

Možnosti odstraňování polyvinylpyrrolidónu (PVP) biologickou cestou

Bc. Mária Vašková

Diplomová práce
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Mária VAŠKOVÁ**
Osobní číslo: **T090247**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Možnosti odstraňování polyvinylpyrrolidonu (PVP) biologickou cestou**

Zásady pro vypracování:

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

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vybrané databáze dostupné na síti UTB.

Primární prameny podle dispozic vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Jan Kupec, CSc.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

14. února 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

13. května 2011

Ve Zlíně dne 14. února 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, 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, 13.5.2011



.....

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 nevýdělečně 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 větší výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Polyvinylpyrrolidón (PVP) je široko využívaný polymér. Výsledný účinok PVP na životné prostredie je vzhľadom k jeho biologickej rezistencii neznámy. Diplomová práca sa venuje možnostiam biologického rozkladu PVP v aeróbných podmienkach (aktivovaný kal, pôda) bez predošlej predúpravy polyméru. Testovanie bolo zamerané na použite aktivovaného kalu s potenciálnou prítomnosťou kultúr produkujúcich špecifické enzýmy (laktamázy). Ďalej sa skúmala biodegradácia polyméru za prítomnosti kosubstrátu 1-methyl-2-pyrrolidónu, akrylamidu a N-acetylphenylalanínu. Vplyv odpadového mycélia z farmaceutickej výroby na priebeh degradácie bol tiež sledovaný.

Kľúčové slová: polyvinylpyrrolidón, biodegradácia, respirometer, biochemická spotreba kyslíka

ABSTRACT

Polyvinylpyrrolidone (PVP) is widely used polymer. The eventual impact of PVP on the environment is not known with regard to its bioresistance. The dissertation describes possibility of PVP biodegradation in aerobic conditions (activated sludge, soil) without pre-treatment of polymer. The testing focused on the use of activated sludge with possible occurrence of specific enzymes (lactamase). The polymer biodegradation was investigated with presence of 1-methyl-2-pyrrolidone, acrylamid and N-acetylphenylalanin cosubstrate. The influence of pharmaceutical scrap mycelium on degradation was studied too.

Keywords: polyvinylpyrrolidone, biodegradation, respirometer, biochemical oxygen demand

Pod'akovanie

Týmto by som chcela poďakovať vedúcemu svojej diplomovej práce Prof. Ing. Jánovi Kupcovi, CSc. za poskytnuté rady a odborné vedenie v priebehu tvorby práce. Ďakujem Ing. Markéte Julinovej, Ph.D za dohľad a cenné rady pri realizácii laboratórnych experimentov. Pod'akovanie patrí aj celému kolektívu a vedeniu Ústavu inžinierstva ochrany životného prostredia.

Vyhlasujem, že odovzdaná verzia diplomovej práce a verzia elektronická nahraná do IS/STAG sú totožné. Ďalej vyhlasujem, že som na celej diplomovej práci pracovala samostatne a použitú literatúru som citovala.

V Zlíne, 13.5.2011


.....

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČASŤ	11
1 POLYVINYLPIRROLIDÓN	12
1.1 CHARAKTERISTIKA PVP	12
1.2 VÝROBA PVP	13
1.3 TOXICITA PVP	15
1.4 POUŽITIE PVP	15
1.5 STANOVENIE PVP	17
2 N-METHYL-2-PYRROLIDÓN	18
2.1 TOXICITA NMP	18
2.2 DEGRADÁCIA NMP	19
3 DEGRADÁCIA POLYMÉROV	20
3.1 TERMICKÁ DEGRADÁCIA	20
3.2 FOTODEGRADÁCIA	21
3.3 BIODEGRADÁCIA	21
4 DEGRADÁCIA PVP	23
4.1 TERMICKÁ DEGRADÁCIA PVP	23
4.2 FOTODEGRADÁCIA PVP	24
4.3 BIODEGRADÁCIA PVP	26
5 ZHODNOTENIE LITERÁRNEJ REŠERŠE A CIEĽ PRÁCE	27
II PRAKTICKÁ ČASŤ	28
6 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	29
6.1 PRÍSTROJOVÉ VYBAVENIE, CHEMIKÁLIE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL A VZORKY	29
6.2 METÓDY STANOVENIA BIOLOGICKEJ ROZLOŽITELNOSTI PVP	33
6.2.1 Stanovenie biologickej rozložiteľnosti látok pomocou respirometra Micro-Oxymax	33
6.2.2 Zahn-Wellens test.....	35
6.3 OSTATNÉ STANOVENIA A ANALÝZY	36
7 VÝSLEDKY A DISKUSIA	38

7.1	ROZKLAD PVP MIKROORGANIZMAMI AKTIVOVANÉHO KALU	38
7.2	VPLYV NITRIFIKÁCIE A KONCENTRÁCIE PVP NA JEHO DEGRADÁCIU	44
7.3	ROZKLAD PVP MIKROORGANIZMAMI PÔDY	46
7.4	ZAHN–WELLENS TEST	52
ZÁVER		55
ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY		56
ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK.....		59
ZOZNAM OBRÁZKOV		61
ZOZNAM TABULIEK		63

ÚVOD

Hromadenie odpadov na skládkach, ako aj narastajúce problémy znečisťovania pôdy a vody, vedú k zvýšenému záujmu o degradabilitu polymérov. Uvedomovanie si problému kumulovania polymérneho odpadu a jeho účinku na environment podnecuje záujem najmä v oblasti jeho biologického rozkladu. Možnosť biodegradácie polymérov je potrebná najmä pre rozpustné alebo s vodou miešateľné polyméry, pretože tieto časom vstupujú do vodných tokov a v takejto forme nemôžu byť recyklované, spaľované ani inak zneškodnené [1].

Syntetický polymér polyvinylpyrrolidón (PVP) priťahuje pozornosť unikátnym komplexom fyzikálnych, chemických a biologických vlastností. Vďaka nim má širokú aplikáciu v rôznych oblastiach, najmä ako prídavná látka vo farmaceutike, kozmetike a potravinárstve. Hoci nepredstavuje toxickú záťaž, ako inertný syntetický polymér predstavuje riziko pre environment, v ktorom sa hromadí. Ide o antropogénny polutant, o ktorého vplyve na životné prostredie sa vie veľmi málo. Keďže ako rozpustný polymér je považovaný za potenciálne problematickú látku hlavne pre vodné prostredie, je obzvlášť dôležité určiť jeho cesty v podmienkach prírodného zvetrávania. Po použití PVP je nakladanie s týmto polymérom ako s odpadom podmienené jeho skupenstvom, keďže PVP môže skončiť ako súčasť tuhých odpadov, alebo ako zriedený vodný roztok [2], ktorý sa kanalizáciou dostane na ČOV. PVP je odolný voči väčšine čistiarenských procesov, a preto je dôležité skúmať rôzne mikrobiálne kultúry z hľadiska schopnosti jeho biodegradácie.

PVP ako rozpustný polymér s rôznou distribúciou molekulových hmotností predstavuje novú triedu analytu. Vzhľadom k jeho zlej biologickej odbúrateľnosti je nutné hľadať okrem možnosti jeho mikrobiálnej degradácie iné možné cesty jeho odstraňovania pomocou nákladnej predúpravy polyméru, prípadne využiť vhodné enzýmy či adaptované heterogénne technické kultúry obsahujúce tieto enzýmy.

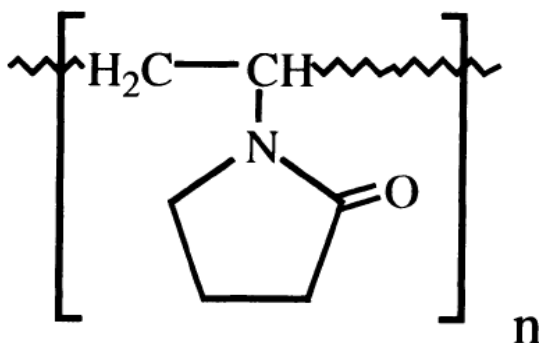
I. TEORETICKÁ ČASŤ

1 POLYVINYLPIRROLIDÓN

Polyvinylpyrrolidón nachádza vďaka svojim fyzikálnym, chemickým a biologickým vlastnostiam uplatnenie v rôznych technológiách. Pre svoju rezistenciu a nulovú toxicitu voči organizmu je využívaný hlavne v potravinárstve a farmácii.

1.1 Charakteristika PVP

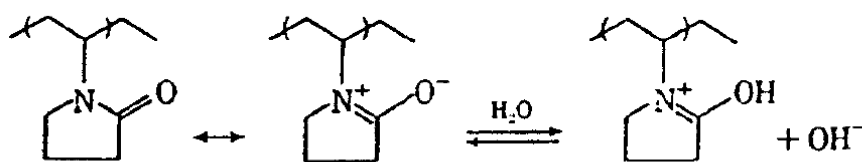
PVP patrí do triedy vo vode dobre rozpustných syntetických polymérov. Z chemického hľadiska je PVP polymérny laktám s vnútornou amidovou väzbou, patriaci medzi poly-N-vinylamidy. Všetky formy PVP sú biele alebo žltobiele prášky s rôznymi veľkosťami častíc. Rozličné komerčne vyrábané formy, ktoré majú využitie vo farmaceutike, kozmetike a potravinárstve, sú odlišené K-čísлом (napr. PVP K12, K17, K25 alebo K30). Takéto označenie prípravkov vyjadruje priemernú molekulovú hmotnosť vypočítanú z relatívnej viskozity. S rastúcou molekulovou hmotnosťou klesá rozpustnosť PVP, kým adhezívna sila, viskozita a často tiež schopnosť tvoriť komplexy rastie [3, 4].



Obr. 1: Štruktúra PVP [5]

Jedným z najdôležitejších znakov PVP je jeho univerzálna rozpustnosť, ktorá siaha od extrémne hydrofilných rozpúšťadiel po hydrofóbne tekutiny. PVP je s rozpúšťadlami (metylénchlorid, chloroform, ethanol, propylénglykol, polyethylénglykol a pod.) a s vodou miešateľný prakticky vo všetkých pomeroch, hoci nad určitú koncentráciu má získaný roztok vysokú viskozitu [3]. Keď je polymérna látka rozpustená v binárnej tekutej zmesi, obvyčajne jedna z kvapalných zložiek prednostne rozpúšťa polymér. Pre PVP rozpustený vo veľmi

polárnej binárnej zmesi voda-dimethylformamid bola zistená preferenčná adsorpcia vody naprieč celým jeho reťazcom [5].

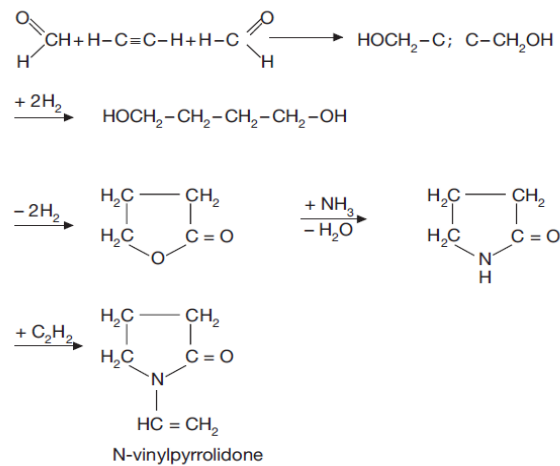


Obr. 2: Správanie sa PVP vo vodných roztokoch [5]

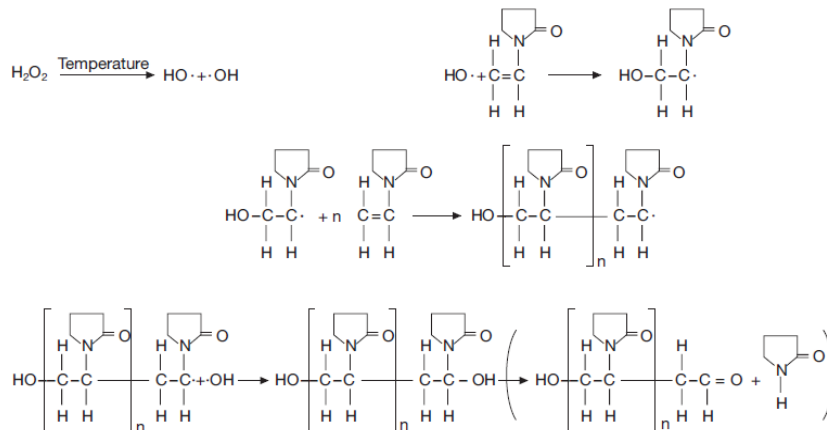
S ohľadom na štruktúru monomérskej jednotky (obr. 1) má PVP amfotérny charakter, pretože obsahuje vysoko polárnu amidovú skupinu (udáva hydrofilné a polárne vlastnosti) a tiež nepolárne metylénové skupiny v hlavnom reťazci a v kruhu (udávajú hydrofóbne vlastnosti) [3]. PVP je zaujímavý i z biologického hľadiska, pretože má štruktúrne znaky podobné proteínom. Je to biokompatibilný a hemokompatibilný polymér s veľmi nízkou toxicitou a je fyziologicky inaktívny [6].

1.2 Výroba PVP

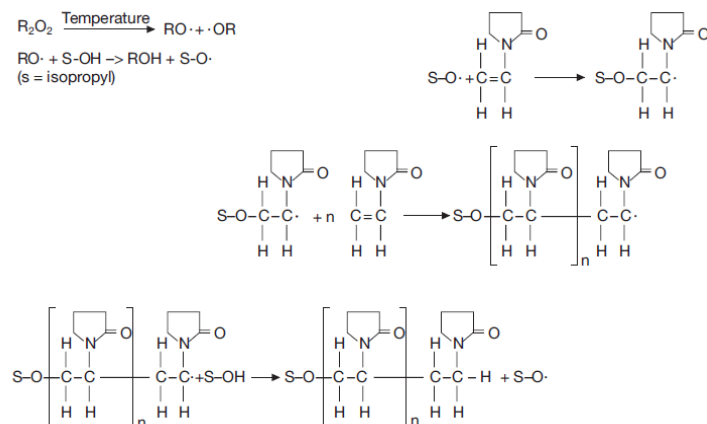
PVP sa vyrába z N-vinylpyrrolidónu, jedného z mnohých produktov Reppeho syntézy (obr. 4). Prvý polymerizačný produkt N-vinylpyrrolidónu bol rozpustný PVP, ktorý bol patentovaný v r. 1939. Obr. 5 a 6 ukazujú dva možné mechanizmy polymerizácie N-vinylpyrrolidónu: ide buď o polymerizáciu voľným radikálom vo vode s použitím iniciátora hydrogénperoxidu, alebo prebieha polymerizácia v 2-propanole (príp. inom organickom rozpúšťadle) s použitím organického peroxidu ako iniciátora. Mechanizmus terminácie polymerizačnej reakcie umožňuje produkovať rozpustný PVP takmer všetkých molekulových hmotností. Technológia polymerizácie v 2-propanole je dnes používaná na výrobu nízko-molekulárneho PVP [3].



Obr. 3: Reppeho syntéza N-vinylpyrrolidónu [3]



Obr. 4: Reakčný mechanizmus radikálovej polymerizácie N-vinylpyrrolidónu vo vode [3]



Obr. 5: Reakčný mechanizmus polymerizácie N-vinylpyrrolidónu v 2-propanole [3]

1.3 Toxicita PVP

Rozpustný PVP bol prvýkrát použitý počas II. svetovej vojny ako náhrada krvnej plazmy. Hoci má na tento účel vynikajúce vlastnosti, viac sa už nepoužíva. Keďže organizmus tento polymér nemetabolizuje, výsledkom je, že malé množstvá vysokomolekulárnych zložiek môžu po intravenóznom podávaní zotrvať v tele. Akútne, subchronická a chronická toxicita orálne podávaného PVP je extrémne nízka. Jediným pozorovaným účinkom je hnačka pri vysokých dávkach. Ojedinele bolo pozorované hromadenie PVP v mezenterických lymfatických uzlinách, čo ale nevykazovalo toxikologický význam. PVP nie je aktivátor ani dráždivá látka. Nie je známy jeho nepriaznivý účinok u ľudí nasledujúci po orálnom podaní ani po jeho intravenóznom použití ako expandra plazmy (dokonca ani po podaní vo veľmi vysokých dávkach). Jediný toxikologický problém je spojený s opakovaným vstrekaním veľkých dávok materiálu s vysokou molekulovou hmotnosťou pod kožu a do hrude [3]. Viaceré štúdie zaoberajúce sa vylučovaním a metabolizovaním PVP po intravenóznom podaní preukázali, že rýchlosť a rozsah jeho odstránenia cez obličky sú závislé na veľkosti molekúl [4].

V roku 1987 Svetová Zdravotnícka Organizácia stanovila hodnotu prijateľnej dennej dávky pre rozpustný polyvinylpyrrolidón (povidón) v jedle na $0-50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ telesnej váhy. V Európskej únii je rozpustný PVP s nominálnu K-hodnotou 25, 30 alebo 90 označený E-čísлом E 1201 pre použitie v potravinových doplnkoch, tabletách a v sladidlách [3].

Štúdia Fritza sa zaoberala meraním difúzneho koeficientu erytrocytov. Bunky boli suspendované vo fyziologických roztokoch s makromolekulami PVP K360 a bez nich. V prítomnosti PVP K360 bol nameraný nezvyčajne vysoký difúzny koeficient pre metabolizujúce bunky, čo naznačuje interakciu medzi bunkou a makromolekulou [7].

Cytotoxické dermálne testy (s použitím obkladov vyrobených z hydrogélu) ukazujú, že hydrogély obsahujúce PVP nemajú žiadny toxický efekt po priamom kontakte s kožou u albínov kráľika [8].

1.4 Použitie PVP

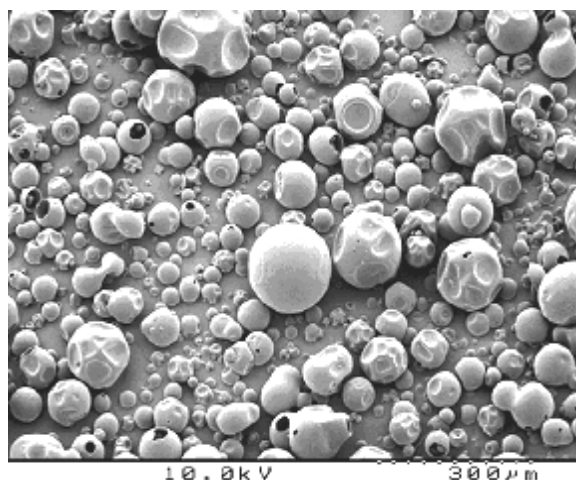
Dnes je rozpustný PVP (komerčne vyrábaný ako Kollidon, Polyvidon, Povidone, Plasdone atď.) jedným z najvšestrannejšie a rozsiahle používaných farmaceutických prídavných látok. Jeho schopnosť interakcie so zlúčeninami s vysokou a nízkou molekulovou hmotnos-

ťou (napr. anorganické anióny, organické zlúčeniny, aminokyseliny, povrchovo aktívne látky, polyméry, proteíny a farmakologicky aktívne látky) vo vodných roztokoch je obzvlášť významá pri vývoji lekárskeho prípravkov (napr. na vylepšenie rozpustnosti a transportných vlastností liekov).

PVP je tiež využívaný vo výrobe jedného z najdôležitejších dezinfekčných prostriedkov, PVP-iodínu [4], tiež vo výrobe tabliet (poťah ich povrchu), orálnych roztokov, sirupov (ako zahusťovadlo), kvapiek a injekčných roztokov [3]. Potenciálne využitie v lekárskej oblasti má aj ako materiál na potiahnutie medicínskych nástrojov určených na implantovanie do ľudského tela [2]. V biomedicíne majú aplikáciu hlavne hydrogély (ide o trojdimenzionálne polymérne siete, schopné absorbovať alebo zadržať vodu, prípadne iné biologické kvapaliny, v množstve až tisíc-násobku ich suchej váhy). Ďalej sa používajú ako oftalmologické nástroje, konštrukcie pre tkanivové inžinierstvo, biosenzory alebo biomembrány [6].

Zaujímavé je použitie PVP ako kryoprotektívneho činidla počas zmrazovania buniek lymfocytov, erytrocytov, či buniek kostnej drene myší pre laboratórne účely. Testovanie na tento účel prebehlo aj na kmeňových bunkách dospelých ľudí [9].

PVP je tiež vhodný pre rôzne technologické aplikácie. Jeho kvality sú využívané v aerosólových sprejoch na vlasy, adhezívach, litografických roztokoch, detergenčných prostriedkoch, kozmetických preparátoch atď [7].



Obr. 6: Typická štruktúra častíc sprejovo sušeného povidónu [3]

Špeciálnou vlastnosťou PVP je schopnosť tvoriť komplexy s veľkým počtom látok. Vytvorené komplexy sú takmer vždy rozpustné a sú stabilné iba v kyslom prostredí. Komplexáciou s PVP môže byť dosiahnutá redukcia toxicity určitých liekov (napr. oxytetracyklín, iodín, oxymetazolín). Dráždivý alebo toxický účinok môže byť tiež redukovaný aj u iných látok, napr. pre kyanidy, nikotín, formaldehyd, formamid a iné toxíny, s ktorými PVP tvorí komplexy adekvátnej stability. Špeciálnym využitím komplexácie je stabilizácia proteínov a enzýmov v diagnostike [3].

1.5 Stanovenie PVP

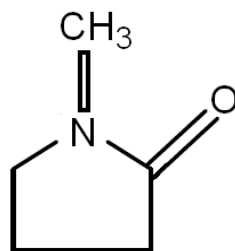
Najvýznamnejšie a najjednoduchšie prostriedky identifikácie pre kvalitatívnu analýzu sú poskytované infračerveným spektrom.

Metódou kvantitatívneho stanovenia PVP popísanou v literatúre je napr. fotometria PVP-iodínového komplexu, zatiaľ čo svetelné rozptyľovanie, sedimentácia a gel-permeatívna chromatografia (GPC) sú obyčajne aplikované na určenie molekulovej hmotnosti. Selektívna metóda na kvantitatívne stanovenie, dokonca aj v stopových množstvách, využíva pyrolytickú plynovú chromatografiu.

Pretože všetky tieto spôsoby nie sú aplikovateľné na detekciu PVP v nízkych hmotnostných koncentráciách a v komplexnom environmentálnom prostredí (napr. v odpadovej vode alebo odpadových kaloch), na výskumy a monitorovanie environmentálnych vzoriek sa berie do úvahy použitie MAL-DI-TOF-MS analýzy (Matrix Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) [3, 4].

2 N-METHYL-2-PYRROLIDÓN

N-methyl-2-pyrrolidón je tiež zámy ako NMP, 1-methyl-2-pyrrolidón, N-methyl-pyrrolidón a 1-methyl-2-pyrrolidinón. Je to obdoba PVP s nízkou molekulovou hmotnosťou používaná ako náhrada vinylpyrrolidónu pri výrobe PVP. N-methyl-2-pyrrolidón je hygroskopická bezfarebná kvapalina s miernym amínovým zápachom. Je to bázická a polárna zlúčenina vysokej stability. Iba pomaly oxiduje vzduchom a ľahko sa čistí frakčnou destiláciou. Je vysoko rozpustný v nižších alkoholoch, nižších ketónoch, éteri, ethylacetáte, chloroforme a benzéne, a stredne rozpustný v alifatických uhľovodíkoch. N-methylpyrrolidón je heterocyklický ketón. Je to organické rozpúšťadlo prírodných (vosky a živice) aj syntetických polymérov (polystyrén, polyestery, polyvinylchlorid a pod.) a je vinikajúco miešateľný s vodou a organickými rozpúšťadlami. Používa sa v rozličných priemyselných oblastiach [10 - 12].



Obr. 7: Chemická štruktúra NMP [12]

2.1 Toxicita NMP

V porovnaní s ostatnými používanými rozpúšťadlami je NMP považovaný za toxikologickejšie a environmentálne vhodnejšie. Avšak nedávne zistenia naznačujú, že NMP je toxický pre vodné organizmy *Daphnia magna*. NMP je považovaný za teratogénny pre potkany po orálnom podaní (nie po inhalácii) [10]. Experimenty na zvieratách preukázali rozvíjajúcu sa toxicitu pri podávaní vo vysokých dávkach. Z hľadiska účinku na človeka je NMP mierne dráždivá látka pre oči, membrány slizníc a pokožku. Relatívne krátka a plošne limitovaná expozícia pokožky voči neriedenému roztoku NMP pravdepodobne vedie k jeho značnému vstrebávaniu. Dávka absorbovaná pokožkou bola vypočítaná na $5,5 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, z čoho je približne 0,5 % močom vylučované v metabolicky nezmenenom stave (testy na dobrovoľníkoch) [11].

Dostupné údaje krátkodobých ekotoxikologických testov na vodných (ryby, kôrovce, riasy a baktérie) a suchozemských druhoch (vtáky) naznačujú nízku akútnu toxicitu NMP. Na základe biodegradability zlúčeniny, indikovanej nízkej akútnej toxicity a faktu, že sa neakumuluje v živých organizmoch, nie je NMP považovaný za existujúce riziko pre životné prostredie [12].

2.2 Degradácia NMP

Nie sú známe prírodné zdroje NMP. NMP nie je degradovateľný chemickou hydrolyzou (je vysoko stabilná zlúčenina), ale je ľahko biodegradovateľný za aeróbnych podmienok. Nie je predpoklad, že by sa kumuloval v živých organizmoch. Metabolitmi NMP sú 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidón, N-methylsukcínimid a 2-hydroxy-N-methylsukcínimid [12]. Porovnanie s 2-pyrrolidónom naznačuje, že NMP je mierne odolnejší voči aeróbnej biodegradácii ako táto jeho analogická zlúčenina.

Niektoré bakteriálne druhy sú schopné využívať NMP ako jediný zdroj dusíka a uhlíka. V štúdiu od autorov Ocegüera-Cervantes a kol. sa zistilo, že organizmy *Alicicliphilus* sp. konzumovali NMP počas rannej fázy rastu. Iné druhy ako napr. *Pseudomonas aeruginosa*, hoci dokážu využívať zlúčeniny príbuzné N-methylpyrrolidónu (napr. 2-pyrrolidón), nie sú schopné využívať samotný NMP [10].

Pre účinné odstraňovanie NMP z odpadovej vody sú za sľubné považované na ozóne založené oxidačné procesy. Wu a kol. [13] sa zaoberali skúmaním rozkladu N-methyl-2-pyrrolidónu využitím konvenčnej ozonizácie (O_3), ozonizácie v kombinácii s UV svetlom (UV/O_3), s hydrogénperoxidom (O_3/H_2O_2) a UV/H_2O_2 metódy. Všetky metódy rozkladu NMP založené na ozóne sú účinné v alkalickom prostredí, kým UV/H_2O_2 proces je účinný v kyslom prostredí.

K odlišnému výsledku sa dopracovali autori Den, Ko a Huang v štúdiu [14], ktorá hodnotila 1-methyl-2-pyrrolidón, spolu s ďalšími piatimi organickými rozpúšťadlami, z hľadiska vplyvu oxidácie na následnú biodegradáciu. Pôsobením nízkych dávok UV/H_2O_2 došlo k rozloženiu chemikálií na menšie fragmenty, ktoré by mohli byť účinne mineralizované aeróbnou biodegradáciou. Vynikajúca redukčná účinnosť (>95%) v TOC a v koncentrácii bola dosiahnutá pre všetky rozpúšťadlá okrem NMP, ktorého stabilná kruhová štruktúra bola odolná aj voči nízkym dávkam UV/H_2O_2 aj voči biodegradácii.

3 DEGRADÁCIA POLYMÉROV

Degradácia znamená fyzikálnu alebo chemickú zmenu v polymére ako výsledok environmentálnych faktorov (svetlo, teplo, vlhkosť, chemické podmienky alebo biologická aktivita). Procesy zahŕňajúce zmeny vo vlastnostiach polyméru (deteriorácia funkcionality) v dôsledku chemických, fyzikálnych alebo biologických reakcií vedúcich k štiepeniu väzby a následným chemickým premenám, sú kategorizované ako polymérna degradácia. Degradácia sa odzrkadľuje v zmenách materiálových vlastností (mechanické, optické alebo elektrické charakteristiky), v praskaní, pukaní, erózii, zmene farby, fázovej separácii alebo delaminácii. Zmeny zahŕňajú štiepenie väzieb, chemickú transformáciu a tvorbu nových funkčných skupín. Degradácia je buď fotodegradácia, termodegradácia alebo biologická degradácia [1].

Pri degradácii treba oddeliť úlohu termickej oxidácie, hydrolýzy a biologickej aktivity. V prostredí kompostu sú možné všetky cesty degradácie polyméru. Bez ohľadu na iniciačný krok degradácie sa pravdepodobne tvoria menšie fragmenty molekúl, ktoré ľahšie podliehajú biologickej aktivite a teda vedú k účinnejšej biodegradácii polyméru [15].

3.1 Termická degradácia

Termická degradácia polymérov je charakterizovaná ako molekulová deteriorácia v dôsledku prehrievania. Pri vysokých teplotách sa môžu zložky dlhého hlavného reťazca polyméru začať oddeľovať (molekulové štiepenie) a reagovať s inými, čím sa zmenia vlastnosti polyméru. Termická degradácia sa všeobecne týka zmien molekulovej hmotnosti a distribúcie molekulových hmotností polyméru aj zmien žiaducich vlastností typických pre polymér [1].

Termooxidácia je zložitý autooxidačný a autoakcelerujúci reťazový proces, ktorý prebieha aj bez prítomnosti svetla (všeobecne žiarenia), ale takmer neprebieha v neprítomnosti kyslíka. V autooxidačnej schéme vzniká iniciačnou reakciou polymérny radikál, a to homolytickým rozštiepením väzby C-H pôsobením tepla, prípadne v kombinácii s mechanickým namáhaním. V propagačnom kroku reaguje radikál s kyslíkom a vzniknutý radikál odtrháva ďalší vodík. Mechanizmus sa uzatvára vznikom nereaktívneho produktu v terminačnej reakcii [16].

3.2 Fotodegradácia

Citlivosť polymérov na fotodegradáciu je spojená so schopnosťou absorbovať škodlivú časť troposférickej slnečnej radiácie. To zahŕňa UV-B terestrické žiarenie (~295-315 nm) a UV-A žiarenie (~315-400 nm) zodpovedné za priamu fotodegradáciu (fotolýza, iniciovaná fotooxidácia). Viditeľná časť slnečného svetla (400-760 nm) urýchľuje polymérnu degradáciu teplom. Infračervené žiarenie (760-2500 nm) urýchľuje termálnu oxidáciu. Väčšina plastov má tendenciu absorbovať vysoko-energetické žiarenie v ultrafialovej oblasti spektra, čo aktivuje ich elektróny na vyššiu reaktivitu a spôsobuje oxidáciu alebo inú degradáciu. Oxo-biodegradačný proces využíva dve metódy na spustenie biodegradácie: fotodegradácia (UV) a oxidácia. UV degradácia využíva UV svetlo na degradovanie konečného produktu. Oxidačný proces využíva čas a teplo na rozklad plastu. Obe metódy redukujú molekulovú hmotnosť plastu a umožňujú jeho biorozklad [1].

3.3 Biodegradácia

Treba odlíšiť biodegradáciu od degradácie. Degradáčne fázy sa zastavujú na fragmentácii polymérov. To sa odohráva účinkom tepla, vlhkosti, slnečných lúčov alebo enzýmov, ktoré skracujú a zoslabujú polymérne reťazce, čo vedie k fragmentácii zvyškov, priečnemu viazaniu a tvorbe nepoddajnejších perzistentných zvyškov. Iba ak sú fragmenty konzumované mikroorganizmami ako zdroj potravy a energie, považujeme polymér za biodegradovateľný [17].

Biodegradácia je proces, ktorým sú organické látky rozkladané živými organizmami. Organický materiál môže byť rozkladaný aeróbne (kyslíkom) alebo anaeróbne (bez kyslíka). Niektoré plasty sú aeróbne biodegradované vo voľnej prírode, anaeróbne v sedimentoch a podzemných skládkach odpadu a súčasne čiastočne aeróbne a čiastočne anaeróbne v kompostoch a v pôde. S biodegradáciou súvisí pojem biomineralizácia, ktorou je organická hmota premenená na minerálne zlúčeniny. CO₂ a voda sú produkované počas aeróbnej biodegradácie; CO₂ spolu s vodou a metánom sa tvoria počas anaeróbnej biodegradácie. Všeobecne mineralizácia polymérov vyžaduje niekoľko odlišných organizmov. Jedny rozkladajú polymér na jeho konštitučné monoméry, jedny sú schopné využiť monoméry a ako produkty vylučujú jednoduchšie odpadné zlúčeniny a jedny by mali byť schopné využívať tento vylučovaný odpad. Biodegradácia teda spočíva na urýchlenom rozklade heterogénnej

organické hmoty ako následok sérií metabolických interakcií medzi rôznymi skupinami mikroorganizmov zmiešanej populácie. Mikroorganizmy (baktérie a huby) sa zúčastňujú degradácie prírodných aj syntetických plastov. Výťažok biodegradácie plastov je určovaný rôznymi faktormi (charakteristiky polyméru, pôdne podmienky, typ organizmu a podstata procesov) [1, 17].

Počas degradácie je polymér najprv prevedený na jeho monoméry, potom sú tieto monoméry mineralizované. Väčšina polymérnych molekúl je príliš veľká, aby prešli cez bunkové membrány mikroorganizmov; preto musia byť najprv depolymerované na menšie monoméry predtým, ako môžu byť absorbované a biodegradované vnútri mikrobiálnych buniek. Rozpad polyméru môže byť iniciovaný rozličnými fyzikálnymi silami (zahrievanie, zmrazovanie, ich kombinácia atď.) a biologickou cestou (pôsobenie mikrobiálnych enzýmov). Najvýznamnejšou iniciačnou reakciou environmentálnej degradácie syntetických polymérov je abiotická hydrolýza [1].

Všeobecne vedie nárast molekulovej hmotnosti k poklesu degradability polyméru mikroorganizmami. Vysoké molekulové hmotnosti vedú k výraznému poklesu v rozpustnosti, čo je nepriaznivé pre mikrobiálny atak, pretože baktérie vyžadujú asimilovaný substrát na prenos cez bunkovú membránu, aby mohli byť degradované bunkovými enzýmami. Najmenej dve kategórie enzýmov sa aktívne zúčastňujú biologickej degradácie polymérov: extracelulárne a intracelulárne depolymerázy. Exoenzými počas degradácie lámu komplexné polyméry a získavajú sa tak menšie molekuly (oligoméry, diméry, monoméry) schopné prechodu polopriepustnými vonkajšími bakteriálnymi membránami a potom sú využité ako zdroje uhlíka a energie. Treba podotknúť, že biodeteriorácia a degradácia polymérneho substrátu môže zriedka dosiahnuť 100 %. Dôvodom je, že malá časť polyméru sa začlení do mikrobiálnej biomasy, humusu a iných prírodných produktov [1].

4 DEGRADÁCIA PVP

Pri zle biodegradovateľných látkach, ako je PVP, je vhodné pre umožnenie degradácie ich rozloženie na menšie fragmenty, ktoré by mohli byť účinne mineralizované aeróbnou biodegradáciou. Na spustenie biodegradácie možno využiť mechanizmy založené na chemickej oxidácii ozónom, peroxidom vodíka, UV žiarením, fotokatalýzou, elektrochemickou oxidáciou či Fentonovou reakciou. Tieto metódy redukujú molekulovú hmotnosť polyméru a produkty týchto reakcií môžu byť potom ľahko biodegradované mikroorganizmami.

4.1 Termická degradácia PVP

Zistilo sa, že vinylpyrrolidón je hlavný nestabilný produkt termickej degradácie PVP. To znamená, že prevládajúci mechanizmus termickej degradácie PVP je depolymerizácia na monomér hlavného polymérneho reťazca. Avšak je evidentné, že súčasne prebiehajú reakcie, ktoré sa môžu zúčastňovať tvorby oligomérov. Termická degradácia čistého PVP je iniciovaná nízkou aktivačnou energiou ($\sim 70 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Nasledujúci proces je nezávislý na molekulovej hmotnosti PVP. Efektívna degradácia nastáva v teplotnom rozsahu 350-500 °C náhodným štiepením reťazca. Na tejto úrovni je percento straty hmoty pre PVP 77 % [18].

Pri depolymerizácii PVP pri vysokých teplotách sú základnými produktami termickej degradácie N-vinylpyrrolidón, pyrrolidón, pyrrolidónový radikál (tvorený lámaním C-N väzieb), fragment pyrrolidónového kruhu a aldehyd. Degradáčny proces PVP sa odohráva v úseku 400-485 °C a vedie k tvorbe esterov ako následok štiepenia väzieb N-C-O a vyvíjaniu NH_3 . Tvorba NH_3 závisí na prítomnosti NH_2 skupín, ktoré sú pravdepodobne tvorené protonáciou N atómu v PVP štruktúre. Protonácia závisí v prvom rade na štiepení N-C väzby [18].

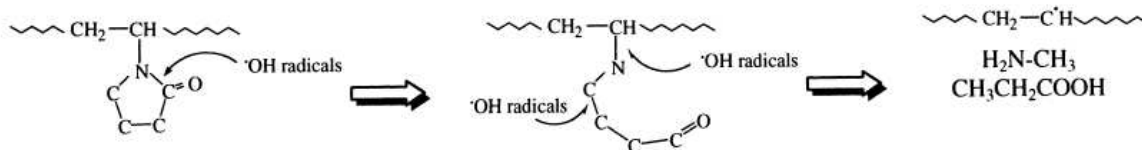
Mechanizmus nízkoteplotnej degradácie pri $t = 75\text{-}300 \text{ }^\circ\text{C}$ je sprevádzaný produkciou pyrrolidónu (jeho tvorba nie je spojená s hydrolyzou monoméru, ale je produktom základného mechanizmu termickej degradácie PVP). Slabé kyseliny a zásady nespôsobujú v reťazci PVP otváranie pyrrolidónového kruhu ako to je u jeho analógu NMP. Iba dlhý var s niektorými hydrolytickými kyselinami alebo zásadami (viac ako 10 hodín) vedie k čiastočnému rozkladu PVP s tvorbou jednotiek N-vinyl- γ -amino-maslovej kyseliny. Hydrolyza na 80-90

% môže byť uskutočňovaná len za prísnych podmienok (napr. v tavenine zmesi KOH - NaOH pri 280 °C) [18].

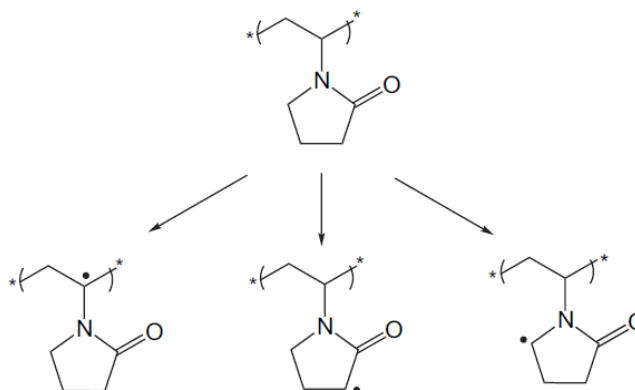
4.2 Fotodegradácia PVP

PVP je na fotooxidáciu veľmi citlivý. Rýchlosť oxidácie a stechiometria reakcií sú silne ovplyvnené fyzikálnym stavom polyméru. Degradáčny mechanizmy PVP v tuhom stave a vo vodnom roztoku sú značne odlišné. Na základe výsledkov fotooxidácie PVP v tuhom stave aj vo vodnom prostredí pri dlhých vlnových dĺžkach ($\lambda \geq 300$ nm) a v prítomnosti kyslíka (v podmienkach prirodzeného vonkajšieho starnutia) môže byť opísaný všeobecný mechanizmus, ktorý vysvetľuje hlavné cesty oxidácie. Hlavný rozdiel medzi fotoproduktmi tvorenými v tuhom stave a vo vodnom roztoku sa týka pomeru nenasýtených produktov a cyklických imidov. UV-svetlom indukovaná fotooxidácia PVP môže byť opísaná ako sled reakcií, ktoré začínajú radikálovým atakom na uhlíkatý atóm v α -pozícii dusíkatého atómu, pričom môžu byť tvorené dva odlišné alkoxyradikály: sekundárny a terciárny radikál. Cesty oxidácie vyžadujúce terciárny alkoxy radikál vedú k štiepeniu makromolekulového reťazca, kým cesty vyžadujúce sekundárny alkoxy radikál spôsobujú iba štiepenie väzieb v pyrrolidónovom kruhu a nie v makromolekulom reťazci [2].

Mechanizmus foto-oxidácie vo vode rozpustného PVP, ktorý má zavesený 5-členný laktámový kruh, je komplikovaný a relatívne pomalý. Ožarovanie s UV vedie k fragmentácii PVP a významnému poklesu v distribúcii molekulovej hmotnosti. Atakovanie PVP radikálmi $\cdot\text{OH}$ (alebo $\cdot\text{OOH}$) zahŕňa štiepenie jednoduchej väzby vo funkčnej skupine N-C=O v hlavnom reťazci PVP a otváranie laktámového kruhu v PVP štruktúre. Nasleduje ďalšie atakovanie $\cdot\text{OH}$ radikálom na úplnú zmenu zvyšných skupín laktámového kruhu v štruktúre PVP. Najdôležitejší krok mechanizmu je foto-oxidačný zlom bočného laktámového kruhu. Otváranie laktámového kruhu je sprevádzané tvorbou primárneho amínu a kyseliny propiónovej. Následná tvorba NH_4^+ a NO_3^- iónov, a konverzia kyseliny propiónovej na kyseliny octovú a mravčiu a následne na plyn CO_2 (fotomineralizácia), je konečným krokom foto-oxidačnej reakcie [19].



Obr. 8: Otváranie laktámového kruhu pri fotooxidácii PVP [19]



Obr. 9: Tri možné pozície makroradikálu vzniknutého reakciou hydroxyl radikálu s PVP [8]

Priebeh degradácie PVP pomocou UV môže byť vylepšený použitím ultrazvuku. Vystavenie PVP ultrazvuku vedie k produkcii kavitačných bublín. Vysoký šmykový stres spojený s kolapsom týchto bublín mechanicky pretrhne väzby, prednostne v centre reťazca. Fotokatalytická degradácia získava abstrakciou vodíkového atómu z molekuly radikál produkovaný z katalyzátora, čoho výsledkom je formácia makroradikálu. Tieto radikály reagujú s kyslíkom, tvoria iné radikály, ktoré náhodným štiepením reťazec degradujú na menšie reťazce a iné malé molekuly [20]. Ultrazvuková metóda je veľmi výhodná na depolymerizovanie makromolekúl, pretože jednoducho redukuje ich molekulovú hmotnosť štiepením najlabilnejších chemických väzieb bez toho, aby dochádzalo k zmenám v chemickej povahe polyméru. Rýchlosť ultrazvukovej degradácie rastie s rastúcou molekulovou hmotnosťou a klesá s rastúcou koncentráciou. Experimentálne výsledky ukazujú, že viskozita polyméru sa znižuje s časom ožarovania ultrazvukom až k limitnej hodnote, pod ktorou sa neuskutočňuje žiadna ďalšia degradácia [21, 22].

4.3 Biodegradácia PVP

Dosiaľ uskutočnené degradačné experimenty úplne nevylučujú biodegradáciu PVP. Výsledky slabej biodegradability PVP vzoriek nemusia znamenať že s inou vzorkou a za iných podmienok nemôže byť dosiahnutá vyššia miera degradácie. Skúmanie biodegradability a adsorpčného správania sa PVP dovoľuje predpokladať, že tento polymér je odstraňovaný z rozpustenej fázy odpadovej vody adsorpciou na kal vďaka jeho neobyčajnej komplexačnej vlastnosti [4].

Zložky priemyselných odpadových vôd spôsobujúce prevádzkové problémy počas biologického ošetrovania majú po preoxidácii UV svetlom a hydrogénperoxidom (UV/H₂O₂) vhodnejšie podmienky pre biodegradáciu. Preoxidácia odpadovej vody zvyšuje celkovú biodegradabilitu PVP. Vhodné intenzity UV a koncentrácie hydrogénperoxidu môžu zaistiť optimálne podmienky pre kompletnú depolimerizáciu PVP v syntetickej odpadovej vode v prítomnosti hydroxylových radikálov [23].

Na základe odolnosti voči biodegradácii je treba PVP pred biologickým rozkladom predupraviť narušením laktámového kruhu. Ide o γ -laktám podliehajúci ataku γ -laktamázy. Enzýmom γ -laktamázu by teda bolo možné iniciovať biorozklad PVP. Medzi mikrobiálne druhy produkujúce enzým γ -laktamázu patria napr. *Sulfolobus solfataricus* MT4 produkujúci (+)- γ -laktamázu [24], *Sulfolobus solfataricus* P2 [25], *Pseudomonas fluorescens* [26]. Enzým (-)- γ -laktamázu produkujú druhy *Aureobacterium* [27].

Testovanie biodegradability za aeróbnych podmienok bolo uskutočnené aj za použitia odpadového mycélia z výroby antibiotík, kde je predpoklad výskytu plesní *Penicillium* [28]. Biodegradácia PVP v kombinácii so škrobom za prítomnosti *Penicillium Digatatum* bola študovaná v práci Al-Badera. Škrob bol najprv konzumovaný organizmami *Penicillium Digatatum* spolu s kryštalickými časticami PVP. PVP degradácia bola však limitovaná [29].

5 ZHODNOTENIE LITERÁRNEJ REŠERŠE A CIEĽ PRÁCE

Zhrnutím poznatkov z literárnych zdrojov možno PVP charakterizovať ako biologicky nerozložiteľný. Aj keď sa PVP javí ako biologicky rezistentný, dosiaľ uskutočnené experimenty jeho biodegradáciu úplne nevylučujú a poukazujú na význam experimentálnych podmienok a použitých mikrobiálnych kultúr.

V predchádzajúcej práci [28] bolo za reálnu možnosť aeróbnej degradácie označené podrobenie PVP bávickej hydrolýze. Náznaky biologického rozkladu vykazovalo aj použitie aeróbného aktivovaného kalu z ČOV spracovávajúcej odpadovú vodu vznikajúcu pri výrobe penicilínu. Tento proces degradácie môže byť podporený v kombinácii s odpadovým mycéliom. Tieto postupy si z dôvodu doterajšieho slabého preskúmania vyžadujú realizáciu ďalších experimentov.

Cieľom tejto práce je sledovanie biodegradácie PVP v aeróbnom prostredí aktivovaného kalu so zameraním na potvrdenie možnej cesty biodegradácie naznačenej v diplomovej práci Bc. Lenky Červenákovéj. Pokusy budú uskutočňované s rôznymi kosubstrátmi. Pre testovanie biologickej degradácie budú tiež použité mikroorganizmy z pôdneho výluhu.

II. PRAKTICKÁ ČASŤ

6 EXPERIMENTÁLNÁ ČASŤ

6.1 Prístrojové vybavenie, chemikálie, biologický materiál a vzorky

Prístrojové vybavenie

Analyzátor organicky viazaného uhlíka Shimadzu TOC-5000 A, Rakúsko

Laboratórna chladená centrifuga JOUAN MR23i

Laboratórne váhy Sartorius, Nemecko

Laboratórny pH/mV/ION meter 735, InoLab WTW

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

Sušiareň Memmert, model 100, SRN

Bežné laboratórne vybavenie a pomôcky

Použité chemikálie

Použité chemikálie boli čistoty p.a. a pochádzali od firmy Lachema a.s., ČR, Penta a Sigma–Aldrich s.r.o.

MgSO_4	síran horečnatý
CaCl_2	chlorid vápenatý
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu železitého
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	síran amónny
KH_2PO_4	dihydrogénfosforečnan draselný
K_2HPO_4	hydrogénfosforečnan draselný
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	dodekahydrát hydrogénfosforečnanu sodného
H_3BO_3	kyselina boritá
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinočnatého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu mangánatého

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu meďnatého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdénanu amónneho
PVP K15	polyvinylpyrrolidón ($M_r \approx 10\,000$)
$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$	1-methyl-2-pyrrolidón
$\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	akrylamid
$\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	N-acetyl-L-phenylalanín
$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$	N-allylthiomočovina
$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	glukóza
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát hydrogénfosforečnanu sodného
NH_4Cl	chlorid amónny
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu horečnatého
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	dihydrát chloridu vápenatého

Biologický materiál

Pre testovanie biologickej degradácie za aeróbných podmienok bol ako inokulum použitý aeróbný kal z čistiarne mestských odpadových vôd Zlín-Malenovice a aeróbný kal zo spoločnosti ČOV a.s., Slovenská Lupča, ktorá čistí odpadové vody aj pre spoločnosť Biotika a.s. (výroba liečiv, vrátane penicilínu). Po dovezení z ČOV bol aktivovaný kal zbavený hrubých nečistôt prefiltrovaním cez sito, trikrát dekantovaný pitnou vodou a 24 hodín prevzdušňovaný vo fermentore. Na samotné pokusy bolo odoberané požadované množstvo kalu, ktoré bolo zcentrifugované pri 3000 ot.min^{-1} po dobu 10 minút. Supernatant sa odlial a biomasa bola resuspendovaná v pripravenom minerálnom médiu, čím sa dosiahla požadovaná koncentrácia sušiny kalu.

Ako inokulum bola použitá aj biologicky aktívna pôda drevného charakteru (lokalita Prlov). Pôda bola pred vlastnými testami zbavená hrubých nečistôt, prípadne tvrdej horniny a prítomných živých organizmov a preosiata cez sito. Vlhkosť pôdy bola cca 66,7 % a hodnota $\text{pH}_{\text{KCl}} = 7,030$. Percentuálne zastúpenie prvkov stanovené elementárnou analýzou

zodpovedalo $C = 26,37 \pm 1,07 \%$; $H = 3,21 \pm 0,16 \%$; $N = 2,27 \pm 0,09 \%$; $S = 0,37 \pm 0,05 \%$ [30].

Z pôdy bolo následne na ďalšie pokusy pripravené pôdne inokulum. Inokulum bolo získané 30-minútovým trepaním množstva pôdy, zodpovedajúceho 100 g sušiny, v 1000 ml minerálneho média. Takto pripravená suspenzia sa nechala 30 minút usadiť a supernatant (pôdne inokulum) sa zliat [31].

Ďalej bolo v experimentoch okrem aktivovaného kalu a pôdy ako podporná degradačná kultúra použité odpadové mycélium z výroby antibiotík (Biotika a.s.). Mycélium obsahuje odpadovú biomasu produkčného kmeňa *Penicillium chrysogenum*, zvyšky živnej pôdy a zvyšky vyprodukovaného penicilínu. Elementárnou analýzou bolo stanovené zloženie zobrazené v tab. 1 (priemerné hodnoty \pm smerodajná odchýlka). Sušina dovezeného mycélia bola stanovená na 21,86 % a hodnota $CHSK_{Cr} = 1023 \text{ mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$.

Tab. 1: Percentuálne zastúpenie prvkov v mycéliu stanovené elementárnou analýzou

Prvok	Obsah [%]	SD
C	42,45	0,34
H	6,899	0,05
N	7,879	0,05
S	0,719	0,04

Minerálne médium

A) Minerálne médium pre aeróbny aktivovaný kal

Na prípravu 1 l minerálneho média pre aeróbny kal boli do 24 hodín prevzdušňovanej destilovanej vody dávkované nasledovné roztoky (pripravené rozpustením uvedeného množstva chemikálií v 1 l destilovanej vody):

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 ml ($22,5 \text{ g l}^{-1}$)
CaCl_2	1 ml ($27,5 \text{ g l}^{-1}$)
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1 ml ($0,25 \text{ g l}^{-1}$)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	5 ml (10 g l^{-1})

Fosfátový pufo	20 ml: KH_2PO_4 (8,2 g l ⁻¹)
	K_2HPO_4 (21,8 g l ⁻¹)
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (44,7 g l ⁻¹)
Stopové prvky	1 ml: H_3BO_3 (0,75 g l ⁻¹)
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (3 g l ⁻¹)
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1 g l ⁻¹)
	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 g l ⁻¹)
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g l ⁻¹)
	$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,1813 g l ⁻¹)
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,05 g l ⁻¹)

B) Minerálne médium pre pôdne inokulum

1 l minerálneho média pre pôdne inokulum sa obdobne pripravilo dávkovaním zo zásobných roztokov A-D (pripravené rozpustením uvedeného množstva chemikálií v 1 l destilovanej vody) do 24 hodín prevzdušňovanej destilovanej vody:

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

Testované vzorky

Na testovanie bol ako substrát použitý polymér PVP K15 ($M_r \approx 10\,000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), Sigma-Aldrich. Príprava vzoriek bola prevádzaná pridaním naváženého množstva práškoveho PVP do rozpúšťadla (biomédium) a dôkladným miešaním roztoku.

Pre aeróbne pokusy boli ďalej ako vybrané kosubstráty testované vzorky 1-methyl-2-pyrrolidónu (1M-2P), akrylamidu (AC), N-acetylphenylalanínu (APhA) a pri vzorkách pôdy aj glukóza. Percentuálny obsah organicky viazaného uhlíka a vypočítaná hodnota TSK (rovnica 3 kap.6.2.1) jednotlivých substrátov sú uvedené v tab.2.

Tab. 2: Hodnoty TSK a percento obsahu uhlíka v molekulách použitých substrátov

Substrát	TSK [mg O ₂ .g ⁻¹]	C [%]
PVP	2020	64,84
1M-2P	2020	60,58
AC	1350	50,69
APhA	2007	63,76

6.2 Metódy stanovenia biologickej rozložiteľnosti PVP

Stanovenie biologického rozkladu bolo uskutočnené vo vodnom a pôdnom prostredí za aeróbných podmienok.

Pri každej vzorke sa pred a po ukončení pokusu vo vodnom aeróbnom prostredí ďalej stanovilo pH, obsah celkového rozpusteného organického uhlíka a sušina kalu; v pôdnom prostredí bolo stanovené pH_{KCl} a sušina pôdy.

6.2.1 Stanovenie biologickej rozložiteľnosti látok pomocou respirometra Micro-Oxymax

Testovanie aeróbnej biodegradácie prebiehalo na prístroji Micro-Oxymax, ktorým je kontinuálne zaznamenávaná produkcia CO₂ a spotreba O₂ pri aeróbnom rozklade. Na stanovenie BSK bolo do jednotlivých pokusných nádob respirometra dávkové stanovené množstvo biomédia, roztoku substrátu a inokula. Objem reakčnej suspenzie bol vždy 50 ml. Dávkovanie a riedenie bolo prevedené tak, aby bola v nádobách dosiahnutá koncentrácia aktivovaného kalu cca 500 mg.l⁻¹ a koncentrácia sledovaného PVP cca 200 mg.l⁻¹. Pri kombináciách substrátov bol pomer koncentrácií PVP ku kosubstrátu 1:1. Všetky vzorky boli testované 3-krát vedľa seba a pri každom meraní bol nasadený slepý pokus (bez testovanej látky) a reaktor obsahujúci iba kosubstrát, a to tak, aby bola zaznamenaná ako endogénna respirácia tak i spotreba kyslíka pripadajúca na rozklad samotného kosubstrátu. Testovacie

banky boli umiestnené do vodného kúpeľa s udržiavanou teplotou 25 °C. Vzorky boli kontinuálne miešané rýchlosťou 350 ot.min⁻¹ a pripojené k meraciemu prístroju.

Počas aeróbnej degradácie bola periodicky zaznamenávaná spotreba O₂ detektorom prístroja Micro-Oxymax, ktorý pracuje na princípe paramagnetickej rezonancie. Výsledky boli vyhodnocované ako biologická spotreba kyslíka (BSK) podľa rovnice 1. Biologický rozklad študovanej látky bol vyjadrený ako percento rozkladu (rovnica 2) vypočítané z pomeru substrátovej BSK k teoretickej spotrebe kyslíka vypočítanej podľa rovnice 3.

Substrátová BSK [mg.g⁻¹]:

$$BSK = \frac{BSK_t - BSK_0}{m} \quad /1/$$

kde:

BSK_t – celková biologická spotreba kyslíka skúšanej látky v čase t nameraná respirometrom Micro-Oxymax [mg]

BSK₀ – celková biologická spotreba kyslíka slepeho stanovenia v čase t nameraná respirometrom Micro-Oxymax [mg]

m – navážka skúšanej látky [g]

Percento biologického rozkladu D [%]:

$$D = \frac{BSK_{\max}}{TSK} * 100 \quad /2/$$

kde:

BSK_{max} – maximálna hodnota substrátovej spotreby kyslíka skúšanej látky [mg.g⁻¹]

TSK – teoretická spotreba kyslíka skúšanej látky [mg.g⁻¹]

Teoretická spotreba kyslíka TSK [mg.mg⁻¹]:

$$TSK = \frac{16 * \left[2a + \frac{1}{2}(b - 3c) + 3d - e \right]}{Mr} \quad /3/$$

kde:

a – počet atomů uhlíka v molekule substrátu

b – počet atomů vodíka v molekule substrátu

c – počet atomů dusíka v molekule substrátu

d – počet atomů síry v molekule substrátu

e – počet atomů kyslíka v molekule substrátu

M_r – relativní molekulová hmotnost substrátu [$\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$]

Pozn. : Pretože nie je známe presné chemické zloženie mycélia, pri výpočtoch bola namiesto TSK použitá hodnota CHSK_{Cr} .

6.2.2 Zahn-Wellens test

Zahn-Wellens test je bežne používaná metóda na sledovanie biodegradácie látok vo vodnom prostredí [32]. Test možno realizovať s dobre rozpustnými substrátmi. Aparatúra sa skladá z deliacich nádob, ktoré sú zospodu prevzdušňované, čím zároveň dochádza k premiešavaniu suspenzie sledovanej látky, biomédia a inokula. Koncentrácia PVP v nádobách bola zvolená na $1000 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ a koncentrácia prídavných kosubstrátov $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$. Test prebiehal pri laboratórnej teplote. V stanovených časových intervaloch sa z nádob odoberali vzorky objemu 3 ml na stanovenie úbytku TOC v čase. K ukončeniu testu sa obvykle pristupuje po minimálne 28 dňoch. Percento odstránenia substrátu podľa úbytku organického uhlíka $D_{\text{TOC}} [\%]$ bolo vypočítané podľa rovnice 4:

$$D_{\text{TOC}} = 100 - \left[\frac{(TOC_s - TOC_{\text{sl.p.}}) * 100}{TOC_{\text{poč.}}} \right] \quad /4/$$

kde:

TOC_s – celkový organický uhlík v substráte v danom čase [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]

$TOC_{\text{sl.p.}}$ - celkový organický uhlík v slepom pokuse v danom čase [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]

$TOC_{\text{poč.}}$ - celkový organický uhlík v substráte na začiatku merania [$\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$]

6.3 Ostatné stanovenia a analýzy

Stanovenie rozpusteného uhlíka

Na stanovenie celkového organického uhlíka (TOC) bol použitý Analyzátor celkového organického uhlíka . Princíp stanovenia je založený na oxidácii celkového uhlíka (TC) vo vzorke v trubici s platinovým katalyzátorom pri 680 °C v prúde vzduchu. Vznikajúci CO₂ je vedený do NDIR detektora (Non-Disperze Infrared detektor). V detektore je signál, vznikajúci absorpciou príslušnej vlnovej dĺžky, registrovaný ako plocha píku, ktorá je priamo úmerná koncentrácii TC vo vzorke.

Pri stanovení anorganického uhlíka (IC) je vzorka nastreknutá v prúde kyslíka do reaktorovej nádoby s kyselinou fosforečnou, kde dochádza k vytesneniu CO₂. Stanovenie koncentrácie IC prebieha rovnako ako stanovenie TC. Koncentrácia organického uhlíka TOC je určená rozdielom koncentrácií TC a IC.

Stanovenie sušiny aktivovaného kalu

Sušina aktivovaného kalu bola stanovená trikrát vedľa seba vákuovou filtráciou 15 ml suspenzie kalu cez vopred premytý, vysušený a zvážený filtračný papier. Následne bol filtračný papier s filtrátom vysušený do konštantnej hmotnosti pri 105 °C a po vychladení bol zvážený. Koncentrácia sušiny X aktivovaného kalu bola vyjadrená v g.l⁻¹ (rovnica 5).

$$X = \frac{m_n - m_0}{m_n} * \frac{1}{V} \quad /5/$$

kde:

m_0 – hmotnosť filtračného papiera [g]

m_n – hmotnosť po vysušení kalu [g]

V – pipetovaný objem [l]

Stanovenie sušiny pôdy

Na dopredu zvážené Petriho misky boli na analytických váhach navážené 2 g pôdy a navážky sa vysušili v elektrickej sušiarňi pri 105 °C do konštantnej hmotnosti. Po ochladení v exikátore na laboratórnu teplotu boli misky s obsahom zvážené. Stanovenie sa prevádzalo trikrát vedľa seba. Od konštantnej hmotnosti bola odčítaná hmotnosť prázdnej misky a potom sa z pôvodnej a konečnej hmotnosti pôdy vyjadřila sušina v percentách.

Stanovenie pH

Pred začiatkom a po ukončení pokusu bola u každej sledovanej vzorky stanovená hodnota pH pomocou laboratórneho pH metra.

Všetky hodnoty a údaje boli spracované tabelárne a graficky pomocou počítačových programov Word a Excel. V elektronickej forme sú všetky vstupné údaje archivované na ústave Inžinierstva ochrany životného prostredia, FT, UTB v Zlíne.

7 VÝSLEDKY A DISKUSIA

7.1 Rozklad PVP mikroorganizmami aktivovaného kalu

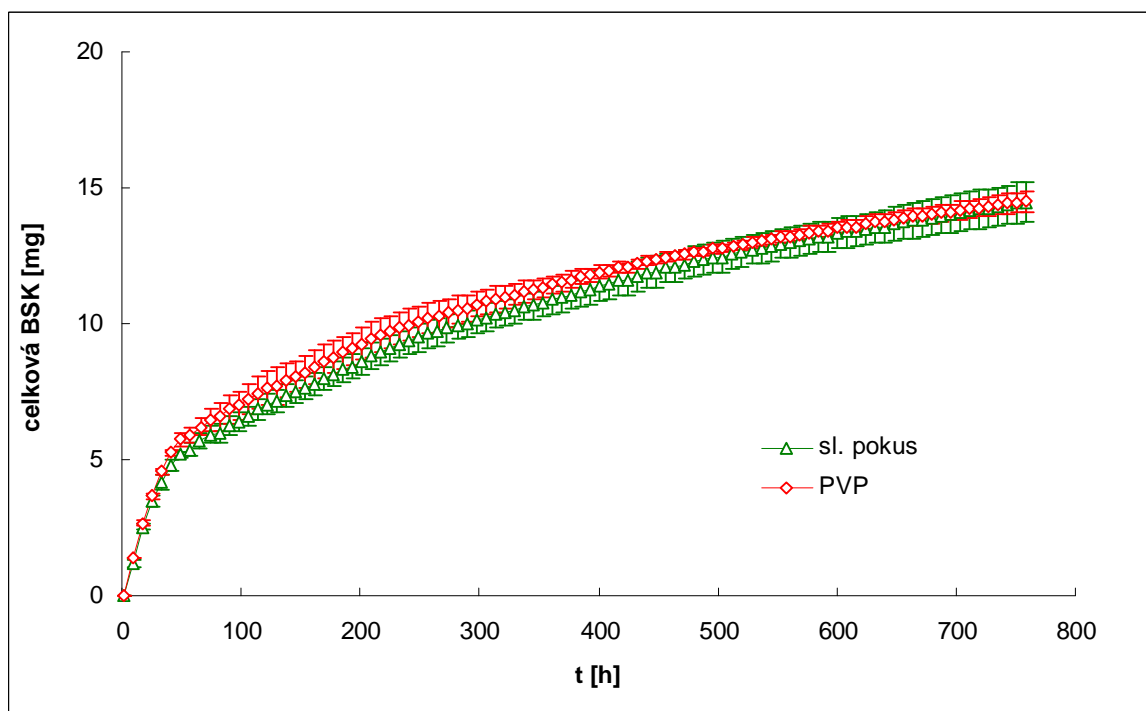
V tejto časti práce bola testovaná biologická rozložiteľnosť PVP v aeróbnom prostredí za prítomnosti aktivovaného kalu – AK z ČOV Zlín-Malenovice alebo AK z ČOV Slovenská Ľupča. Biologická spotreba kyslíka u oboch typov aktivovaného kalu bola sledovaná aj pre vzorku PVP v kombinácii s rôznymi kosubstrátmi a po prídavku mycélia v pomeroch 1:1.

Pokus s aktivovaným kalom z ČOV Malenovice, čistiacej mestskej odpadovej vody, trval cca 760 hodín (32 dní). Koncentrácia PVP v nádobách respirometra bola $203,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Ako substrát bol okrem PVP sledovaný aj rozklad 1-methyl-2-pyrrolidónu (1M-2P), akrylamidu (AC) a N-acetylphenylalanínu (APhA). Výsledky týchto meraní boli následne použité na vyhodnotenie vplyvu kosubstrátov na degradáciu PVP. Podobne bol sledovaný aj vplyv mycélia ako pomocnej degradačnej kultúry na rozklad PVP.

Tab. 3: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice

Vzorka	pH		Sušina [mg.l^{-1}]		TOC [mg.l^{-1}]		D_{TOC} [%]	t_{lag} [h]
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup		
sl. pokus	7,588	6,757	581,0	180,0	15,18	8,558	-	-
PVP	7,579	6,728	581,0	46,00	141,0	142,5	-	-
1M-2P	7,586	6,091	581,0	289,0	175,9	6,242	101,4	35
1M-2P + PVP	7,555	6,095	581,0	190,0	318,4	137,0	-	-
APhA	7,350	6,625	581,0	199,0	158,7	6,484	101,4	46
APhA + PVP	7,353	6,598	581,0	274,0	287,3	136,3	-	-
AC	7,588	6,153	581,0	202,0	132,5	10,39	98,44	70
AC + PVP	7,585	6,045	581,0	70,00	257,1	134,5	-	-
MYC	7,577	6,552	581,0	210,0	61,69	11,26	94,19	17
MYC + PVP	7,571	6,580	581,0	220,0	190,2	139,3	-	-

Celková BSK vzorky samotného PVP bez prídavného kosubstrátu sa pohybovala na úrovni endogénnej respirácie (obr.10), teda k degradácii nedochádza. Túto skutočnosť potvrdzujú nemenné hodnoty TOC na vstupe a výstupe (tab. 3). Nutné je však podotknúť, že hodnoty TOC uvádzané v celej práci sú u vzoriek obsahujúcich PVP iba orientačné – v predchádzajúcich diplomových prácach [33] bola preukázaná sorpcia PVP na aktivovaný kal.

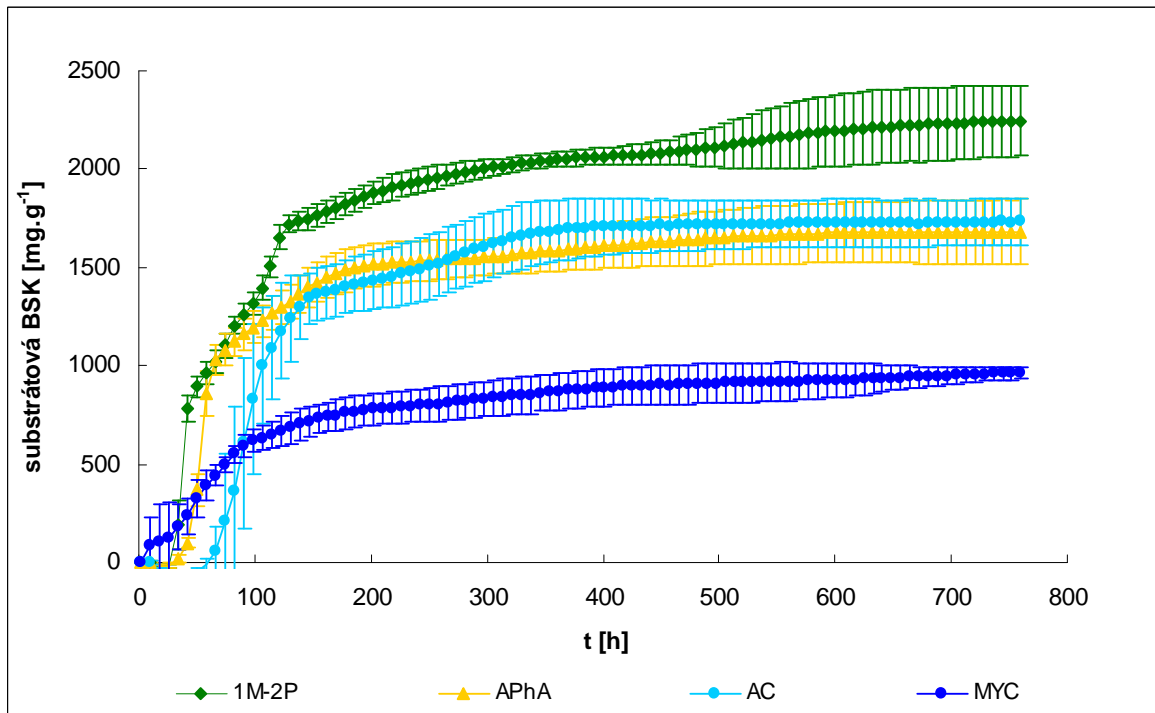


Obr. 10: Celková BSK vzorky PVP v prostredí aktivovaného kalu ČOV

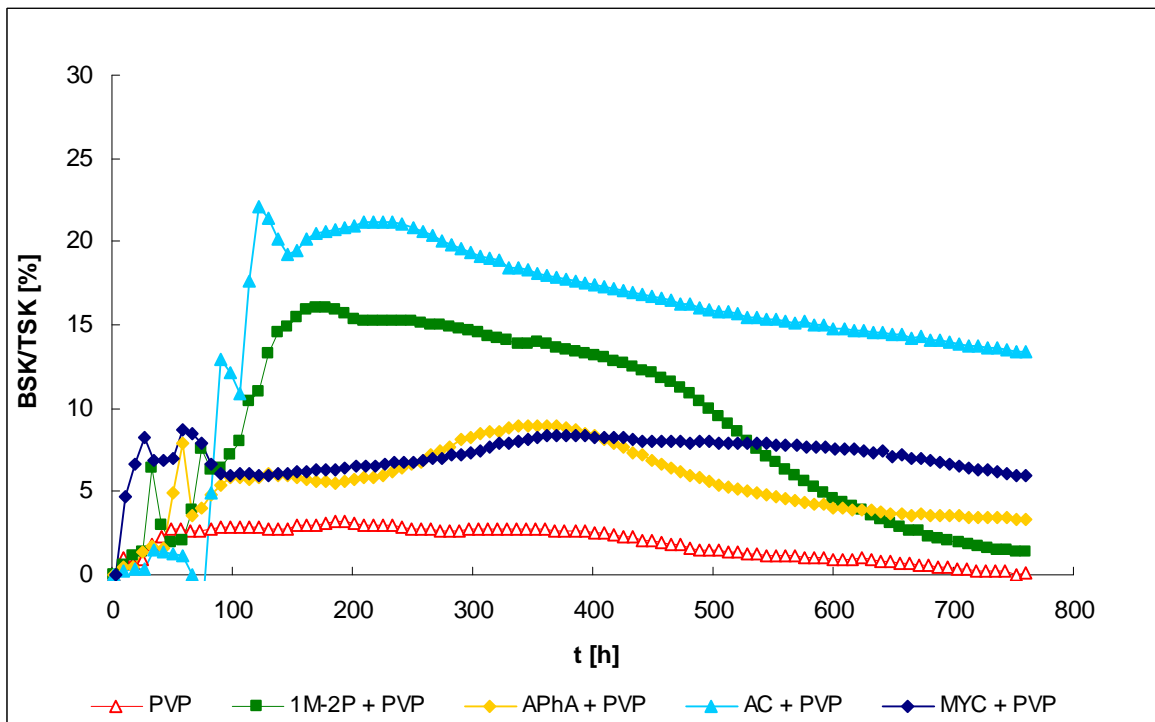
Zlín–Malenovice

Na obr. 11 vidno krivky substrátovej BSK jednotlivých kosubstrátov a mycélia, všetky sa vyznačujú lagovou fázou. Najvyššie hodnoty spotreby kyslíka dosahuje 1-methyl-2-pyrrolidón. Krivka znázorňujúca rozklad N-acetylphenylalanínu je takmer totožná s krivkou akrylamidu. Hodnoty substrátovej BSK mycélia ležia až pod týmito krivkami. Z hodnôt BSK_{max}/TSK vyplýva, že všetky navrhnuté kosubstráty sú dobre biologicky rozložiteľné. Akrylamid sa rozložil zo 100 % po cca 170 hodine. Úplne rozloženým bol po dobe 300 hodín taktiež 1-methyl-2-pyrrolidón. Približne po 200 hodinách bola dosiahnutá maximálne degradácia N-acetylphenylalanínu 83 %.

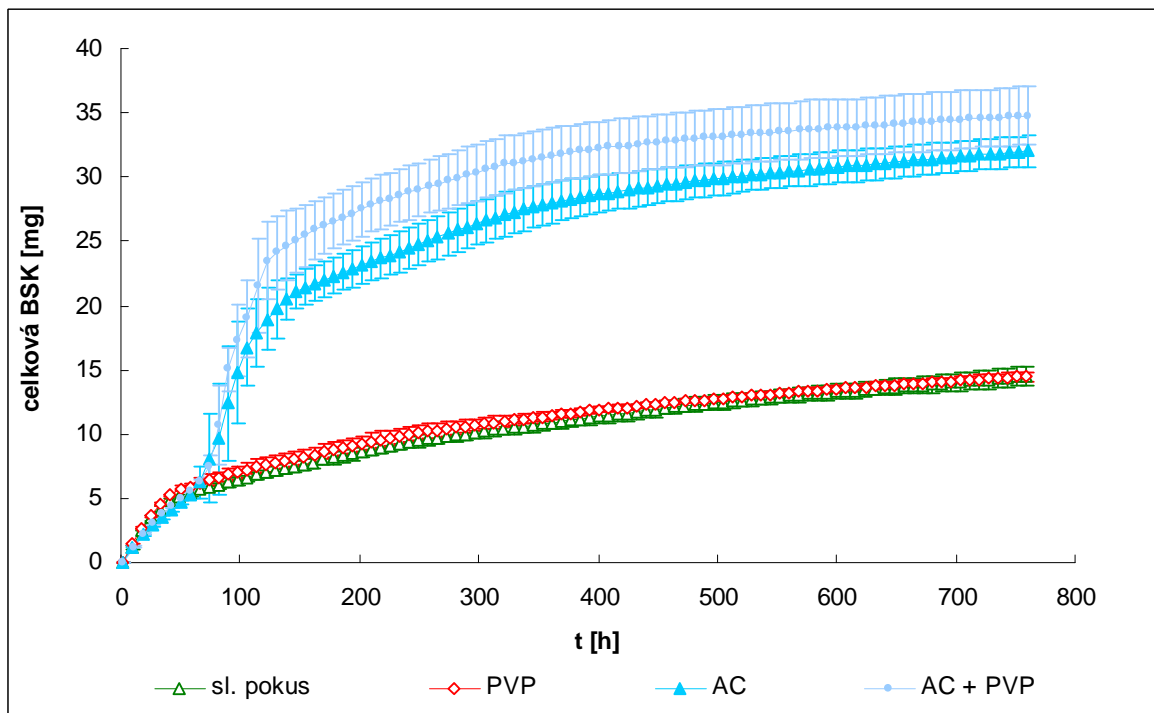
Z porovnania vplyvu kosubstrátov, resp. mycélia na degradáciu PVP bol ako najúčinnjšou variantou prídavku k PVP zaznamenaný akrylamid. Obr. 12 zobrazuje percento degradácie vzoriek vyjadrené ako pomer BSK (po odočte BSK pripadajúcej na samotný kosubstrát) ku TSK polyvinylpyrrolidónu. Klesajúca tendencia kriviek naznačuje možnosť vzniku medzi-produktov inhibujúcich respiráciu kalu. Na obr. 13 vidno, ako prídavok akrylamidu ovplyvnil rozklad PVP. Krivka znázorňujúca kombináciu PVP s akrylamidom sa nachádza nad krivkou samotného kosubstrátu. Rozdiel medzi nimi vyplýva zo spotreby kyslíka pripadajúcej na degradáciu PVP.



Obr. 11: Substrátová BSK kosubstrátov a mycélia v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice



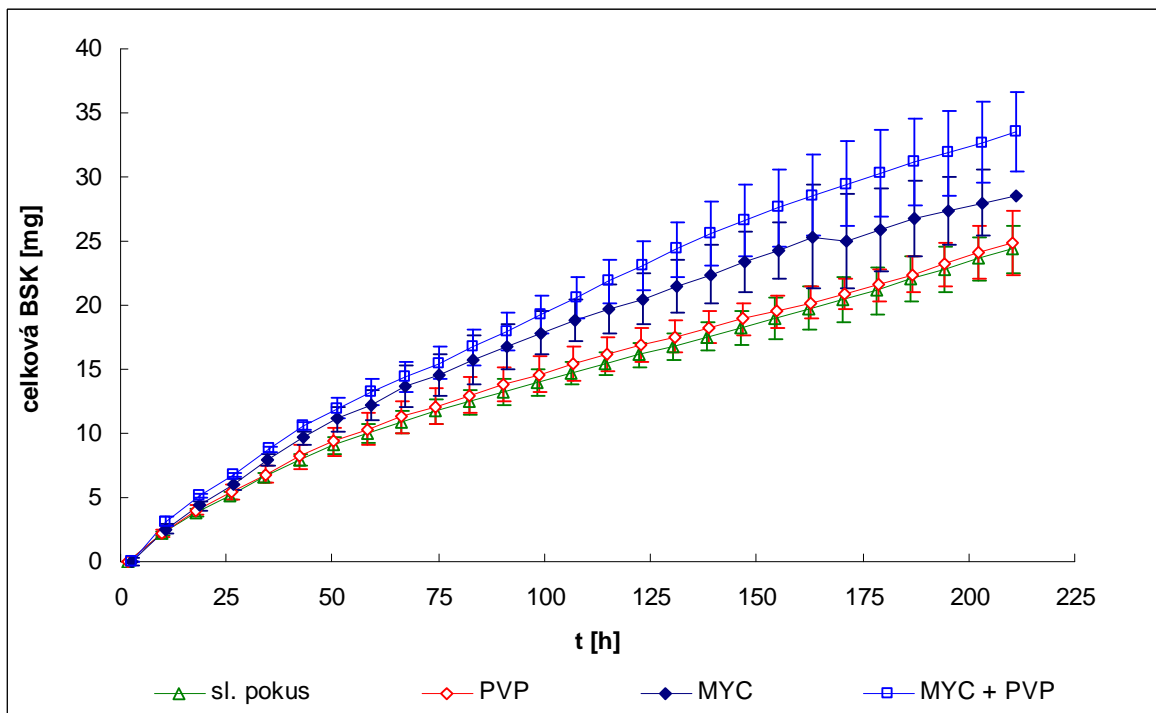
Obr. 12: Vplyv kosubstrátov a mycélia na percento degradácie PVP v prostredí aktivovného kalu ČOV Zlín-Malenovice



Obr. 13: Hodnoty celkovej BSK vzorky PVP, akrylamidu a ich kombinácie v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice

Druhým použitým kalom bol aeróbnym aktivovaný kal z ČOV a.s., Slovenská Ľupča odobieraný v čase výroby antibiotík v spoločnosti Biotika a.s., ktorá tiež využíva služby čistiarne. Pokus musel byť z dôvodu poruchy na respirometri predčasne ukončený. Keďže nebolo možné ďalšie opakovanie testu, v práci sú uvedené čiastočné výsledky za dobu 211 hodín (9 dní) a na doplnenie bol test na záver práce opakovaný metódou Zahn-Wellensa (kap.7.4). Koncentrácia PVP v reaktoroch respirometra bola $196,2 \text{ mg.l}^{-1}$. Celková BSK vzorky samotného PVP sa pohybovala na úrovni endogénnej respirácie (obr.14).

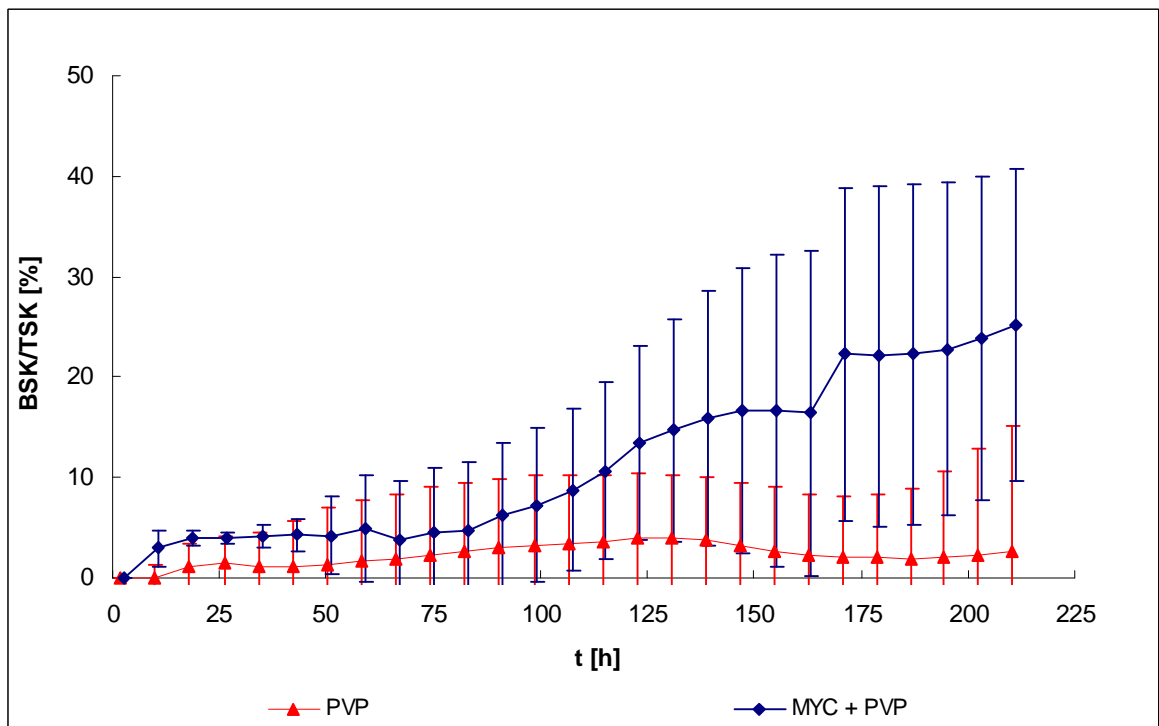
Prídavok kosubstrátov k vzorke PVP v tomto prostredí nevyvolal podporu jeho rozkladu. Naopak, prídavok mycélia znamenal nárast percenta degradácie PVP až na cca 25 % (obr. 15), pričom táto hodnota nemusí byť pri rastúcej tendencii krivky konečná (predčasné ukončenie pokusu pre poruchu prístroja). Tento výsledok považujeme za potvrdenie výsledkov predchádzajúcej diplomovej práce [28]. Pomerne veľká smerodajná odchýlka môže vyplývať z nehomogénneho rozloženia zložiek v mycéliu (mikrobiálna biomasa, živná pôda, penicilín).



Obr. 14: Celková BSK vzorky PVP, mycélia a ich kombinácie v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Lupča

Tab. 4: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Lupča

Vzorka	pH		Sušina [mg.l ⁻¹]		TOC [mg.l ⁻¹]	
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup
sl. pokus AK Slov. Lupča	7,482	6,512	547,3	241,1	66,21	23,94
PVP	7,488	6,431	547,3	258,0	205,2	166,4
1M-2P	7,499	6,411	547,3	268,0	238,6	28,87
1M-2P + PVP	7,496	6,375	547,3	265,6	373,4	169,0
APhA	7,242	6,469	547,3	291,6	186,4	24,18
APhA + PVP	7,212	6,569	547,3	243,8	317,4	154,6
AC	7,506	6,398	547,3	199,8	172,4	35,02
AC + PVP	7,51	6,466	547,3	261,8	331,4	179,6
MYC	7,455	6,399	547,3	297,3	108,2	32,50
MYC + PVP	7,45	6,455	547,3	170,0	250,6	162,2



Obr. 15: Percento degradácie vzorky PVP bez a po zaočkovaní mycéliom v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Lupča

7.2 Vplyv nitrifikácie a koncentrácie PVP na jeho degradáciu

V tejto časti práce bola testovaná biologická rozložiteľnosť roztokov PVP o dvoch rôznych koncentráciách (200 a 1000 mg.l⁻¹) v aeróbnom prostredí aktivovaného kalu z ČOV Zlín-Malenovice. Biologická spotreba kyslíka v prostredí kalu bola sledovaná aj pre vzorku PVP v kombinácii s akrylamidom, ktorý sa v predchádzajúcich testoch ukázal ako najefektívnejší typ kosubstrátu (obr. 12). Na druhej strane bol ale zaznamenaný pokles biodegradčných kriviek v čase, čo môže naznačovať vznik metabolitov rozkladu pôsobiacich inhibične na mikroorganizmy aktivovaného kalu. K tomuto poklesu (pravdepodobnému vzniku inhibujúcich medziproduktov) dochádza v čase, kedy začínajú prebiehať nitrifikačné pochody. Z tohto dôvodu sa v tomto teste pristúpilo k pridaniu allylthiomocoviny do vzoriek na potlačenie nitrifikácie v priebehu odbúravania dusíkatých substrátov a zároveň bol študovaný tiež vplyv koncentrácie PVP na priebeh jeho rozkladu.

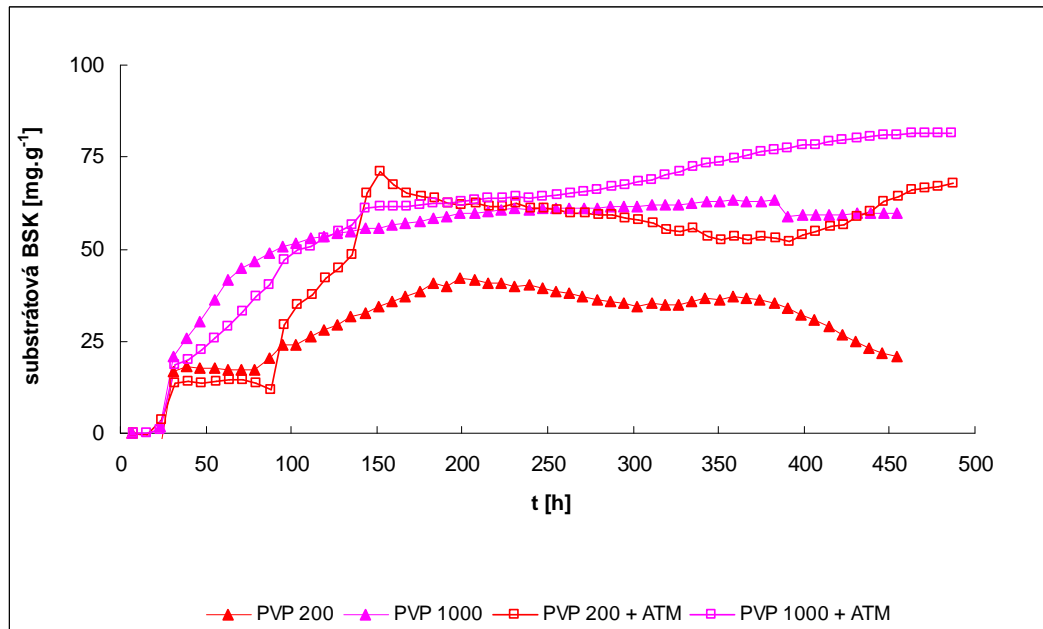
Pokus trval cca 455 hodín (19 dní). Koncentrácia PVP v nádobách respirometra bola 218,5 mg.l⁻¹ (PVP 200), resp. 997,5 mg.l⁻¹ (PVP 1000). Vzorky boli upravené prídavkom N-allylthiomocoviny (ATM), ktorej koncentrácia v reaktore bola 2 mg.l⁻¹. Popri PVP bola sledovaná aj degradácia akrylamidu s koncentráciou 207,6 mg.l⁻¹. U vzoriek s obsahom akrylamidu bolo pri ukončení pokusu zaznamenané výrazné zníženie hodnôt pH (tab. 5).

Tab. 5: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe

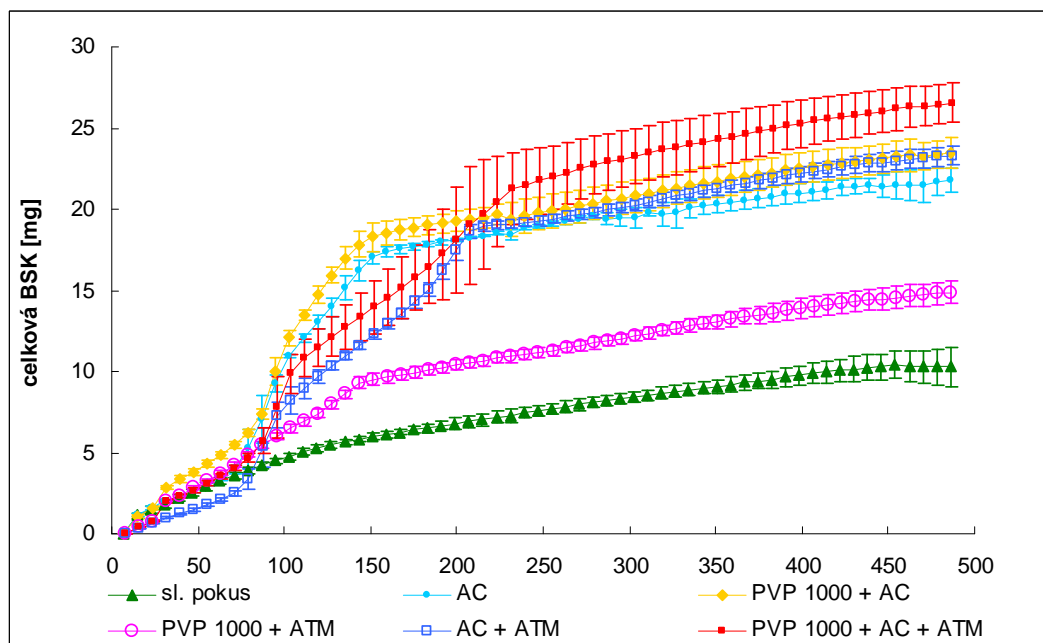
Vzorka	pH		Sušina [mg.l ⁻¹]		TOC [mg.l ⁻¹]		D _{TOC} [%]
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup	
sl. pokus	7,406	6,732	488,6	227,8	35,38	16,28	-
PVP 200	7,408	6,692	488,2	143,3	193,4	174,8	-
PVP 1000	7,388	6,439	467,3	182,7	841,0	674,9	-
AC	7,415	5,118	487,5	220,0	170,7	18,13	98,63
PVP 1000 + AC	7,387	5,015	530,2	285,1	934,2	753,8	-
sl. pokus + ATM	7,407	6,621	442,4	244,4	40,54	15,18	-
PVP 200 + ATM	7,387	6,595	538,0	284,4	203,0	165,9	-
PVP 1000 + ATM	7,337	6,376	488,8	264,9	786,8	623,3	-
AC + ATM	7,361	5,018	439,5	240,2	169,3	18,32	98,48
PVP 1000+AC+ATM	7,334	5,035	524,4	103,3	855,2	645,5	-

Ako vyplýva z grafov, pri potlačení nitrifikačných pochodov došlo k zvýšeniu BSK, najvýraznejšie pri vzorke PVP 200 + ATM (obr. 16) a vzorke PVP 1000 + AC + ATM (obr. 17). Zrejme pri koncentrácii 2 mg.l⁻¹ ATM v reaktore nedochádza k potláčaniu nitrifikácie (obvyklý prídavok ATM na potlačenie nitrifikácie je totiž 10 mg.l⁻¹). Na obr. 16 vidíme, ako

vplýva koncentrácia PVP na jeho degradáciu. Pre vzorku PVP 1000, na rozdiel od vzorky PVP 200, je hodnota BSK výrazne vyššia než hodnota endogénnej respirácie, teda nezaniká v rámci respirácie samotného kalu. Podľa percenta odstránenia TOC dochádza k vyššej miere degradácie pri vyššej koncentrácii PVP (tab. 5).



Obr. 16: Hodnoty substrátovej BSK vzorky PVP o dvoch rôznych koncentráciách a po prídavku *N*-allylthiomočoviny

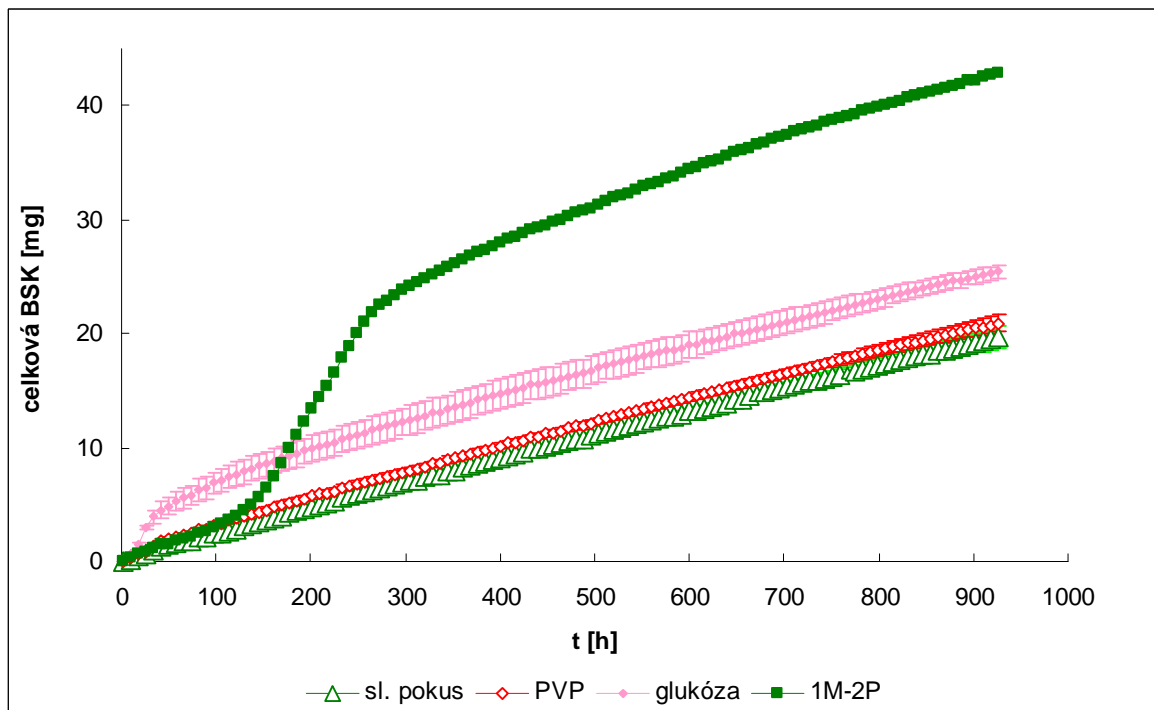


Obr. 17: Hodnoty celkovej BSK PVP 1000 v kombinácii s akrylamidom a po prídavku *N*-allylthiomočoviny

7.3 Rozklad PVP mikroorganizmami půdy

Cieľom tejto časti práce bolo testovanie biologickej rozložiteľnosti roztoku PVP v aeróbnom prostredí pôdy a pôdneho inokula, pretože táto cesta bola ako jediný kladný rozklad PVP popísaná v práci [34]. Biologická spotreba kyslíka u pôdneho inokula bola sledovaná aj pre vzorku PVP v kombinácii s rôznymi kosubstrátmi a mycéliom.

Pre testovanie bola použitá pôda lesného pôvodu s obsahom vlhkosti 71,46%. Do reaktorov bolo navážených cca 10 g pôdy a to tak, že bolo najprv odvážených cca 5 g pôdy, potom bolo do pôdy aplikovaných priamou navážkou cca 10 mg vzorky PVP a následne sa dovážilo ďalších cca 5 g pôdy. Ako kontrolné substráty boli použité ľahko rozložiteľné substráty glukóza a 1-methyl-2-pyrrolidón. Pokus trval cca 928 hodín (39 dní). Maximálny stupeň biodegradácie glukózy bol dosiahnutý v 320 hodine a to 50%. 1M-2P bol úplne rozložený v priebehu 540 h s lagovou fázou 110 h. Celková BSK vzorky PVP sa pohybovala mierne nad hodnotami endogénnej respirácie (obr. 18), čo naznačuje možný primárny rozklad PVP.



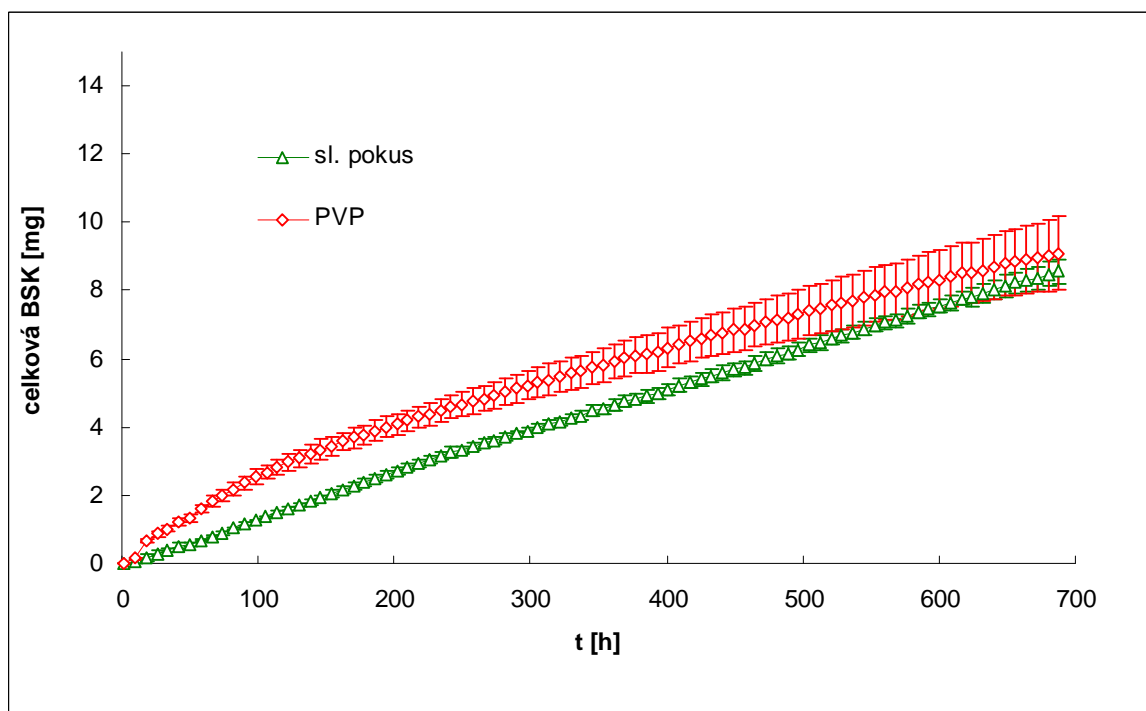
Obr. 18: Celková BSK vzorky PVP, 1-methyl-2-pyrrolidónu a glukózy v pôdnom prostredí

Ďalej bolo na sledovanie biodegradácie PVP použité pôdne inokulum pripravené postupom popísaným v kapitole 6.1. Pokus trval cca 690 hodín (29 dní). Koncentrácia PVP v nádobách respirometra bola $205,1 \text{ mg.l}^{-1}$. Ako substrát bol okrem PVP sledovaný aj rozklad 1-methyl-2-pyrrolidónu, akrylamidu a N-acetylphenylalanínu (obdobne ako pri pokusoch s aktivovaným kalom). Celková BSK vzorky sa pohybovala nad hodnotami endogénnej respirácie (obr. 19), teda možno tvrdiť, že aj v prostredí pôdneho inokula prebieha do určitého stupňa degradácia PVP.

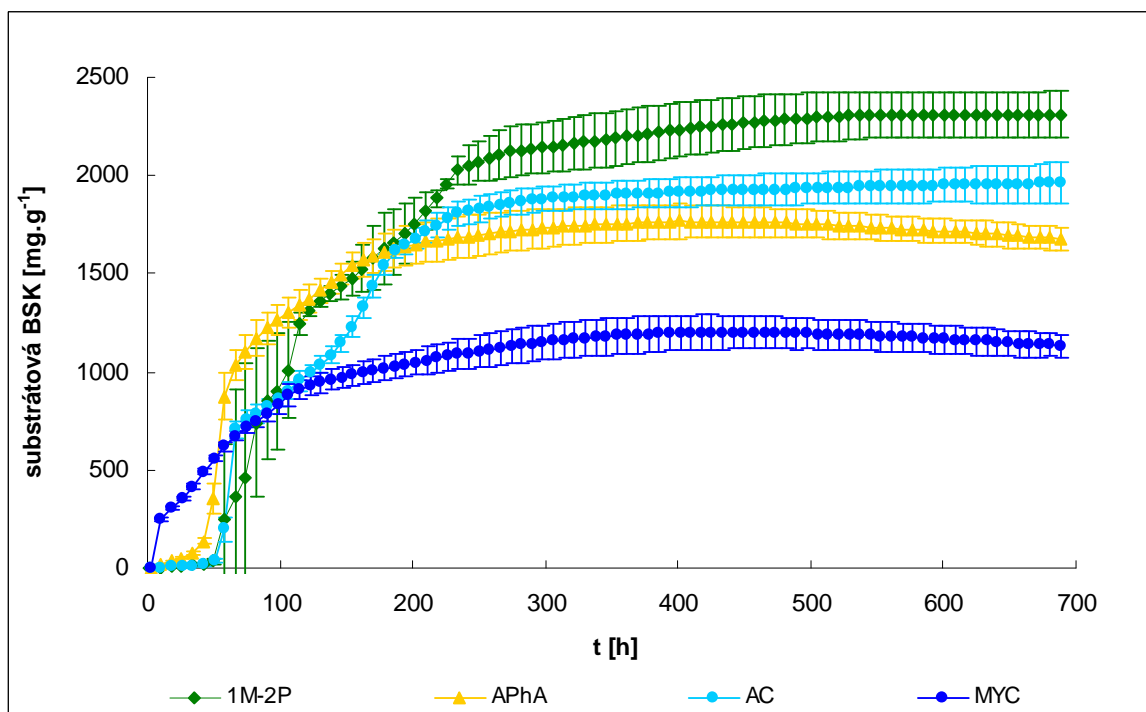
Tab. 6: Hodnoty pH a TOC vzoriek pôdneho inokula na vstupe a výstupe

Vzorka	pH		TOC [mg.l^{-1}]		D_{TOC} [%]	t_{lag} [h]
	Vstup	Výstup	Vstup	Výstup		
sl.pokus	7,498	7,295	37,17	25,49	-	-
PVP	7,543	7,299	153,6	76,87	-	-
1M-2P	7,549	6,941	182,7	27,99	98,28	56
1M-2P + PVP	7,556	6,956	293,1	101,2	-	-
APhA	7,121	7,325	182,1	25,35	100,1	44
APhA + PVP	7,182	7,300	307,5	97,79	-	-
AC	7,541	6,797	153,9	33,65	93,01	55
AC + PVP	7,584	6,724	262,1	100,6	-	-
MYC	7,512	7,172	88,18	25,08	100,8	-
MYC + PVP	7,530	7,043	204,7	102,4	-	-

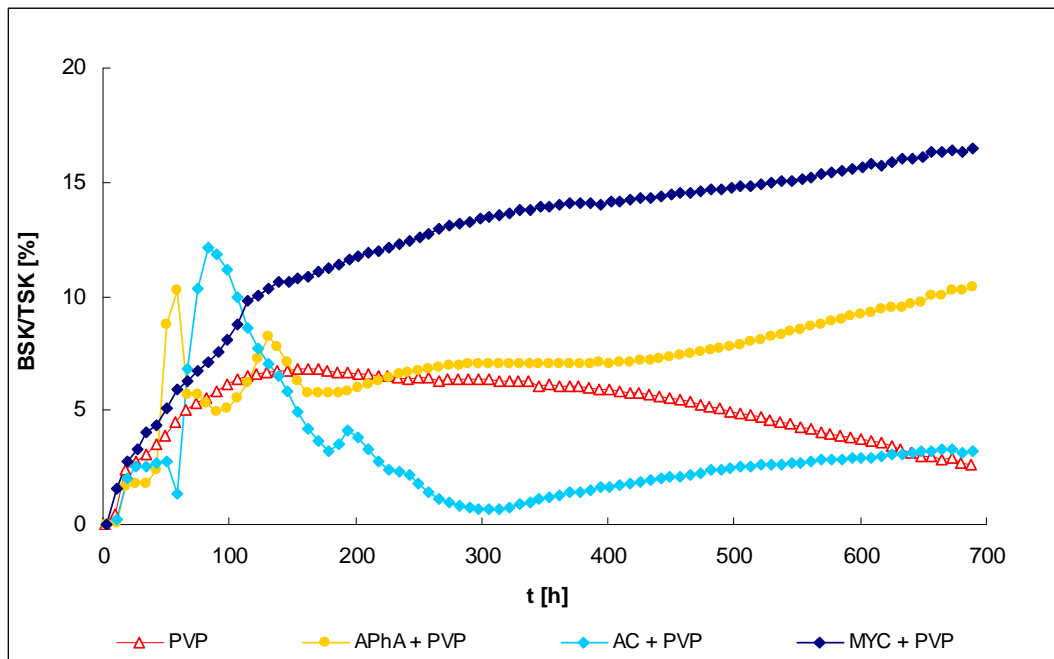
Na obr. 20 sú znázornené krivky substrátovej BSK jednotlivých substrátov a mycélia v prostredí pôdneho inokula. U kriviek kosubstrátov bola pozorovaná lagová fáza (tab. 6). Najvyššie hodnoty, rovnako ako pri použití AK Malenovice, dosahuje 1-methyl-2-pyrrolidón. Nasleduje akrylamid, N-acetylphenylalanín a mycélium. Maximálna hodnota percenta biodegradácie acetylphenylalanínu v cca 234 h bola 85 %. Zo 100 % boli rozložené akrylamid s dobou rozkladu 163 h, 1-methyl-2-pyrrolidón počas 233 h a mycélium v 186 h trvania pokusu. Prídavok kosubstrátov v tomto prostredí nemal na degradáciu PVP výrazný vplyv (obr. 21). Pri kombinácii AC + PVP dokonca možno predpokladať vznik toxických medziproduktov.



Obr. 19: Celková BSK vzorky PVP v prostředí půdneho inokula

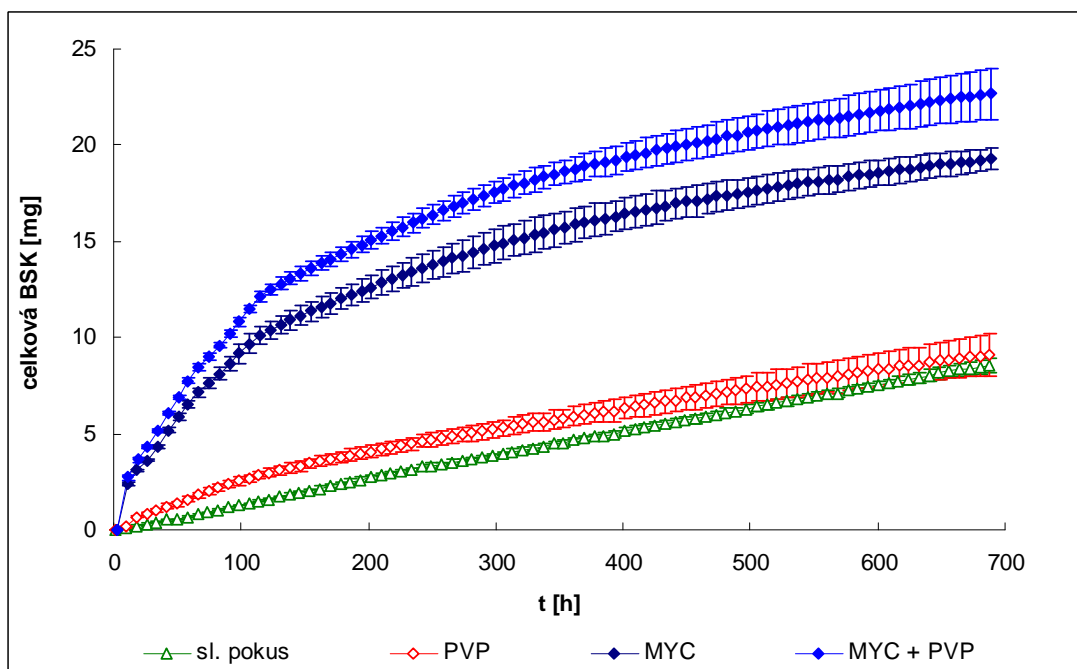


Obr. 20: Substrátová BSK různých substrátů a mycelia v prostředí půdneho inokula



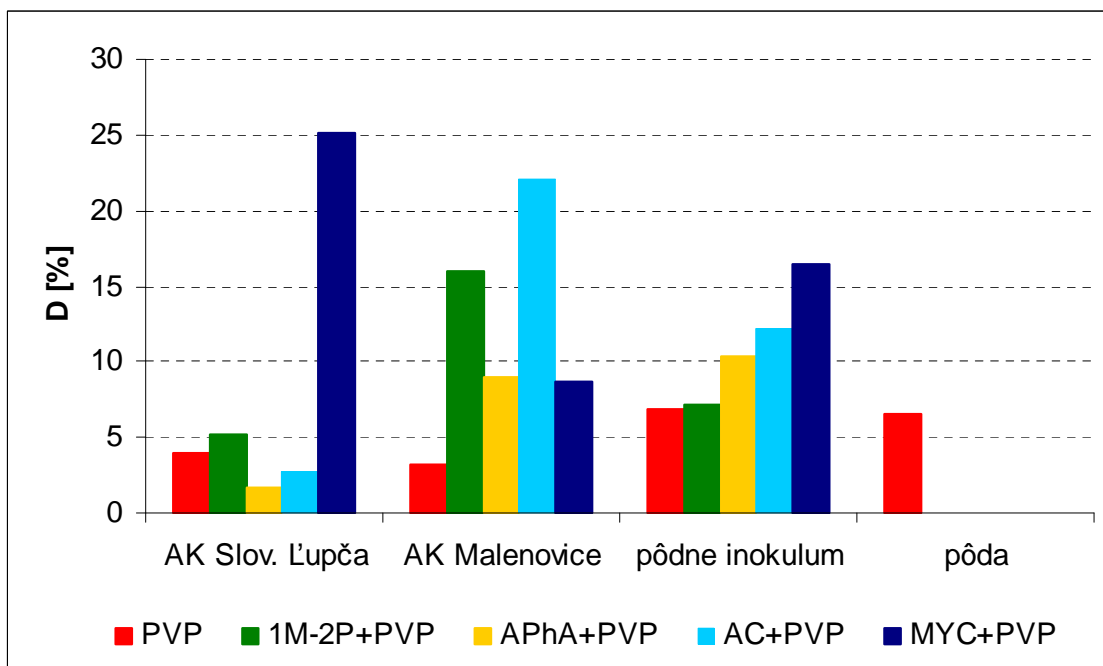
Obr. 21: Vplyv kosubstrátov a mycélia na percento degradácie PVP v prostredí pôdneho inokula

Prídavok mycélia však aj v tomto prípade rozklad PVP podporil. Detailnejšie je účinok mycélia zobrazený na obr. 22. Krivka znázorňujúca kombináciu PVP s mycéliom sa nachádza nad krivkou samotného mycélia.



Obr. 22: Hodnoty celkovej BSK vzorky PVP, vzorky mycélia a ich kombinácie v prostredí pôdneho inokula

Na obr. 23 je zobrazené porovnanie vplyvu kosubstrátov a mycélia na percento degradácie samotného PVP v rôznych prostrediach. Treba zdôrazniť, že jednotlivé stĺpce v grafe vychádzajú z maximálnej hodnoty BSK pre samotný PVP, teda po odočte spotreby kyslíka príslušného kosubstrátu, resp. mycélia.



Obr. 23: Porovnanie vplyvu kosubstrátov a mycélia na percento biologického rozkladu samotného PVP v rôznych prostrediach

Pre vzorku PVP bez prídavku kosubstrátu, či podpornej degradačnej kultúry, sa javí byť najvhodnejším prostredím na biodegradáciu pôda. Takmer totožný výsledok bol dosiahnutý aj s pôdnym inokulom, kde sa vylúčila možnosť adsorpcie na pevné zložky pôdy.

Pri použití kosubstrátov sa nedá určiť jednoznačný trend, účinok na biodegradáciu PVP závisí od kombinácie použitej látky a mikrobiálneho zastúpenia v prostredí. Výraznú hodnotu rozkladu (nad 20 %) dosiahla kombinácia s akrylamidom v prostredí AK Malenovice. Najvyššie percento degradácie však bolo dosiahnuté v prostredí AK Slovenská Ľupča po zaočkovaní mycéliom. Táto hodnota však nemusí byť konečná vzhľadom na predčasné ukončenie pokusu a rastúcu tendenciu krivky substrátovej BSK.

Z výsledkov vyplýva, že dochádza k určitým rozkladným procesom, zrejme k štiepeniu laktámového kruhu polyvinylpyrrolidónu. Tento primárny rozklad nie je zrejme doprevádzaný rozkladom polymérneho reťazca. Zatiaľ nie je známy mechanizmus štiepenia kruhu

za pomoci mycélia. Za prípadné štiepenie laktámovej väzby v štruktúre PVP sú pravdepodobne zodpovedné β -laktamázy (pre proces štiepenia molekúl PVP sú žiadúce γ -laktamázy). Výskyt tohto enzýmu v odpadovom mycéliu je však otázný. Produkčný kmeň *Penicillium chrysogenum* produkuje penicilíny, čo sú laktámové antibiotiká (v štruktúre obsahujú β -laktámový kruh), a preto logicky organizmy tohto kmeňa nemajú laktamázovú aktivitu. Vysvetlenie štiepenia laktámového kruhu PVP pomocou mycélia je však možné inou cestou. Mycélium z výroby penicilínu je pevný zvyšok po extrakcii a odfiltrovaní účinných látok. Podľa technológie výroby by už malo obsahovať iba reziduá penicilínu. Pri manipulácii v otvorených priestoroch spoločnosti Biotika a.s., dochádza ku kontaminácii mycélia baktériami z okolia, medzi nimi aj gram-negatívnymi baktériami s beta-laktamázovou aktivitou. Prítomnosťou zvyškového penicilínu je vyvolaná tvorba betalaktamáz. Baktérie zvyškový penicilín biologicky deaktivujú a vyprodukované enzýmy sa následne môžu účastniť štiepenia laktámového kruhu PVP [35].

7.4 Zahn–Wellens test

Pomocou Zahn-Wellens testu bola sledovaná biodegradácia PVP a to i napriek tomu, že táto metóda nie je úplne vhodná, pretože môže dochádzať k čiastočnej sorpcii PVP na kal [33]. Z tohto dôvodu sa koncentrácia PVP v reakčnej suspenzii zvolila na cca 1000 mg.l⁻¹ a zároveň tak bola dosiahnutá minimálna koncentračná zmena pri odbere vzoriek na stanovenie TOC. Presné koncentrácie v jednotlivých nádobách sú uvedené v tab. 7.

Tab. 7: Koncentrácie substrátov a mycelia v nádobách Zahn-Wellens testu

č. deličky	Vzorka	Koncentrácia v deličke [mg.l ⁻¹]		Zastúpenie uhlíka [mg.l ⁻¹]		
		PVP	Kosubstrát	PVP	PVP + ko-substrát	
2	1M-2P	-	221,0	-	133,9	
3	APhA	-	198,8	-	126,8	
4	AC	-	197,4	-	100,1	
5	MYC	-	199,9	-	84,85	
6	PVP	+ sl. pokus	1012	-	655,9	655,9
7		+ 1M-2P	999,7	221,0	648,2	782,1
8		+ APhA	998,7	198,8	647,5	774,3
9		+ AC	1006	197,4	652,6	752,6
10		+ MYC	1000	199,9	648,8	733,6

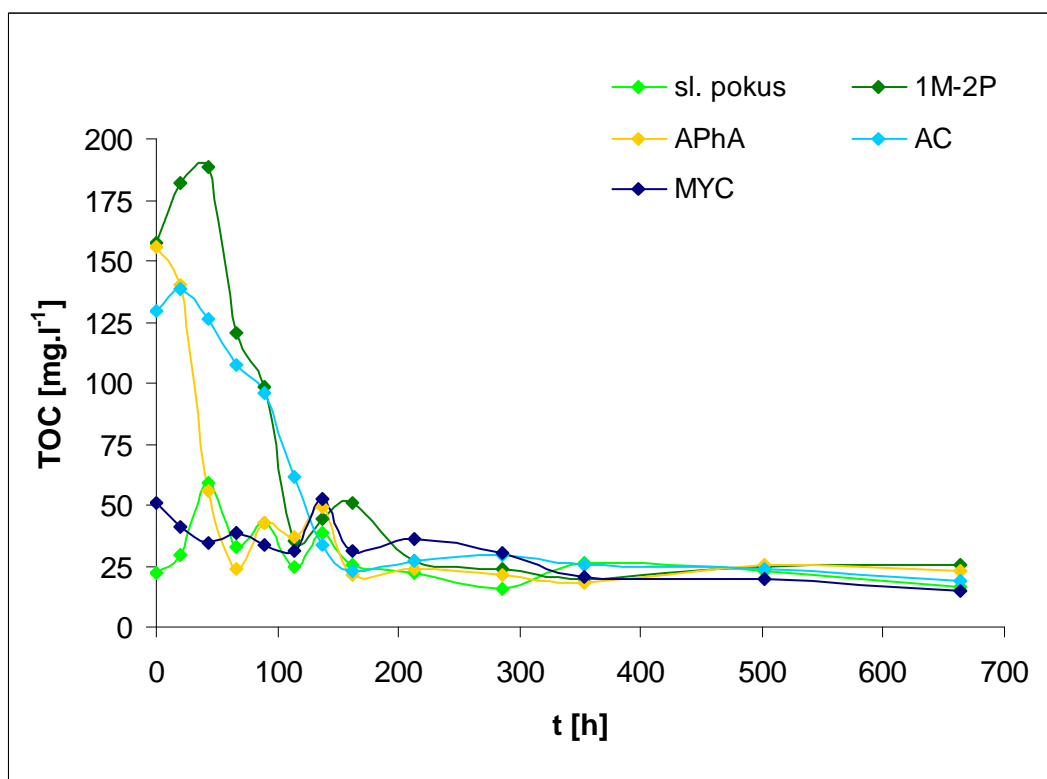
Sušina AK Slovenská Ľupča v dvojlitrových nádobách bola 442,1 mg.l⁻¹. Testovaniu boli podrobené kombinácie substrátov obdobne ako pri testoch na respirometri (tab. 8). V určitých časových intervaloch sa z nádob odoberali vzorky na stanovenie TOC. Získané hodnoty sa vynesli do grafov v závislosti od času.

Tab. 8: Usporiadanie vzoriek Zahn-Wellens testu

č. deličky	Vzorka	pH	
		Vstup	Výstup
1	sl.pokus	6,20	6,38
2	PVP	6,18	6,31
3	1M-2P	6,16	6,27
4	1M-2P+PVP	6,15	6,25
5	APhA	6,14	6,13
6	APhA+PVP	6,14	6,46
7	AC	6,14	6,34
8	AC+PVP	6,16	6,29
9	MYC	6,17	6,25
10	MYC+PVP	6,19	6,12

Obr. 24, 25 zobrazujú priebeh odbúravania substrátov na základe sledovania TOC do 29 dňa doby trvania testu, kedy boli aj zmerané hodnoty pH označené ako výstupné. Pokus však nebol ukončený a v súčasnosti stále prebieha s cieľom pozorovať možné zmeny u vzoriek PVP z dlhodobejšieho hľadiska.

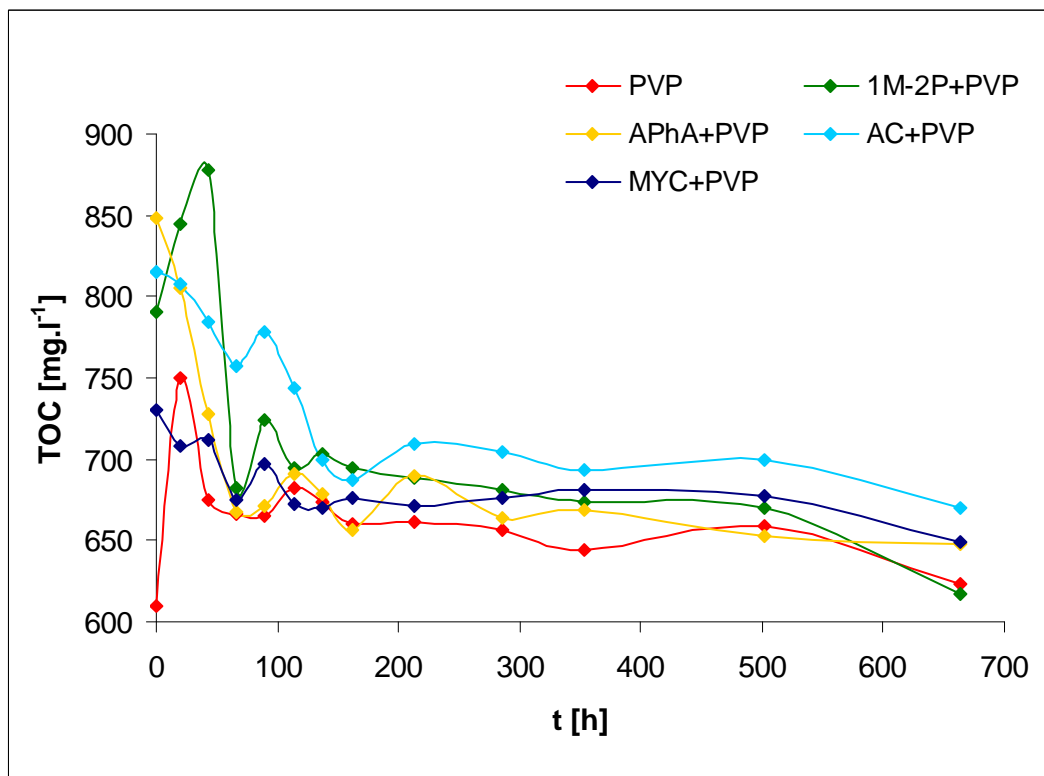
Priebeh Zahn-Wellensovho testu pre samostatné kosubstráty a mycélium je znázornený na obr. 24. Podľa tvaru kriviek, ktoré do cca 350 h poklesli na úroveň slepého pokusu, považujeme jednotlivé substráty za degradované. Z výsledkov vyplýva, že najrýchlejšie podlieha biodegradácii N-acetylphenylalanín.



Obr. 24: Priebeh úbytku TOC substrátov v čase

Priebeh kriviek odpovedajúcich vzorkám PVP v kombinácii s kosubstrátmi (obr.25) nenasvedčuje, že by dochádzalo k podpore biodegradácie polyméru. Hodnoty TOC sa v priebehu testu dostali len na úroveň samotného PVP a neklesli pod hladinu 600 mg.l^{-1} , ktorá by zodpovedala dávkovaniu PVP do testovacích nádob. Zaznamenaný úbytok uhlíka u vzoriek je daný odbúraním prídavných kosubstrátov a nemožno ho spájať s degradáciou polymérnej zložky suspenzie. PVP je podľa sledovania obsahu TOC v prostredí aktivovaného kalu

zo Slovenskej Ľupče stabilný a nepodlieha rozkladu. Tieto výsledky nekorešponujú s výsledkami testu na respirometri (kap. 7.1).



Obr. 25: Priebeh úbytku TOC vzoriek PVP v kombinácii s kosubstrátmi a mycéliom

ZÁVER

Cieľom práce bolo sledovanie biodegradácie PVP v aeróbnom prostredí pôdy a aktivovaného kalu. Hlavným zameraním práce bolo potvrdenie možnej cesty biodegradácie naznačenej v predchádzajúcich pokusoch s aktivovaným kalom z ČOV spracovávajúcej odpadovú vodu vznikajúcu pri výrobe penicilínu. Hoci bol aktivovaný kal z ČOV a.s., Slovenská Ľupča získaný v dobe výroby penicilínu v spoločnosti Biotika a.s., kedy bol už adaptovaný na substrát s laktámovou štruktúrou, k výraznej degradácii polyméru nedošlo. Avšak v kombinácii s mycéliom ako pomocnou degradačnou kultúrou sa dosiahlo percento rozkladu 25,15 %.

Vzorka samotného PVP najlepšie podlieha biorozkladu v pôdnom prostredí, resp. v prostredí pôdneho inokula, kde sa dosiahlo približne dvojnásobne vyššie percento degradácie ako pri použití aeróbných kalov. Tieto hodnoty sú však stále pomerne nízke a blízke oblasti zodpovedajúcej endogénnej respirácii, a preto sa pristúpilo k použitiu pomocných kosubstrátov. Cestu biologického rozkladu PVP (22,13 %) naznačovalo použitie aeróbného aktivovaného kalu z ČOV Malenovice v kombinácii s akrylamidom.

Pri použití kosubstrátov nemožno stanoviť jednoznačný trend, účinok na odbúravanie PVP závisí od kombinácie použitej látky a mikrobiálneho charakteru prostredia. V prostredí AK Malenovice je najúčinnjším prídavným kosubstrátom akrylamid, nasleduje 1-methyl-2-pyrrolidón. Pre pôdne inokulum je najlepšou kombináciou odpadové mycélium. Najvyššie percento degradácie bolo dosiahnuté v prostredí AK Slovenská Ľupča po zaočkovaní mycéliom, kde vidno výrazný nárast oproti ostatným prídavným kosubstrátom.

Z výsledkov vyplýva, že v aeróbnom prostredí pravdepodobne dochádza činnosťou mikroorganizmov a vplyvom prítomných kosubstrátov k čiastočnému štiepeniu laktámového kruhu polyvinylpyrrolidónu, ktoré zrejme nie je doprevádzané rozkladom polymérneho reťazca. Vznikajúce medziprodukty neboli v rámci práce identifikované.

ZOZNAM POUŽITEJ LITERATURY

- [1] Shah, A. A. a kol. Biological degradation of plastics: A comprehensive review, *Biotechnol. Adv.* 26, 246 – 265, (2008)
- [2] Hassouna, F. a kol. Photooxidation of poly(N-vinylpyrrolidone) (PVP) in the solid state and in aqueous solution, *Polym. Degrad. Stab.* 94, 2257-2266, (2009)
- [3] Bühler, V. Polyvinylpyrrolidone excipients for pharmaceuticals, Povidone, Crospovidone and Copovidone. Springer Berlin Heidelberg New York, (2005), ISBN 3-540-23412-8
- [4] Trimpin, S. a kol. Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr., A* 938, 67-77, (2001)
- [5] Katime, I. a kol. Preferential sorption of polyvinylpyrrolidone (PVP) in the binary solvent mixture water/DMF. *Polym. Bull.* 26, 587-594, (1991)
- [6] Ricca, M., Foderà, V., Giacomazza, D. Probing the internal environment of PVP networks generated by irradiation with different sources. *Colloid Polym. Sci.* 288, 969-980, (2010)
- [7] Fritz, O. G. Anomalous diffusion of erythrocytes in the presence of polyvinylpyrrolidone. *Biophysics* 46, 219-228, (1984)
- [8] Barros, J. A. G. a kol. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels produced by Fenton reaction. *Polymer* 47, 8414-8419, (2006)
- [9] Guha, A., Devireddy, R. Polyvinylpyrrolidone (PVP) mitigates the damaging effects of intracellular ice formation in adult stem cells. *Ann. Biomed. Eng.* 38, 1826-1835, (2010)
- [10] Ocegüera-Cervantes, A. a kol. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6214-6223, (2007)
- [11] Bader, M., Keener, S. A., Wrbitzky, R. Dermal absorption and urinary elimination of N-methyl-2-pyrrolidone. *Int. J. Occup. Med. Environ. Health* 78, 673-676, (2005)
- [12] CICAD (2001): N-Methyl-2-pyrrolidone (NMP). Concise International Chemical Assessment Document 35, Inter-Organization Programme for the Sound

- Management of Chemicals, United Nations Environment Programme, International Labour Organisation, World Health Organization, Geneva, 2001
- [13] Wu, J. J. a kol. Ozone-based advanced oxidation processes for the decomposition of N-methyl-2-pyrrolidone in aqueous medium. *Ozone: Sci. Eng.* 29, 177-183, (2007)
- [14] Den, W., Ko, F. H., Huang, T. Y. Treatment of organic wastewater discharged from semiconductor manufacturing process by ultraviolet/hydrogen peroxide and biodegradation. *IEEE Trans. Semicond. Manufacturing* 15, 540-551, (2002)
- [15] Day, M. a kol. Degradable polymers: the role of the degradation environment. *J. Environ. Polym. Degrad.* 5, 137-151, (1997)
- [16] Podešova, J., Kovářová, J. Možnosti přípravy makromolekulárních antidegradantů pro polymery. *Chem. Listy* 104, 1034-1039, (2010)
- [17] Mohee, R. a kol. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. *Waste Manage.* 28, 1624-1629, (2008)
- [18] Bianco, G. a kol. Thermal stability of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-methacrylic acid) copolymers in inert atmosphere. *Polym. Degrad. Stab.* 80, 567-574, (2003)
- [19] Horikoshi, S. a kol. Photocatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions V. Photomineralization of lactam ring-pendant polyvinylpyrrolidone at titania/water interfaces. *J. Photochem. Photobiol., A* 138, 69-77, (2001)
- [20] Aarathi, T., Shaama, M., Madras, G. Degradation of water soluble polymers under combined ultrasonic and ultraviolet radiation. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46, 6204-6210, (2007)
- [21] Taghizadeh, M. T., Bahadori, A. Degradation kinetics of poly(vinyl-pyrrolidone) under ultrasonic irradiation. *J. Polym. Res.* 16, 545-554, (2009)
- [22] Taghizadeh, M. T., Asadpour, T. Effect of molecular weight on the ultrasonic degradation of poly(vinyl-pyrrolidone). *Ultrason. Sonochem.* 16, 280-286, (2009)
- [23] Loraine, G. A. Oxidation of polyvinylpyrrolidone and an ethoxylate surfactant in phase-inversion wastewater. *Water Environ. Res.* 80, 373-379, (2008)
- [24] Hickey, A. M. a kol. Development and use of a microreactor for the study of biotransformations by a cross-linked γ -lactamase enzyme. *Biotechnol. Journal* 4, 510-516, (2009)

- [25]Wanga, J. a kol. Single-step purification and immobilization of γ -lactamase and on column transformation of 2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one. *Process Biochem.* 46, 81-87, (2011)
- [26]Brabban, A. D., Littlechild, J., Wisdom, R. Stereospecific gamma-lactamase activity in a *Pseudomonas fluorescens* species. *J. Ind. Microbiol.* 16, 8-14, (1996)
- [27]Line, K., Isupova, M. N., Littlechild, J. A. The crystal structure of a (-) γ -lactamase from an *Aureobacterium* species reveals a tetrahedral intermediate in the active site. *J. Mol. Biol.* 338, 519-532, (2004)
- [28]Červenáková, L. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2010)
- [29]Al-Bader, L. A. Dizertačná práce. King Saud University, (2004)
- [30]Genčurová, M. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2011)
- [31]ČSN EN ISO 14851. Stanovení úplné aerobní biodegradability plastů ve vodném prostředí – Metoda měření spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru, (2005)
- [32]ČSN EN ISO 29888. Jakost vod – Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí–Statická zkouška (Zahn–Wellensova metoda), (2000)
- [33]Klívar, S. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2010)
- [34]Abd El-Mohdy, H. L., Ghanem, S. Biodegradability, antimicrobial activity and properties of PVA/PVP hydrogels prepared by γ -irradiation. *J. Polym. Res.* 16, 1 – 10, (2009)
- [35]Borošová, B., Nепublikované zdelenie

ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

AC	Akrylamid
AK	Aktivovaný kal
APhA	N-acetylphenylalanín
ATM	allylthiomočovina
BSK	Biologická spotreba kyslíka
BSK ₀	Celková biologická spotreba kyslíka slepého stanovenia
BSK _t	Celková biologická spotreba kyslíka
ČOV	Čistiareň odpadových vôd
CHSK _{Cr}	Chemická spotreba kyslíka stanovená dichrómanovou metódou
D	Percento biologického rozkladu
IC	Koncentrácia anorganického uhlíka
Kap.	Kapitola
m	Hmotnostná koncentrácia
m ₀	Hmotnosť filtračného papiera
m _n	Hmotnosť po vysušení kalu
1M-2P	1-methyl-2-pyrrolidón
Mr	Relatívna molekulová hmotnosť
MYC	Mycélium
NMP	N-methyl-2-pyrrolidón
Obr.	Obrázok
PVP	Polyvinylpyrrolidón
SD	Smerodajná odchýlka
t	Čas
Tab.	Tabuľka

t_{lag}	Lagová fáza
TC	Koncentrácia celkového rozpusteného uhlíka
TOC	Koncentrácia celkového rozpusteného organického uhlíka
TSK	Teoretická spotreba kyslíka
UV	Ultrafialové žiarenie
V	Pipetovaný objem
X	Sušina

ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1: Štruktúra PVP.....	12
Obr. 2: Správanie sa PVP vo vodných roztokoch.....	13
Obr. 3: Reppeho syntéza N-vinylpyrrolidón.....	14
Obr. 4: Reakčný mechanizmus radikálovej polymerizácie N-vinylpyrrolidónu vo vode	14
Obr. 5: Reakčný mechanizmus polymerizácie N-vinylpyrrolidónu v 2-propanole	14
Obr. 6: Typická štruktúra častíc sprejovo sušeného povidónu	16
Obr. 7: Chemická štruktúra NMP	18
Obr. 8: Otváranie laktámového kruhu pri fotooxidácii PVP	25
Obr. 9: Tri možné pozície makroradikálu vzniknutého reakciou hydroxyl radikálu s PVP.....	25
Obr. 10: Celková BSK vzorky PVP v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín–Malenovice	39
Obr. 11: Substrátová BSK kosubstrátov a mycélia v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice.....	40
Obr. 12: Vplyv kosubstrátov a mycélia na percento degradácie PVP v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice	40
Obr. 13: Hodnoty celkovej BSK vzorky PVP, akrylamidu a ich kombinácie v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice	41
Obr. 14: Celková BSK vzorky PVP, mycélia a ich kombinácie v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Ľupča.....	42
Obr. 15: Percento degradácie vzorky PVP bez a po zaočkovaní mycéliom v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Ľupča.....	43
Obr. 16: Hodnoty substrátovej BSK vzorky PVP o dvoch rôznych koncentráciách a po prídavku N-allylthiomocoviny	45
Obr. 17: Hodnoty celkovej BSK PVP 1000 v kombinácii s akrylamidom a po prídavku N-allylthiomocoviny	45
Obr. 18: Celková BSK vzorky PVP, 1-methyl-2-pyrrolidónu a glukózy v pôdnom prostredí.....	46
Obr. 19: Celková BSK vzorky PVP v prostredí pôdneho inokula.....	48
Obr. 20: Substrátová BSK rôznych substrátov a mycélia v prostredí pôdneho inokula	48

Obr. 21: Vplyv kosubstrátov a mycélia na percento degradácie PVP v prostredí pôdneho inokula	49
Obr. 22: Hodnoty celkovej BSK vzorky PVP, vzorky mycélia a ich kombinácie v prostredí pôdneho inokula	49
Obr. 23: Porovnanie vplyvu kosubstrátov a mycélia na percento biologického rozkladu samotného PVP v rôznych prostrediach.....	50
Obr. 24: Priebeh úbytku TOC substrátov v čase.....	53
Obr. 25: Priebeh úbytku TOC vzoriek PVP v kombinácii s kosubstrátmi a mycéliom.....	54

ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1: Percentuálne zastúpenie prvkov v mycéliu stanovené elementárnou analýzou.....	31
Tab. 2: Hodnoty TSK a percento obsahu uhlíka v molekulách použitých substrátov	33
Tab. 3: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe v prostredí aktivovaného kalu ČOV Zlín-Malenovice	38
Tab. 4: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe v prostredí aktivovaného kalu ČOV Slovenská Ľupča.....	42
Tab. 5: Hodnoty pH, sušiny a TOC vzoriek na vstupe a na výstupe	44
Tab. 6: Hodnoty pH a TOC vzoriek pôdneho inokula na vstupe a výstupe.....	47
Tab. 7: Koncentrácie substrátov a mycelia v nádobách Zahn-Wellens testu.....	52
Tab. 8: Usporiadanie vzoriek Zahn-Wellens testu.....	52

EVIDENČNÝ LIST DIPLOMOVEJ PRÁCE

Sigla (miesto uloženia diplomovej práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Názov diplomovej práce	Možnosti odstraňovania polyvinylpyrrolidónu (PVP) biologickou cestou The possibility of biological disposal of polyvinylpyrrolidone (PVP)
Autor diplomovej práce	Bc. Mária Vašková
Vedúci diplomovej práce	Prof. Ing. Jan Kupec, CSc.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysokej školy	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín Fakulta technologická, nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájenia DP	2011
Počet strán	63
Počet zväzkov	3
Vybavenie	25 obrázkov, 8 tabuliek
Kľúčové slová	polyvinylpyrrolidón, biochemická spotreba kyslíka, biodegradácia, respirometer polyvinylpyrrolidone, biochemical oxygen demand, biodegradation, respirometer