

Iniciace biologického rozkladu polyvinylalkoholu v půdním prostředí

Bc. Silvie Pekařová

Diplomová práce
2012



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Silvie PEKAŘOVÁ**
Osobní číslo: **T10342**
Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Iniciace biologického rozkladu polyvinylalkoholu
v půdním prostředí**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární rešerši na zadané téma se zaměřením na: biodegradaci polyvinylalkoholu (PVA) v půdním prostředí; teoretické iniciátory biologického rozkladu PVA v půdním prostředí; možnosti využití aktivovaného kalu k iniciaci biologického rozkladu špatně biologicky rozložitelných xenobiotik v půdním prostředí; postupy inokulace půdy aktivovaným kalem.
2. V experimentální části: optimalizujte metodu stanovení biologického rozkladu organické látky (PVA) v půdě inokulované aktivovaným kalem pomocí respirometru BI2000 (Bioscience corp., USA); proveďte testy biologické rozložitelnosti PVA v půdě inokulované aktivovaným kalem adaptovaným na PVA, v případě negativních výsledků navrhnete (na základě literární studie) a otestujte další potenciální iniciátory rozkladu.
3. Naměřená a vypočtená data zpracujte a dosažené výsledky kriticky zhodnoťte.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

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

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Markéta Julinová, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

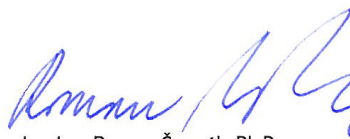
Datum zadání diplomové práce:

13. února 2012

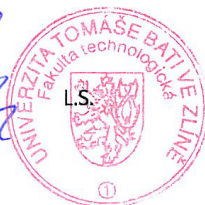
Termín odevzdání diplomové práce:

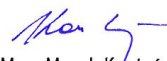
4. května 2012

Ve Zlíně dne 13. února 2012



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan





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

Příjmení a jméno: PEKAŘOVÁ SILVIE

Obor: IOŽP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 4.5.2012


.....

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

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

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

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

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

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

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

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

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

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

ABSTRAKT

Tato práce se zabývá studii biologického rozkladu PVA v půdním prostředí inokulovaném odpadní biomasou. Pro samotný rozklad PVA v půdě byl použit adaptovaný aktivovaný kal z čistírny odpadních vod a odpadní mycelium z výroby antibiotik obsahující kmen *Penicillium chrysogenum*. V první části práce jsou popsány optimalizační testy, jejichž úkolem bylo zajistit vhodný postup bioaugmentace. Tedy postup při inokulaci půdy biomasou aktivovaného kalu a také příprava zkušební roztoku PVA. Druhá část se zabývá samotným rozkladem PVA v půdě inokulované na PVA adaptovaným aktivovaným kalem a okrajově je popsána biodegradace PVA za přítomnosti kmene *Penicillium chrysogenum* ve vodné suspenzi. Rozklad PVA v půdě po bioaugmentaci na PVA adaptovaným aktivovaným kalem byl 60 % za 40 dní, rozklad PVA v samotné půdě nebyl po tuto dobu zaznamenán. Opakovaným přidavkem PVA do inokulované půdy došlo opět k jeho rozkladu (52 % za 16 dní), což ukazuje že PVA-degradující mikroorganismy si zanechávají svou degrační aktivitu i po odstranění substrátu. Adaptace odpadního mycélia na PVA byla úspěšná jen po prvním přidavku PVA (TOC<20 mg/l), ovšem druhým přidavkem PVA k rozkladu nedošlo. Je tedy nutné podrobit odpadní mycélium dalším respirometrickým testům a zhodnotit, zdali je možné ho využít při biodegradaci PVA v půdě.

Klíčová slova: Inokulace, bioaugmentace, aktivovaný kal, *Penicillium chrysogenum*, půda, biodegradace, PVA

ABSTRACT

This thesis deals with the study of biological partition of PVA in soil environment inoculated by waste biomass. For the partition of the PVA in soil itself, activated sludge from waste treatment plant as well as waste mycelium from the production of antibiotics containing *Penicillium chrysogenum* stem, was used. First part of the thesis describes optimization tests with a view to cover the suitable procedure of bioaugmentation, in other words, procedure along with inoculation of soil by sludge activated with biomass, as well as preparation of PVA test solution. Next part of the thesis deals with the PVA partition in soil inoculated to PVA by adapted activated sludge, and also biodegeneration of PVA in the presen-

ce of *Penicillium chrysogenum* in aqueous suspension is described marginally. PVA partition in soil after the bioaugmentation to PVA adapted by activated sludge was 60 % in 40 days, partition in PVA in the soil itself was not observed at all. By means of repeated addition of PVA into inoculated soil, the partition was reached again (50 % in 16 days), which points at the fact that PVA-degrading micro-organisms leave their own degrading activity beyond the removal of substrate. Adaptation of waste mycelium on PVA was successful only after first addition of PVA (TOC < 20 mg/l). Second addition evoked no desired reaction - PVA was not parted. It is necessary to put the waste mycelium through another respirometric tests and to evaluate, whether it is possible to use it during biodegradation of PVA in soil.

Keywords: inoculation, bioaugmentation, activated sludge, *Penicillium chrysogenum*, soil, biodegradation, PVA

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu diplomové práce Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za ochotu a obětavost, poskytnutí cenných rad a připomínek, které mi pomohly vypracovat tuto práci. Dále děkuji celému kolektivu na Ústavu inženýrství životního prostředí za bezproblémovou spolupráci a vytvoření skvělých pracovních podmínek.

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

OBSAH

ÚVOD	11
I TEORETICKÁ ČÁST	13
1 MECHANISMUS BIODEGRADACE PVA	14
1.1 BIODEGRADACE PVA VE VODNÍM A PŮDNÍM PROSTŘEDÍ.....	16
2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVA SMĚSÍ V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ	19
2.1 BIODEGRADACE PVA V PŮDĚ – VLIV PŘÍRODNÍCH ORGANICKÝCH PLNIV	19
2.2 BIODEGRADACE PVA V PŮDĚ – VLIV KUKUŘIČNÉHO ŠKROBU A LIGNOCELULOZOVÝCH VLÁKEN	20
2.3 BIODEGRADACE V PŮDĚ - SMĚS PVA/CHEMICKY MODIFIKOVANÝ ŠKROB (RS4).....	21
2.4 BIODEGRADACE V PŮDĚ – SMĚS PVA A VODNÍ ŘASY	21
2.5 SMĚS PVA S EPOXIDOVÝMI OLEJI	22
3 BIOAUGUMENTACE	24
3.1 BIOREMEDIACE PŮDY KONTAMINOVANÉ PENTACHLORFENOLEM	24
3.2 BIOREMEDIACE PŮDY KONTAMINOVANÉ UHLOVODÍKY KOMBINACÍ BIOSTIMULACE A BIOAUGUMENTACE POMOCÍ VLÁKNITÉ HOUBY	25
3.3 BIOREMEDIACE PŮDY KONTAMINOVANÉ FTALÁTY PO BIOAUGUMENTACI ADAPTOVANÝM AKTIVOVANÝM KALEM	26
4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE	27
5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
5.1 TESTOVANÝ VZOREK, POUŽITÉ MATERIÁLY, CHEMIKÁLIE, ROZTOKY A PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	28
5.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL.....	30
5.3 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI PVA	31
5.3.1 Hodnocení úplné biologické rozložitelnosti PVA stanovením biologické spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru	31
5.3.2 Zahn – Wellensův test.....	35
5.4 LABORATORNÍ ANALÝZY A POSTUPY	36
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
6 OPTIMALIZACE TESTŮ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU PVA V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ V RESPIROMETRU BI-2000	41
6.1 VOLBA VHODNÉHO TYPU PŮDY PRO BIODEGRADACI PVA.....	41
6.2 VOLBA VHODNÉHO MÉDIA PRO PŘÍPRAVU ZÁSOBNÍHO ROZTOKU PVA	44
6.3 INOKULACE PŮDY BIOMASOU AKTIVOVANÉHO KALU	47
6.4 VOLBA VHODNÉHO NOSIČE PRO BIOMASU AKTIVOVANÉHO KALU	49
6.4.1 Využití pilin, jako nosiče pro biomasu AK.....	50
6.4.2 Využití perlitu, jako nosiče pro biomasu AK.....	52
7 ROZKLAD PVA V PŮDĚ INOKULOVANÉ NA PVA ADAPTOVANÝM AKTIVOVANÝM KALEM	55
8 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVA ZA PŘÍTOMNOSTI KMENE PENICILLIUM CHRISOGENUM	62
ZÁVĚR	64

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	66
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	71
SEZNAM OBRÁZKŮ	73
SEZNAM TABULEK	75

ÚVOD

Polyvinylalkohol (PVA) byl objeven F.Klatte v roce 1915. Jeho výrobu zmýdelněním polyvinilacetátu s hydroxidem sodným popsali Herrmann a W Haehnel v roce 1924 a od 30. let 20. století je považován za biologicky rozložitelný syntetický polymer ve vodném aerobním prostředí.[1]

Nejvýznamnější vlastností PVA pro praktické využití je jeho rozpustnost ve vodě a vysoká odolnost vůči organickým rozpouštědlům. Hlavními veličinami ovlivňujícími jeho fyzikální vlastnosti jsou polymerační stupeň a stupeň hydrolyzy, resp. reesterifikace (zbytkový obsah hydroxylových a acetátových funkčních skupin). Jestliže je PVA plně hydrolyzovaný je zcela rozpustný jen v horké a vařící vodě. Částečně hydrolyzovaný PVA je rozpustný při pokojové teplotě. PVA se stupněm hydrolyzy 70-80 % je rozpustný pouze ve vodě při teplotách do 40°C. Při teplotách vyšších jak 40°C dochází při jeho rozpouštění nejprve k zakalení roztoku a následuje vysrážení PVA.[2]

PVA má v současné době široké využití v celé řadě průmyslových aplikací. Například v potravinářském průmyslu na přípravu ovocného želé, dále k výrobě impregnačních hmot, díky kterým materiál odolá benzínu, olejům, rozpouštědlům, ale i tukům. Našel uplatnění v textilním průmyslu, kde se z něj vyrábí textilní vlákna, ve zdravotnictví na výrobu chirurgických nití, ve farmaceutickém průmyslu na potahy tablet. Využívá se také při výrobě biofermentačních produktů, v kosmetickém průmyslu na výrobu krémů a vlasových přípravků. Také se z něj vyrábí obalové materiály, těsnění různého typu, hadice, trubky a mnoho dalšího.[3]

Z environmentálního hlediska je důležité zejména jeho uplatnění v zemědělství a agroprůmyslu, kde se využívá např. na výrobu repelentů proti švábům a roztočům, na hnojiva upravené polyvinylalkoholem s pomalým uvolňováním, také na přípravu vodorozpustných folií (tzv. secí pásy) a mořidel, které se nanášejí na semena.[4] Po jeho aplikaci v zemědělství dochází k jeho akumulaci v půdě (vysoká schopnost sorbovat se na půdní částice, špatná biologická rozložitelnost), což může vést ke změně fyzikálně-chemických vlastností půdy. Proto je třeba věnovat pozornost odstranění PVA z půdního prostředí a to podpořením jeho biologického rozkladu. K tomu lze využít dva možné způsoby. Prvním je podpoření rozkladu přísadkami snadno rozložitelných látek, při jejichž rozkladu může docházet k produkci enzymů podílejících se na rozkladu samotného PVA (výroba směsných filmů). Druhým je tzv. bioaugmentace využívající směsných nebo čistých mikrobiálních kultur schopných rozkladu PVA.

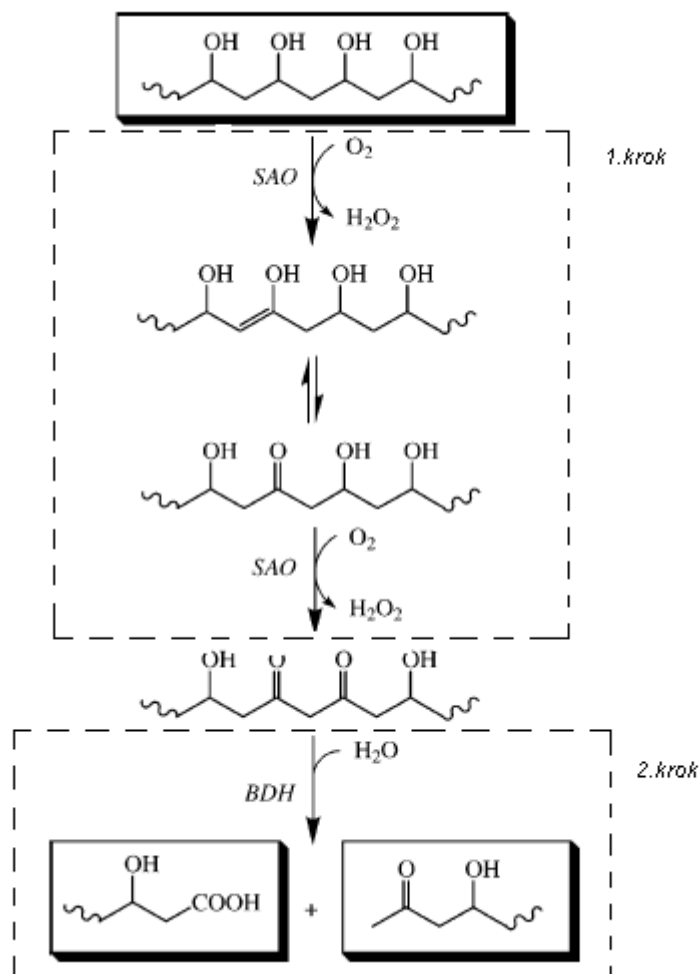
Tato diplomová práce se zabývá studiem biologického rozkladu PVA v půdním prostředí po bioaugmentaci - obohacení půdní mikrobiální biocenózy mikroorganismy aktivovaného kalu schopného rozkládat PVA. Práce tak navazuje na dlouhodobý výzkum na ústavu Inženýrství ochrany životního prostředí v oblasti biologického rozkladu PVA.

TEORETICKÁ ČÁST

1 MECHANISMUS BIODEGRADACE PVA

V roce 1973 bylo poprvé zjištěno, že PVA je zcela degradován pomocí mikroorganismů, které byly izolovány z půdních vzorků a identifikovány jako *Pseudomonas*. Od roku 1973 pak byla publikována celá řada vědeckých prací studujících biologický rozklad PVA jak čistými mikrobiálními kulturami tak směsnými. Např. byla studována biodegradace PVA pomocí *Flammulina velutipes* [5], degradace PVA s využitím *Sphingomonas sp SA3* a jeho symbiontů [6], biologický rozklad PVA pomocí *Mikrobakterium barkeri* KCCM 10507 a *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 izolovaných z odpadních vod [7]. Studován byl také vliv pH a poměru biogenních prvků C/N na biodegradaci PVA ve směsné bakteriální kultuře [8]. Zároveň byla izolována celá řada mikroorganismů podílejících se na rozkladu PVA např. byla provedena izolace a charakterizace PVA degradující bakterie *Sphingopyxis sp PVA3* [9] nebo byl identifikován nový kmen *Streptomyces venezuelae* GY1 produkující PVA degradující enzym [10] a nebo byla popsána izolace a degradační aktivita PVA degradujícího kmene *Cardiobacterium sp. SB68* a *SB69* [11].

Bylo navrženo několik různých mechanismů biodegradace PVA v závislosti na typu mikroorganismu a studovaném prostředí. Např. byla autory Watanabem a kol.[12] obr.1, popsána studie významu enzymatických reakcí při odbourávání PVA o vysoké molekulové hmotnosti. Zde byl uhlíkový řetězec PVA rozštěpen dvěma po sobě jdoucími reakcemi. V prvním kroku sekundární alkohol oxidasa (SAO) katalyzoval oxidaci PVA pomocí molekulárního kyslíku, jako akceptoru elektronů na tvorbu peroxidu vodíku a β -diketonových skupin v molekulách PVA. Ve druhém kroku dochází ke štěpení β -diketonových skupin v molekule PVA za vzniku karboxylových a methylových zbytků produktů rozkladu. Jako velmi významný enzym podílející se na rozkladu PVA byl autorem označen SAO, který byl izolován z půdy a extrahován z kmene *Pseudomonas*. [13]



Obr. 1. Biologický rozklad PVA zprostředkovaný sekundárním alkoholem oxidasa (SAO) a β -diketonovou hydrolasou (BDH)

Další možný mechanismus rozkladu PVA popsal Shiamo a kol. [14], který se zaměřil na symbiotickou degradaci PVA. Ve své studii izoloval dva kmeny, *Pseudomonas putida* VM15A a *Pseudomonas sp.* VM15C a zjistil, že obě kultury jsou na sobě závislé při biodegradaci PVA, kdy kultura VM15A dodává potřebný kofaktor pyrrolochinolinchinon (PQQ), a kultura VM15C produkuje degradační enzymy. PQQ je nekovalentně vázaná prostetická skupina mnoha chinoproteinů, které se vyskytují v periplasmatickém prostoru určitých gram negativních bakterií, kde katalyzují oxidaci alkoholů nebo sacharidů. Z mnoha již popsaných studií vyplývá, že PQQ je důležitým faktorem pro činnost dehydrogenas, které oxidují PVA. [15]

Z výše uvedených studií je zřejmé, že mikroorganismů, které se podílejí na degradaci PVA pomocí svých enzymatických systémů je celá řada. Tyto kultury byly izolovány z půdního i vodního prostředí, ale také například z odpadních vod či aktivovaného kalu.

Typy doposud známých enzymů, pomocí kterých se zmiňované bakteriální druhy podílejí na odbourávání PVA: [16]

1. Oxidasa sekundárních alkoholů (SAO) oxidující dvě sousední sekundární OH skupiny uvnitř řetězce PVA
2. Dehydratasa (β -diketon hydrolasa), která uskutečňuje štěpení řetězců
3. PVA-dehydrogenasa (PVADH) účinná jen v přítomnosti pyrollochynolin-chinonu (PQQ)
4. Oxidasa, která je aktivní jen vůči již oxidovanému PVA

1.1 Biodegradace PVA ve vodním a půdním prostředí

Byla publikována řada prací k problematice biologického rozkladu PVA ve vodním prostředí při aerobních podmínkách, neboť PVA je ve vodě rozpustný polymer. Např. Chiellini a kol. [17] provedli studii rozkladu PVA s 98% stupněm hydrolýzy ve vodě inokulované aktivovaným kalem. PVA bylo degradováno z 50 % za 70 dní. Dalším experimentem byla adaptace aktivovaného kalu, přidáním definovaného množství PVA, který zde sloužil jako jediný zdroj uhlíku a energie. V přítomnosti adaptovaného kalu rozsah biologického rozkladu PVA98 dosáhl větších hodnot, než u předchozího testu. PVA zde bylo degradováno na 60 % za 25 dní. [17]

Na rozklad PVA v půdním prostředí bylo zaměřeno také několik studií. Např. Solaro a kol. [18] se zabývali rozkladem PVA se stupněm hydrolýzy 88 a 98 % metodou půdního Soil burial testu. Kdy u PVA s nižším stupněm hydrolýzy byl pozorován větší sklon k mikrobiální asimilaci než u PVA98, avšak degradace obou vzorků nepřesáhla 15 %.

Velmi omezený sklon k biodegradaci u plně hydrolyzovaného PVA pozoroval Sawada [19], kdy vzorky PVA99 byly „pohřbeny“ (soil burial test) v různých půdách na 18 odlišných místech. Takové uložení představovalo různé typografické a klimatické podmínky. Po dvou letech inkubace byla zaznamenána ztráta hmotnosti pouze 10 %.

V tabulce 1 je uveden stručný přehled vybraných studií zabývajících se biologickým rozkladem PVA v různých typech prostředí.

Tab. 1. Příklady studií biologického rozkladu PVA za různých podmínek

% hydrolyzy PVA	Prostředí	Mikrobiální zastoupení	Kritérium biodegradace	Rozklad PVA (%)	Čas (dny)	Autor
88	Kompost	Mikroorganismy přítomné v kompostu	produkce CO ₂	25	300	Chiellini a kol. [17]
72	Půda lesního typu	Půdní mikroorganismy	produkce CO ₂	17,4	141	Chiellini a kol [20]
99	Půda lesního typu	Půdní mikroorganismy	produkce CO ₂	6	141	
98	Vodné aerobní	AAK* kal z ČOV z papírenského průmyslu	produkce CO ₂	46	48	Corti a kol. [21]
88	Vodné aerobní	AAK kal z ČOV z papírenského průmyslu	produkce CO ₂	38	48	
98	Vodné aerobní	AK* kal z ČOV z papírenského průmyslu	produkce CO ₂	50	70	Chiellini a kol [17]
98	Vodné aerobní	AAK kal z ČOV z papírenského průmyslu	produkce CO ₂	60	28	
88	Vodné aerobní	laboratorně AAK kal z komunálních odpadních vod	produkce CO ₂	94,4	16	Vojtek 2004 [16]
88	Vodné aerobní	Kultura OT3+ <i>Rhodococcus</i>	Spektrofotometrické stanovení PVA	81,5	42	Vlčková 2005 [22]

* AAK – adaptovaný aktivovaný kal

*AK – aktivovaný kal

Jak je z přehledu uvedeného v tabulce 1 patrné, rozklad PVA ve vodném prostředí je za vhodných podmínek efektivnější oproti jeho degradaci v půdě. Faktorů, ovlivňujících rozklad PVA je několik. Například absence nebo jen vzácný výskyt PVA-degradujících mikroorganismů v půdním prostředí, hmotnost, velikost a tvar testovaných PVA vzorků, silné interakce PVA s organickými a anorganickými složkami prostředí (sorpce na půdní částice) a v neposlední řadě stupeň hydrolyzy. Příkladem je studie rozkladu PVA filmů v půdním prostředí se stupněm hydrolyzy 98, 88 a 72, kterou provedl Corti a kol. [23]. Zde

k nejvyššímu rozkladu došlo u PVA72 a nejméně se rozložil PVA98. Ze získaných výsledků lze usoudit, že schopnost mikroorganismů rozkládat PVA v půdě závisí na stupni hydrolyzy. PVA se tak v půdním prostředí akumuluje a může ovlivňovat fyzikálně-chemické parametry půdy. Proto je snaha podpořit rozklad PVA v půdě. Toho lze v současnosti docílit dvěma způsoby.

1. Příprava směsných filmů – principem je podpořit rozklad přidavkem snadno rozložitelných látek pokud možno z obnovitelných zdrojů (škrob, lignin, celuloza atd.). V této oblasti byla publikována celá řada prací, v kapitole 2 jsou některé studie podrobněji popsány.
2. Bioaugmentace – principem této metody je inokulace kontaminovaného prostředí mikroorganismy, které mají schopnost degradovat přítomné polutanty. Informace o degradaci PVA tímto způsobem nejsou doposud dostupné, ale pomocí bioaugmentace byla odstraněna celá řada xenobiotik. Například byla publikována biodegradace polychlorovaných bifenylyů po bioaugmentaci půdy *Arthrobacter sp.* B1B a *Ralstonia eutrophus* H850, či odstranění 1,2,4-trichlorbenzenu po inokulaci půdy *Pseudomonas sp.* P51, dále také odstranění fenolu po bioaugmentaci půdy *Comamonas sp.* RN7(R503) izolovaného z aktivovaného kalu a mnoho dalších.[24] Kapitola 3 podrobněji popisuje odstranění kontaminace některých polutantů využitím bioaugmentace.

2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVA SMĚSÍ V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ

Jako nejvhodnější plniva pro přípravu směsných filmů na bázi PVA s potenciálem zvýšení biologického rozkladu samotného polymeru lze využít některé typy biopolymerů. Jejich přidávkou dochází nejen ke snížení ceny materiálu, ale také v některých případech ke zlepšení technologicko-uživatelských vlastností a v ideálním případě i k zamýšlené podpoře biologického rozkladu. Proto se biopolymery, jako je například celulóza, škrob, chitin, želatina nebo lignin staly středem zájmu pro přípravu směsí s PVA. V následujících kapitolách je uvedený stručný přehled modifikací PVA, pozornost je věnována především studiu biorozkladu těchto směsí v půdním prostředí.

2.1 Biodegradace PVA v půdě – vliv přírodních organických plniv

Corti a kol. [23] se zaměřili na rozklad PVA v půdním prostředí s využitím surovin z obnovitelných zdrojů a to želatiny, vylisované cukrové třtiny a lignocelulózy. Z těchto materiálů byly připravené směsi s PVA, pro potenciální využití jako zemědělské mulčovací folie. Byla také zkoumána závislost biologického rozkladu komerčních vzorků na stupni hydrolýzy.

Pro respirometrické testy, které byly prováděny za simulovaných půdních podmínek byl autory použit PVA se stupněm hydrolýzy 98, 88 a 72 %, odpadní želatina (OŽ) z farmaceutického průmyslu obsahující glycerol a pigmenty, cukrová třtina (CT). PVA směsi na bázi filmů byly připraveny válcováním a následným lisováním při teplotě 170 – 180°C.

Respirometrické biodegradční testy byly provedeny v 11 Erlenmayerových baňkách, které obsahovaly vícevrstvý substrát s následujícím složením: dno obsahovalo 20 g perlitu, střední vrstva byla naplněná směsí 20 g perlitu a 10 g lesní půdy a byla pokryta 20 g perlitu. Každá vrstva byla smíchána s 20 ml destilované vody. Dané vzorky byly uloženy ve střední vrstvě. Rozsah biologického rozkladu (mineralizace) byl hodnocen z množství vyprodukovaného CO₂ v testovací baňce odečtené od slepého pokusu a byl vyjádřen jako procento teoretického množství CO₂.

V případě PVA98/CT, kdy poměr obou látek byl 1:1 a inkubace probíhala po dobu 157 dní došlo k mineralizaci z 23,7 %. Během stejné doby mineralizace čistého PVA byla 9,2 % a cukrové třtiny 34,3 %. Autoři uvádí mírné zvýšení biodegradace dané směsi.

Směs PVA88/OŽ byla v poměrech PVA/OŽ : 90/10, 80/20 a 20/80 hmotnostních procent. Směsi s největším obsahem odpadní želatiny (OŽ 80%) odpovídala hodnota mineralizace

40,7 %, ovšem v případě čisté želatiny proběhla mineralizace z 82 %, u samotného PVA88 byla mineralizace jen 13,3 %. Po 45 dnech testu bylo zjištěno, že s rostoucím obsahem PVA ve směsi klesalo procento rozkladu.[23]

2.2 Biodegradace PVA v půdě – vliv kukuřičného škrobu a lignocelulózových vláken

Imam a kol. [25] studovali biologický rozklad směsí, které byly připraveny z lignocelulózových vláken a PVA. Směsi v podobě filmů byly odlity z vodné suspenze s nebo bez hexamethoxymethylmelaminem (HMMM), který plnil funkci síťovacího činidla. Jako změkčovadla byla použita močovina a glycerol. Byl přidán kukuřičný škrob ke zvýšení obsahu obnovitelných surovin a také pro snížení celkových nákladů. U takto připravených filmů byla hodnocena jejich biologická odbouratelnost v půdním prostředí pomocí respirometrických testů (respirometr Micro-Oximax).

Jako vstupní materiály byly použity PVA se stupněm hydrolyzy 95,5 – 96,5 %, HMMM se stupněm methylace 97 %, kyselina citronová, glycerol, močovina, lignocelulózová vlákna (LV), což jsou zbytky ovocných šťáv po extrakci a kukuřičný škrob (KŠ) s obsahem přibližně 30 % amylyasy a 70 % amylopektinu.

Byly připraveny směsi PVA/KŠ, PVA/KŠ/HMMM, PVA/LV/KŠ, PVA/LV/KŠ/HMMM a PVA/LV. Asi 500 mg každé směsi v podobě filmu bylo rozřezáno na malé kousky a smícháno s 25 g kompostu v 250 ml reakčních baňkách. Vývoj CO₂ byl zaznamenáván každých 6 hodin po dobu 55 dnů a více.

Ze získaných výsledků byla zjištěna větší mineralizace u vzorku PVA/LV/KŠ ve srovnání s PVA/LV/KŠ/HMMM, který obsahuje 8 % síťovacího činidla. Produkce CO₂ u směsi PVA/LV/KŠ byla mnohem vyšší, než ve vzorku bez PVA což naznačuje, že degradace PVA byla stimulována přítomností LV a KŠ plniv ve směsi. Množství CO₂ uvolněného z přísad (LV/KŠ, LV/KŠ/HMMM) překročil hodnotu odpovídající 100% mineralizaci, to znamená, že škrob spolu s dalšími přísadami jako je močovina a glycerin snadno poskytnou uhlík a dusík, které zlepšují mineralizační kapacitu půdy. Rozklad zesíťovaného a nezesíťovaného PVA zůstal okolo 2 %. [25]

2.3 Biodegradace v půdě - Směs PVA/chemicky modifikovaný škrob (RS4)

V této studii byla zkoumána biodegradabilita směsí PVA se stupněm hydrolyzy 99 % s chemicky upraveným škrobem (RS4) a s kukuřičným škrobem (KŠ), jako aditiva zde byl glycerol (G) a kyselina citronová (CK). Filmy byly připravovány mícháním a následným odléváním.

Test biodegradace v půdě byl proveden podle modifikovaného postupu Deviho a kol. [26]. Nádoby s přibližnou kapacitou 10 l byly naplněné zemědělskou půdou, filmy daných směsí byly nakrájeny na malé kousky a uloženy v půdě do hloubky 10 cm, půda byla kropena vodou v pravidelném časovém intervalu tak, aby vlhkost byla mezi 20 – 40 %. Degradace vzorku byla stanovována v pravidelných časových intervalech (15 dní) gravimetricky. Úbytek hmotnosti vzorku v čase byl indikací rychlosti degradace v půdě. Test probíhal 5 měsíců.

U všech filmů došlo k rychlé degradaci v prvních 60 dnech, poté následovala pomalá degradace až do ukončení testu. Směs PVA/KŠ/G byla degradována na 42 % ovšem u směsi PVA/KŠ/CK proběhl 60 % rozklad. U vzorku PVA/RS4/G proběhla 40 % degradace a u PVA/RS4/CK 57 %. Samotné PVA prokázalo vysokou odolnost vůči rozkladu v půdě, bylo dosaženo pouze 18% degradace. [27]

2.4 Biodegradace v půdě – Směs PVA a vodní řasy

Řasy a mořské řasy byly používány mnoho let v zemědělství jako hnojiva, pomocné půdní látky či rostoucí medium. Účinnost „zeleného hnojení“ byla prokázána hlavně kvůli vysoké koncentraci draselných solí, ale také díky stopovým prvkům a růstovým faktorům jako je citokinin, betain nebo auxin. Řasy patří mezi obnovitelné zdroje mořského původu a mohou být využity na výrobu eko- kompozitů.[28]

Chiellini a kol. [28] využili pro přípravu směsí s PVA vlákna zelené řasy *Ulva armoricana*. Na přípravu kompozitů byl použit PVA se stupněm hydrolyzy 88%, zelené řasy *Ulva armoricana* (U), kukuřičný škrob (KŠ) a glycerol (G). Filmy byly připravovány odléváním a následným odpařováním na Petriho miskách při pokojové teplotě.

Respirometrický test obsahoval z menší části půdu a z větší části hygroskopický hlinito-křemičitan (perlit). Válcová skleněná nádoba o objemu 500ml obsahovala tři vrstvy. První

vrstva byla složená z 15 g perlitu s 45 ml vody, druhou vrstvu tvořilo 10 g půdy, 5 g perlitu, 15 ml vody a 350 mg vzorku a třetí vrstva se skládala s 15 g perlitu a 45 ml vody. Vyprodukovaný CO₂ byl absorbován do roztoku 0,05 N KOH, který se následně titroval 0,1 N HCl.

Studie prokázala pozitivní výsledky u kompozitů s vysokým obsahem přírodních plniv. Film, který se skládal z PVA, *Ulva armoricana*, kukuřičného škrobu a glycerolu v poměru hmotnostních procent PVA 40 % : *Ulva* 20 %: škrob 20 %: glycerol 20 % byl mineralizován z 50 % (což odpovídá obsahu snadno rozložitelných komponent). U samotné řasy došlo k mineralizaci přes 80 %. Mineralizace probíhala 150 dní.

V tomto výzkumu byla zelená řasa označena jako vhodné plnivo pro výrobu kompozitů s PVA. Mechanické vlastnosti těchto kompozitů jsou příznivé pro výrobu materiálů a výrobků s využitím v zemědělství.

2.5 Směs PVA s epoxidovými oleji

Polymery z rostlinných olejů jako je lněný olej, sojový olej, ricinový olej a další představují určitou náhradu v petrochemickém průmyslu. Díky obsahu různých směsí triglyceridů mohou být polymerizované a biologicky rozložitelné v přírodních podmínkách.

Biodegradaci směsí ricinového oleje (RO) a lněného oleje (LO) s PVA v půdním prostředí zkoumali Riaz a kol. [29], pro jejich možné využití jako bio-obaly a zemědělské folie.

Jako výchozí suroviny byly použity dehydratovaný ricinový olej (DRO) a lněný olej, PVA se stupněm hydrolyzy 98 %, kyselina octová, benzen, peroxid vodíku, diethyleter, kyselina sírová (90%), acethanhydrid a N-methyl-2-pyrrolidon (NMP).

Směsi epoxidových olejů (RO/LO) s PVA byly smíchány v hmotnostních poměrech DRO/LO:PVA, 80:20, 50:50, 20:80. Příprava probíhala pomocí mikrovlnné metody. Filmy byly připraveny sušením za okolních podmínek, po 15 dnech byly sušeny ve vakuové sušárně při 60 °C po dobu 72 hodin.

Biodegradace původních polymerů, směsí, standardů a slepých vzorků byly stanoveny respirometricky v simulovaném půdním testu. Vzorek o hmotnosti 0,3g byl degradován ve směsi zemědělské a lesní půdy s obsahem jemné frakce perlitu a vody. Dostatečně vlhká směsná půda (25g) se vzorkem byla dána do lahve mezi dvě vrstvy vlhkého perlitu. Produkovaný CO₂ byl absorbován do roztoku 0,025 N BaOH a tento roztok byl dále titrován

0,05 N HCl. Skutečná produkce CO₂ v každém vzorku byla získána odečtením hodnoty CO₂ slepého pokusu od hodnoty CO₂ ve vzorku. Experiment probíhal 60 dní.

Biodegradace původní DRO a LO byla 50 % a 30 % za 60 dní. Rozdíl v degradaci těchto olejů je pravděpodobně způsoben počtem oxiranových (epoxidových) kruhů. Vyšší počet ethylenoxidových kruhů u lněného oleje brání mikrobiální činnosti a snižuje rozsah biodegradace. Čistý PVA98 byl degradován pouze 7 %. Směs DRO/PVA s poměrem 80:20, 50:50, 20:80 podlehly degradaci 41 %, 28 % a 15 % zatímco LO/PVA se stejným poměrem látek degradovala 25 %, 18 % a 10 %. Tyto výsledky jasně ukazují, že rozsah biologického rozkladu závisí na množství epoxidové složky ve směsi. Studie také ukázala, že PVA s obsahem epoxidových olejů je náchylnější na biodegradaci pomocí půdních mikroorganismů. Produkce CO₂ v průběhu testu potvrdil mineralizaci DRO a LO díky půdní mikroflóře.

Nejvyšší procento biologického rozkladu bylo dosaženo u směsi DRO/PVA 80:20 a to 41 %. Dobré mechanické vlastnosti a střední biologická rozložitelnost činí tuto směs vhodným materiálem pro výrobu balících materiálů a zemědělských mulčovacích filmů.[29]

Z výše uvedených studií vyplývá, že dosažené procento biologického rozkladu směsných folií odpovídalo obsahu snadno rozložitelných komponent jako je škrob, želatina a jiné, samotné PVA bylo degradováno minimálně. Proto se tento způsob odstraňování PVA z půdního prostředí jeví jako neefektivní.

3 BIOAUGUMENTACE

Bioaugmentací se rozumí cílené obohacení půdního prostředí selektovanými bakteriálními kmeny v podobě tzv. inokula s vysokou biodegradací aktivitou k přítomným polutantům. Cílem je doplnit mikrobiální společenstvo o zástupce schopné biodegradace daného znečištění. Bioaugmentaci často doprovází biostimulace. Podstatou biostimulace je zajištění co možná nejlepších vnějších podmínek např. úpravou pH, přidáním živin atd., pro zvýšení míry účinnosti biologického rozkladu. [30] V následujících kapitolách je uvedeno několik studií, které se zabývaly odstraněním kontaminace z půdy pomocí bioaugmentace.

3.1 Bioremediace půdy kontaminované pentachlorfenolem

Pentachlorfenol (PCP) je jedním s nejrozšířenějších přípravků na ochranu dřeva na světě, což vedlo ke kontaminaci značného množství půd. Je známo mnoho bakteriálních kultur, schopných degradace PCP, jako například *Flavobacterium sp.* nebo *Arthrobacter sp.*, které se ale ani po letech nenacházejí v kontaminované půdě. Zde se bioaugmentace jeví jako vhodná metoda na odstranění PCP z půdního prostředí.[31]

Barbeau a kol. [31] se zaměřili na odstranění PCP z půdy s využitím výše zmíněné bioaugmentace. Studovali dva druhy půdy, které byly kontaminované PCP. První půda byla písčité a obsahovala 500 mg/kg PCP a byla znečišťována po dobu 10 let, druhý druh byla spíše prachovitá hlína s obsahem 80 mg/kg PCP a kontaminovaná 30 let. Druhá půda byla použita k produkci PCP-degradujících bakteriálních společenstev. První půda byla čištěna pomocí bioaugmentace.

Pro inokulaci půdy zvolili autoři následující typy inokul - aktivovaný kal, centrifugovaný aktivovaný kal (4000ot/10min) a aktivní půdní biomasu s obsahem PCP-degradujících bakterií. Aktivní půdní biomasa byla připravena smícháním 125 l hlíny (obsah 10 %) a kalu v bioreaktoru s mechanickým míchadlem a aeračním systémem. V průběhu třiceti dnů vzrostlo množství PCP-degradujících mikroorganismů v bioreaktoru z 10^5 KTJ/g na 10^8 KTJ/g půdy.

Samotná bioaugmentace byla provedena ve 4 litrových lahvích, které obsahovaly 2 kg první půdy. Byly použity tři formy inokula. Bioaugmentace byla studována v pěti různých prostředích: půda s obsahem 13 ml aktivovaného kalu a 87 ml minerálního média (MM), půda s obsahem 7 g centrifugovaného kalu, půda se 42 ml alkoholu s adaptovanou biomasou a 58 ml MM, půda s obsahem 100 ml MM (neinokulovaná) a půda se 100 ml MM a 10

g azidu sodného (neinokulovaná). Po smíchání daných směsí byly lahve uzavřeny a inkubovány při teplotě 20°C bez přístupu světla. Pro zajištění homogenizace půdy a dobrého přenosu kyslíku byl obsah v lahvích ručně míchán každé tři dny.

Účinnost aktivního půdního společenství byla testována na prvním druhu kontaminované půdy, která neobsahovala žádné mikroorganismy schopné odbourávat PCP. Koncentrace PCP v inokulované půdě klesla ze 400 mg/kg na 5 mg/kg za 130 dní v závislosti na typu inokula, zatímco koncentrace PCP v neinokulované půdě byla konstantní. Tudíž 98 % PCP bylo v půdě degradováno za použití adaptovaných mikroorganismů.

Z daných výsledků vyplývá, že bioremediace pomocí bioaugmentace je vhodná pro odstranění PCP z kontaminovaných půd.

3.2 Bioremediace půdy kontaminované uhlovodíky kombinací biostimulace a bioaugmentace pomocí vláknité houby

Jandera-Lopez a kol. [32] se zabývali odstraněním uhlovodíků ze znečištěné prachovité hlíny, která obsahovala 40 % alifatických uhlovodíků (AU) a 21 % polycyklických aromatických uhlovodíků (PAU) s využitím kombinované metody a to biostimulace a bioaugmentace.

Autoři ve své práci postupovali následujícím způsobem: byly odebrány dva druhy půdy. Půda 1 obsahovala 60,6 mg uhlovodíků na kilogram a půda 2 obsahovala 500 mg uhlovodíků na kilogram. Každá půda byla proseta přes 2 mm síto, a homogenizována. Před začátkem experimentu byl v půdách stanoven celkový dusík, celkový organický uhlík, koncentrace fosforu, vodní kapacita, pH, množství mikroorganismů a koncentrace uhlovodíků.

Z obou kontaminovaných půd byly vypěstovány bakteriální kmeny *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus sydowii*, které byly později využity jako inokulum.

V půdě 1 probíhala adaptace hub. Byla připravena směsná půda s obsahem 3 g cukrové třtiny a 10 g znečištěné půdy 1. Takto připravená směs byla sterilizována. Další směsná půda, stejného složení, byla zvlhčena živným médiem s obsahem minerálních solí, dusíku a fosforu z kontaminovaných zemin. V obou připravených směsích byl poměr C:N:P 100:10:1. Takto připravené směsi byly dány do sterilních vialek a naočkovány 5 ml odpovídajícího inokula. Vialky byly inkubovány při teplotě 28°C 7 dnů. Experimenty byly připraveny třikrát vedle sebe ve sterilních podmínkách.

Bioaugmentace byla provedena ve 40 g nesterilní zvlhčené půdy 2 živným médiem, ke které bylo přidáno 13 g směsné adaptované půdy. Vialky s obsahem dané směsi byly inkubovány při teplotě 28°C 35 dní.

Biostimulace byla provedena podle stejného postupu se dvěma změnami. Cukrová třtina byla sterilizována a zvlhčená směsná půda nebyla naočkována.

Přírodní houby jako *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum*, *Aspergillus sydowii* izolované ze silně znečištěných půd byly po adaptaci schopny růstu ve směsné půdě 1 s vysokým obsahem AU, PAU a jiných uhlovodíků o vysoké molekulové hmotnosti. Bylo zjištěno, že bioaugmentací pomocí *Rhizopus sp.* bylo odstraněno 90 % AU a 70 % PAU, díky *Aspergillus sydowii* došlo k degradaci AU z 59 % a PAU z 51 % a *P. funiculosum* odstranil AU z 84 % a PAU z 64 %. Odstranění daného znečištění bioaugmentací se ukázalo jako velmi účinné. Biostimulací bylo odstraněno jen 34 % PAU a 59 % AU.

3.3 Bioremediace půdy kontaminované ftaláty po bioaugmentaci adaptovaným aktivovaným kalem

Tato studie je zaměřena na odstranění čtyř esterů kyseliny ftalové (PAEs) a to dimethyl ftalátu (DMP), diethyl ftalátu (DEP), di-n-butylftalátu (DBP) a di-n-oktylftalátu (DOP) z půdy obohacené adaptovaným kalem.

Kal z čistírny odpadních vod byl adaptován v prostředí obsahující ftaláty metodou diskontinuálního provozu. V průběhu adaptace byla sledována koncentrace PAEs a biomasy.

Výsledky ukázaly, že degradace PAEs v půdě s adaptovaným aktivovaným kalem souvisí s délkou alkylových řetězců. Ftaláty DMP a DEP byly velmi rychle degradovány s více než 90% odstraněním za méně než deset dnů. Oproti tomu DOP a DBP degradovaly pomalu. U DBP byla degradace okolo 10 % za třicet dní a u DOP méně než 50 % za stejné období.[33]

4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE

Z literární studie vyplývá, že biopolymery obsažené ve směsných filmech na bázi PVA významně nepodporují biologický rozklad samotného PVA v půdním prostředí. Vhodnou metodou se tak jeví bioaugmentace, která byla použita např. při odstraňování PCP, PAU nebo ftalátů z půdního prostředí. K obohacení půdy byly v těchto případech použity jak čisté mikrobiální kultury (PAU) [32] tak směsné mikrobiální kultury v podobě aktivovaného kalu z čistíren odpadních vod (PCP, ftaláty) [31,33].

Vzhledem k faktu, že informací o postupech bioaugmentace půd je nedostatek byla diplomová práce rozdělena na dvě části:

1. Optimalizace postupu inokulace půdního prostředí aktivovaným kalem a optimalizace testů stanovení biologické rozložitelnosti polymerů v půdním prostředí pomocí respirometru BI-2000 (Bioscience corp. USA).
2. Samotné studium rozkladu PVA v půdním prostředí inokulovaném odpadní biomasou - aktivovaný kal a mycelium z výroby antibiotik (Biotika a.s., Lúbeča, Slovensko). Tento typ inokul byl zvolen především z ekonomického hlediska pro jejich nízkou cenu a relativně snadnou dostupnost. Přičemž bylo v řadě prací prokázáno, že aktivovaný kal z čistíren odpadních vod je schopný rozkladu PVA ve vodném prostředí a je tak vhodný pro bioaugmentaci půdy. K problematice využití odpadního mycelia z výroby antibiotik nejsou dostupné informace nicméně kultura *Penicillium chrysogenum* (obsažená v mycéliu) byla využita k rozkladu některých typů xenobiotik např. fenolu či některých aromatických sloučenin.

5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 Testovaný vzorek, použité materiály, chemikálie, roztoky a přístrojové vybavení

Testovaný vzorek

PVAp (Poval 205): stupeň hydrolyzy 88 mol%, obsah acetátových skupin 12 %, viskozita 4 % vodného roztoku při teplotě 20 °C: 5 mPa.s, $CHSK_{Cr}$ je 1599,8 mg/g, prášková forma, výrobce Kuraray, Japonsko.

Materiály

Odpadní piliny z dubového dřeva o velikosti cca 5x5x1 mm.

AGROPERLIT (Perlit s.r.o., Šenov u Nového Jičína) je pomocná půdní látka, kterou výrobce popisuje jako expandovanou vulkanickou horninu. Obsah rizikových prvků splňuje zákonem stanovené limity v mg/kg sušiny: Cd 2; Pb 100; Hg 1; As 10; Cr 100; Cu 100; Mo 5; Ni 50; Zn 300. Vlhkost max. 2 % a pH 6,0 – 7,5.

Chemikálie

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

chlorid draselný, kyselina sírová, dihydrogenfosforečnan draselný, síran amonný, hydrogenfosforečnan draselný dodekahydrát, chlorid vápenatý, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, chlorid železitý hexahydrát, síran hořečnatý heptahydrát, kyselina boritá, molybdenan amonný tetrahydrát, síran železnatý heptahydrát, síran zinečnatý heptahydrát, síran měďnatý pentahydrát, síran manganatý tetrahydrát, síran kobaltnatý heptahydrát, kyselina chlorovodíková, Soda lime (NaOH/CaO) s indikátorem.

Roztok biomédia

Na přípravu standardního minerálního média (1 litr) byly použity zásobní roztoky, připravené rozpouštěním následujících chemikálií v 1 litru destilované vody.

a) fosfátový pufr pH = 7,2

- 8,2g KH_2PO_4 – dihydrogenfosforečnan draselný
- 21,75g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – hydrogenfosforečnan draselný dodekahydrát
- 44,7g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ – hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát
- b) 10g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – síran amonný
- c) 27,5 CaCl_2 – chlorid vápenatý
- d) 0,25g $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ – chlorid železitý hexahydrát
- e) 22,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – síran hořečnatý heptahydrát
- f) roztok stopových prvků
 - 0,75g H_3BO_3 – kyselina boritá
 - 0,05g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – molybdenan amonný tetrahydrát
 - 0,18g $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – síran kobaltnatý heptahydrát
 - 0,5g $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ – síran manganatý tetrahydrát
 - 0,05g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ – síran měďnatý pentahydrát
 - 0,1g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – síran zinečnatý heptahydrát
 - 3g $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ – síran železnatý heptahydrát

Příprava biomédia:

Do odměrné baňky o objemu 1 litr bylo nadávkováno 800 ml destilované vody a po 1 ml zásobních roztoků c), d), e), f). Dále bylo přidáno 5 ml roztoku b) a 20 ml zásobního roztoku a). Vše bylo promícháno a doplněno destilovanou vodou po rysku.

Přístrojové vybavení

- Elektrochemický respirometr BI-2000, Bioscience corp., USA
- Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu corp. Japonsko
- Centrifuga MPW – 340, Warszawa a centrifuga Hettich Rotanta 460R, UK
- Sušárna Memmert model 100, SRN
- pH-metr Inolab pH/ION 735 s pH elektrodou SenTic 81
- Analytické váhy Sartorius
- Běžné laboratorní sklo a vybavení

5.2 Biologický materiál

Aktivovaný kal

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích byl po dodání zbaven hrubých nečistot filtrací přes síto, 3x dekatován pitnou vodou a provzdušňován 24 hodin.

Adaptovaný aktivovaný kal

Před zahájením adaptace byl aktivovaný kal nejprve centrifugován při 300 ot/min po dobu 10 minut a po odlití supernatantu byla biomasa suspendována v minerálním médiu tak, aby sušina kalu byla 5 g/l. K takto připravenému kalu bylo přidáno cca 0,5 g PVA, vše se promíchalo a bylo dáno do fermentoru připojeného na čerpadlo, aby bylo zajištěno kontinuální provzdušňování. Adaptace probíhala 3 týdny (TOC < 20 mg/l), po této době byl adaptovaný kal znovu centrifugován a suspendován v biomédiu za stejných podmínek a bylo opět přidáno cca 0,5 g PVA. Po týdnu bylo veškeré PVA odstraněno mikroorganismy (TOC < 20 mg/l) a adaptovaný kal byl použit k bioaugmentaci. Celkový obsah PVA-degradujících mikroorganismů v adaptovaném aktivovaném kalu byl $70 \cdot 10^4$ KTJ/g půdy.

Odpadní biomasa s výroby antibiotik (Biotika a.s., Ľubča, Slovensko)

Jedná se o mycélium obsahující odpadní biomasu kmene *Penicillium chrysogenum*, zbytky živné půdy a zbytky vyprodukovaného penicilínu. Sušina mycelia je 21,86 % a hodnota $CHSK_{Cr} = 1023 \text{ mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$. Procentuální zastoupení prvků v mycéliu stanovené elementární analýzou: C = 42,45±0,34 %; H = 6,899±0,05 %; N = 7,879±0,05 %; S = 0,719±0,04 %.

Půda

- **Zemědělská zemina**

Jílová hnědozem (odběr Zádveřice, okr. Zlín, 2011), která byla zbavená hrubých nečistot (kořínky, zbytky zemědělských rostlin), případně tvrdé horniny prosetím přes síto (velikost ok 5 mm). Vlhkost zemědělské zeminy byla průměrně okolo 11,4 % a pH_{KCl} bylo 7,005. Elementární analýzou bylo v dané půdě stanoveno procentuální zastoupení prvků: : C = 2,221±0,04 %; H = 0,5037±0,01 %. Celkový počet mikroorganismů v zemědělské půdě byl $22 \cdot 10^6$ KTJ/g a počet aktinomycét byl $5,5 \cdot 10^6$ v 1 g zeminy.

- **Komerční kompost**

Zahradnický kompost značky Agro (Agro CS a.s., Česká Skalice) s obsahem zkompostovatelných surovin rostlinného původu, humusu a přísadkou dolomitického vápence. Výrobce uvádí obsah rizikových prvků v mg/kg sušiny: Cd 2; Pb 100; As 20; Cr 100; Cu 150; Mo 20; Zn 600 a množství nerozložitelných přísad max. 2 %. Laboratorními analýzami pak byla zjištěna vlhkost kompostu cca 65,2 % a pH_{KCl} 6,902. Elementární analýzou bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků: C = 20,398±0,74 %; H = 2,314±0,07 %; N = 1,116±0,05 %; S = 0,229±0,02 %. Kvalitativní složení komerčního kompostu, stanovené rentgenovou fluorescenční spektroskopií, je následující Ca > Al > K > Fe > Ti > Mn > Si. Celkový počet mikroorganismů v komerčním kompostu byl $53 \cdot 10^6$ KTJ/g a počet aktinomycet byl $4,5 \cdot 10^5$ v 1 g kompostu.

- **Směsná půda**

Směsná biologicky aktivní půda byla složená ze zemědělské zeminy a komerčního kompostu v poměru 5:1 (1000 ml kompostu a 200 ml zemědělské zeminy). Vlhkost směsné půdy byla cca 55 % a pH_{KCl} půdy bylo 6,766. Kvalitativní složení směsné půdy, stanovené rentgenovou fluorescenční spektroskopií, je následující Al > K > Fe > Ca > Si > Ti > Mn. Celkový počet mikroorganismů ve směsné půdě byl $173 \cdot 10^6$ KTJ/g a počet aktinomycet byl $4 \cdot 10^5$ v 1 g stanovované půdy.

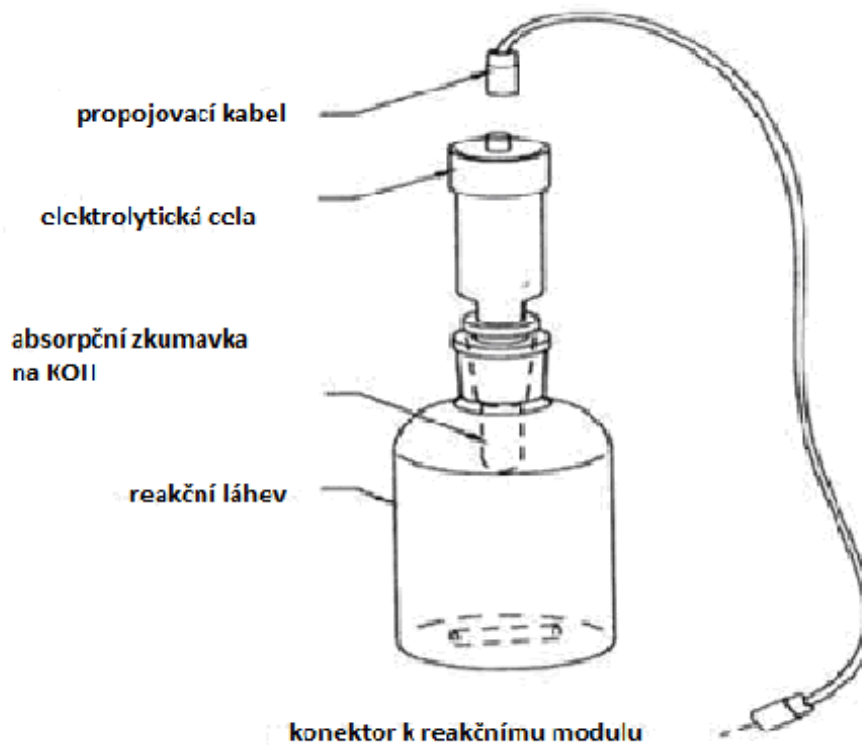
5.3 Hodnocení biologické rozložitelnosti PVA

5.3.1 Hodnocení úplné biologické rozložitelnosti PVA stanovením biologické spotřeby kyslíku v uzavřeném respirometru

Pro stanovení úplného biologického rozkladu PVA v půdním prostředí byl využit uzavřený elektrochemický respirometr BI-2000 (Bioscience corp. USA). Přístroj je určen pro sledování biologických pochodů probíhajících v aerobních podmínkách na základě spotřeby kyslíku [34].

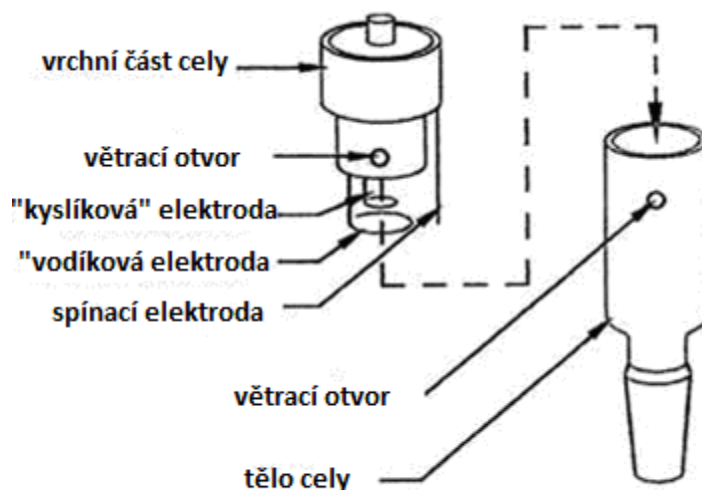
Respirometr BI-2000 [34] je složen ze dvou reakčních modulů po 8 reakčních nádobách o objemu 1 litr s elektrolytickými celami, temperované vodní lázně a regulátoru teploty. Reakční modul obsahuje elektronický hardware, který je důležitý na vyvíjení kyslíku, na regulaci teploty a na snímání barometrického tlaku a teploty. Reakční nádoby, elektrolytické

cely a absorpční zkumavky na KOH tvoří reaktor, který zabezpečuje vhodné podmínky pro experimenty. Všechny části reaktoru jsou vyrobeny z borosilikátového skla se zábrusy. V průběhu experimentu je každá nádoba ponořena do vodní lázně a propojena pomocí spojovacích kabelů k přednímu panelu reakčního modulu.



Obr. 2. Reakční nádoba respirometru BI-2000 [34]

Elektrolytické cely (Obr.3) se skládají z hlavní části, tzv. těla cely, které se dále dělí na vnitřní a vnější část. Cela je pomocí zábrusu napojena na absorpční zkumavku, kde stejným způsobem je horní část těla cely zavedena na vrchní část těla cely. Ta obsahuje tři druhy elektrod a to kyslíkovou, vodíkovou a spínací elektrodu. Ve vnější části cely je umístěna spínací i vodíková elektroda, zatímco kyslíková elektroda je vložena do vnitřní části cely.[34]



Obr. 3. Elektrolytická cely respirometru BI-2000 [34]

Princip měření

Mikroorganismy přítomné v reakční nádobě potřebují k přeměně chemických látek neustálý přísun kyslíku. Vyprodukovaný oxid uhličitý je absorbovaný v absorpčních zkumavkách hydroxidem draselným. Dojde tak k mírnému podtlaku, který způsobí pokles hladiny elektrolytu ve vnější části elektrolytické cely. Elektrolytem je zde 1N kyselina sírová. V okamžiku kdy hladina elektrolytu poklesne, dojde k přerušení kontaktu mezi spínací elektrodou a elektrolytem. Tato reakce způsobí aktivaci cely a mezi dvěma elektrodami ponořenými do elektrolytu začne procházet elektrický proud.

Disociací molekul kyseliny sírové v roztoku vzniknou kladné ionty vodíku a záporné ionty SO_4^{2-} . Kationty vodíku se pohybují k záporné elektrodě, kde přijmou elektron a sloučí se do molekuly vodíku. Vodík je pak vypouštěn do atmosféry prostřednictvím otvorů na stěně cely. Anionty SO_4^{2-} se pohybují ke kladné elektrodě, které odevzdají své přebytečné elektrony a elektricky neutrální molekula ihned reaguje s vodou. Při této reakci se uvolňují molekuly kyslíku. Množství vyprodukovaného kyslíku je úměrné elektrickému proudu podle Faradayova zákona. Na záporné elektrodě se tedy vylučuje vodík a na kladné elektrodě kyslík. Přitom v elektrolytu zůstává stejný počet molekul kyseliny sírové, zatímco molekul vody ubývá a dochází ke zkoncentrování kyseliny.

Po ustálení tlaku uvnitř cely začne hladina elektrolytu ve vnější části cely stoupat, dojde k přerušení elektrolytické reakce. Množství vyprodukovaného kyslíku je vyjádřeno v mg a uloženo v počítači.

Podmínky testu

Celkový objem půdy v jednotlivých reakčních nádobách byl 500 ml. Nejprve bylo přidáno 250 ml půdy, poté byl přidán testovaný vzorek (cca 1g) a reakční nádoba byla doplněna dalšími 250 ml půdy. Tento postup byl zvolen na základě specifických vlastností respirometru a předcházejících testů, prováděných Genčurovou [35], kde bylo za těchto podmínek dosaženo uspokojivé reprodukovatelnosti. Každá reakční nádoba byla vložena do vodní lázně s teplotou 25 ± 1 °C. Po nasazení všech potřebných částí na reakční nádobu byl proveden test těsnosti a v poslední fázi byl spuštěn pokus. Všechny testy probíhaly ve tmě. Na začátku a na konci testu byla vždy stanovena sušina půdy a pH_{KCl} půdy.

Substrátová BSK byla vypočtena podle rovnice 1 a procento biologického rozkladu bylo vypočteno podle rovnice 2 nebo 3 podle typu vzorku [35].

$$BSK_s = \frac{BSK_L - BSK_{SL}}{m} \quad /1/$$

Kde:

BSK_s substrátová biologická spotřeba kyslíku 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. $\%_{CHSK_{Cr}}$ vyjádřené jako poměr biologické spotřeba kyslíku ku teoretické resp. chemické spotřebě kyslíku:

$$\%_{TSK} = \frac{BSK_s}{TSK} \cdot 100 \quad /2/$$

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

Kde:

BSK_s substrátová spotřeba kyslíku testovaného vzorku [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

TSK teoretická spotřeba kyslíku testovaného vzorku vypočítaná podle rce. 4 [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

$CHSK_{Cr}$... chemická spotřeba kyslíku testované látky [$\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$]

Teoretická spotřeba kyslíku je daná rovnicí podle normy ČSN EN ISO 9408 [36]:

$$TSK = \frac{16 \cdot \left(2a + \frac{1}{2}b - c \right)}{Mr} \quad /4/$$

Kde:

TSK... teoretická spotřeba kyslíku v TSK [g.g⁻¹]

a..... počet atomů uhlíku

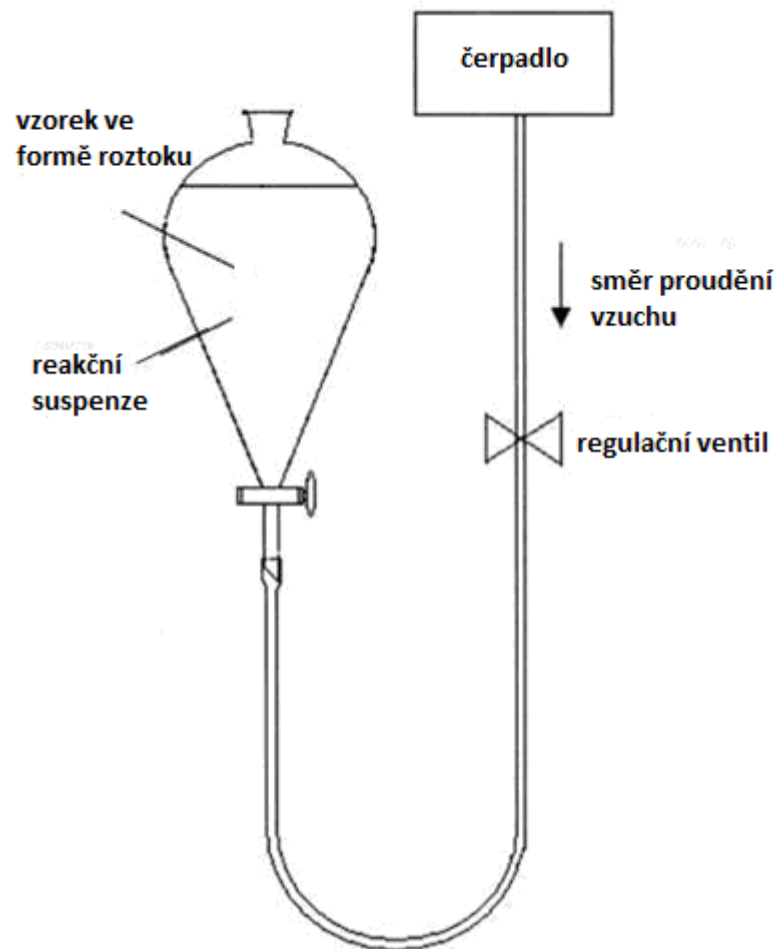
b..... počet atomů vodíku

c..... počet atomů kyslíku

Mr..... relativní molekulová hmotnost látky [g.mol⁻¹]

5.3.2 Zahn – Wellensův test

Tato metoda se používá na sledování biologického rozkladu látek ve vodním aerobním prostředí podle normy ČSN EN 29888 [37]. V tomto případě se metoda použila na sledování rozkladu PVA za přítomnosti kmene *Penicillium chrysogenum*, ve formě mycelia, suspendovaného v biomédiu. Koncentrace mycelia v suspenzi byla 500 mg/l (vztaženo na sušinu). PVA bylo do suspenze (mycélium+minerální médium) vpraveno ve formě roztoku tak, aby koncentrace v bioreaktoru byla 200 mg/l. Aparatura byla složena ze tří dvoulitrových děliček, které byly provzdušňované zespodu vzduchovými čerpadly. Byl zajištěn přísun kyslíku i promíchávání suspenze. V průběhu testu byly odebírány vzorky ke stanovení celkového uhlíku (viz kapitola 5.5).



Obr. 4. Aparatura pro sledování biodegradace látek ve vodném aerobním prostředí [35]

5.4 Laboratorní analýzy a postupy

Stanovení sušiny půdy

Petriho miska včetně víčka byla vysušena při 105°C nejméně po dobu 30 minut a nechána vychladnout v exsikátoru nejméně 45 minut. Do takto vysušené a zvážené Petriho misky vč. víčka bylo naváženo cca 5 g půdy s přesností na 10 mg. Otevřené Petriho misky se vzorkem byly umístěny do sušárny vyhřáté na 105°C a sušeny vč. víčka do konstantní hmotnosti (cca 3 h). Po ukončení sušení byla víčkem uzavřená Petriho miska vložena do exsikátoru a po vychladnutí (nejdříve po 45 min) byla zvážena s přesností na 10 mg. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe a sušina půdy byla vyjádřena rozdílem hmotností v %.

Stanovení sušiny aktivovaného kalu

Stanovení sušiny bylo prováděno vakuovou filtrací 10 ml suspenze aktivovaného kalu na předem zvážený filtrační papír (o plošné hmotnosti 85 g.m²). Potom byl filtrační papír vysušen do konstantní hmotnosti při teplotě 105 °C a po vychladnutí v exikátoru zvážen na analytických vahách. Stanovení bylo provedeno třikrát vedle sebe a sušina aktivovaného kalu byla vyjádřena rozdílem hmotností v g.l⁻¹.

Stanovení organicky vázaného uhlíku

Na stanovení celkového organického uhlíku byl použit analyzátor uhlíku Shimadzu TOC 5000A. Množství celkového organického uhlíku (TOC) je dané rozdílem celkového uhlíku (TC) a anorganického uhlíku (IC). Princip stanovení celkového uhlíku je založený na oxidaci veškerého uhlíku ve vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při 670 °C v proudu kyslíku. Vzniklý CO₂ je veden do NDR detektoru (Non-Disperse Infrared Detector), kde signál vznikající absorpcí příslušné vlnové délky je registrovaný jako plocha píku přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku [38]. Při stanovení anorganického uhlíku je vzorek dávkován v proudu nosného plynu na inertní nosič s kyselinou fosforečnou, kde dojde k vytěsnění oxidu uhličitého. Vyhodnocení signálu je totožné jako u stanovení TC. [39]

Stanovení chemické spotřeby kyslíku dichromanovou metodou CHSK_{Cr}

Metoda je založena na oxidaci organických látek přítomných ve vzorku dichromanem draselným v přítomnosti kyseliny sírové při dvouhodinovém varu. Oxidace je katalyzována stříbrnými ionty a probíhá v nadbytku oxidačního činidla. Množství spotřebovaného dichromanu draselného na oxidaci organických látek se stanoví titrací odměrným roztokem síranu mamonu železnatého na indikátor ferroin [38].

Měření pH

Po kalibraci pH metru, značky Inolab pH/ION 735, pomocí dvou tlumivých roztoků s hodnotou pH nižší a vyšší než je pH vzorku bylo za stálého míchání stanoveno pH vzorku. Jako elektroda zde byla použita pH elektroda SenTix 81.

Stanovení pH půdy – výměnná půdní reakce pH_{KCl}

Do Erlenmayerovy baňky se naváží přibližně 20 g půdního vzorku, přidá se 50 ml roztoku 0,2M KCl a rozmíchá se skleněnou tyčinkou. Za 24 ± 4 hodin se suspenze přefiltruje přes řídký filtrační papír a změří se hodnota pH [38].

Posouzení biodegradability z hlediska sledování úbytku substrátu – PVA

Princip zkoušky spočívá ve sledování úbytku PVA z reakční suspenze. PVA s trijodidem v přítomnosti kyseliny borité tvoří komplex modrého zbarvení, jehož intenzita se mění s koncentrací PVA. Této vlastnosti je možné využít pro spektrofotometrické stanovení PVA v koncentracích 0 až 20 $mg \cdot l^{-1}$ [40].

Postup

Do 50 ml odměrné baňky byly nadávkovány 3 ml přefiltrovaného vzorku a doplněny do poloviny cca 25 ml destilovanou vodou. Poté bylo přidáno 15 ml kyseliny borité ($40 g \cdot l^{-1}$) a 3 ml roztoku jodu ($12,7 g \cdot l^{-1}$) s jodidem draselným ($25 g \cdot l^{-1}$) a doplněno po rysku destilovanou vodou. Po promíchání byl vzniklý roztok podroben spektrofotometrickému stanovení při vlnové délce 658 nm. Koncentrace PVA byla vypočtena z rovnice regresní přímky kalibrační závislosti. Kalibrační závislost byla stanovená z kalibračních standardů o koncentracích PVA 0 – 20 $mg \cdot l^{-1}$.

Rentgenová fluorescenční spektroskopie – charakteristika půdy

Kvalitativní chemické složení půd bylo stanoveno pomocí rentgenové fluorescenční spektrometrie (XRF analýza) na přístroji X-Ray Fluorescence Spectrometer Eleatech. Před vlastním stanovením byl vzorek vysušen za laboratorní teploty a přeset přes síto (velikost ok 2 mm).

Elementární analýza

Chemické složení bylo stanoveno na přístroji Hermo Elektron Corporation Flash EA 1112 Series v konfiguraci CHNS/O a zastoupení stanovovaných prvků je uváděno v absolutních procentech vztažených na navážku vzorku (2-3 mg). Obsah uhlíku stanovený EA odpovídá obsahu organicky vázaného uhlíku ve vzorku. Před vlastním stanovením byl vzorek půdy byl vysušen při $105^{\circ}C$ a přeset přes síto (velikost ok 2 mm).

Mikrobiologický rozbor půdy

Mikrobiologický rozbor byl proveden za účelem stanovení celkového počtu mikroorganismů a aktinomycét v testované směsné půdě a ke stanovení PVA degradujících mikroorganismů v adaptovaném aktivovaném kalu.

Živná média:

- **Minerální agar (MA):** 3,9 g základu, 2 mg kvasničného autolyzátu a 0,3 ml stopových prvků na 200 ml destilované vody.
- **Minerální agar s PVA (MA-PVA):** 3,9 g základu, 2 mg kvasničného autolyzátu, 100 mg PVA a 0,3 ml stopových prvků na 200 ml destilované vody.
- **Agar pro půdní bakterie (APB):** 7,8 g základu, 200 mg kvasničného autolyzátu, 200 mg tryptonu a 0,6 ml stopových prvků na 400 ml destilované vody.

Živná média byla po dobu 20 minut sterilizována v tlakové nádobě a po vychladnutí rozlita na Petriho misky.

Postup mikrobiologického rozboru

Byl navážen 1 g vzorku půdy a dán do 10 ml sterilního vytřepávacího roztoku. Po dobu 10 minut bylo se suspenzí třepáno a po 30 vteřinách bylo s takto upraveným vzorkem provedeno desetinné ředění. Ředění vzorků bylo provedeno až do koncentrace 10^{-6} pomocí řady zkumavek s obsahem 4,5 ml sterilního fyziologického roztoku (8,5 g NaCl/ l vody). Na Petriho misky s APB agarem byla očkována ředění 10^{-5} a 10^{-6} a na Petriho misky s MA a MA-PVA agarem byla očkována ředění 10^{-4} až 10^{-6} . Poté byla všechna ředění rozetřena sterilní hokejkou. Kultivace probíhala 9 dní pro APB agar a 21 dní pro MA a MA-PVA agar při teplotě 25 °C a temnu. Odečet byl proveden u ředění, kde byly kolonie dobře odečitatelné. Odečet aktinomycét byl prováděn mikroskopicky. Počty mikroorganismů daného ředění byly přepočteny na KTJ/ g půdy (kalu).

PRAKTICKÁ ČÁST

6 OPTIMALIZACE TESTŮ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU PVA V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ V RESPIROMETRU BI-2000

Cílem optimalizačních testů bylo v první fázi zvolit vhodný typ půdy pro biodegradaci PVA a v druhé fázi vhodný postup inokulace dané půdy biomasou aktivovaného kalu.

Zároveň bylo nutné při práci s respirometrem BI-2000 zajistit tyto podmínky:

1. Vysokou spotřebu kyslíku, aby nedocházelo k měření v rámci chyby a byly odstraněny atmosférické negativní vlivy (změna atmosférického tlaku a teploty). Protože data jsou sice korigována na aktuální teplotu a tlak, ale celý nejsou v uzavřeném a temperovaném prostoru a reagují tak poměrně citlivě na okolní změny.
2. Dobrý přestup kyslíku z plynné fáze do pevné. Vrstva půdy by tedy měla být co nejvíce prodyšná, aby přestup kyslíku nebyl nijak omezen.

Postup přípravy testů byl zvolen na základě výsledků diplomové práce Genčurové [35]. Dávkování půdy bylo prováděno objemově (viz kap. 5.3.1) a jako substrát byla použita glukosa - dobře biologicky rozložitelná látka, která byla do reaktoru dávkována metodou přímé navážky – 2 g/l_p* (aktuální obsah glukosy v reaktoru byl 1 g). Byla tak zajištěna dobrá manipulace se vzorkem a výborná reprodukovatelnost dat. Před a po každém testu byla měřena sušina a pH_{KCl} půdy s obsahem testovaného vorku i slepých pokusů.

6.1 Volba vhodného typu půdy pro biodegradaci PVA

Úkolem biodegradačního testu bylo zvolit vhodnou půdu tak, aby její vlhkost byla cca 50 % a aby daná půda nejlépe simulovala reálné podmínky. Jelikož cílem této práce je podpořit rozklad PVA po jeho použití v zemědělství, tak by vybraná půda měla odpovídat svým složením zemědělským půdám. K dispozici byla zemědělská zemina jílovitého typu s vlhkostí cca 15,04 %. Při pokusech zvýšit vlhkost u zemědělské zeminy bylo zjištěno, že schopnost této půdy zadržovat vodu je minimální. Při vyšším obsahu vody docházelo k tvorbě velkých shluků a půda se stávala bahnitá. Nebylo zde tedy možné dosáhnout požadované vlhkosti. Zároveň docházelo v reaktoru k tvorbě neprodyšných půdních aglomerátů a nebyl tak zajištěn dobrý přestup kyslíku z plynné fáze do pevné. Z tohoto důvodu byla

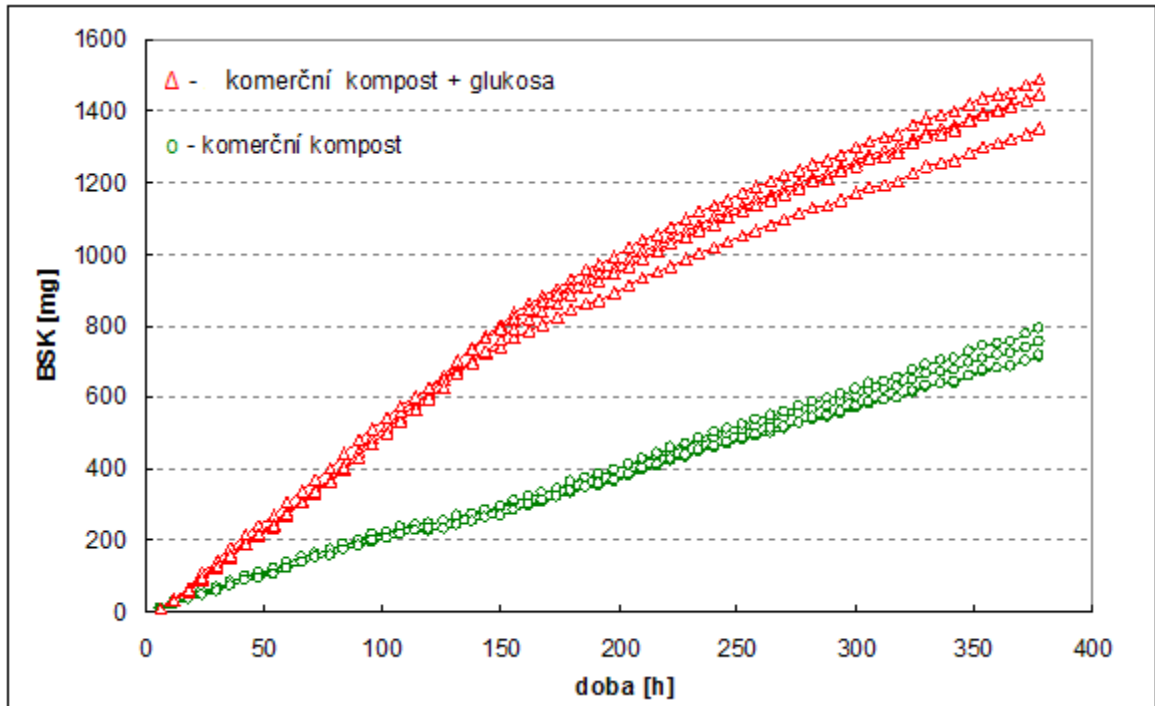
* hmotnost vztažená na 1 litr půdy → l_p

navržena druhá alternativní varianta tj. připravit směsnou půdu s vybranou komerční zeminou. Na trhu je možné vybrat si z několika desítek typů zahradnických substrátů například pro bylinky a koření, okrasné dřeviny, pro středomořské rostliny a další, nebo také z řady komerčních kompostů. Některé z těchto dostupných substrátů a kompostů ovšem obsahují syntetické hnojiva, mají změněné pH či snížený nebo zvýšený obsah živin a stopových prvků. Pro naše experimenty bylo potřeba zvolit takovou komerční půdu, která nebude obsahovat zmíněné přídatné látky. Byl tedy vybrán univerzální zahradnický kompost s vlhkostí cca 61 % (viz kap. 5.2), v práci označený jako komerční kompost. Mikrobiologické testy potvrdily dostatečné oživení kompostu viz tab. 2. a při studiu biologického rozkladu glukosy bylo dosaženo 60 % rozkladu - obr. 7.

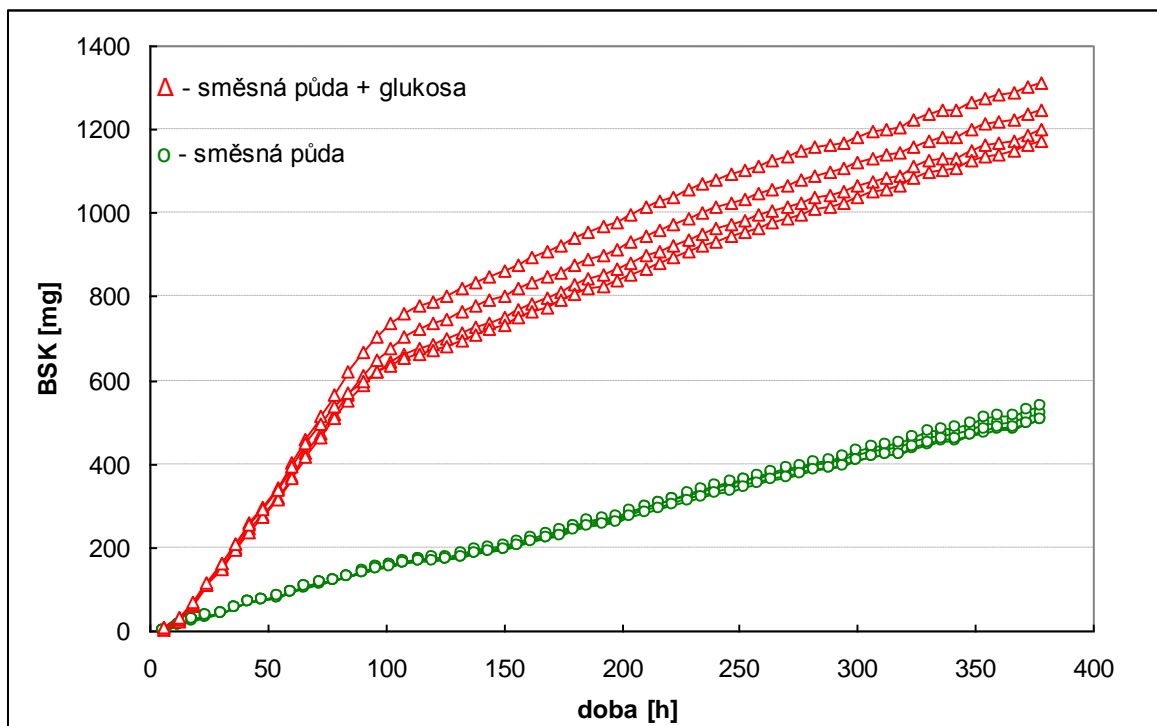
Pro návrh vhodného poměru mezi komerčním kompostem a zemědělskou zeminou byla provedena série vsádkových testů s různým poměrem jednotlivých půd. Hodnotícím kritériem byla v první fázi vlhkost půdy a mísitelnost (tvorba půdních aglomerátů). Jako nejoptimálnější byla vyhodnocena směs 1:5 (zemědělská:komerční). Byla tak získána půda s vlhkostí okolo 50 %, která byla připravena smícháním 1000 ml kompostu a 200 ml zemědělské zeminy. V takto připravené půdě a v samotném zahradnickém kompostu byl testován rozklad glukosy obr. 5 a 6. Experiment probíhal po dobu 15 dní. U obou testovaných půd došlo k 60 % rozkladu glukosy. Z obr. 7, který znázorňuje porovnání průběhu rozkladu glukosy v půdách vyplývá, že ve směsné půdě probíhala biodegradace glukosy lépe než v zahradnickém kompostu. Potvrzuje to i mikrobiologický rozbor, kdy směsná půda je nejvíce mikrobiálně oživena (tab.2). Ze získaných výsledků byla pro všechny další experimenty zvolena směsná půda v poměru 5:1.

Tab. 2. Celkové počty půdních mikroorganismů a aktinomycét v půdách

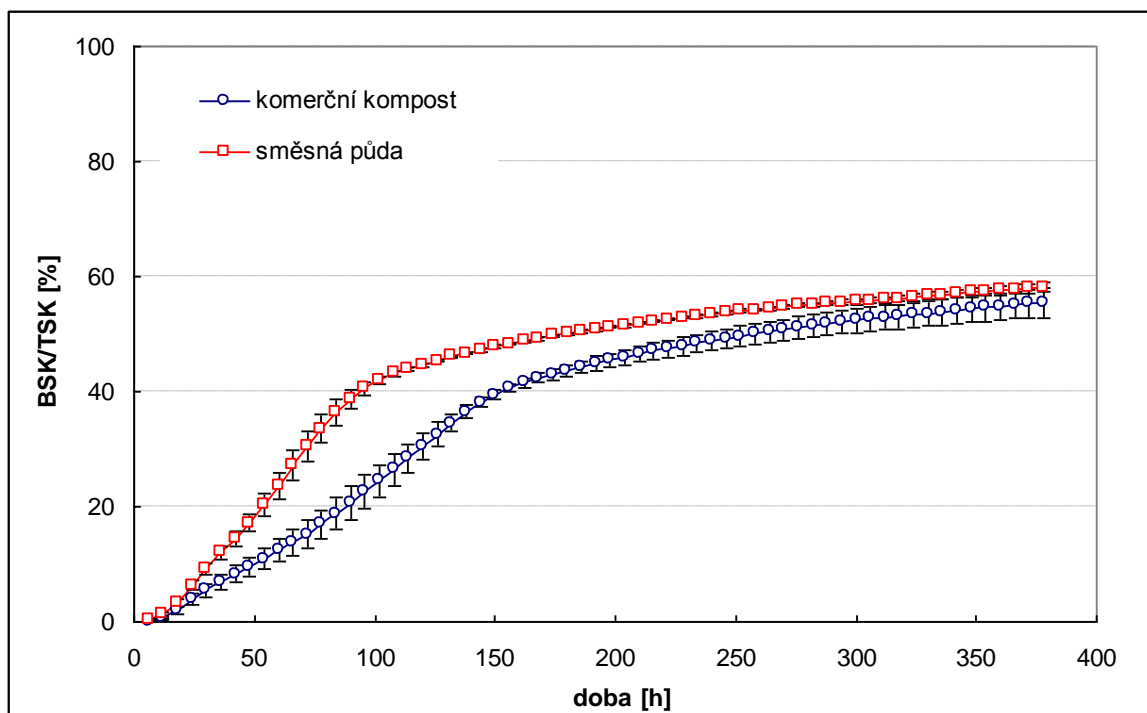
Typ půdy	Celkový počet půdních mikroorganismů [KTJ/g půdy]	Počty aktinomycét v 1 g půdy
Zemědělská zemina	$22 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^5$
Komerční kompost	$53 \cdot 10^6$	$5,5 \cdot 10^6$
Směsná půda	$173 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$



Obr. 5. Průběh biologického rozkladu glukosy v komerčním kompostu



Obr. 6. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě



Obr. 7. Srovnání průběhu biologického rozkladu glukosy v obou typech půdy vyjádřený jako BSK/TSK (\pm směrodatná odchylka)

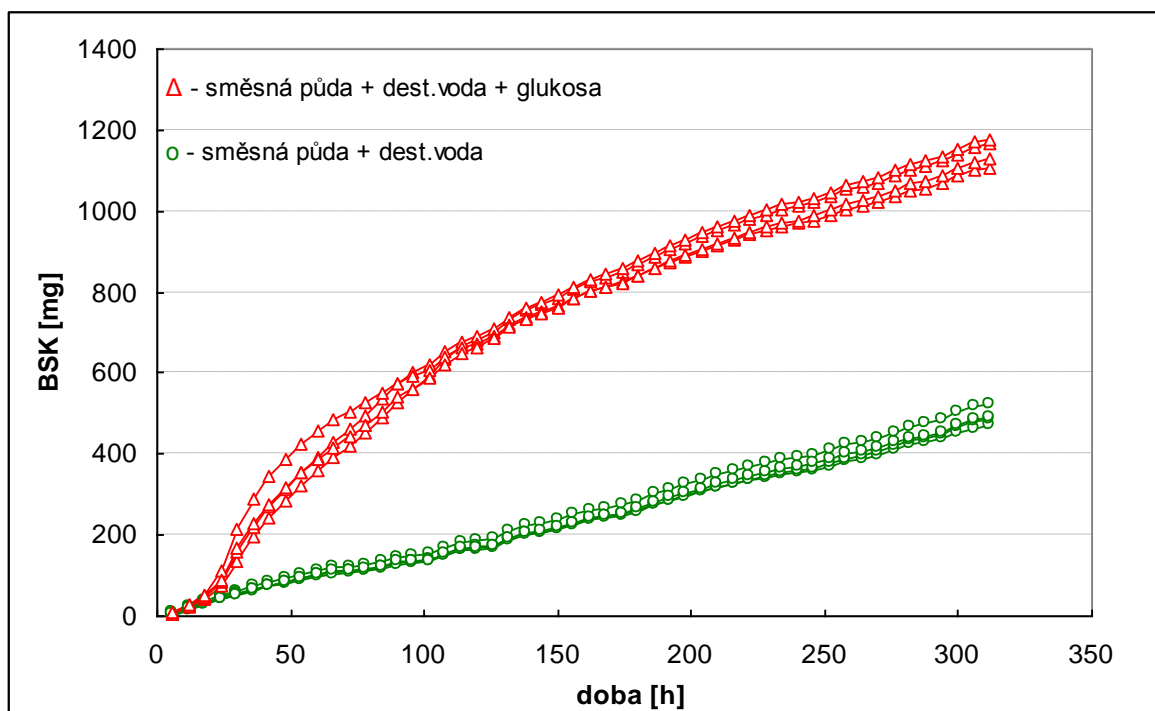
6.2 Volba vhodného média pro přípravu zásobního roztoku PVA

V případě PVA, který je silně hydrofobický, nelze při přípravě testu postupovat metodou přímé navážky zkoušené látky do reaktoru. Docházelo by k tvorbě aglomerátů PVA s půdou a data by tak byla nereprodukovatelná. Bylo nutno tedy přistoupit k dávkování substrátu v roztoku. V převážné většině norem zabývajících se biologickým rozkladem organických látek je uvedena příprava roztoku zkoušené látky v biomédium. Rozhodujícím kritériem pro experiment však byly výsledky diplomové práce Nedbálka [41], který se zabýval vlivem minerálních solí na biodegradaci PVA. Ve své práci uvedl, že přítomnost některých minerálních solí, konkrétně fosforečnanů, může inhibovat činnost některých PVA – degradujících mikroorganismů. Vzhledem k této skutečnosti bylo záměrem práce použít roztok zkoušené látky připravený z destilované vody. Tuto formu přípravy roztoku připouští i norma ČSN EN ISO 7827 [42]. Nicméně, destilovaná voda není vhodná pro přípravu roztoků studovaných látek a proto bylo nejprve nutné posoudit, zda-li je to vůbec možné.

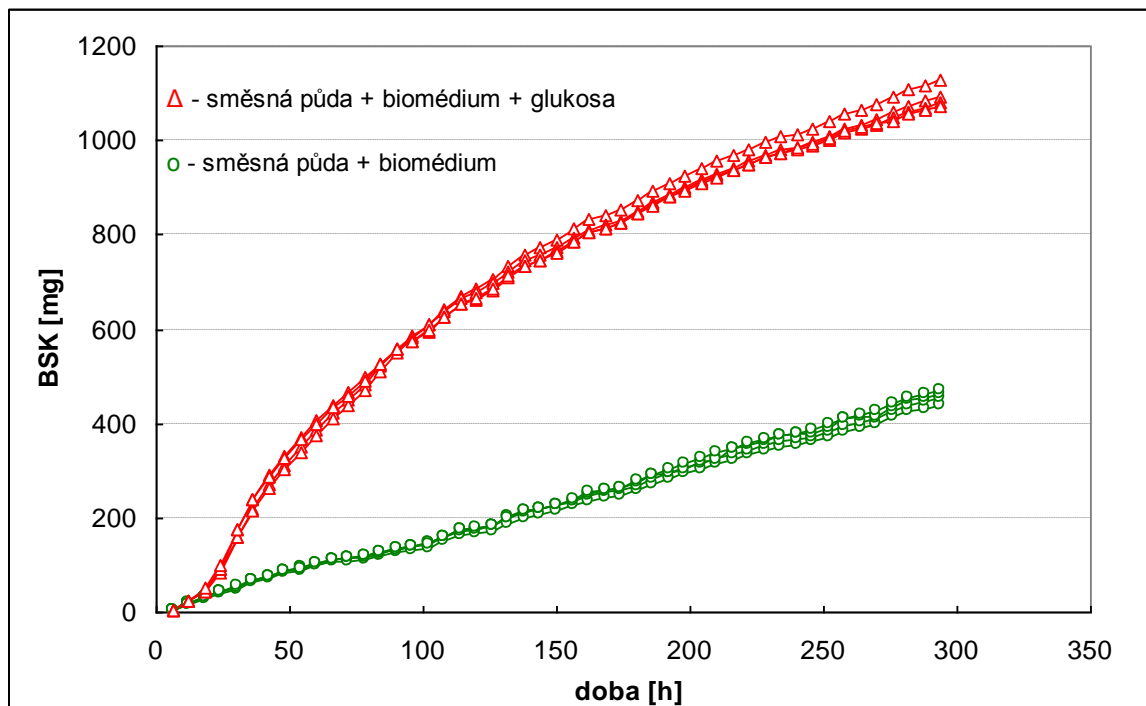
Vliv přidavku destilované vody na půdní mikroflóru byl testován na biodegradaci glukosy ve směsné půdě. Před testem bylo nutné zjistit jaké množství vody/biomédia je možné

dávkovat na 1 l směsné půdy, aby nedocházelo k tvorbě půdních aglomerátů. Byly připraveny série vzorků směsné půdy a do každé byl nadávkován různý objem vody od 30 do 50 ml. Objemy nižší jak 30 ml by vyžadovaly přípravu zásobních roztoků o vysoké koncentraci PVA (špatná rozpustnost, vysoká viskozita roztoků). Při dávkování vyšším jak 50 ml došlo v půdě ke tvorbě shluků a manipulace s půdou byla obtížná. Po přidání 30 ml půda nevykazovala změnu fyzikálních vlastností a byla v ní stanovena vlhkost, která byla cca 50 %. S rostoucím dávkováním destilované vody/biomédia se zhoršovaly fyzikální vlastnosti půdy. Zvolen byl tedy objem 30 ml na 1 l směsné půdy. Rozklad glukosy v přítomnosti biomédia a destilované vody ve směsné půdě probíhal 12 dní.

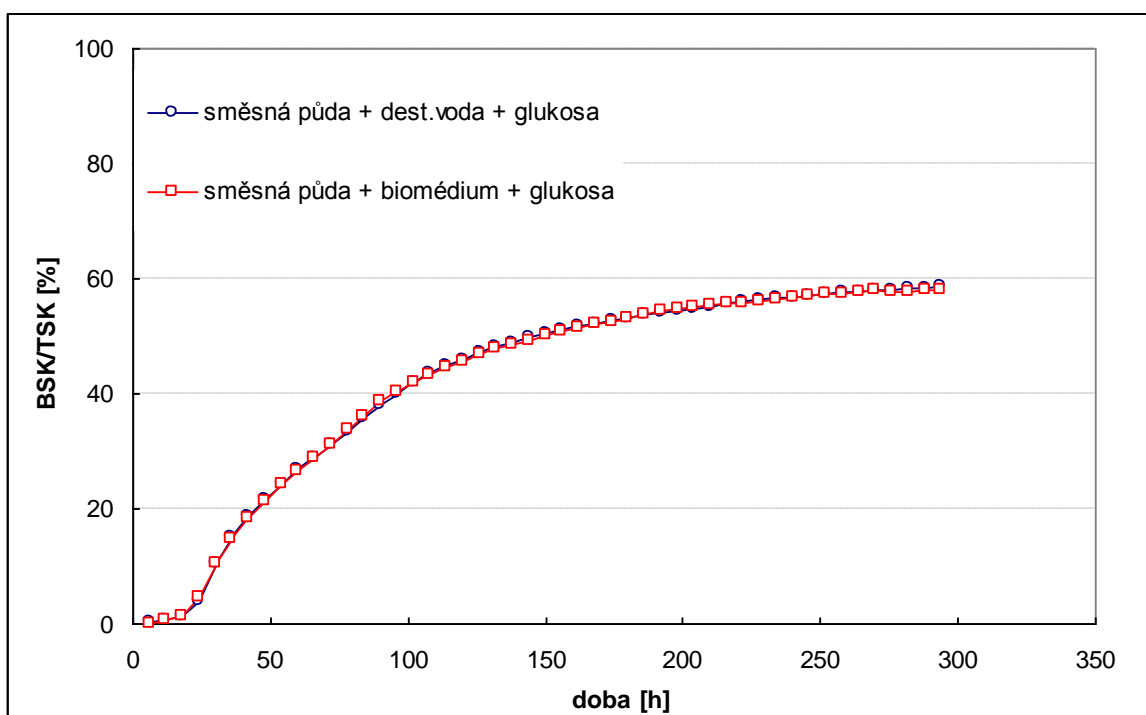
Obr. 8 a 9 znázorňují průběh biodegradace glukosy ve směsné půdě s přidavkem destilované vody nebo biomédia. U obou případů byla glukosa rozložena z 60 %. Ze sumárního grafu, který je znázorněn na obr. 10 vyplývá, že průběh biologického rozkladu glukosy je v obou případech identický, tzn. že při zvoleném dávkování nemá destilovaná voda negativní vliv na půdní mikroorganismy. Vzhledem k této skutečnosti a výsledkům práce Neďbálka [41] byla zvolena destilovaná voda pro přípravu zásobního roztoku PVA.



Obr. 8. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem destilované vody



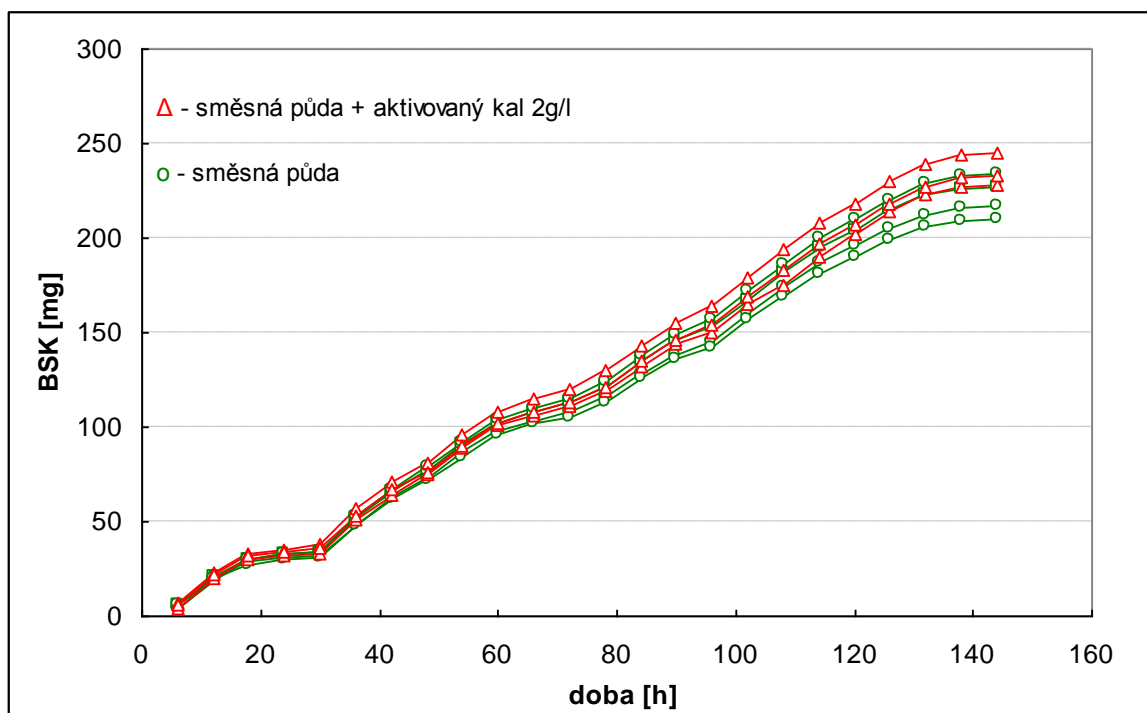
Obr. 9. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem biomédia



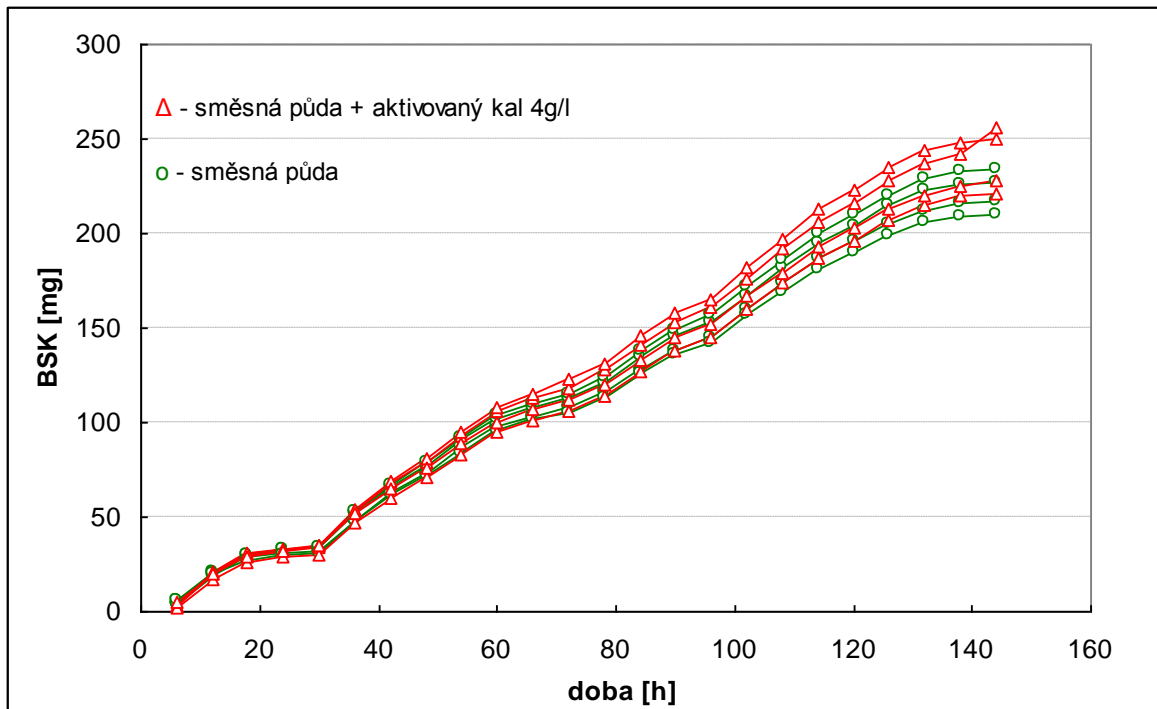
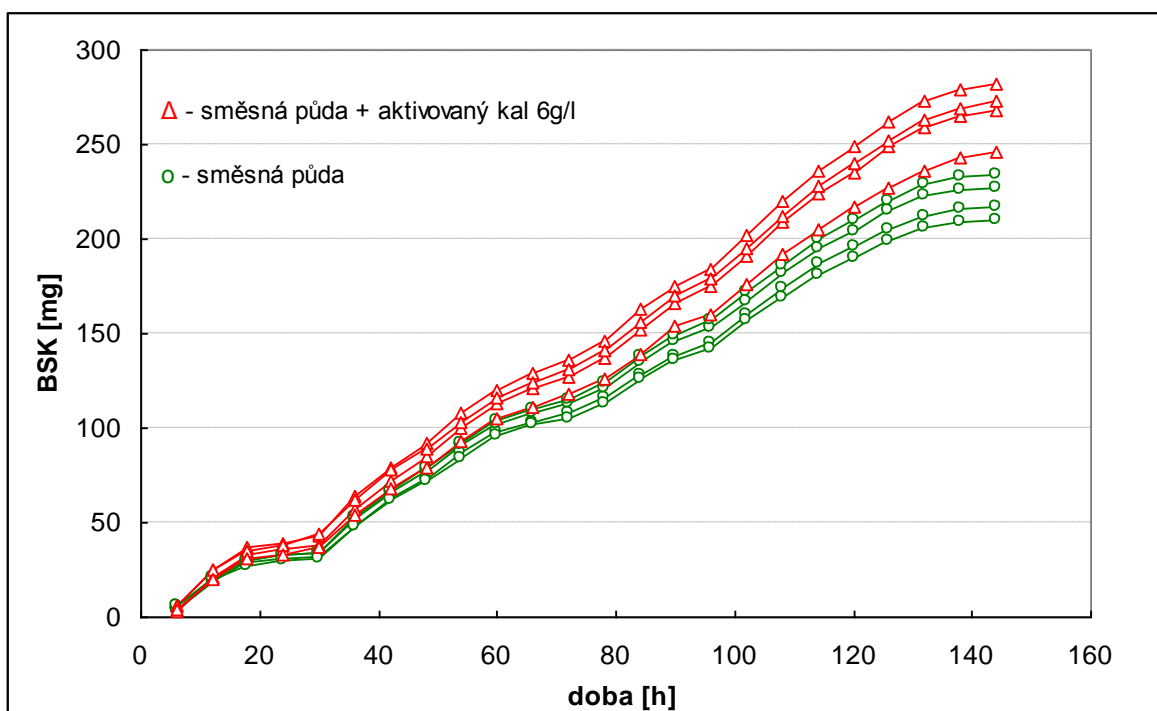
Obr. 10. Srovnání průběhu biologického rozkladu glukosy po přidavku biomédia nebo destilované vody

6.3 Inokulace půdy biomasou aktivovaného kalu

Úkolem tohoto respirometrického testu bylo určit vhodné množství sušiny aktivovaného kalu pro inokulaci půdy. Biomasa aktivovaného kalu byla do půdy přidána metodou přímého přidavku dvěma způsoby. První způsob byl přidavek koncentrované suspenze aktivovaného kalu v biomédiu. Objem přidávaného roztoku byl 30 ml na 1 l směsné půdy. Půda byla rovnoměrně rozprostřena a biomasa aktivovaného kalu byla rovnoměrně pomocí stříčky nanášena do celé plochy, poté byla celá směs důkladně homogenizována. Byla testována sušina 2, 4 a 6 g aktivovaného kalu / 1 l půdy. Slepým pokusem zde byla čistá směsná půda bez přidavku kalu. Obr. 11, 12 a 13 znázorňují průběh BSK u testovaných sušin aktivovaného kalu.



Obr. 11. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 2 g AK/l_p

Obr. 12. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 4 g AK/l_pObr. 13. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 6 g AK/l_p

Z obr. 11-13 je ale zřejmé, že respirace u jednotlivých testů probíhá téměř stejně a až u sušiny 6 g/l_p lze zaznamenat nepatrné zvýšení hodnot BSK. Také manipulace

s koncentrovanou suspenzí AK nebyla příliš uspokojivá. Bylo nemožné zajistit dobrou homogenizaci a distribuci AK v celém obsahu inokulované půdy a docházelo k tvorbě půdních aglomerátů. Z těchto důvodů byl otestován druhý způsob přímého přidavku AK. V tomto experimentu byl aktivovaný kal přidán do půdy ve formě částečně odvodněné biomasy (centrifugace 3000 ot/min po dobu 10 min, sušina biomasy 12,32 %). Sušina přidávané biomasy byla 2 g – 6 g sušiny aktivovaného kalu na 1 l půdy a 2 g glukosy na 1 litr půdy. Experiment probíhal po dobu 7 dnů a rozklad glukosy proběhl z 60 %. Získané výsledky neměly uspokojivou reprodukovatelnost, taktéž docházelo k tvorbě aglomerátů a dobrá homogenizace biomasy aktivovaného kalu do půdy nebyla proveditelná, z tohoto důvodu zde nejsou získaná data prezentována.

Od metody přímého přidavku aktivovaného kalu do půdy bylo tedy odstoupeno. Množství biomasy také není rozhodující. Vždy bude záležet na kvalitě samotného aktivovaného kalu a množství PVA-degradujících mikroorganismů. To vše závisí na složení substrátu v odpadní vodě. Rozhodujícím kritériem je tudíž manipulace s aktivovaným kalem při přípravě testu, tedy technická stránka realizace testu - schopnost dobré homogenizace biomasy AK do půdy a vyhovující manipulace s biomasou. To lze zajistit výběrem vhodného nosiče. V následující kapitole jsou popsány experimenty s využitím možných nosičů pro biomasu AK.

6.4 Volba vhodného nosiče pro biomasu aktivovaného kalu

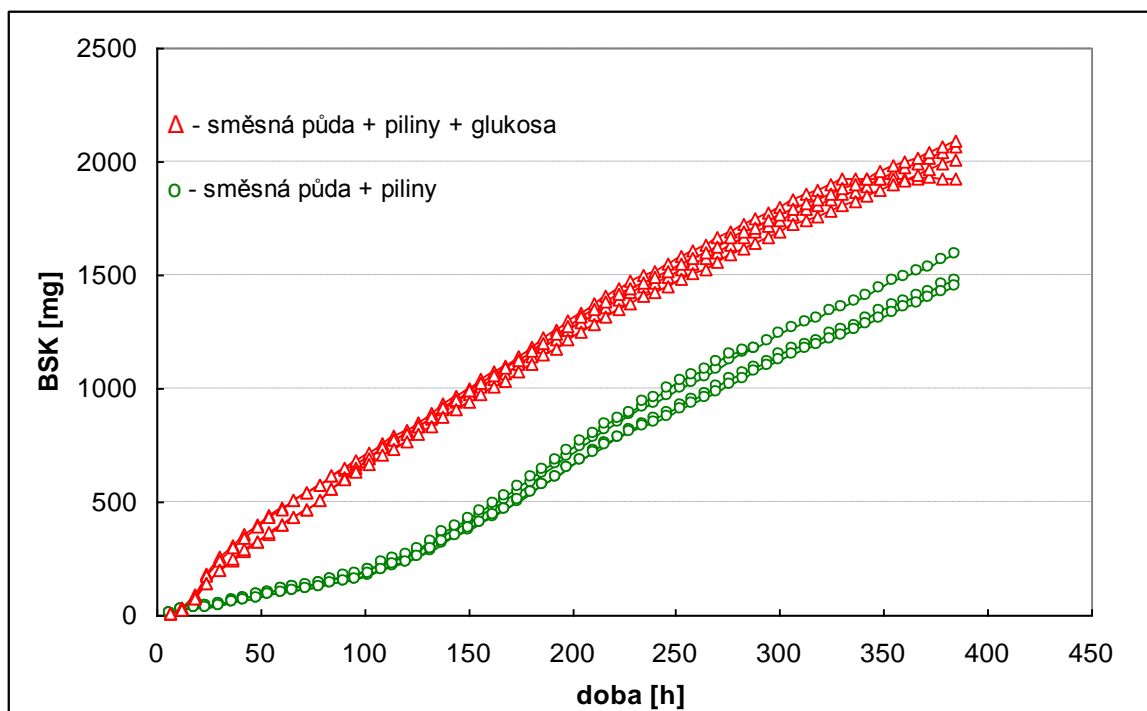
Vzhledem k výsledkům předešlého testu, který prokázal, že dávkování biomasy AK přímo do půdy není vhodné, bylo cílem tohoto experimentu zvolit vhodný nosič pro biomasu AK. Norma ČSN EN 14046 [43] nabízí možnost využití strukturního materiálu jako např. malé kousky dřeva nebo využití těžce biologicky odbouratelného či inertního materiálu. Tyto přídavné látky mohou zabránit slepování a hrudkovatění směsné půdy (tvorba již zmíněných aglomerátů) i po přidání biomasy AK. V řadě publikací bývá využíván také mořský písek, nicméně v předcházejících diplomových pracích probíhajících na UIOŽP se ukázal jako nevhodný, protože opět docházelo k tvorbě hutných, neprodyšných aglomerátů. Navrženy a otestovány byly tak dřevěné piliny z dubového dřeva, které mohou teoreticky přispívat k rozkladu PVA, jelikož na jejich rozkladu se podílí mikroorganismy produkující ligninolitické enzymy, které se mohou uplatňovat při rozkladu samotného PVA. Jako druhý nosič byl navržen perlit (inertní materiál).

6.4.1 Využití pilin, jako nosiče pro biomasu AK

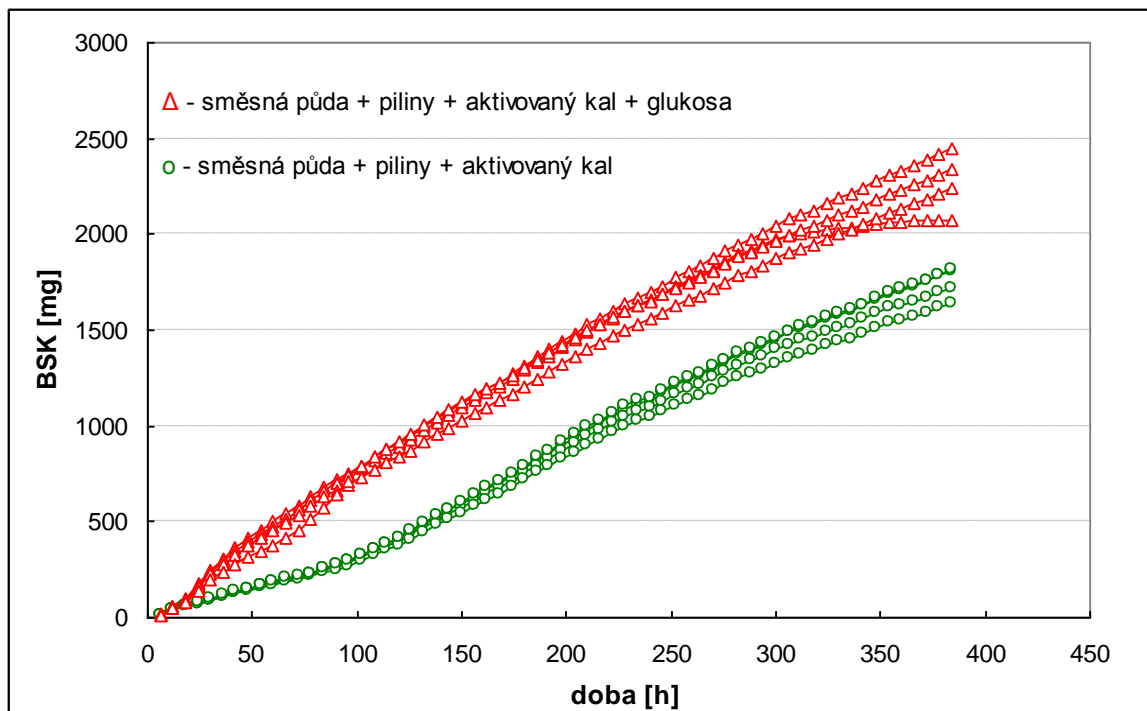
Jako první proběhl test s využitím již zmíněných dřevěných pilin (velikost cca 5x5x1 mm). V prvním kroku bylo nutné zvolit vhodný objem pilin na 1 l směsné půdy tak, aby respirace samotné půdy nebyla významně ovlivněna a byl zajištěn dobrý přestup kyslíku z pevné do plynné fáze. Ve druhém kroku byl zvolený objem pilin smíchan s biomasou AK, dávkován do reaktorů a byl sledován rozklad glukosy v takto upravené půdě.

Piliny o objemu 150 a 250 ml byly smíchány s 1 l půdy. Z vizuálního porovnání se nejlépe jevil objem pilin 250 ml na 1 l směsné půdy. Poté byl vybraný objem pilin promyt destilovanou vodou a vysušen v sušárně při teplotě 80 °C. K takto připraveným pilinám bylo přidáno 2,5 l suspenze AK o sušině 5,91 g/l. Bylo necháno 30 minut v klidu, aby došlo k „sorpci“ aktivovaného kalu pilinami. Poté byla suspenze centrifugována při 3000 ot/min po dobu 10 minut. Byl odlit supernatant a piliny s biomasou AK byly smíchány s půdou. Takto připravená půda byla vložena do reaktorů a byla přidána glukosa (2 g/l_p). Srovnávacím testem zde byla půda obsahující samotné piliny, zpracované stejným způsobem jako v předešlém případě pouze bez AK (2,5 l destilované vody). Test probíhal po dobu 16 dní.

Obr. 14 a 15 popisují průběh biologického rozkladu glukosy v půdě obsahující samotné piliny a piliny smíchané s aktivovaným kalem.

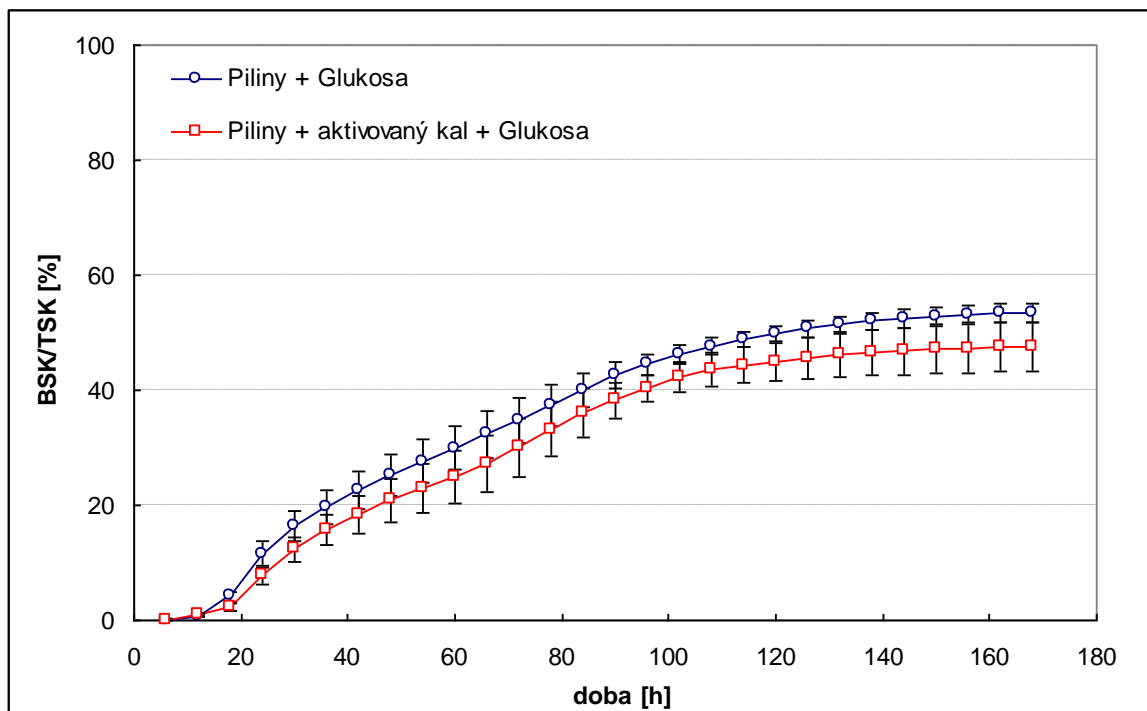


Obr. 14. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem 250 ml pilin/1 l půdy



Obr. 15. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem 250 ml pilin s aktivovaným kalem /1 l půdy

Obr. 16 pak ukazuje porovnání průběhu biodegradace glukosy v přítomnosti testovaných látek. Z výsledků vyplývá, že rozklad glukosy v přítomnosti pilin s biomasou AK v půdě probíhá hůře než-li degradace glukosy v přítomnosti čistých pilin v půdě. V průběhu testů byly zaznamenány vysoké hodnoty BSK a to až cca 2000 mg u slepých pokusů. Jedná se o značně vysoké hodnoty a při sledování biologického rozkladu špatně rozložitelných látek mezi které lze zařadit i PVA by mohlo dojít ke zkreslení výsledků – rozklad samotného PVA by mohl probíhat na úrovni slepých pokusů. Z toho důvodu byly piliny vyhodnoceny jako nevhodné pro samotnou bioaugmentaci.



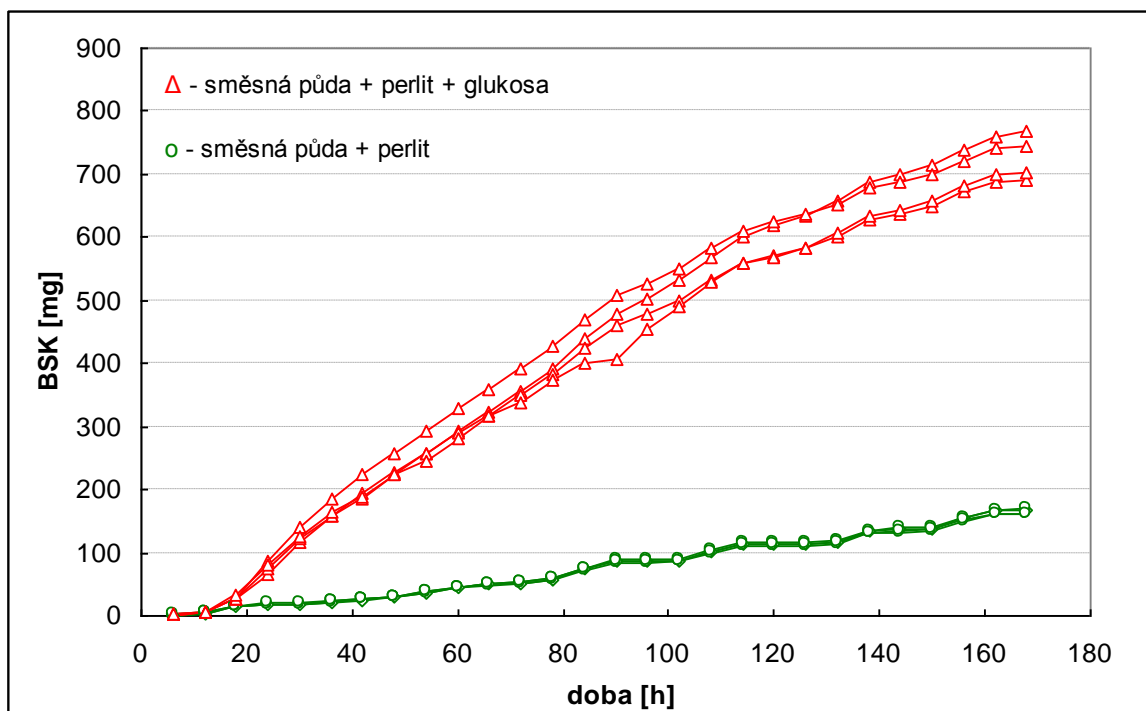
Obr. 16. Porovnání průběhu biodegradace glukosy v půdě za přítomnosti pilin a pilin obohacených aktivovaným kalem

6.4.2 Využití perlitu, jako nosiče pro biomasu AK

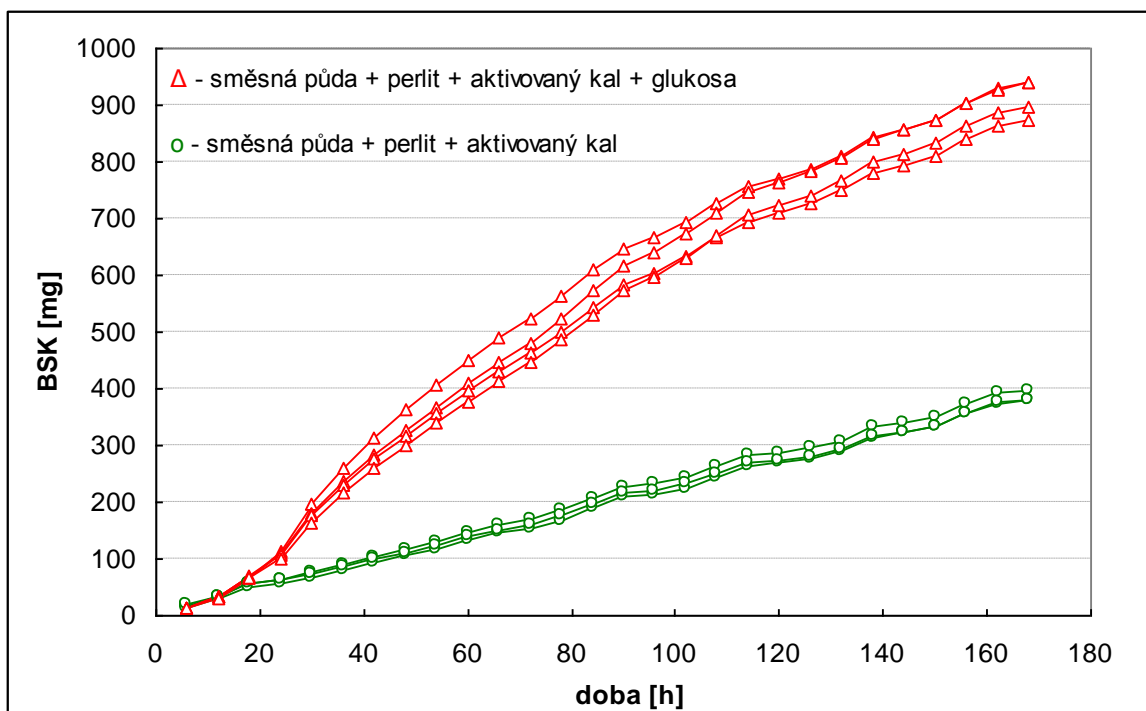
Druhým testovaným nosičem byl inertní materiál perlit. Prvním krokem před samotným testem byla samotná příprava perlitu. V druhém kroku byl perlit smíchán s biomasou a následně homogenizován do půdy, půda byla dána do reaktorů a byla přidána glukosa (2 g/l_p).

Příprava perlitu byla provedena podle práce Kratiny [38]. Před vlastními testy byl nejprve perlit 3x promyt destilovanou vodou a vysušen při 105°C. 24 hodin před testem byl takto připravený perlit smíchán s destilovanou vodou v poměru 1:1 (245 g čistého promytého a suchého perlitu + 245 ml vody). S takto připraveným perlitem byla smíchána biomasa AK (centrifugována při 3000 ot/min) tak, aby obsah biomasy v reaktoru byl 6 g/l_p. Poté byla směs přidána do směsné půdy a důkladně homogenizována. Půda byla dána do reaktorů a následně byla přidána glukosa (2 g/l_p). Jako srovnávací test sloužil perlit smíchán pouze s destilovanou vodou bez AK. Pokus probíhal po dobu 7 dní. Obr. 17 a 18 popisují průběh

biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě v přítomnosti čistého perlitu a perlitu s biomasou aktivovaného kalu.

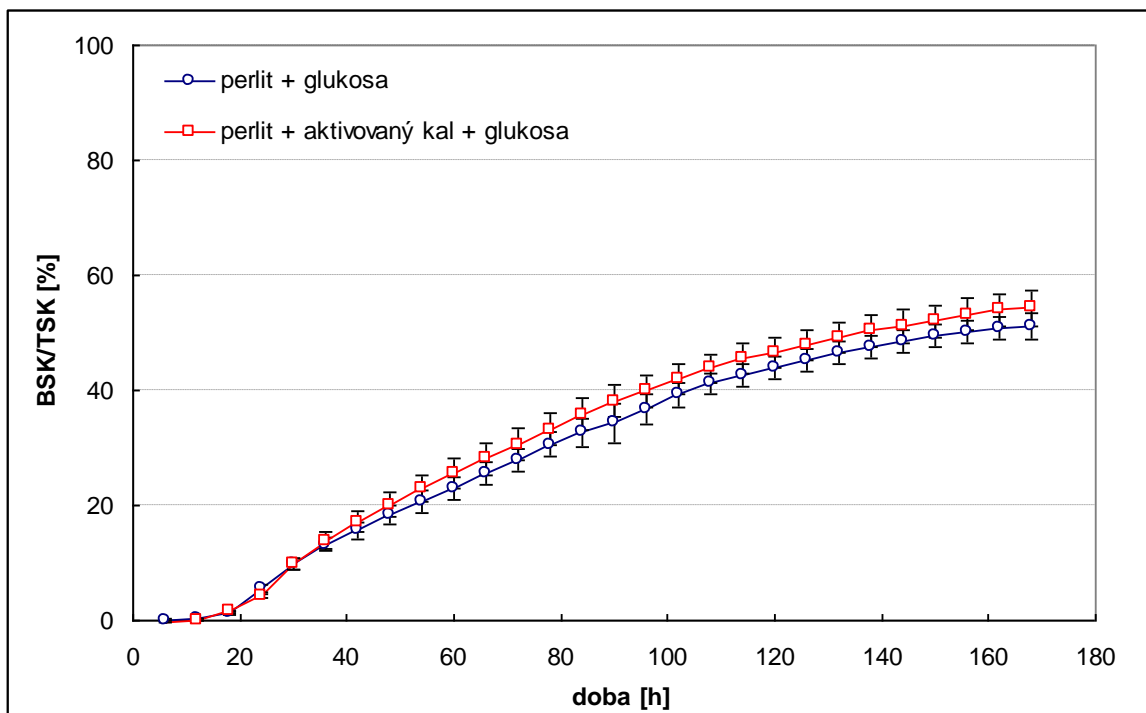


Obr. 17. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu



Obr. 18. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu a aktivovaného kalu

Z Obr. 19, který popisuje srovnání průběhů biodegradace glukosy v přítomnosti samotného perlitu a perlitu s AK vyplývá, že perlit je vhodný jako inertního nosič pro biomasu AK.



Obr. 19. Srovnání průběhů degradace glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu a perlitu s aktivovaným kalem

Na základě výsledků uvedených v předcházejících kapitolách byl zvolen následující postup bioaugmentace půdy aktivovaným kalem:

- směsná půda
- příprava roztoku zkoušené látky v destilované vodě
- inertní nosič – perlit
- zahuštěná biomasa AK (centrifugován při 3000 ot/min po dobu 10 min)

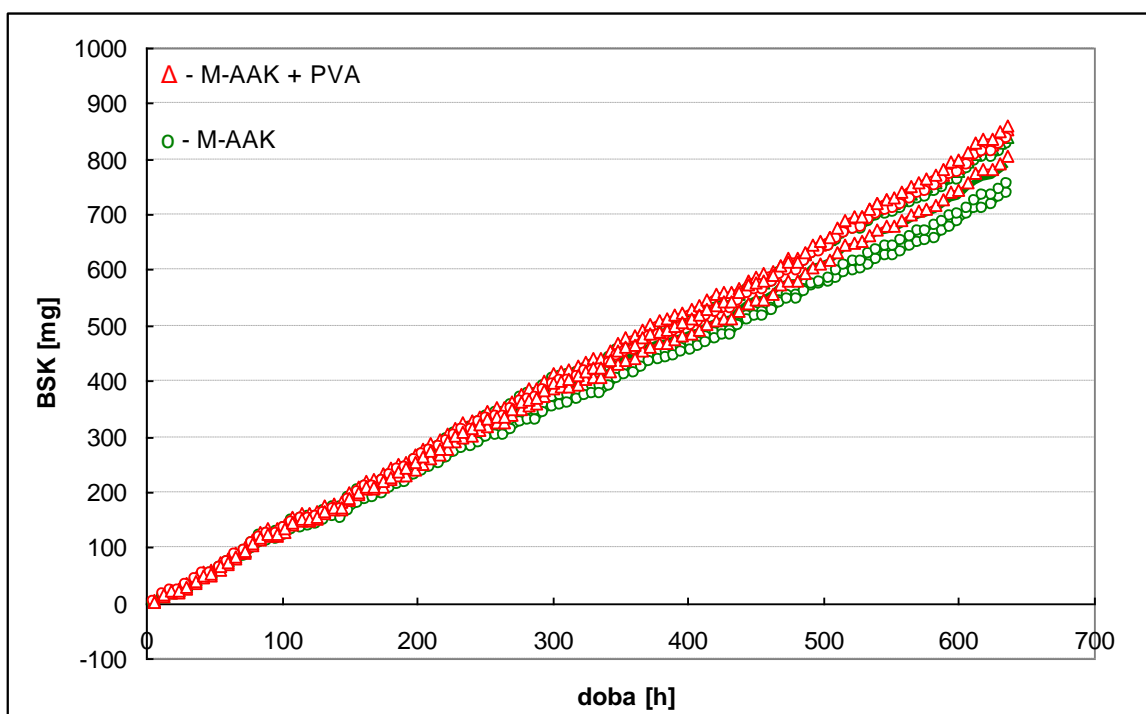
Podrobnější popis experimentů je uveden v nadcházející kapitole.

7 ROZKLAD PVA V PŮDĚ INOKULOVANÉ NA PVA ADAPTOVANÝM AKTIVOVANÝM KALEM

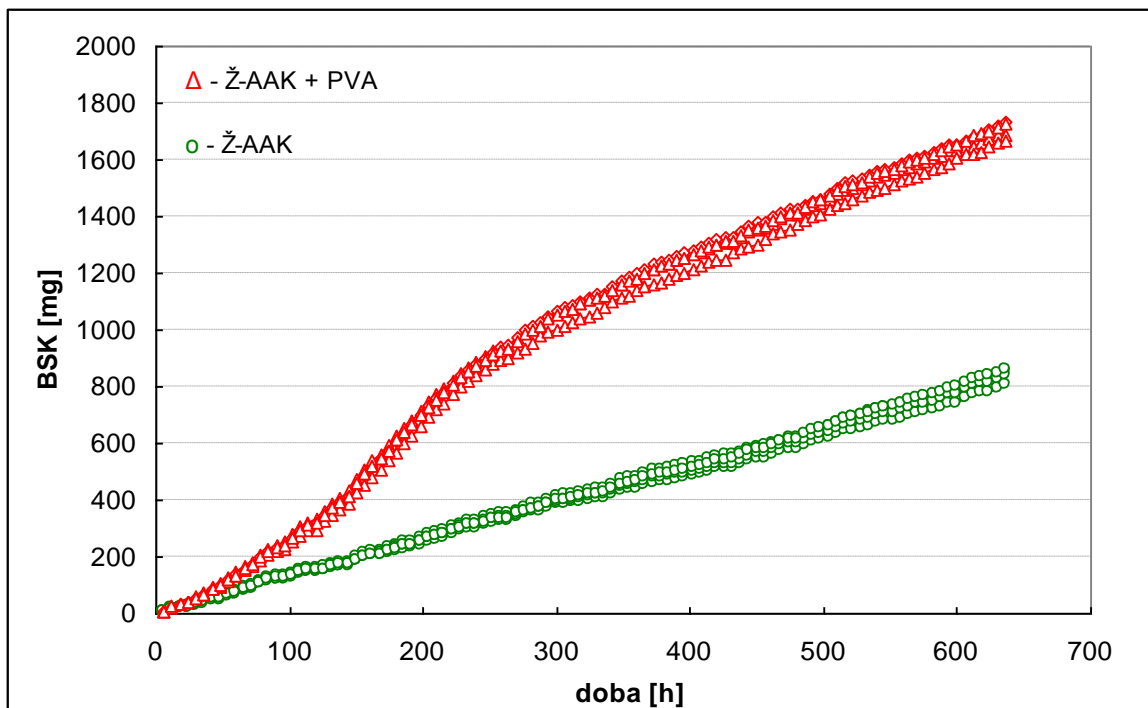
Cílem celého experimentu bylo podpořit rozklad PVA v půdě pomocí bioaugmentace. Jako inokulum byl použit na PVA adaptovaný aktivovaný kal (AAK) z čistírny odpadních vod (kap. 5.2). Na základě výsledků optimalizačních testů, které jsou popsány v kapitole 6, byl postup bioaugmentace následující: Byla připravena směsná půda složená ze zemědělské zeminy a komerčního kompostu v poměru 1:5. Dále byl den dopředu připraven perlit: perlit byl promyt destilovanou vodou pro případné odstranění nečistot a vysušen při 105 °C. Poté bylo naváženo 245 g perlitu a smícháno s 245 ml vody (poměr voda:perlit = 1:1) a ponecháno v klidu 24h. Jako inokulum byl k dispozici na PVA adaptovaný aktivovaný kal ve dvou fermentorech o celkovém objemu 5 l (na konci adaptace byly hodnoty TOC < 20 mg/l a koncentrace PVA pod detekcí spektrofotometrického stanovení). AAK z prvního i druhého fermentoru byl centrifugován (3000ot/min po dobu 10 minut) zvlášť a následně byl odlit supernatant. Biomasa z fermentoru 1 (mrtvý kal) o sušině 2,34 g/l byla sterilizována v autoklávu (30 minut při 125°C) poté byla smíchána s 245 g připraveného perlitu a následně homogenizována do půdy o objemu 3 kg. Takto nachystaná půda sloužila pro studium rozkladu PVA v půdě (vliv látek přítomných v biomase AK – bílkoviny, polysacharidy, polyestery, kyselina deoxyribonukleová a ribonukleová atd.) Biomasa z fermentoru 2 (živý kal) o sušině 2,37 g/l byla použita pro inokulaci půdy na PVA adaptovaným aktivovaným kalem a byl studován samotný rozklad PVA (příprava stejná jako v předcházejícím případě, ale bez sterilizace biomasy). Opět byla biomasa smíchána s perlitem a homogenizována do půdy ve stejných poměrech. Počet PVA-degradujících mikroorganismů v živé biomase AAK byl $70 \cdot 10^4$ KTJ/g AAK. Dále byl připraven zásobní roztok PVA v destilované vodě o koncentraci 66,7 g/l. Připravená půda s živou a mrtvou biomasou aktivovaného kalu byla dávkována do bioreaktorů po 500 ml. Po nadávkování směsné půdy bylo dodáno vždy 15 ml roztoku PVA, aktuální koncentrace PVA v půdě byla 2 g/l_p (max. 30 ml/l půdy), do vzorků a do slepých pokusů byl dávkován stejný objem destilované vody. Vzorky i slepé pokusy byly připraveny 4x vedle sebe.

Obr. 20 znázorňuje průběh biologického rozkladu PVA ve směsné půdě obsahující mrtvou biomasou AAK. Je zřejmé, že rozklad PVA v samotné směsné půdě obohacené pouze mrtvou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu bez mikroorganismů schopných rozkladu

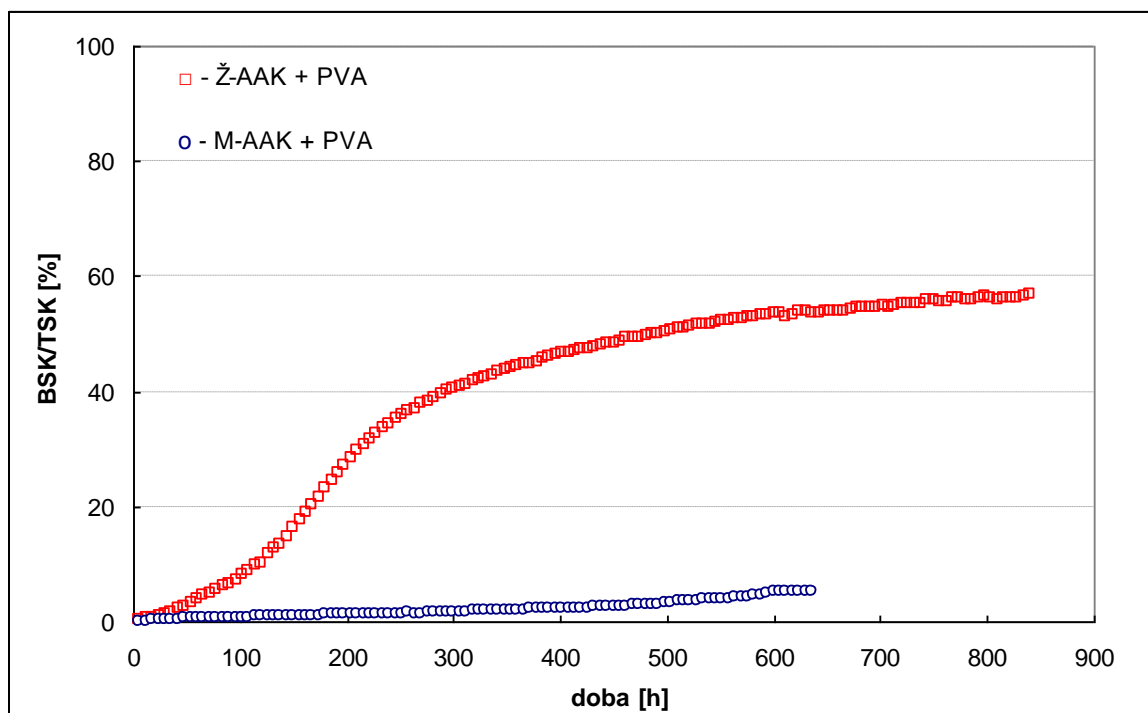
PVA, téměř neprobíhal. Po 10 denní lagové fázi bylo sice zaznamenáno malé procento rozkladu (cca 5 %), ale s největší pravděpodobností se jednalo pouze o rozklad zbytkových acetátových skupin. Naopak biologický rozklad PVA ve směsné půdě obohacené živou biomasou AAK probíhal daleko lépe – obr. 21. Z obr. 21 je evidentní, že rozklad začal téměř okamžitě (lagová fáze < 24 h) a po 40 dnech trvání experimentu došlo k degradaci PVA z 60 %. Na obr. 22 je pro názornost uvedeno srovnání průběhu biodegradace PVA ve směsné půdě s mrtvou biomasou AAK a s živou biomasou AAK.



Obr. 20. Průběh biologického rozkladu PVA ve směsné půdě s mrtvou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu

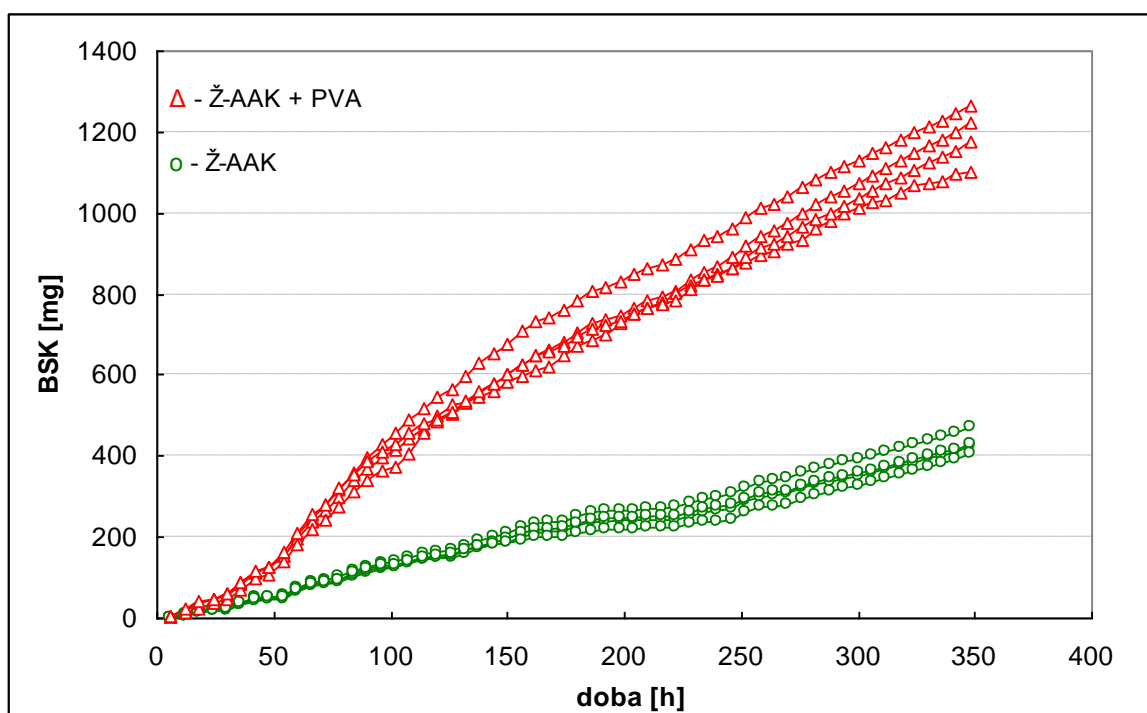


Obr. 21. Průběh biologického rozkladu PVA (přídavek I) ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu



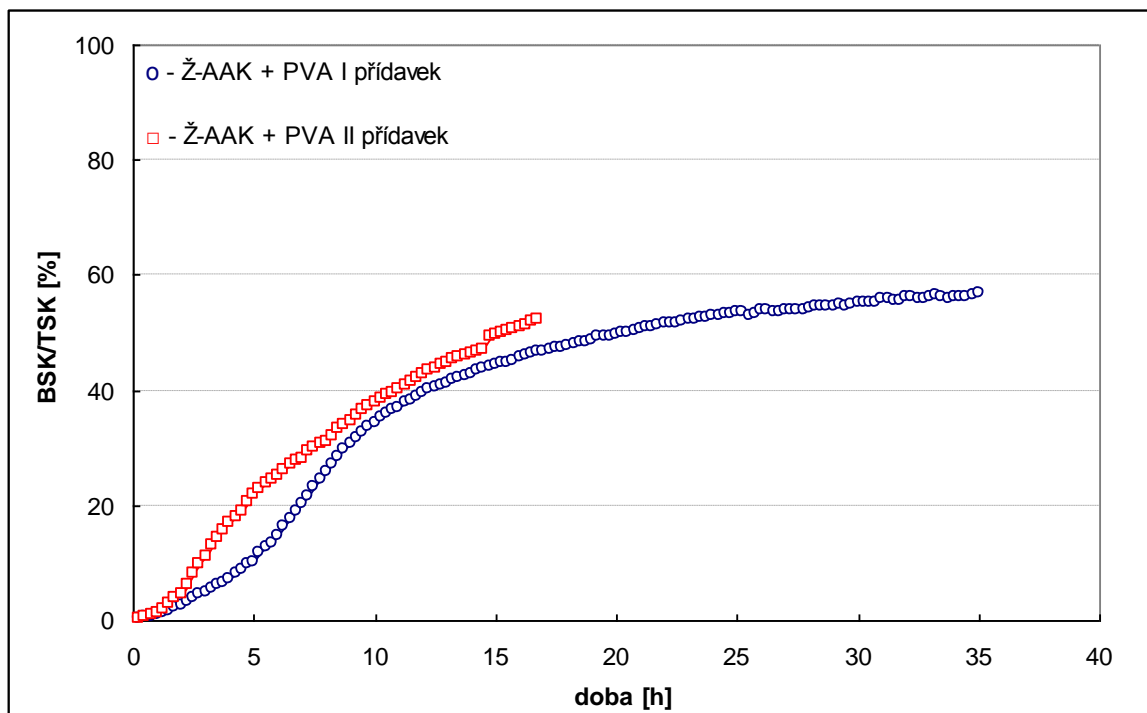
Obr. 22. Srovnání průběhu biologického rozkladu PVA (přídavek I) ve směsné půdě s živou a mrtvou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu

Ve 40 dnu experimentu, tj. 8 dnů po dosažení max. biologického rozkladu prvního přídávku PVA, byl do bioreaktorů s obsahem směsné půdy a živé biomasy AAK přidán druhý přídavek PVA (15 ml roztoku PVA o koncentraci 66,7 mg/l tak, aby obsah PVA v bioreaktoru byl 1 g) a do slepých pokusů byla přidána destilovaná voda (zachování stejných podmínek experimentu). Účelem druhého přídávku PVA bylo zjistit, zdali si PVA-degradující mikroorganismy zanechávají svou aktivitu i po prvním rozkladu substrátu. Obr. 23 znázorňuje biologický rozklad PVA po druhém přídávku. V průběhu testu bylo dosaženo během 16 dní 52 % biologického rozkladu PVA a lagová fáze byla 24 h. Je zřejmé, že degradační aktivita PVA-degradujících mikroorganismů přetrvává v půdě minimálně po dobu 8 dnů od dosažení maximálního procenta rozkladu a jsou tedy schopné degradace i po delší době. Nicméně bude zapotřebí provést další testy, které výsledky tohoto experimentu potvrdí.



Obr. 23. Průběh biologického rozkladu PVA (přídavek II) ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu po opakovaném přídávku

Z obr. 24, který srovnává průběh biologického rozkladu PVA v půdě při prvním a druhém přidavku PVA je evidentní, že mikroflóra nejen že si udržuje svou degradační aktivitu v půdě, ale rozklad je i rychlejší. Odpovídá tomu strmější biodegradační křivka při druhém přidavku PVA oproti biologickému rozkladu při prvním přidavku PVA.



Obr. 24. Porovnání průběhu biologického rozkladu PVA ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu po prvním a druhém přidavku PVA

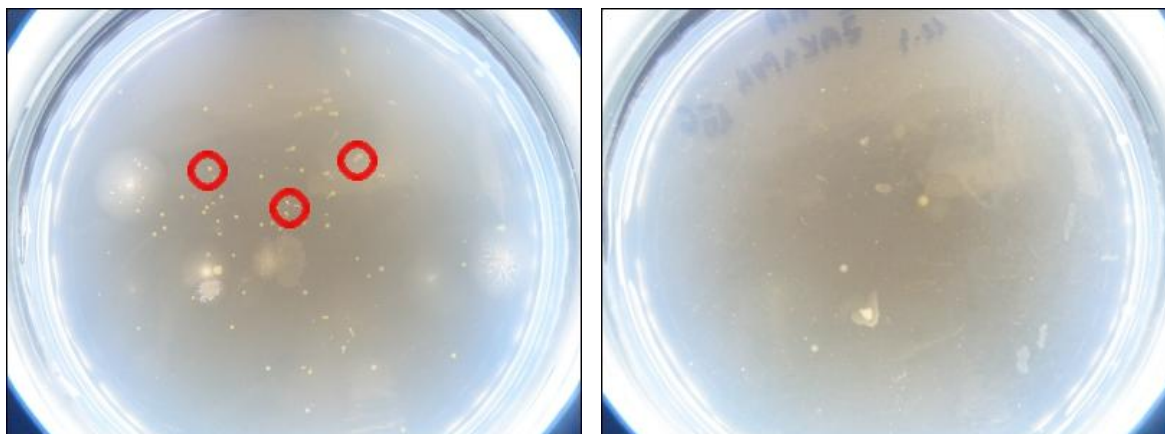
V průběhu experimentu byly také odebírány vzorky půdy i s perlitem pro mikrobiologické rozbor, které sloužily jako doplňující screeningové testy k samotnému respirometrickému pokusu. První mikrobiologický rozbor byl prováděn na začátku testu před přidáním PVA. Celkový počet půdních mikroorganismů ve směsné půdě s obsahem živé biomasy adaptovaného aktivovaného kalu byl $74 \cdot 10^6$ KTJ/g a aktinomycét $4 \cdot 10^5$ v 1 g půdy. Ve směsné půdě s obsahem mrtvé biomasy adaptovaného aktivovaného kalu byly počty půdních mikroorganismů na začátku testu cca o polovinu menší a to $39 \cdot 10^6$ KTJ/g, počet aktinomycét byl stejný (tab. 3). Inokulací půdy živým aktivovaným kalem tak dochází podle očekávání ke zvýšení mikrobiálního oživení samotné půdy. Další vzorky půdy pro mikrobiologické rozbor byly odebírány v průběhu testu. Celkové počty půdních mikroorganismů a aktinomycét se v průběhu experimentu výrazně neměnily viz tab. 3.

Tab. 3. Celkový počet půdních mikroorganismů, aktinomycét a PVA – degradujících mikroorganismů po 13, 32 a 40 dnech experimentu

Složení půdy	Celkový počet půdních mikroorganismů [KTJ/g půdy]	Počty aktinomycét v 1 g půdy
0 DEN		
SP+Ž-AAK	$74 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$
SP+M-AAK	$39 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$
13 DEN		
SP+Ž-AAK	$41 \cdot 10^6$	$2,5 \cdot 10^6$
SP+M-AAK	$28 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
SP+Ž-AAK+PVA	$27 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^6$
SP+M-AAK+PVA	$31 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
32 DEN dosaženo max. biologického rozkladu prvního přídávku PVA		
SP+Ž-AAK	$31,5 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
SP+M-AAK	$26,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
SP+Ž-AAK+PVA	$29 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^5$
SP+M-AAK+PVA	$27,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
40 DEN zahájení experimentu – druhý přídavek PVA		
SP+Ž-AAK	$27 \cdot 10^6$	$6 \cdot 10^5$
SP+M-AAK	$27,5 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$
SP+Ž-AAK+PVA	$28,5 \cdot 10^6$	$4,5 \cdot 10^5$
SP+M-AAK+PVA	$30 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^6$

SP – směsná půda, M-AAK – mrtvý adaptovaný aktivovaný kal, Ž-AAK – živý adaptovaný aktivovaný kal

Mikrobiologické stanovení PVA-degradérů bylo provedeno na začátku a konci biologického rozkladu prvního přídávku PVA. K mikrobiologickému rozboru byly vzorky půdy odebrány bez perlitu (pro stanovení PVA-degradérů v samotné půdě). PVA-degradující mikroorganismy byly odečítány na minerálním agar s přídávkem PVA a jako srovnávací živné médium sloužil samotný minerální agar. Byly počítány kolonie, které vyrostly na minerálním agar s PVA, ale které se již nevyskytovaly na samotném minerálním agaru. Za potencionální PVA-degradující mikroorganismy mohou být označeny žlutě pigmentující kolonie, které na minerálním agaru bez PVA nebyly zaznamenány (obr. 25).



Obr. 25. Kolonie potencionálních PVA-degradujících mikroorganismů vypěstované na minerálním agaru s PVA (vlevo) ve srovnání s koloniemi na minerálním agaru (vpravo)

V prvním odběru – půda bez perlitu (zahájení experimentu) kolonie PVA-degradujících mikroorganismů nebyly zaznamenány. Důvodem pravděpodobně bylo to, že vzorek byl odebrán bez inokulovaného perlitu. Byla stanovována pouze směsná půda. Nicméně to ukazuje skutečnost, že v použité směsné půdě nejsou přítomni PVA-degradující mikroorganismy a po přidavku biomasy adaptovaného aktivovaného kalu, která byla nejprve smíchána s perlitem a poté homogenizována do půdy, nedochází podle očekávání k okamžitému rozšíření PVA-degradujících mikroorganismů do samotné směsné půdy.

V posledním odběru – půda bez perlitu (ukončení experimentu) bylo po 14 dnech kultivace na Petriho miskách s minerálním agarem s PVA, zaznamenáno $61 \cdot 10^6$ KTJ/g žlutě pigmentujících kolonií – eventuální PVA-degradující mikroorganismy. Na základě těchto výsledků je možné říci, že PVA-degradéři, které obsahovala biomasa AAK, se v průběhu biologického rozkladu PVA uvolnily z perlitu do půdy a pozvolna se rozšiřují v půdě, která je jimi tak dostatečně oživena.

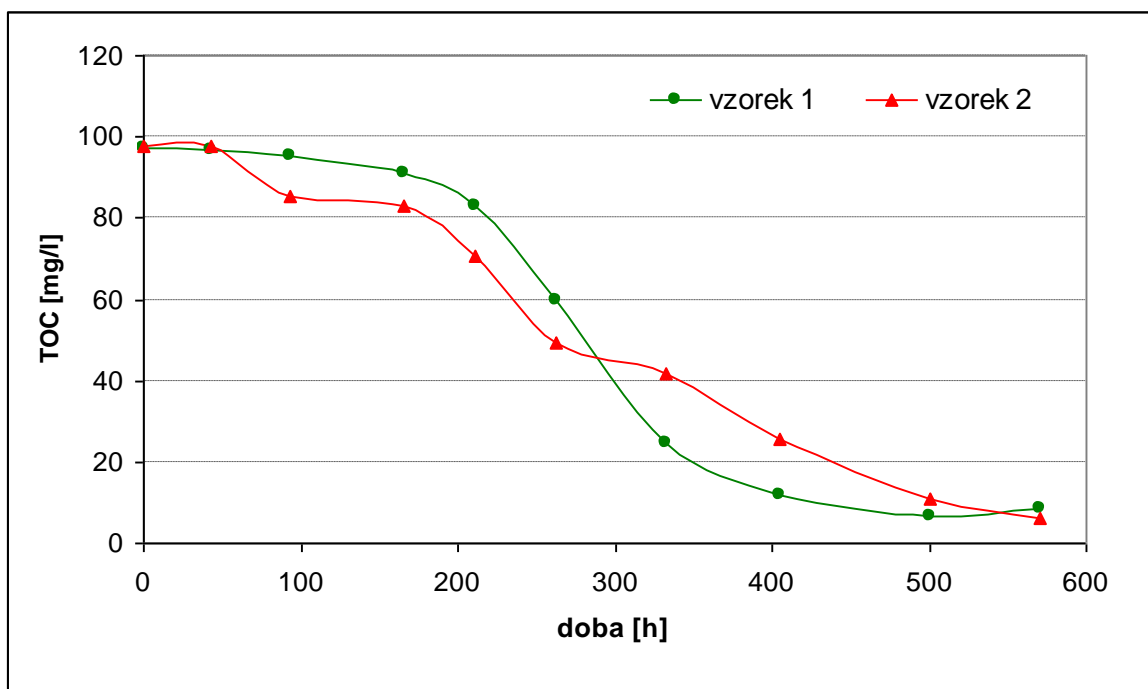
Nicméně bude nutné podrobnější studium PVA-degradujících mikroorganismů, které se v průběhu biologického rozkladu PVA v půdě vyskytují. Bylo by tedy vhodné respirometrické testy doplnit o testy z oblasti pokročilých technik molekulární biologie (PCR- polymerázová řetězová reakce).

8 BIOLOGICKÝ ROZKLAD PVA ZA PŘÍTOMNOSTI KMENE *PENICILLIUM CHRISOGENUM*

Záměrem testu bylo podpořit rozklad PVA v půdě pomocí kmene *Penicillium chrysogenum*, který se vyskytuje v odpadním mycéliu z výroby antibiotik (informace o mycéliu kap. 5.2). Vzhledem ke skutečnosti, že nejsou popsány studie rozkladu PVA pomocí tohoto kmene bylo nejprve nutné zjistit, zdali je to vůbec možné. Zahájeno bylo tedy nejprve studium rozkladu PVA ve vodném aerobním prostředí za přítomnosti výše zmíněného mikrobiálního kmene. Pokusy byly realizovány pomocí Zahn-Wellensova testu. Jako první byla zahájena adaptace a to následujícím postupem: byla připravena suspenze mycélia (500 mg/vztaženo na sušinu) v biomédiu v děličce o objemu 2 l s kontinuálním provzdušňováním. Do takto připravené suspenze byl hned přidán roztok PVA připravený v biomédiu, tak aby výsledná koncentrace PVA v děličce byla 200 mg/l. Z děličky byly v pravidelných intervalech odebírány vzorky a byl sledován úbytek TOC v mg/l. Po cca 2 měsíční adaptaci došlo ke 100 % rozkladu PVA v suspenzi mycélia (TOC < 20 mg/l). Bylo tedy znovu přidáno PVA v roztoku, aby koncentrace PVA v suspenzi byla opět 200 mg/l a byl sledován opakovaný rozklad PVA. Po dvou a půl měsících nebyl však zaznamenán opětovný rozklad PVA - ani po 44 dnech nedošlo k poklesu TOC. Důvodů může být celá řada např.: v průběhu rozkladu PVA dochází k tvorbě mírně toxických meziproductů snižujících mikrobiální aktivitu PVA-degradérů a nebo některá látka obsažená v mycéliu (zbytková koncentrace antibiotik) působí negativně na PVA-degradující mikroorganismy. Pro podrobnější studium biologického rozkladu PVA kmenem *Penicillium chrysogenum* byl připraven rozšířený Zahn-Wellensův test.

Připraveny byly suspenze mycélia v biomédiu v děličkách výše popsaným postupem 3x vedle sebe. Ve všech děličkách byla před zahájením samotného testu suspenze mycélia provzdušňována po dobu 14 dní až koncentrace TOC byla nižší jak 20 mg/l – odstranění zbytkových organických látek přítomných v mycéliu, popř. penicilinu [44]. Poté bylo do dvou děliček přidáno PVA stejným způsobem jako při první adaptaci a třetí dělička sloužila jako slepý pokus. Z děliček byly odebírány vzorky, byl zaznamenáván objem, čas a datum odběru. Průběh rozkladu PVA v přítomnosti kmene *Penicillium chrysogenum* v závislosti na čase popisuje obr. 26. Po 25 dnech došlo k rozkladu PVA v suspenzi mycélia. Opakovaným pokusem bylo potvrzeno, že v mycéliu, při prvním přidavku PVA dojde k jeho rozkladu. Tato skutečnost naznačuje, že kmen *Penicillium chrysogenum* je schop-

ný rozkládat PVA, nicméně pro vyslovení přesných závěrů je třeba provést další respirometrické testy.



Obr. 26. Průběh biologického rozkladu PVA v přítomnosti suspenze mycélia v biomédiu

Pokud by jejich výsledky potvrdily biologický rozklad PVA za přítomnosti kmene *Penicillium chrysogenum*, stává se odpadní mycélium z výroby antibiotik eventuální možností pro podporu rozkladu PVA v půdním prostředí. Nicméně je důležité jeho další studium a podrobnější popis jeho složení.

ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo podpořit rozklad PVA v půdním prostředí pomocí bioaugmentace. Ke sledování všech biodegradačních testů byl použit respirometr BI-2000 a hodnotícím kritériem byl poměr BSK/TSK.

Diplomová práce byla rozdělena na tři části. V první části byla provedena série optimalizačních testů, v druhé byla realizována samotná bioaugmentace půdy obsahující PVA, biomasou adaptovaného aktivovaného kalu a třetí část se zabývala rozkladem PVA s využitím kmene *Penicillium chrysogenum*.

Záměrem optimalizačních testů bylo navrhnout vhodný postup inokulace půdy biomasou aktivovaného kalu. Na základě výsledků experimentů byla pro studium biodegradace PVA v půdním prostředí zvolena v laboratoři připravená směsná půda složená z komerčního kompostu a zemědělské zeminy v poměru 5:1. Jako inertní nosič biomasy aktivovaného kalu byl vybrán perlit a to z důvodů lepší manipulace a homogenizace biomasy AK do půdy. PVA byl dávkován ve formě roztoku v destilované vodě, pro minimalizaci případných negativních vlivů fosforečnanů přítomných v minerálním médiu [41].

Druhá část byla zaměřena na sledování biologické degradace PVA v půdě inokulované biomasou na PVA adaptovaného aktivovaného kalu. Rozklad PVA začal téměř okamžitě – lagová fáze byla menší než 24 hodin. Po 40 dnech trvání experimentu byl zaznamenán rozklad PVA z 60 %, což odpovídá rozkladu snadno rozložitelného substrátu (60 % BSK/TSK pro glukosu). Přibližně ve 40 dnu experimentu (dosažené plató) byl do reaktorů přidán přírůstek PVA. I po přidavku PVA došlo k jeho rozkladu (60 %). Je zřejmé, že PVA-degradující mikroorganismy, které byly vneseny do půdy, si udržují svou degradační aktivitu ještě minimálně po dobu 8 dní po dosažení maximálního rozkladu. Je ovšem nutné získané výsledky dále potvrdit.

V poslední části diplomové práci byla věnována pozornost odpadnímu myceliu z výroby antibiotik, které obsahovalo kmen *Penicillium chrysogenum*. Cílem bylo zjistit, zda je možné tento kmen využít pro podporu rozkladu PVA v půdním prostředí. Zahájeno bylo tedy nejprve studium rozkladu PVA ve vodném aerobním prostředí za přítomnosti výše zmíněného mikrobiálního kmene. Byly připraveny suspenze mycéliu v biomédiu a byl přidán PVA. Byl sledován úbytek TOC v závislosti na čase. Po 25 dnech došlo k rozkladu PVA v suspenzi (TOC < 20 mg/l), nicméně po opakovaném přidavku PVA nedošlo k jeho

rozkladu. Opět je nutné testy zopakovat a blíže se věnovat tomuto kmeni. Je ovšem zřejmé, že možnost jeho využití při rozkladu PVA je reálná.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Mowiol – příručka výrobce
- [2] HERMAN, F., Semicrystalline Polymers to Ziegler-Natta Catalysts, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, vol. 8, 2003, pp. 399-436, ISBN 0-471-28781-4
- [3] DUCHÁČEK, V., Polymery-výroba, vlastnosti, zpracování, použití. Praha, 2006. pp.77
ISBN 80-7080-616-6
- [4] VANOČANOVÁ, Z., *Štúdium štruktúry a vlastností polyvinylalkoholu modifikovaného hydrolyzátom kolagénu*, diplomová práce, 2001, Slovenská technická univerzita Katedra plastov a kaučuku
- [5] TSUJIYAMA, S., NITTA, T., MAOKA, T., Biodegradation of polyvinyl alcohol by *Flammulina velutipes* in an unsubmerged culture, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, vol. 112, no. 1, 2011, pp. 58-62
- [6] KIM, SOHN, Degradation of polyvinyl alcohol by *Sphingomonas* sp SA3 and its symbiote, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, vol. 30, no. 1, 2003, pp. 70-74, doi: 10.1007/s10295-002-0010-4
- [7] CHOI, K., PARK, C., KIM, S., LYOO, W., Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater, *Journal of industrial microbiology and biotechnology*, vol. 14, no. 5, 2004, pp. 1009-1013
- [8] ZHANG, ZHEN, Influence of pH and C/N Ratio on Poly(Vinyl Alcohol) Biodegradation in Mixed Bacterial Culture, *Journal of polymers and the environment*, vol. 17, no. 4, 2009, pp. 286-290, doi: 10.1007/s10924-009-0151-x
- [9] YAMATSU, A., MATSUMI, R., ATOMI, H., Isolation and characterization of a novel poly(vinylalcohol)-degrading bacterium, *Sphingopyxis* sp., *Applied microbiology and biotechnology*, vol. 72, no. 4, 2006, pp. 804-811, doi: 10.1007/s00253-006-0351-4
- [10] ZHANG, Y., LI Y., SHEN, W., New strain, *Streptomyces venezuelae* GY1, producing a poly(vinyl alcohol)-degrading enzyme, *World journal of microbiology & biotechnology*, vol. 22, no. 6, 2006, doi: 10.1007/s11274-005-9081-5

- [11] LEE, J., KIM, M., Isolation of new and potent poly(vinyl alcohol)-degrading strains and their degradation activity, *polymer degradation and stability*, vol. 81, no. 2, 2003, pp. 303-308, doi: 10.1016/S0141-3910(03)00101-0
- [12] SAKAI, K., HAMADA, N., WATANABE, Y., Studies on the poly(vinylalcohol)-degrading enzyme. Part VI, Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and b-diketone hydrolase from *Pseudomonas* sp., *Agric Biol Chem*, no. 50, 1986, pp. 989–96
- [13] CHIELLINI, E., CORTI, A., D'ANTONE, S., SOLARO, R., Biodegradation of poly(vinylalcohol) based materials, *Prog. Polym. Sci.*, no. 28, 2003, pp. 963-1014
- [14] SAKAZAWA, C., SHIAMO, M., TANIGUCHI, Y., KATO, N., Symbiotic utilization of poly(vinylalkohol) by mixed cultures, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 46, 1981, pp. 261-267
- [15] GOODWIN, P., ANTHONY, C., The biochemistry, physiology and genetics of PQQ and PQQ-containing enzymes, *Mikrob. Physiol.*, vol. 40, 1998, pp. 1-80
- [16] VOJTEK, T., *Biodegradace směsí přírodních a syntetických polymerů v aerobním vodném prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2004, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [17] CHIELLINI, E., CORTI, A., SOLARO, R., Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based blown films under different environmental conditions, *Polym Degrad Stab.*, no. 75, 1999, pp. 447-58
- [18] SOLARO, R., CORTI, A., CHIELLINI, E., A new respirometric test simulating soil Burian conditions for the evaluation of polymer biodegradation, *J Environ. Polym. Degrad.*, no. 6, 1998, pp. 203
- [19] SAWADA, H., Field testing of biodegradable plastics, *Biodegradable plastics and polymers*, 1994, pp. 298–310
- [20] CHIELLINI, E., CORTI, A., Oxo-biodegradable polymers – Effect of hydrolysis degree on biodegradation behaviour of poly(vinyl alcohol), *Polymer Degradation and Stability*, vol. 91, no. 12, 2006, pp. 3397-3406, ISSN 0141-3910

- [21] CORTI, A., SOLARO, R., CHIELLINI, E., Biodegradation of poly(vinyl alcohol) in selected mixed microbial culture and relevant culture filtrate, *Polymer Degradation and Stability*, vol. 75, no. 3, 2002, pp. 447-458, ISSN 0141-3910
- [22] VLČKOVÁ, A., *Studium bakterií rozkládajících polyvinyl-alkohol*, diplomová práce, Zlín, 2005, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [23] CORTI, Y., CINELLI, D., Biodegradation of Poly(vinyl alcohol) in Soil Environment: Influence of Natural Organic Fillers and Structural Parameters, *Macromol. Chem. Phys.*, vol. 10, no. 11, 2002, pp. 1526-1531, doi: 10.1002/1522-1352(200210)10:11<1526::AID-MCP1526>3.0.CO;2-0
- [24] FANTROUSSI, AGATHOS, Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation, *Current Opinion in Microbiology*, no. 8, 2008, pp. 268-275, doi: 10.1016/j.mib.2005.04.011
- [25] IMAM, CINELLI, GORDON, Characterization of Biodegradable Composite Films Prepared from Blends of Poly(Vinyl alcohol), Cornstarch, and Lignocellulosic Fiber, *Journal of Polymers and the Environment*, vol. 13, no.1, 2005, doi: 10.1007/s10924-004-1215-6
- [26] THAKORE, I., DESAI, S., SARAWADE, B., DEVI, S., *Eur Polym J*, no. 37, 2001, pp. 151–160
- [27] YUN, WEE, BYUN YOON, Biodegradability of Chemically Modified Starch (RS4)/PVA Blend Films: Part 2, *J Polym Environ.*, no. 16, 2008, pp. 12-18, doi: 10.1007/s10924-008-0084-9
- [28] CHIELLINI, E., CINELLI, P., ILIEVA, V., MARTERA, M., Biodegradable Thermoplastic Composites Based on Polyvinyl Alcohol and Algae, *Biomacromolecules*, vol. 9, no. 3, 2007, pp. 1007-1013
- [29] RIAZ, U., ASHRAF S.M., SHARMA, H.O., Mechanical, morphological and biodegradation studies of microwave processed nanostructured blends of some bio-based oil epoxies with poly (vinyl alcohol), *Polymer Degradation and Stability*, no. 96, 2010, pp. 33-42, doi: 10.1016/j.polymdegradstab.2010.11.007
- [30] KOLEKTIV AUTORŮ, Kompendium sanačních technologií. 1st ed, *Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor spol s r.o.*, 2006, pp. 280, ISBN 80-86832-15-5

- [31] BARBEAU, C., DESCHEÑES, L., KARAMANEV, D., COMEAU, Y., SAMSON, R., Bioremediation Of pentachlorophenol-contaminated soil by bioaugmentation using activated soil, *Appl Microbiol Biotechnol*, no. 48, 1997, pp. 745-752
- [32] MANCERA-LO' PEZ, ESPARZA-GARCÍA, CHA' VEZ-GO' MEZ, RODRÍGUEZ-VA' ZQUEZ, SAUCEDO-CASTANEDA, Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation–bioaugmentation with filamentous fungi, *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 61, 2008, pp. 151-160, doi: 10.1016/j.ibiod.2007.05.012
- [33] JIANLONG, W., XUAN, Z., WEIZHONG, E., Biodegradation of phthalic acid esters (PAEs) in soil bioaugmented with acclimated activated sludge, *Process Biochemistry*, no. 39, 2004, pp. 1837-1841, doi: 10.1016/j.procbio.2003.08.005
- [34] NEMEČKOVÁ, T., *Ověření respirometru BI- 2000 pro sledování biodegradace organických látek*, diplomová práce, Zlín, 2008, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [35] GENČUROVÁ, M., *Biodeteriorácia PVC/DOP/MMT nanokompozitov vo vodnom a pôdnom prostredí*, diplomová práce, Zlín, 2011, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [36] ČSN EN ISO 9408: 1995, *Jakost vod. Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení spotřeby kyslíku v respirometru*
- [37] ČSN EN 29888: 1993, *Jakost vod. Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodném aerobním prostředí. Statická zkouška (Zahn- Wellensův test)*
- [38] KRATINA, J., *Stabilita kompozitních materiálů v biotickém prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2005, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [39] *Instruction manual Total organic carbon analyser model TOC – 5000A*, Shimadzu Corporation, Japan, 1996
- [40] JOSHI, D.P., LAN-CHUN-FUNG Y.L., PRITCHARD G., Determination of polyvinylalcohol via its complex with boric acid and iodine, *Analytica Chimica Acta*, no. 104, 1979, pp. 153-160

- [41] Nedbálek, M., *Vliv podmínek prostředí na biodegradaci polyvinylalkoholu*, diplomová práce, Zlín, 2008, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [42] ČSN EN ISO 7827: 1998, *Jakost vod. Hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC)*
- [43] ČSN EN 14046: 2003, *Obaly - Hodnocení úplné aerobní biodegradace obalových materiálů při řízených podmínkách kompostování - Metoda analytického stanovení uvolněného oxidu uhličitého*
- [44] GARTISER, S., URICH, E., Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests, *Chemosphere*, vol. 67, no. 3, 2007, pp. 604-613, ISSN 0045-6535

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAK	Adaptovaný aktivovaný kal
AK	Adaptovaný kal
AU	Alifatické uhlovodíky
BSK _s	Substrátová biochemická spotřeba kyslíku [mg.g ⁻¹]
CK	Kyselina citronová
CT	Cukrová třtina
ČSN	Česká státní norma
DBP	di-n-butylftalát
DEP	Diethyl ftalát
DMP	Dimethyl ftalát
DOP	di-n-oktylftalát
DRO	Dehydratovaný ricinový olej
G	Glycerol
HMMM	Hexamethoxymethylmelamin
CHSK _{Cr}	Chemická spotřeba kyslíku stanovena dichromanovou metodou [mg.g ⁻¹]
KŠ	Kukuřičný škrob
LO	Lněný olej
LV	Lignocelulozová vlákna
MM	Minerální médium
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon
OŽ	Odpadní želatina
PAE _s	Estery kyseliny ftalové
PAU	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCP	Pentachlorfenol

PVA	Polyvinylalkohol
RO	Ricinový olej
RS4	Chemicky upravený škrob
SP	Směsná půda
TOC	Veškerý organický uhlík [mg.l ⁻¹]
TSK	Teoretická spotřeba kyslíku [mg.g ⁻¹]
UIOŽP	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Biologický rozklad PVA zprostředkovaný sekundárním alkoholem oxidasa (SAO) a β -diketonovou hydrolasou (BDH).....	15
Obr. 2. Reakční nádoba respirometru BI-2000 [34].....	32
Obr. 3. Elektrolytická cela respirometru BI-2000 [34]	33
Obr. 4. Aparatura pro sledování biodegradace látek ve vodném aerobním prostředí [35]	36
Obr. 5. Průběh biologického rozkladu glukosy v komerčním kompostu	43
Obr. 6. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě	43
Obr. 7. Srovnání průběhu biologického rozkladu glukosy v obou typech půdy vyjádřený jako BSK/TSK (\pm směrodatná odchylka)	44
Obr. 8. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem destilované vody	45
Obr. 9. Průběh biologického rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem biomédia	46
Obr. 10. Srovnání průběhu biologického rozkladu glukosy po přidávku biomédia nebo destilované vody	46
Obr. 11. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 2 g AK/l _p	47
Obr. 12. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 4 g AK/l _p	48
Obr. 13. Respirace směsné půdy inokulované aktivovaným kalem – 6 g AK/l _p	48
Obr. 14. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem 250 ml pilin/1 l půdy	50
Obr. 15. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem 250 ml pilin s aktivovaným kalem /1 l půdy	51
Obr. 16. Porovnání průběhu biodegradace glukosy v půdě za přítomnosti pilin a pilin obohacených aktivovaným kalem	52
Obr. 17. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu	53
Obr. 18. Průběh biologické rozkladu glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu a aktivovaného kalu	53
Obr. 19. Srovnání průběhů degradace glukosy ve směsné půdě s obsahem perlitu a perlitu s aktivovaným kalem.....	54
Obr. 20. Průběh biologického rozkladu PVA ve směsné půdě s mrtvou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu	56

Obr. 21. Průběh biologického rozkladu PVA (přídavek I) ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu	57
Obr. 22. Srovnání průběhu biologického rozkladu PVA (přídavek I) ve směsné půdě s živou a mrtvou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu	57
Obr. 23. Průběh biologického rozkladu PVA (přídavek II) ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu po opakovaném přídavku	58
Obr. 24. Porovnání průběhu biologického rozkladu PVA ve směsné půdě s živou biomasou adaptovaného aktivovaného kalu po prvním a druhém přídavku PVA.....	59
Obr. 25. Kolonie potencionálních PVA-degradujících mikroorganismů vypěstované na minerálním agaru s PVA (vlevo) ve srovnání s koloniemi na minerálním agaru (vpravo).....	61
Obr. 26. Průběh biologického rozkladu PVA v přítomnosti suspenze mycélia v biomédiu	63

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Příklady studií biologického rozkladu PVA za různých podmínek.....</i>	17
<i>Tab. 2. Celkové počty půdních mikroorganismů a aktinomycét v půdách</i>	42
<i>Tab. 3. Celkový počet půdních mikroorganismů, aktinomycét a PVA – degradujících mikroorganismů po 13, 32 a 40 dnech experimentu</i>	60

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB
9 Název diplomové práce	Iniciace biologického rozkladu polyvinylal-koholu v půdním prostředí
Autor diplomové práce	Bc. Silvie Pekařová
Vedoucí diplomové práce	Ing. Markéta Julinová, Ph. D.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
10 Adresa vysoké školy	Nám. T.G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
11 Fakulta (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Technologická fakulta
12 Katedra (adresa, pokud je jiná než adresa VŠ)	Nám. T.G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Rok obhájení DP	2012
Počet stran	76
Počet svazků	1
Vybavení (obrázky, tabulky...)	26 obrázků, 3 tabulky
Klíčová slova	Inokulace, bioaugmentace, aktivovaný kal, <i>Penicillium chrysogenum</i> , biodegradace, PVA