradace

V aerobních podmínkách za přítomnosti kyslíku a mikroorganismů je organická hmota (uhlíkové řetězce v polymeru) přeměněna na oxid uhličitý, amoniak, sírany, fosforečnany, biomasu, vodu a energii. Za hlavní degradačními pochody u aerobní biodegradace se dají označit oxidace a hydrolýza. Hydrolýza může být dvojího typu: chemická a biologická. Ta se liší především v katalyzátorech, přičemž chemickou hydrolýzu katalyzují kyseliny či zásady, biologická je katalyzovaná enzymy a bývá označována jako enzymatická [19,20].

Aerobní organismy jako zdroj využívají organické látky (disimilace) a pro syntézu látek a nových buněk (asimilace). Substrát se z části oxiduje na CO_2 a vodu a zbytek se převádí na zásobní látky a tvorbu nové biomasy.

Průběh biologického rozkladu za těchto podmínek lze vyjádřit rovnicí /2/ :



Z této rovnice vyplývají následující možnosti, které sledují biologickou rozložitelnost.

- 1) Stanovení úbytku rozkládané látky
- 2) Stanovení spotřeby kyslíku
- 3) Stanovení vývoje konečného produktu
- 4) Sledování přírůstku počtu mikroorganismů nebo jejich hmotnosti

Tato vymezení jsou do značné míry formální, poněvadž jednotlivé testy a sledovaná kritéria mohou představovat kombinace uvedených variant [19].

Biodegradabilita prvních biodegradovatelných plastů byla testována metodami vyvinutými pro studium schopnosti plastů odolávat napadení mikroorganismů. Tyto testy se později nahradily metodami, které stanovují koncové produkty mikrobiálního metabolismu. Aby bylo vyhověno všem požadavkům na testování biorozložitelnosti plastů, byla vyvinuta řada metodik pro celé spektrum prostředí, ve kterých po upotřebení plasty končí [11].

V diplomové práci Kozákové byly prováděny testy v půdním prostředí („substrát na hroby“ AGROS, z roku 2001) [21]. K posouzení aerobní biodegradace v půdním prostředí bylo použito respirometrického stanovení na základě sledování množství vyprodukovaného

oxidu uhličitého mikrobiálními pochody. Nejprve byla sledována endogenní respirace půdní mikroflóry přítomné v zemině po dobu 8 dnů. Po uplynutí této doby byly přidány biogenní prvky ve formě roztoku. Zdrojem dusíku byl $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a zdrojem fosforu K_2HPO_4 . Potřebná množství byla vypočítána podle poměru C: N: P = 100:10:1. Testovaný vzorek PVA byl SLOVIOL P88-08 stupeň hydrolýzy 88 %. Z dosažených výsledků je patrné, že ke známkám biodegradace směsné fólie ani PVA po dobu 65 dnů nedošlo. Na počátku provedený mikrobiologický rozbor byl zaměřen na stanovení bakterií, které jsou schopné PVA rozkládat. Po 10 denní kultivaci bylo zjištěno, že množství bylo menší než 100 kolonií bakterií v 1g půdy (negativní závěr).

V diplomové práci Sedláře [22] byly pro testy zvoleny dva typy půdy v poměru: substrát na hroby: substrát na pelargonie = 1:2 (Agro CS. a.s, z roku 2003). U připraveného extraktu byl stanoven TOC (celkový organický uhlík) a proveden mikrobiologický rozbor. Biodegradace se posuzovala na základě množství vyprodukovaného oxidu uhličitého. PVA bylo dávkováno ve formě prášku a testovaný vzorek byl PVA 88-08 se stupněm hydrolýzy 88%, dále byly do reaktorů přidány biogenní prvky. Potřebná množství byla vypočtena podle poměru C: N: P =100:10:1. Po dokonalém promíchání nutričních prvků byla směs umístěna zpět do reaktoru. Po 52 dnech testu došlo cca k 20 % degradaci PVA podle sledovaného kritéria.

V navazující diplomové práci Dvořákové byl použit půdní extrakt připravený ze směsi půd v poměru substrát na hroby: zahradní substrát = 1:2 (Agro CS. a.s, z roku 2004) [13]. V půdním prostředí byla sledována produkce oxidu uhličitého, a to pouze titrační metodou. Testovaný vzorek PVA SLOVIOL P88-08 stupeň hydrolýzy 88 %. Byly testovány směsné fólie na bázi PVA a jejich komponenty: lignin, přírodní škrob, plastifikovaný škrob. Dále do reakčních lahví byly přidány biogenní prvky. Po dokonalém promíchání nutričních komponent s půdním substrátem a vzorkem byla směs umístěna do biotermostatu, který udržoval stálé podmínky: 25 °C a temno. Po 40 dnech se nejlépe rozložila fólie, která obsahovala 70 % PVA, 15% plastifikovaného škrobu, 10 % glycerínu, a 5 % ligninu a procento rozkladu činilo 30,7%.

Autoři se domnívají, že podle předpokladů je biodegradace v půdním prostředí málo efektivní a pomalá. Důvodem mohla být špatná homogenizace látky, nižší dostupnost testovaného vzorku mikroorganismům (ve formě prášku), dále možná sorpce sledovaných vzorků na částice půdy, příp. nedostatečným mikrobiálním oživením použité půdy, které jsou odpovědné za biodegradaci PVA.

- **Koncentrace substrátu**

Na koncentraci substrátu závisí rychlost biodegradace. Ta roste, jen dokud nedosáhne mezní hodnoty. Pokud se koncentrace zvýší nad její hranici, poté už nedochází ke změně rychlosti. Tyto prahové koncentrace mají za následek zastavení biodegradace [7]. V půdách je pro mikroorganismy i při vysokých koncentracích substrátu dostupná pouze jeho malá část, zejména v důsledku jeho nízké rozpustnosti a sorpce. Při velmi malých koncentracích substrátu k biologickému rozkladu nedochází. Vztah mezi strukturou a biologickou rozložitelností organické látky je jedním z důležitých faktorů při hodnocení účinku kontaminantu na životní prostředí. Chemická struktura určuje, jakým způsobem se bude ubírat biochemická oxidace organické látky [17]. V případě PVA nebyla koncentrace substrátu dosud studována.

- **Vliv mikrobionálního inokula**

Hlavním předpokladem úspěšného biologického odstranění látky je přítomnost takových mikroorganismů, které mají příslušné enzymy umožňující její rozklad. Zastoupení mikroorganismů v půdách je rozmanité a mohou odstraňovat různé organické látky, ale tento faktor není limitujícím [17].

- **Vlhkost**

Je nezbytná pro samotný proces rozkladu a to především v půdním prostředí. Rozklad ve většině případů probíhá na povrchu ve formě kapalného filmu. Vlhkost ovlivňuje kyslíkové poměry v půdě, dostupnost živin a transport mikroorganismů. Se stoupající vlhkostí se zhoršuje difúze kyslíku v půdě, protože z jejich pórů voda vytlačí vzduch, ve kterém kyslík difunduje mnohem rychleji než ve vodě. Na druhé straně přítomnost vody stimuluje biodegradaci rozpouštěním a přenosem živin k mikroorganismům [17].

- **Nutriční prvky jako zdroj**

Rychlost biodegradace může být ovlivněna nutriční nevyvážeností, zejména nedostatkem dusíku a fosforu. Vyhovující poměr minerálních živin pro růst biomasy je C: N: P = 100:10:1. Zdrojem uhlíku je organické znečištění. [17].

V diplomové práci Nedbálka [23] pokusy měly vysvětlit příčiny zpomalení degradace PVA aktivovaným kalem, za podmínek lehce odbouratelných substrátu (tryptonu a sacharózy). Výsledky ukázaly, že tento jev není vyvolán substrátovou kompetencí (upřednostěním využívání tryptonu či sacharózy před využitím PVA), ani nedostatkem minerálních

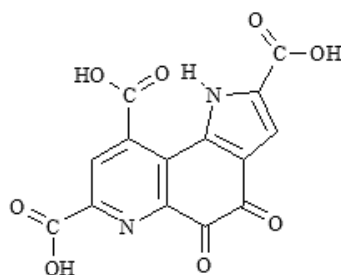
látek, ani účinkem rozpuštěných metabolitů rostoucích heterotrofních bakterií. Určité indície ukázaly citlivost degradačních bakterií vůči zvýšeným koncentracím fosforečnanů. Z výsledků vyplývalo, že skutečně růst všech tří testovaných degradačních kultur je ovlivňován zvýšenými koncentracemi fosforečnanů v prostředí.

V navazující diplomové práci Ošďádalové [24] byla sledována degradace PVA v prostředí různých koncentrací minerálních solí (fosforečnanů). Výsledky ukázaly, že vyšší koncentrace fosforečnanů zpomalují růst kultur i degradaci PVA. Pokusy dále ukázaly, že kromě fosforečnanů potlačují růst kultur i zvýšené koncentrace chloridů. Mikroorganismům nevadí v růstu nižší koncentrace fosforečnanů nebo chloridů, ale jisté zvýšené koncentrace těchto solí zpomalují růst kultur i rozklad PVA. Dá se říci, že koncentrace těchto solí významným způsobem ovlivňují degradaci PVA.

2.5 Symbiotická degradace PVA a přítomnost PQQ

Pyrolochinolinchinon (PQQ)

Při degradaci PVA má u některých bakterií významnou roli přítomnost PQQ. Pyrolochinolinchinon je nekovalentně vázaná prostetická skupina mnoha chinoproteinů. Jednou z jeho hlavních úloh je jeho přítomnost při oxidaci PVA či jiných organických substrátů. Jedná se totiž o nezbytný faktor pro činnost dehydrogenas, které oxidují PVA. Výskyt chinoproteinů byl dosud zaznamenán v periplasmatickém prostoru některých Gram-negativních bakterií, kde slouží jako katalyzátory při oxidaci alkoholů nebo sacharidů. Důležitá je také přítomnost aminokyselin či bílkovinných sloučenin jako je např. pepton, kvasničný autolyzát, apod. v kultivačním médiu. Přítomnost aminokyselin nebo bílkovinných sloučenin je totiž příčinou snížení obsahu PQQ v systému vlivem transformace PQQ na biologicky neaktivní složku [25]. (na obr. 3 je znázorněn strukturní vzorec PQQ).



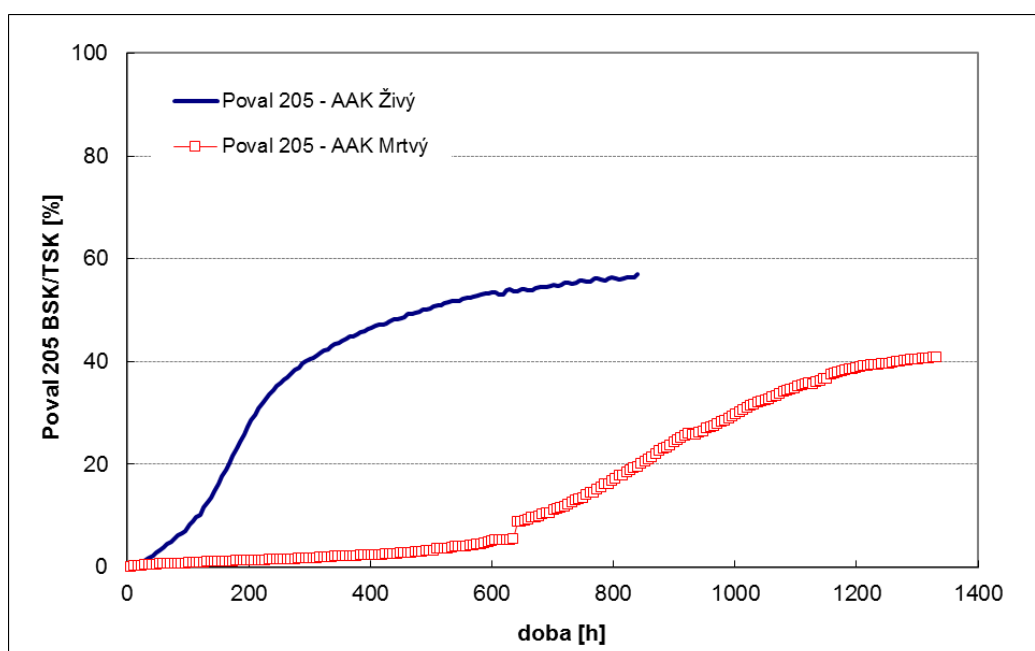
Obr. 3. Strukturní vzorec PQQ [24]

V diplomové práci Coufalíkové [26] byl studován symbiotický vztah dvou mikrobiálních kultur (kultura OT3 a *Rhodococcus erythropolis*) při biodegradaci PVA. Z výsledků vyplývá, že kultura OT3 je schopná PVA degradovat jenom tehdy, je-li kultura *Rhodococcus erythropolis* přítomna ve formě buněk. Cílem práce dále bylo ověření vlastnosti OT3 pomocí degradačních zkoušek a provedením růstových testů. Degradační testy se prováděly v tekutém médiu a ve většině případů byl přidán pyrolochinolinochinon (PQQ). Práce dále ověřovala, zda i mrtvá biomasa *Acetobacter aceti* je schopna dodat kultuře OT3 přírodní zdroj PQQ a také dodat druhý faktor pro symbiotickou degradaci PVA, a to hemovou skupinu. Degradace PVA kulturou OT3 s biomasou proběhla z 64,5 % a byla srovnatelná s degradací PVA kulturou OT3 a *Rhodococcus erythropolis*, která degradovala PVA cca z 63 %.

V práci Zemana [27] byl studován vliv PQQ a dalších látek na biodegradaci PVA neadaptovaným aktivovaným kalem. V neadaptovaném aktivovaném kalu probíhá degradace rychleji za podmínek, kdy jediným substrátem bylo PVA- zde proběhl úplný rozklad PVA za 15 dní. Jakýkoliv přídavek dalších látek do směsi biodegradaci zpomaloval. Pokud byly v degradační směsi přítomny sekundární alkoholy a PQQ, trvala degradace PVA 17 dní, v případě přítomnosti tryptonu a sacharózy ve směsi proběhla degradace PVA nehledě na součastnou přítomnost nebo nepřítomnost PQQ a sekundárních alkoholů za cca 28 dní.

3 NÁVAZNOST A CÍLE BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Diplomová práce S. Pekařové [28] se zabývala rozkladem PVA v půdním prostředí. V experimentu byla použita půda inokulovaná adaptovaným aktivovaným kalem z čistírny odpadních vod. Byla zkoušena jak živá kultura, tak mrtvá (sterilizace byla provedena při 125°C a negativní výskyt mikroorganismů byl potvrzen mikrobiologickými testy), bez přísavky nutričních prvků (C, N, P). Živá kultura kalu rozložila PVA z 60 % za 33 dní. V pokusech s mrtvou biomasou aktivovaného kalu by k rozkladu vlivem mikroorganismů nemělo docházet. Byl přesto pozorován rozklad PVA (viz. Obr. 4), který se postupem času zvyšoval. Takto došlo k degradaci PVA z 40 % po 54 dnech. Tento rozklad je vysvětlován možnou přítomností PQQ a nepřítomností PO_4^{3-} v půdním prostředí.



Obr. 4. Srovnávání průběhu biologického rozkladu PVA v půdě s živou a mrtvou bio masou adaptovaného aktivovaného kalu [28].

V diplomové práci Ošťádalové [24] byl sledován vliv minerálních solí (fosforečnanů) na biodegradaci PVA. Výsledky ukázaly, že vyšší koncentrace fosforečnanů zpomalují růst kultur i degradaci PVA.

Cílem této bakalářské práce je navázat na práci Pekařové a sledovat vliv PQQ a fosforečnanů na degradaci PVA.

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Testovaný vzorek, chemikálie, přístrojové vybavení

Testovaný vzorek

PVA (MOWIOL 5-88) stupeň hydrolyzy 88 mol %, CHSK_{Cr} je 1403,7 mg/g, prášková forma, výrobce Kuraray, Japonsko

Chemikálie

Při laboratorních pokusech byly použity následující chemikálie čistoty p.a. od firmy Sigma- Aldrich s.r.o. nebo Penta s.r.o.

chlorid draselný, hydrodenfosforečnan sodný dekahydrát, dihydrogenfosforečnan draselný, Soda lime (NaOH/CaO) s indikátorem.

PQQ- pyrolochinolinchinon(Sigma- Aldrich) čistoty p.a.

Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Sartorius GmbH, SRN
- Elektrochemický respirometr BI-2000, Bioscience, corp., USA
- pH- metr Inolab pH/ON 735 s pH elektrodou SenTic 81, WTW Německo
- Sušárna Memmert model 100, SRN
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

4.2 Biologický materiál

- **Směsná půda**

Směsná biologicky aktivní půda byla složena ze zemědělské zeminy a komerčního kompostu v různých poměrech (viz. diskuzní část).

- **Zemědělská zemina**

Jílovitá hnědozem (odběr Lešná, okr. Vsetín, podzim 2013), která byla zbavená hrubých nečistot a případné tvrdé horniny prosetím přes síto (velikost okolo 5 mm).

- **Komerční kompost**

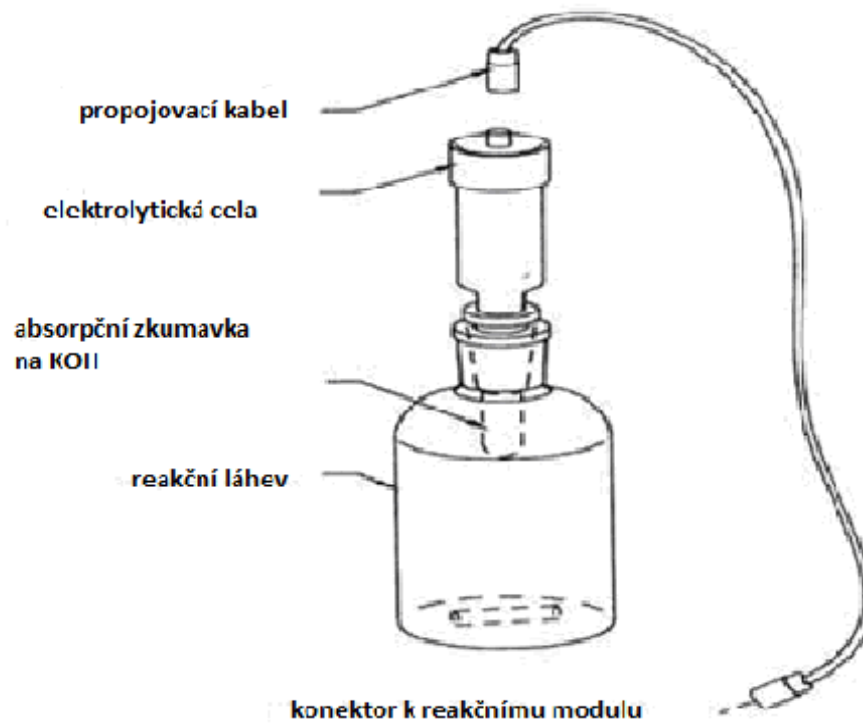
Zahradnický kompost značky Agro (Agro CS a.s., Česká Skalice) s obsahem zkompostovatelných surovin rostlinného původu, humusu a přísadkem dolomitického vápence. Výrobce uvádí obsah rizikových prvků v mg/kg sušiny: Cd 2, Pb 100, Hg 1, As 10, Cr 100, Cu 100, Mo 5, Ni 50, Zn 300 a množství nerozložitelných příměsí max 2%.

4.3 Hodnocení rozložitelnosti

4.3.1 Respirometr BI 2000 (uzavřený respirometr)

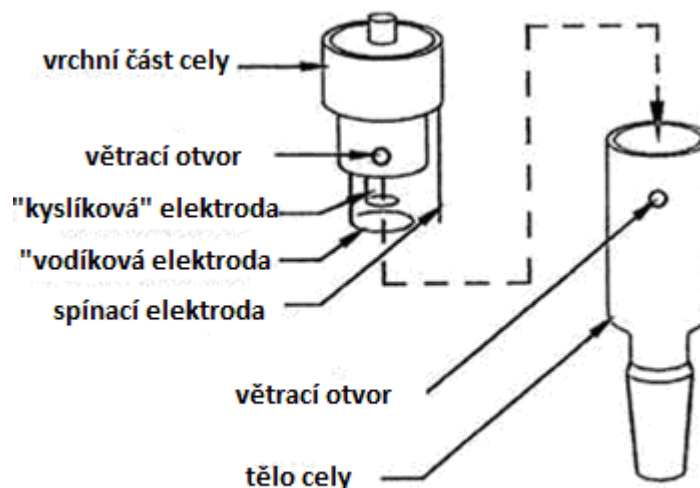
Pro stanovení rozkladu PVA v půdním prostředí byl použit respirometr Bioscience-corp.USA (BI-2000). Přístroj sleduje biologické pochody a to za aerobních podmínek a měřenou veličinou je spotřeba kyslíku. Samotný respirometr [28] se skládá ze dvou modulů kde na každém z nich je 8 reakčních nádob, které mají objem 1 litr s elektrolytickými celami, vodní lázně (temperované) a regulátor teploty. Každá z reakčních nádob byla následně vložena do vodní lázně. Teplota se pohybovala $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Po sestavení reakční aparatury se provedl test těsnosti a poté byl spuštěn pokus. Probíhající testy byly ve tmě.

K reakčnímu modulu patří elektronický hardware, který slouží k vyvíjení kyslíku, a další úlohy jako regulace teploty a snímá tlak a teplotu. Samotné reakční nádoby, elektrolytické cely a zkumavky na NaOH tvoří reaktory, a to zabezpečuje vhodné podmínky samotných pokusů. Všechny části reaktorů jsou vyrobeny ze skla (borosilikátového) se zábrusy. V průběhu pokusů je každá nádoba ponořena do vodní lázně a vše je propojené pomocí spojovacích kabelů k přednímu panelu modulů [28].



Obr. 5. Reakční nádoba respirometru BI-2000 [28]

Hlavní částí u elektrolytických cel je tzv. tělo cely, které je děleno na část vnitřní a vnější. Za pomoci zábrusu je cela napojena na absorpční zkumavku, kde horní část těla cely je zavedena stejným způsobem na vrchní část cely a obsahuje tři druhy různých elektrod kyslíkovou, vodíkovou, a spínací. Kyslíková je vložena ve vnitřní části cely [28].



Obr. 6. Elektrolytická cely respirometru BI-2000
[28]

4.3.2 Princip měření

Mikroorganismy přítomné v reakční nádobě potřebují k přeměně chemických látek neustálý přísun kyslíku. Oxid uhličitý, který je vyprodukován při spotřebě kyslíku mikroorganismy se absorbuje v absorpčních zkumavkách hydroxidem sodným (NaOH). Tím dojde k mírnému podtlaku, který způsobí pokles hladiny elektrolytu ve vnější části elektrolytické cely. Jako elektrolyt se v respirometru používá 0,5M kyselina sírová [28].

Jak poklesne hladina elektrolytu, dojde k přerušení kontaktu mezi spínací elektrodou a elektrolytem. Reakce způsobí aktivaci cely, takže začne procházet proud mezi dvěma elektrodami ponořenými do elektrolytu [28].

Disociací molekul kyseliny sírové v roztoku vzniknou kladné ionty vodíku a záporné ionty SO_4^{2-} . Průchodem elektrického proudu se kationty vodíku pohybují k záporné elektrodě, zde přijmou elektron a na záporné elektrodě se vyloučí vodík. Vodík je poté vypouštěn do atmosféry pomocí otvorů, které jsou na stěně cely. Vzniklé záporné ionty SO_4^{2-} se naopak pohybují ke kladné elektrodě. Dojde k odevzdání přebytečných elektronů a radikály $\text{SO}_4^{\cdot-}$, které když vzniknou, začnou reagovat s vodou za vzniku kyseliny sírové. Při reakci se uvolní molekula kyslíku. Množství vyprodukovaného kyslíku je úměrné elektrickému proudu podle Faradayova zákona. Jakmile dojde k ustálení tlaku uvnitř cely, hladina elekt-

rolytu ve vnější části cely začne stoupat a tím dojde k přerušení elektrolytické reakce. Množství kyslíku, který je vyprodukovaný je v mg a data jsou uložena v počítači [28].

4.4 Výpočet biologické rozložitelnosti

Z naměřených dat byla vypočítána substrátová biologická spotřeba kyslíku podle rovnice /2/

$$BSK_s = \frac{BSK_L - BSK_{SL}}{m} \quad /2/$$

Kde:

BSK_s	substrátová biologická spotřeba testovaného vzorku [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
BSK_L	naměřená biologická spotřeba kyslíku testovaného vzorku v čase t [mg]
BSK_{SL}	naměřená biologická spotřeba kyslíku slepého pokusu v čase t [mg]
m	navážka testovaného vzorku do reaktoru [g]

Procento biologického rozkladu $\%_{TSK}$ resp. $\%_{CHSK_{Cr}}$ určuje poměr biologické spotřeby kyslíku ku teoretické spotřebě kyslíku (resp. chemické spotřebě kyslíku) podle rovnice /3/ resp. /4/

$$\%_{TSK} = \frac{BSK_s}{TSK} \cdot 100 \quad /3/$$

$$\%_{TSK} = \frac{BSK_s}{CHSK_{Cr}} \cdot 100 \quad /4/$$

Kde:

BSK_s	substrátová biologická spotřeba testovaného vzorku [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
TSK	teoretická spotřeba kyslíku testované látky [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]
$CHSK_{Cr}$	chemická spotřeba kyslíku testované látky [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$]

Teoretická spotřeba byla vypočítaná podle následující rovnice /5/

$$TSK = \frac{16 \cdot (2a + \frac{1}{2}b - c)}{Mr} \quad /5/$$

Kde:

TSK	teoretická spotřeba kyslíku v TSK [g.g ⁻¹]
a	počet atomů uhlíku
b	počet atomů vodíku
c	počet atomů kyslíku
Mr	relativní molekulová hmotnost látky [g.mol ⁻¹]

4.5 Analýzy a postupy

4.5.1 Stanovení sušiny půdy

Petriho miska včetně víčka se vysušila při 105°C nejméně po dobu 30 min a poté se nechala vychladnout v exsikátoru nejméně 45 min. Do vysušené a zvážené Petriho misky včetně víčka se navážilo cca 5 g půdy a to s přesností na 10 mg. Otevřené Petriho misky už se vzorkem se umístily do vyhřáté sušárny na 105°C a sušily se včetně víčka do konstantní hmotnosti. Po ukončení sušení se víčkem uzavřená Petriho miska vložila do exsikátoru a po vychladnutí (nejdříve po 45 min) se zvažila s přesností na 10 mg. Každé stanovení bylo provedeno a to třikrát vedle sebe a poté sušina půdy byla vyjádřena rozdílem hmotností v procentech [29].

4.5.2 Stanovení pH půdy (pH_{KCl})- půdní výměnná kapacita

Do Erlenmayerovy baňky se navážilo přibližně 20 g půdního vzorku, přidalo se 50 ml roztoku 0,2 M KCl a rozmíchá skleněnou tyčinkou. Za 24±4 hodin se suspenze přefiltrovala přes řídký filtrační papír a změřila se hodnota pH [30].

4.5.3 Měření pH

Po kalibraci pH-metru, pomocí dvou tlumivých roztoků s hodnotou pH nižší a vyšší než je pH vzorku bylo za stálého míchání stanoveno pH vzorku.

5 VÝSLEDKOVÁ A DISKUZNÍ ČÁST

V této části bakalářské práce jsou soustředěny výsledky jednotlivých testů. Jednotlivá měření jsou rozdělena do částí z důvodu přehlednosti.

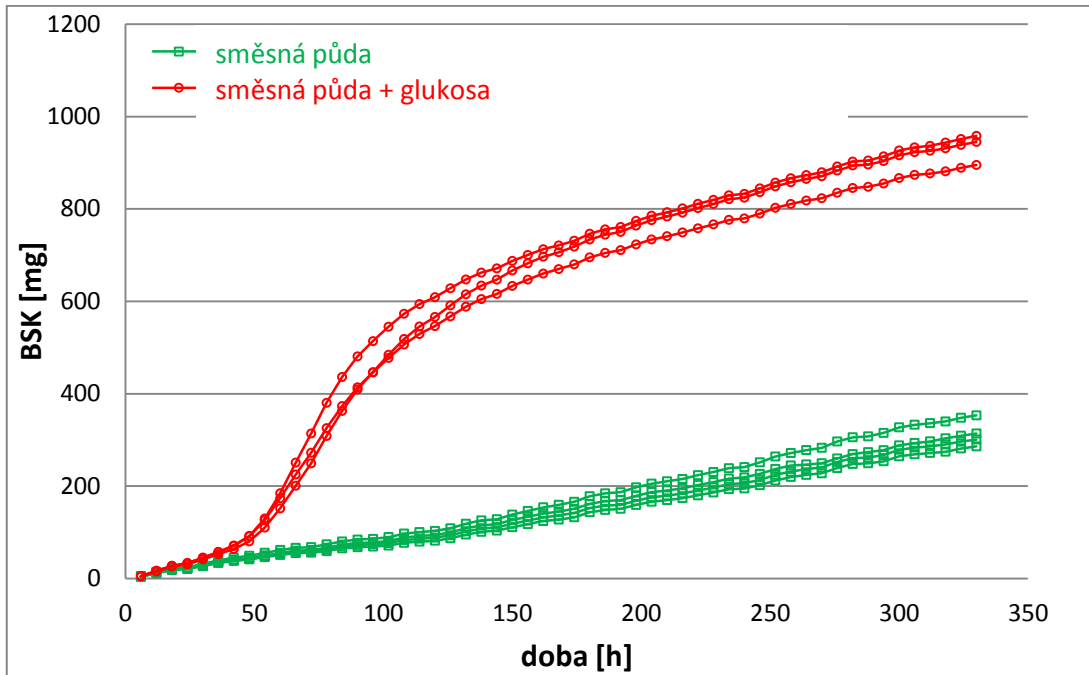
5.1 Příprava směsné půdy

Důležitou podmínkou byl dobrý přestup kyslíku z plynné do pevné fáze. Samotná vrstva půdy by při těchto testech měla být co nejvíce prodyšná, aby přestup kyslíku nebyl omezo-
ván. Pro samotné testy byla zvolena zemědělská půda a komerční substrát. Samostatná zemědělská zemina by nebyla vhodná ke stanovení, protože byla těžkou a hutnou. Naopak samotný komerční kompost je slabě mikrobiálně oživen a rozklad by proto nebyl ideální. Proto byl vhodně zvolen poměr mezi zemědělskou zeminou a komerčním kompostem pro zachování požadované vlhkosti. Pro zvolení vhodného poměru mezi substrátem a zemědělskou půdou byly provedeny různé testy s poměrem jednotlivých půd. Směs půdy v poměru zemědělská půda: komerční substrát (1:5), která byla připravena smícháním 200 ml zemědělské půdy a 1000 ml komerčního substrátu. Další testovaný poměr byl 1 :1 smícháním 500 ml zemědělské půdy a 500 ml komerčního substrátu.

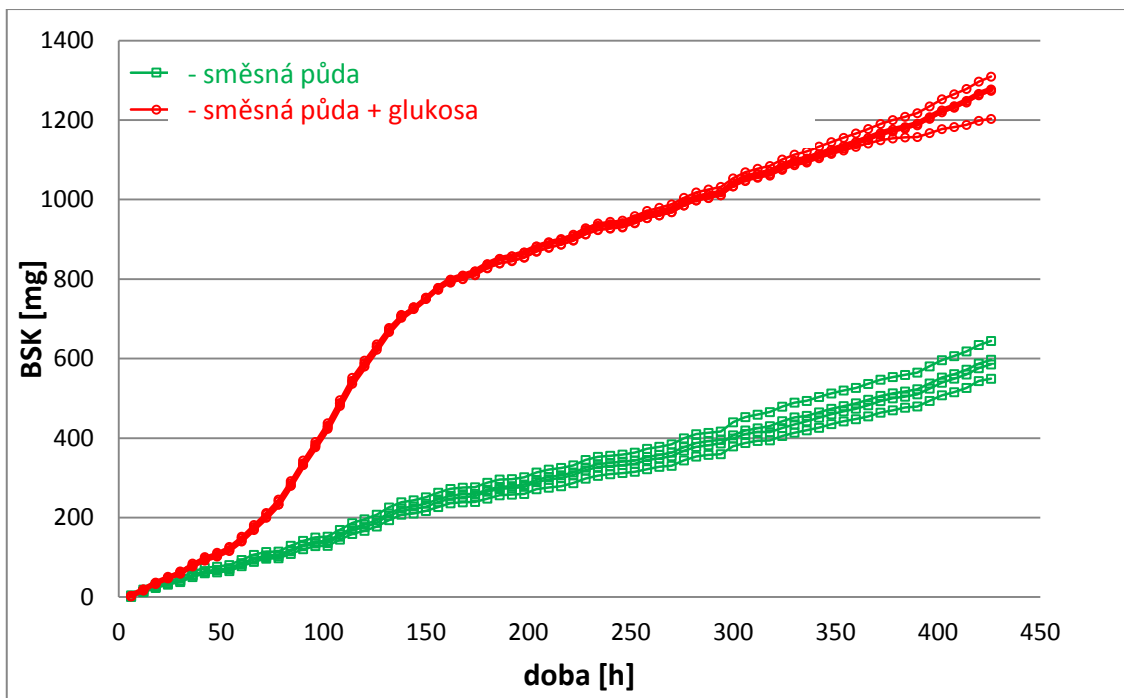
Postup přípravy byl zvolen na základě výsledků v diplomové práci [31]. Dávkování bylo prováděno objemově (viz. 4.3.1) a jako substrát byla použita dobře biologicky rozložitelná látka- glukóza. Do reakčních nádob se dávkovala přímou navážkou 2 g na litr půdy (navážka v reaktoru byla 1 g). Pro zachování vlhkosti se do reaktoru přidalo navíc 10 ml destilované vody. Vlhkost směsných půd se pohybovala cca 55 %. V takto připravených půdách různých poměrů byl testován rozklad glukosy Obr. 7 a Obr. 8. Tyto testy probíhaly po dobu 14-18 dní. U obou těchto testovaných půd došlo k cca 60 % rozkladu glukosy.

Na obr. 9. je uvedeno srovnání biologického rozkladu v obou testovaných poměrech směsných půd.

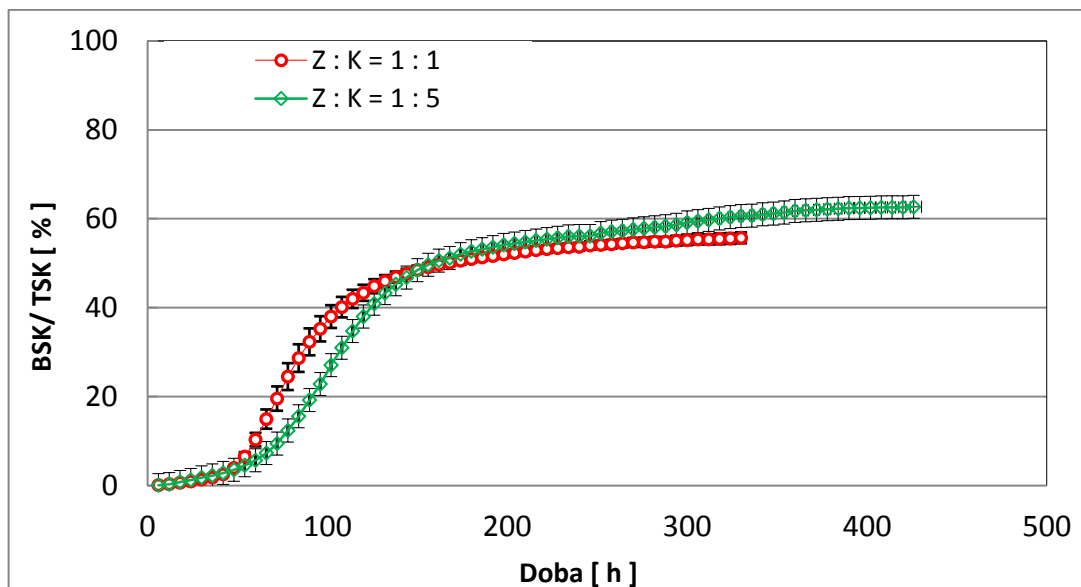
Před začátkem a na konci každého pokusu byla stanovena sušina půdy a změřeno pH_{KCl} a to u slepých pokusů i s obsahem testované látky.



Obr. 7. Průběh celkového biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě
Zemědělská zemina: Komerční kompost = 1:1



Obr. 8. Průběh celkového biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě
Zemědělská zemina: Komerční kompost = 1:5



Obr. 9. Srovnání biologického rozkladu glukózy v obou typech půdy vyjádřený jako BSK/TSK (\pm směrodatná odchylka)

Tab. 1. Limitní hodnoty rozkladu glukózy

zemina: substrát	t_{LAG} [h]	t_{10} [h]	t_{90} [h]	t_{ROZ} [h]	BSK/TSK [%]
1:1	$18 \pm 0,109$	$48 \pm 0,990$	$156 \pm 0,919$	$306 \pm 1,122$	58
1:5	$6 \pm 0,030$	$72 \pm 0,555$	$240 \pm 0,869$	$396 \pm 2,750$	60

Kde:

t_{LAG} čas lagové fáze [h]

t_{10} čas v 10 % maximálního stupně rozkladu [h]

t_{90} čas v 90% maximálního stupně rozkladu [h]

t_{ROZ} čas rozkladu [h]

BSK/TSK procento rozkladu [h]

Z hodnot uvedených v Tab. 1 je vidět rychlejší rozklad glukózy v poměru směsné půdy 1:1 oproti 1:5. Proto vyšší poměr této zeminy oproti komerčnímu substrátu zrychloval rozklad glukózy. Pro experimentální podmínky testu byl proto zvolen poměr 1:1.

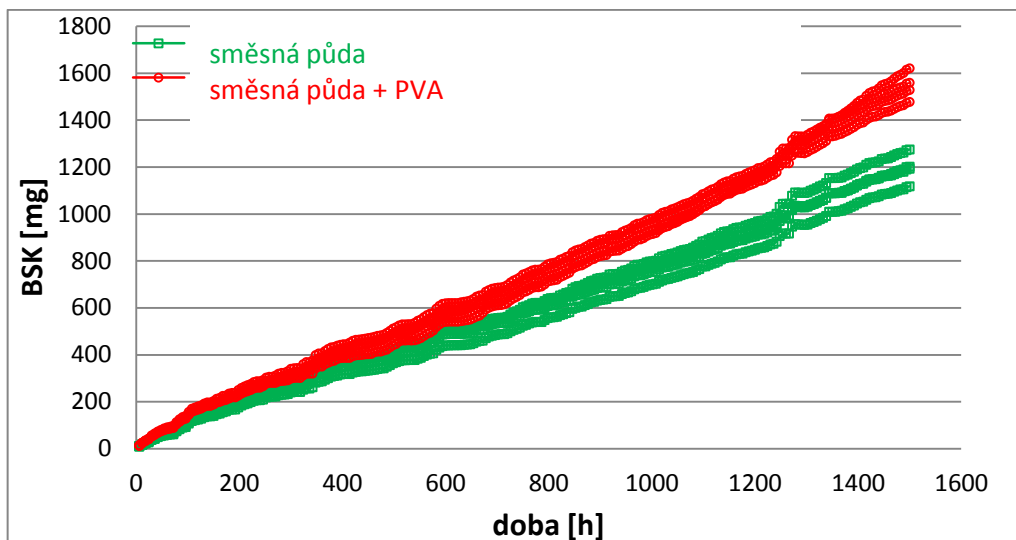
5.2 Biodegradace PVA ve směsné půdě

Cílem testů bylo sledování biodegradace PVA v půdním prostředí bez nutričních prvků.

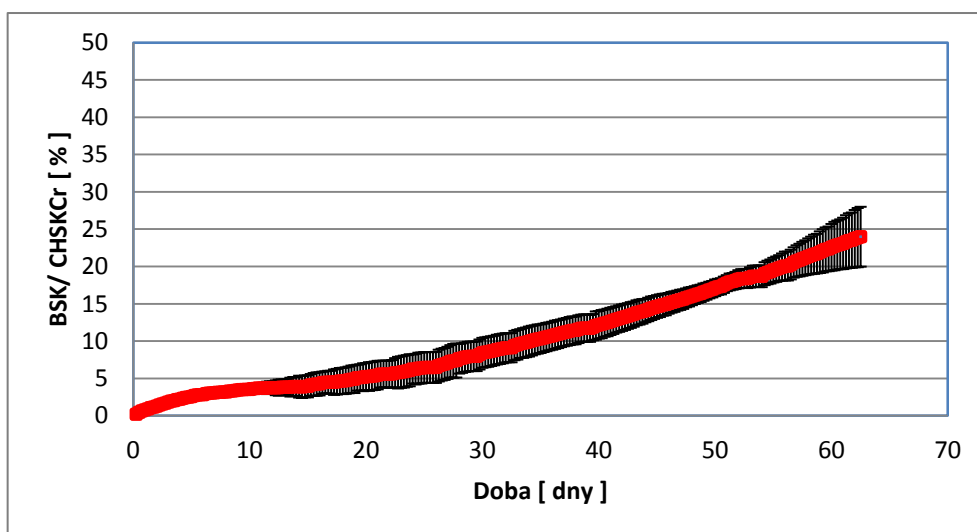
Na základě zkušebních testů s glukózou byl pro přípravu směsné půdy vhodnější poměr 1:1 ze zemědělské zeminy a komerčního substrátu podle kap. 5.1. Dále byl připraven zásobní roztok PVA v destilované vodě o koncentraci 100 g/l. Roztok PVA se připravoval 24 hod předem intenzivním mícháním za studena. Připravená půda byla poté dávkována pomocí odměrného válce v objemu směsné půdy 500 ml do reakčních nádob. Po nadávkování směsné půdy bylo dodáno vždy 10 ml zásobního roztoku PVA. Poté aktuální koncentrace v reaktorech byla 2 g/l půdy. Byla sledována i endogenní respirace půdního substrátu, kde byl dávkován stejný objem destilované vody. Slepé pokusy i testované vzorky byly připraveny 4x vedle sebe. Před začátkem a po ukončení testů byla stanovena hodnota pH_{KCl} a sušina směsné půdy. Vlhkost půdy se pohybovala u PVA přibližně 71 %, u slepého pokusu 63 % a pH_{KCl} 5,228. Test byl založen na sledování spotřeby kyslíku (BSK). Nebyly přítomny nutriční prvky.

Na obr. 10 lze vidět kumulativní spotřebu kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA. Zřejmé je, že v samotné směsné půdě byl polyvinylalkohol schopen rozkladu. Rozklad začal téměř okamžitě. Lagová fáze je menší než 24 hodin avšak po 62 dnech došlo k degradaci PVA pouze z $24 \pm 4,008$ %. Mikrobiologické testy nebyly prováděny.

Na Obr. 11 je znázorněn průběh degradace PVA vyjádřený jako $\text{BSK} / \text{CHSK}_{\text{Cr}}$ (\pm směrodatná odchylka).



Obr. 10. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA



Obr. 11. Průběh degradace PVA ve směsné půdě vyjádřený jako BSK/CHSK_{Cr} (\pm směrodatná odchylka)

Degradace PVA probíhala velmi pomalu, jedním z důvodů může být, jak uvedl Sedlář ve své práci kyselá povaha půdy [22]. Pomalý až žádný rozklad si Kozáková a Dvořáková zdůvodnily možnou sorpcí sledovaného vzorku na částice půdy nebo špatnou homogenizací látky do půdy a nižší dostupnost samotným mikroorganismům [21,13]. Autoři uvedli, že důvod může být nedostatečným mikrobiálním oživením použité půdy (substrát na hroby, substrát na pelargonie), které jsou zodpovědné za degradaci polyvinylalkoholu.

5.3 Biodegradace PVA za přítomnosti fosforečnanů

Výsledky diplomové práce Nedbálka [23] ukazují, že růst bakterií je negativně ovlivňován zvýšenou koncentrací fosforečnanů v prostředí. Dále navrhl detailně prostudovat vlastnosti PVA-degradačních bakterií v obecné citlivosti na minerální látky a ověření urychlení procesu degradace PVA v prostředí se sníženou koncentrací minerálních solí.

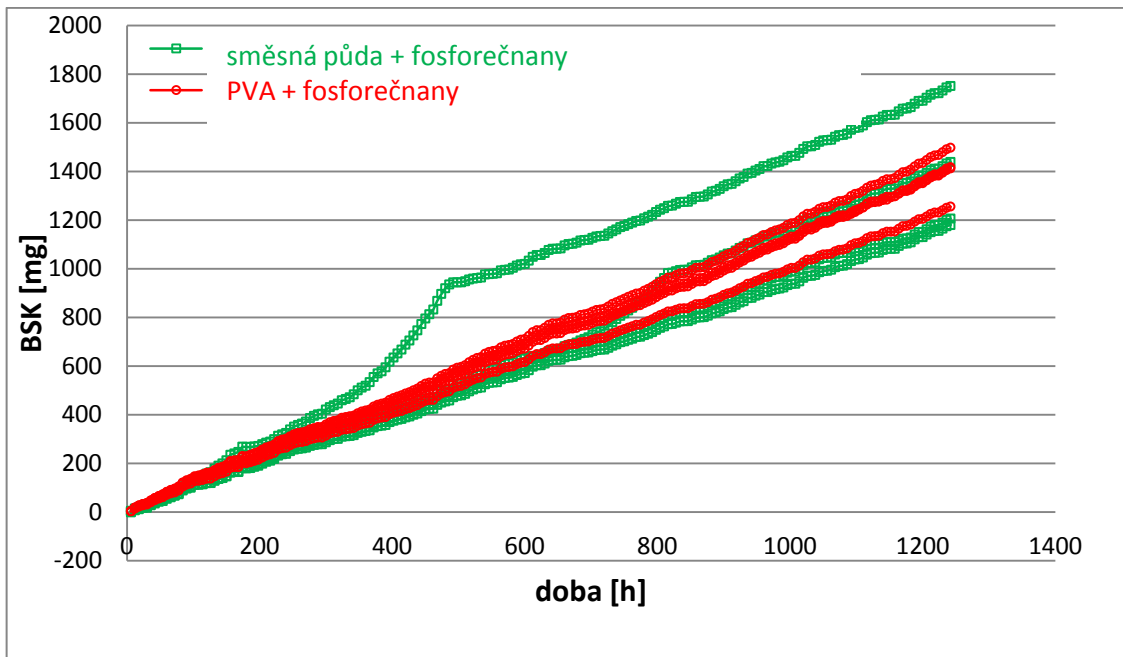
Rozhodujícím kritériem pro testy realizované v mé práci byla diplomová práce Ošťádalové, která se zabývala vlivem minerálních solí na biodegradaci polyvinylalkoholu [24]. Ve své práci uvedla, že přítomnost některých minerálních solí (fosforečnanů), mohou zpomalovat činnost mikroorganismů degradujících PVA.

Směsný roztok PVA a fosforečnanů nebylo možné připravit z důvodu vysrážení roztoku. Z tohoto důvodu bylo přistoupeno k druhému postupu. Do zemědělské půdy byly fosforečnany dávkovány přímou navážkou, kde se důkladně homogenizovaly a poté se přidal komerční substrát. Směsná půda se připravovala 24 hodin před experimentem, kdy koncentrace fosforečnanů v půdě byla 13,34 mmol na litr půdy. Dále byl připraven zásobní roztok PVA v destilované vodě o koncentraci 100 g/l.

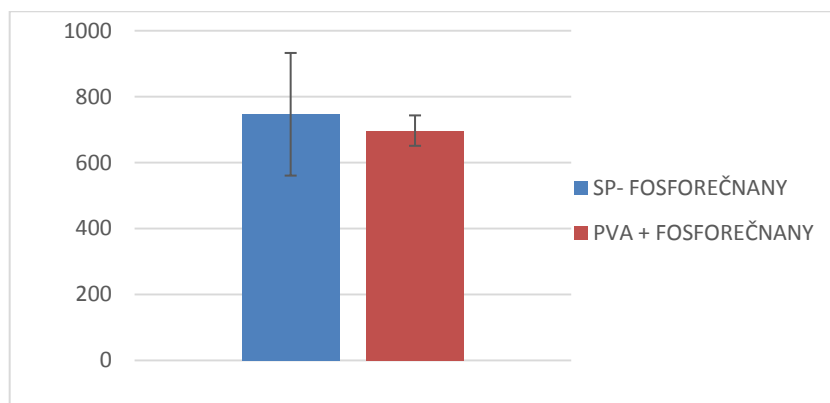
Připravená půda byla poté dávkována do bioreaktoru po 500 ml. Po nadávkování směsné půdy se přidalo 10 ml zásobního roztoku PVA o koncentraci 2 g/l půdy. Byla sledována endogenní respirace půdního substrátu (slepý pokus), kde byl dávkován stejný objem destilované vody. Testované vzorky i slepé pokusy byly připraveny 4x vedle sebe. Před začátkem a po ukončení testů byla změřena hodnota pH_{KCl} a sušina směsné půdy. Vlhkost půdy byla přibližně 71 % a pH_{KCl} 5,348.

Na Obr. 12 lze vidět kumulativní spotřebu kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti fosforečnanů. Z výsledků vyplývá, že nelze říct jaký vliv mají fosforečnany na degradaci PVA. Je možné se domnívat, že fosfor mohl sloužit jako nutriční prvek mikroorganismům přítomným v směsné půdě.

Směrodatné odchylky měření v rámci chyby a těsnosti dat, jsou zahrnuty na Obr. 13.



Obr. 12. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti fosforečnanů



Obr. 13. Kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti fosforečnanů (\pm směrodatná odchylka)

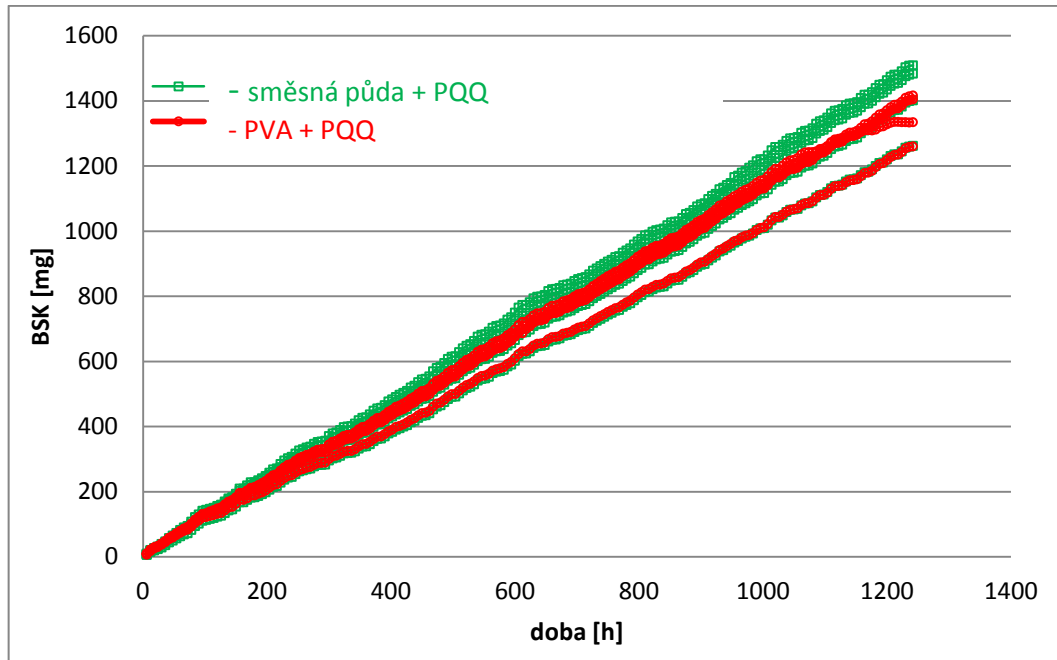
5.4 Biodegradace PVA za přítomnosti PQQ

Přítomnost PQQ má při biodegradaci PVA u některých bakterií důležitou a významnou roli. Probíhající testy měly ověřit vliv PQQ na biodegradaci PVA v půdě.

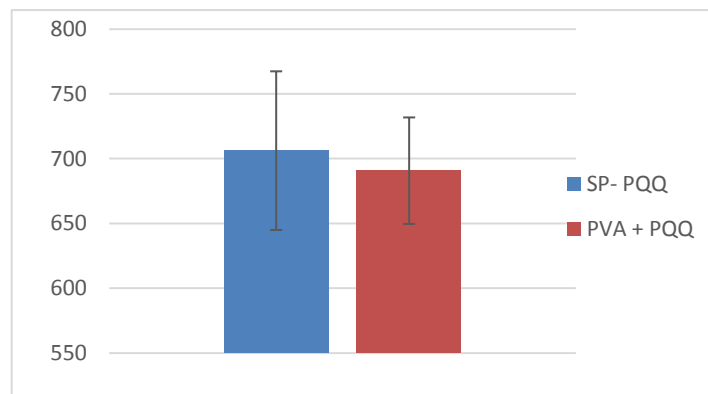
Byla připravena půda složená ze zemědělské zeminy a komerčního substrátu v poměru 1:1. Dále byl připraven zásobní roztok PVA v destilované vodě o koncentraci 100 g/l. Roztok PVA se připravoval 24 hod předem intenzivním mícháním za studena. A zásobní roztok PQQ byl o koncentraci 100 mg/l. Připravená půda byla poté dávkována do reakčních nádob po 500 ml. Po nadávkování směsné půdy bylo dodáno vždy 10 ml zásobního roztoku PVA s přídatkem 0,5 ml PQQ. Poté aktuální koncentrace polyvinylalkoholu v reaktorech byla 2 g/l půdy s přídatkem 0,02 mg/l půdy PQQ. Byla sledována i endogenní respirace půdního substrátu, kde byl dávkován stejný objem destilované vody s přídatkem PQQ o koncentraci 0,02 mg/l půdy. Slepé pokusy i testované vzorky byly připraveny 4x vedle sebe. Před začátkem a po ukončení testů byla stanovena hodnota pH_{KCl} a vlhkost směsné půdy. Vlhkost zeminy se pohybovala u PVA za přítomnosti PQQ kolem 63% u slepých pokusů s PQQ 70% a pH_{KCl} 5,228.

Na Obr. 14. je znázorněn průběh kumulativní spotřeby kyslíku připadajícího na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti PQQ. Pokus degradace PVA byl prováděn po dobu 52 dní, kdy byl pozorován mírný inhibiční účinek PQQ a proto nedocházelo k degradaci PVA.

Směrodatné odchylky měření v rámci chyby a těsnosti dat, jsou zahrnuty na Obr. 14.



Obr. 14. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti PQQ



Obr. 15. Kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti PQQ (\pm směrodatná odchylka)

K degradaci PVA za přítomnosti PQQ nemuselo vůbec docházet. Přítomností mikroorganismů mohlo dojít ke spotřebování PQQ, protože bylo dávkováno v menším množství a tento důsledek mohl ovlivnit celkovou degradaci PVA.

ZÁVĚR

Tato bakalářská práce se zabývala sledováním biologické rozložitelnosti PVA v půdním prostředí za aerobních podmínek. V experimentech byla sledována degradace samotného PVA, dále s přítomností PQQ a fosforečnanů. Tyto testy byly prováděny pomocí elektrochemického respirometru BI-2000, kde hodnotícím kritériem bylo BSK/TSK.

V laboratoři byla nejprve připravena směsná půda složená z komerčního substrátu a zemědělské zeminy v poměru 1:1. V první části těchto biodegradačních testů byla věnována pozornost samotnému rozkladu PVA, kde rozklad začal téměř okamžitě. Lagová fáze byla menší jak 24 hodin. Po 60 dnech trvání tohoto testu bez přítomnosti nutričních prvků byl zaznamenán rozklad PVA z $24 \pm 4,008$ %. Vyššího rozkladu nebylo za danou dobu pravděpodobně dosaženo z možného důvodu slabého mikrobiálního oživení a kyselé povahy půdy. Mikrobiologický rozbor půdy na PVA degradující bakterie nebyl v rámci této práce proveden.

V další části provedených experimentů byla sledována závislost přítomnosti fosforečnanů na degradaci PVA. Bylo zjištěno, že nelze s jistotou říci, jestliže daná koncentrace fosforečnanů má vliv na degradaci PVA. Hodnoty BSK byly srovnatelné v případě srovnání se slepým pokusem.

Poslední část prováděných testů sledovala degradaci PVA za přítomnosti PQQ. Z výsledků lze říci, že docházelo s dobou testu spíše k mírnému inhibičnímu účinku. K degradaci PVA tedy nedocházelo.

Závěrem lze říci, že k degradaci PVA za přítomnosti PQQ a fosforečnanů nedocházelo.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kovačič L., Bína J.: *Plasty*, Alfa Bratislava, 1974
- [2] Zámorský Z.: *Nauka o polymerech II*. Ediční středisko VUT, Brno 1980, Vysoké učení technické v Brně, fakulta technologická
- [3] Rybníkář F.: *Makromolekulární chemie II.*, 1 vyd. Brno, Vysoké učení technické v Brně 1987
- [4] Rybníkář F.: *Makromolekulární chemie*, 1 vyd. Zlín: FT VUT, 2000
- [5] Ducháček V.: *Polymery- výroba, vlastnosti, zpracování, použití*, Praha 2006, ISBN- 80- 70- 80- 616- 6
- [6] Vanovčáková Z.: *Štúdium struktury a vlastnosti polyvinylalkoholu modifikovaného hydrolyzátem kolagenu*, diplomová práce 2001, Slovenská technická univerzita Katedra plastov a kaučuku
- [7] Pitter P., Chudoba J., *Biodegradability of organic substances in the aquatic environment*, CRC Press Boston, 1990
- [8] Honzík R.: *Plasty se zkrácenou životností a způsoby jejich degradace* [online]. dostupný z www: <<http://biom.cz/index.html?x=194542/>>
- [9] Tu Kim Dung, *Degradace polyvinylalkoholu (PVA) Fentonovou reakcí*, diplomová práce Zlín, 2009
- [10] Geryková Z.: *Aerobní rozklad PVA pomocí oxidací Fentonovou reakcí*, diplomová práce Zlín, 2010
- [11] Slejška A.: *Testování biodegradability*, Časopis Biom, 1997
- [12] Zíchová M.: *Možnosti odbourávání syntetických makromolekulárních látek se zaměřením na biodegradaci*, Brno 2008, dostupné z: http://www.vutbr.cz/www_base/zav_prace_soubor_verejne.php?file_id=796, bakalářská práce, VUT Brno
- [13] Dvořáková M.: *Sledování biologických rozkladných procesů směsných polymerů v půdním prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2004
- [14] Moravcová M.: *Rozložitelnost směsných polymerů v prostředí kompostu*, diplomová práce, Zlín 2007
- [15] Bernkopfová S.: *Stabilita biopolymery modifikovaných PVA blendů v anaerobním prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2007

- [16] Chromčáková J.: *Degradace směsí přírodních syntetických polymerů v aerobním prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2002
- [17] Váňa J.: *Kompostování odpadů*, Časopis Biom, 2003
- [18] Honsová S.: *Anaerobní rozklad PVA a jeho směsí s vybranými polysacharidy*, diplomová práce, Zlín, 2006
- [19] Hoffmann J., Řezníčková I., Růžička J.: *Technologie cvičení z ochrany prostředí*, část II: 1.vyd. Zlín, 2000
- [20] Kupec J.: *Zpracování odpadních vod a kalů*, UTB ve Zlíně, 2002
- [21] Kozáková J.: *Testy biorozkladu produktů zpracování bílkovinných odpadů*, diplomová práce, Zlín, 2001
- [22] Sedlář J.: *Analýza plyných produktů při biodegradaci plastů*, diplomová práce, Zlín, 2003
- [23] Nedbálek M.: *Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu*, diplomová práce, Zlín, 2008
- [24] Ošřádalová K.: *Význam minerálních solí při biodegradaci polyvinylalkoholu*, diplomová práce, Zlín, 2010
- [25] Václavková T.: *Studium mikroorganismů významných při rozkladu polyvinylalkoholu*, disertační práce, UTB Zlín, 2009
- [26] Coufalíková M.: *Symbiotická degradace polyvinylalkoholu*, diplomová práce, Zlín, 2006
- [27] Zeman P.: *Vliv přídatných látek na biodegradaci polyvinylalkoholu*, diplomová práce, Zlín, 2007
- [28] Pekařová S.: *Iniciace biologického rozkladu polyvinylalkoholu v půdním prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2012
- [29] Sedláček M. a kol.: *Metody rozborů kalů a pevných odpadů*, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, 1978
- [30] Zbírál J.: *Analýza půd I.*, Státní kontrolní a zkušební ústav zemědělský, Praha, 1995
- [31] Genčurová M.: *Biodeteriorácia PVC/ DOP/MMT nanokompozitov ve vodnom a pôdnom prostredí*, diplomová práce, Zlín, 2011

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

TOC	Celkový organický uhlík
PVA	Polyvinylalkohol
PQQ	Pyrolochinolinchinon
PVAc	Polyvinylacetát
PCL	Poly- ϵ - kaprolaktam
ČOV	Čistírna odpadních vod
pH_{KCl}	Půdní výměnná kapacita
BSK_s	Substrátová biochemická spotřeba kyslíku
TSK	Teoretická spotřeba kyslíku
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
AK	Aktivovaný kal
AAK	Adaptovaný aktivovaný kal
UIOŽP	Ústav inženýrství životního prostředí
t_{Lag}	Čas lágové fáze
t_{10}	Čas v 10 % maximálního stupně rozkladu
t_{90}	Čas v 90 % maximálního stupně rozkladu
t_{Roz}	Čas rozkladu

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Strukturní vzorec PVA [2].....	11
Obr. 2. Mechanismus výroby PVA z PVAc [3]	12
Obr. 3. Strukturní vzorec PQQ [24]	21
Obr. 4. Srovnávání průběhu biologického rozkladu PVA v půdě s živou a mrtvou bio masou adaptovaného aktivovaného kalu [28].	23
Obr. 5. Reakční nádoba respirometru BI-2000 [28]	27
Obr. 6. Elektrolytická cela respirometru BI-2000 [28].....	28
Obr. 7. Průběh celkového biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě.....	33
Obr. 8. Průběh celkového biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě.....	33
Obr. 9. Srovnání biologického rozkladu glukosy v obou typech půdy vyjádřený jako BSK/TSK (\pm směrodatná odchylka).....	34
Obr. 10. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA	36
Obr. 11. Průběh degradace PVA ve směsné půdě vyjádřený jako BSK/CHSK _{Cr} (\pm směrodatná odchylka).....	36
Obr. 12. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti fosforečnanů	38
Obr. 13. Kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti fosforečnanů (\pm směrodatná odchylka).....	38
Obr. 14. Celková kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti PQQ	40
Obr. 15. Kumulativní spotřeba kyslíku připadající na endogenní respiraci a biologický rozklad PVA za přítomnosti PQQ (\pm směrodatná odchylka).....	40

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Limitní hodnoty rozkladu glukózy	34
--	----