

# **Osud polymerního antioxidantu ANOXOMERu v životním prostředí**

Bc. Petr Ondříšek

---

Diplomová práce  
2013

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Petr ONDŘÍŠEK**  
Osobní číslo: **T11556**  
Studijní program: **N2808 Chemie a technologie materiálů**  
Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**  
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Osud polymerního antioxidantu ANOXOMERu  
v životním prostředí**

Zásady pro vypracování:

1. Provedte literární studii zaměřenou na možnosti sledování osudu xenobiotik v životním prostředí, pozornost věnujte zejména polymerním látkám. V literární části také charakterizujte studovaný polymerní antioxidant ANOXOMER.
2. Realizujte testy biologické rozložitelnosti polymerního antioxidantu ANOXOMERu ve vodném a půdním aerobním prostředí.
3. Výsledky všech testů náležitě interpretujte v diskusní části a závěru práce.

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

**Ing. Markéta Julinová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**8. února 2013**

Termín odevzdání diplomové práce:

**17. května 2013**

Ve Zlíně dne 8. února 2013

  
doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*



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

Příjmení a jméno: .....

Obor: .....

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové 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 <sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové 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 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 <sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60 <sup>3)</sup> 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 <sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou 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 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 práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové 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 .....

.....

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

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

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

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

<sup>2)</sup> 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).

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

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

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

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

## ABSTRAKT

Diplomová práce „Osud polymerního antioxidantu anoxomeru v životním prostředí“ se zabývá biologickým rozkladem tohoto antioxidantu v jednotlivých složkách životního prostředí. Nejprve explikuje osud xenobiotik v životním prostředí obecně, následně blíže specifikuje zkoumaný anoxomer a zaměřuje se přímo na možnost jeho rozkladu. Stěžejní část práce pojednává o biologickém rozkladu anoxomeru respiračními metodami a současně zjišťuje, do jaké míry jeho přítomnost ovlivňuje mikroorganismy ve zkoumaných prostředích, a to konkrétně v aktivovaném kalu, anaerobním kalu, říční vodě, říčním sedimentu a půdě. V žádném zmíněném prostředí však během testů nedošlo k biologickému rozkladu anoxomeru. Je tedy velmi pravděpodobné, že s jeho používáním bude v daných prostředích docházet k jeho akumulaci a tím i neustálému zvyšování jeho koncentrace v jednotlivých složkách ŽP.

Klíčová slova:

Anoxomer, biologický rozklad, degradace, respirometrie, osud xenobiotik

## ABSTRACT

The dissertation of the “Fate of Polymeric Antioxidant ANOXOMER in the Environment” considers the biological dissolution of said antioxidant in selected parts of the environment. Firstly it is stated how the fate of xenobiotics is explicated in general, then is specified the studied anoxomer and is closely inspected during its dissolution. The main part of this work considers the biological degradation of anoxomer by respiratory means and consequently determines to what scale its presents affects the microorganisms in examined environments, namely in activated sludge, anaerobic sludge, river water, river sediment and soil. There we no occurrences of biological degradation of anoxomer during all trials. Therefore it is very likely that its use will lead to its accumulation and thus constant increase of its concentration in every part of the environment.

Key words:

Anoxomer, biodegradation, degradation, respirometry, fate of xenobiotics

Na tomto místě bych rád poděkoval své vedoucí práce Ing. Markétě Julinové, Ph.D. za odborné vedení práce, cenné rady a pomoc při získávání obtížně dostupných zdrojů. Dále bych chtěl za spolupráci poděkovat také pracovníkům Ústavu inženýrství životního prostředí.

*„Magráta byla pravděpodobně jedinou osobou v celém Lancre, která si lámala hlavu s problémem, jak dosáhnout toho, aby byly odpadky biologicky co nejsnáze rozložitelné. Všichni ostatní se jen modlili, aby jim věci vydržely co nejdéle, a věděli po čertech dobře, že když to necháte chvíli ležet bez dozoru, shnije téměř cokoliv.“*

*Terry Pratchett*

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

## Obsah

ÚVOD .....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 OSUD XENOBIOTIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ .....</b>	<b>12</b>
<b>2 MOŽNOSTI STUDIA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU XENOBIOTIK   V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ .....</b>	<b>16</b>
<b>2.1 OBECNĚ O DEGRADAČNÍCH PROCESECH .....</b>	<b>16</b>
<b>2.2 METODY BIOLOGICKÉHO ROZKLADU .....</b>	<b>17</b>
2.2.1 RESPIROMETRICKÉ TESTY .....	17
2.2.2 GRAVIMETRIE.....	19
<b>3 ANOXOMER .....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 VLASTNOSTI ANOXOMERU .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2 OSUD ANOXOMERU V ŽP .....</b>	<b>23</b>
<b>4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE .....</b>	<b>25</b>
<b>5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>26</b>
<b>5.1 TESTOVANÝ VZOREK, POUŽITÉ MATERIÁLY, CHEMIKÁLIE,   ROZTOKY A PŘÍSTROJOVÁ VYBAVENÍ .....</b>	<b>26</b>
<b>5.2 BIOLOGICKÝ MATERIÁL .....</b>	<b>28</b>
<b>5.3 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU .....</b>	<b>30</b>
5.3.1 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU RESPIROMETREM MICRO- OXYMAX.....	30
5.3.2 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU RESPIROMETREM BI-2000 .....	32
5.3.3 VÝPOČET BSK, TSK A PROCENTA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU U SUBSTRÁTU V RESPIROMETRU BI-2000 A RESPIROMETRU MICRO-OXYMAX .....	35
5.3.4 MODIFIKOVANÝ ZAHN – WELLENSŮV TEST PRO AEROBNÍ PODMÍNKY .....	36
5.3.5 VOLUMETRICKÉ SLEDOVÁNÍ ANAEROBNÍHO ROZKLADU .....	37
5.3.6 ABIOTICKÉ TESTY .....	37
<b>5.4 LABORATORNÍ ANALÝZY A POSTUPY .....</b>	<b>38</b>
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST .....</b>	<b>42</b>
<b>6 VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>43</b>
<b>6.1 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU   V AKTIVOVANÉM KALU .....</b>	<b>44</b>
6.1.1 BIOLOGICKÝ ROZKLAD ANOXOMERU – RESPIROMETRICKÝ TEST .....	44
6.1.2 BIOLOGICKÝ ROZKLAD – MODIFIKOVANÝ ZAHN-WELLENSŮV TEST .....	46
6.1.3 FTIR ANALÝZA ANOXOMERU VYSTAVENÉHO PŮSOBNÍ AKTIVOVANÉHO KALU .....	47
6.1.4 SKENOVÁ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE .....	51
<b>6.2 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU   V ANAEROBNÍM KALU .....</b>	<b>52</b>
6.2.1 FTIR ANALÝZA ANOXOMERU VYSTAVENÉHO PŮSOBNÍ ANAEROBNÍHO KALU .....	52
<b>6.3 HODNOCENÍ BIOLOGICKÉHO ROZKLADU ANOXOMERU   V ŘÍČNÍ VODĚ .....</b>	<b>54</b>



6.3.1	BIOLOGICKÝ ROZKLAD ANOXOMERU – RESPIROMETRICKÝ TEST I .....	54
6.3.2	BIOLOGICKÝ ROZKLAD ANOXOMERU – RESPIROMETRICKÝ TEST II .....	55
6.3.3	FTIR ANALÝZA ANOXOMERU VYSTAVENÉHO PŮSOBENÍ ŘÍČNÍ VODY .....	57
<b>6.4</b>	<b>HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU V ŘÍČNÍM SEDIMENTU .....</b>	<b>59</b>
6.4.1	BIOLOGICKÝ ROZKLAD ANOXOMERU – RESPIROMETRICKÝ TEST .....	60
6.4.2	FTIR ANALÝZA ANOXOMERU VYSTAVENÉHO PŮSOBENÍ ŘÍČNÍHO SEDIMENTU .....	61
<b>6.5</b>	<b>HODNOCENÍ BIOLOGICKÉ ROZLOŽITELNOSTI ANOXOMERU V PŮDNÍM PROSTŘEDÍ .....</b>	<b>63</b>
6.5.1	BIOLOGICKÝ ROZKLAD ANOXOMERU – RESPIROMETRICKÝ TEST .....	65
6.5.2	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR PŮDY .....	66
6.5.3	FTIR ANALÝZA ANOXOMERU VYSTAVENÉHO PŮSOBENÍ PŮDY .....	67
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>70</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>72</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>74</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>75</b>
	<b>SEZNAM TABULEK .....</b>	<b>77</b>

## ÚVOD

Životní prostředí je v důsledku neustálého růstu a vývoje populace stále více zatěžováno. Moderní člověk si již dnes jen těžko představí svůj život bez obrovského množství produktů, které jej ulehčují a obohacují. Většina lidí si však vůbec neuvědomuje, že přípravky, které každodenně používají, mají také skryté negativní důsledky.

*„Rozvoj naší společnosti s sebou tak přinesl širokou škálu chemických sloučenin, které se dostávají také do životního prostředí, ať už úmyslnou aplikací, průmyslovým používáním či během nehod při zpracování, dopravě atd. U některých těchto látek dochází k akumulaci v prostředí a mnohdy mohou být transportovány na dlouhé vzdálenosti, protože je organismy odbourávají jen s velkými obtížemi. S tímto faktem pak souvisí i skutečnost, že jsou tyto látky také ukládány v těle organismů a ohrožují je svou toxicitou“ [1]. „Do této skupiny patří již řadu let nechvalně známé DDT, dále např. polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) a také celá řada organických pesticidů“ [2].*

Množství environmentálních polutantů se stále rozšiřuje, za posledních pár let je doplnily také polybromované retardátory hoření (BFRs), dále léčiva a čím dál větší množství přípravků péče o osobní hygienu (např. Triklosan obsažený v zubních pastách). Ač se tyto látky již desítky let používají a vyskytují v životním prostředí, jejich dopad na přírodu se však do popředí zájmu překvapivě dostal teprve v nedávné době, a proto jsou navzdory své letité přítomnosti označovány výrazem „nový“ environmentální polutant. [2]

Významnou skupinu výše zmíněných nových environmentálních polutantů představují synteticky vyráběná potravinářská aditiva. Do této skupiny patří například: sladidla (sacharin), barviva (tartrazin, indigotin, chinolinová žluť) a antioxidanty (Butylhydroxyanisol, butylhydroxytoulén). [3] U většiny z nich jsou známé veškeré toxikologické studie, nicméně informací souvisejících s ekotoxikologickými studiemi a jejich osudem v ŽP je dostupných jen velmi málo. Jedním ze zástupců této specifické skupiny je i tzv. Anoxomer, který je používán jako antioxidant, a je tak součástí celé řady komerčních potravinových olejů. Z hlediska ochrany životního prostředí je důležitá skutečnost, že po požití prochází organismem beze změny a je vylučován stolicí. Dostává se tak do splaškových odpadních vod a následně na ČOV, kde podle dostupných informací pravděpodobně nebude podléhat biologickému rozkladu.

Cílem této práce je studium biologického rozkladu anoxomeru v průběhu čistírenského procesu a v jednotlivých složkách životního prostředí.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 OSUD XENOBIOTIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

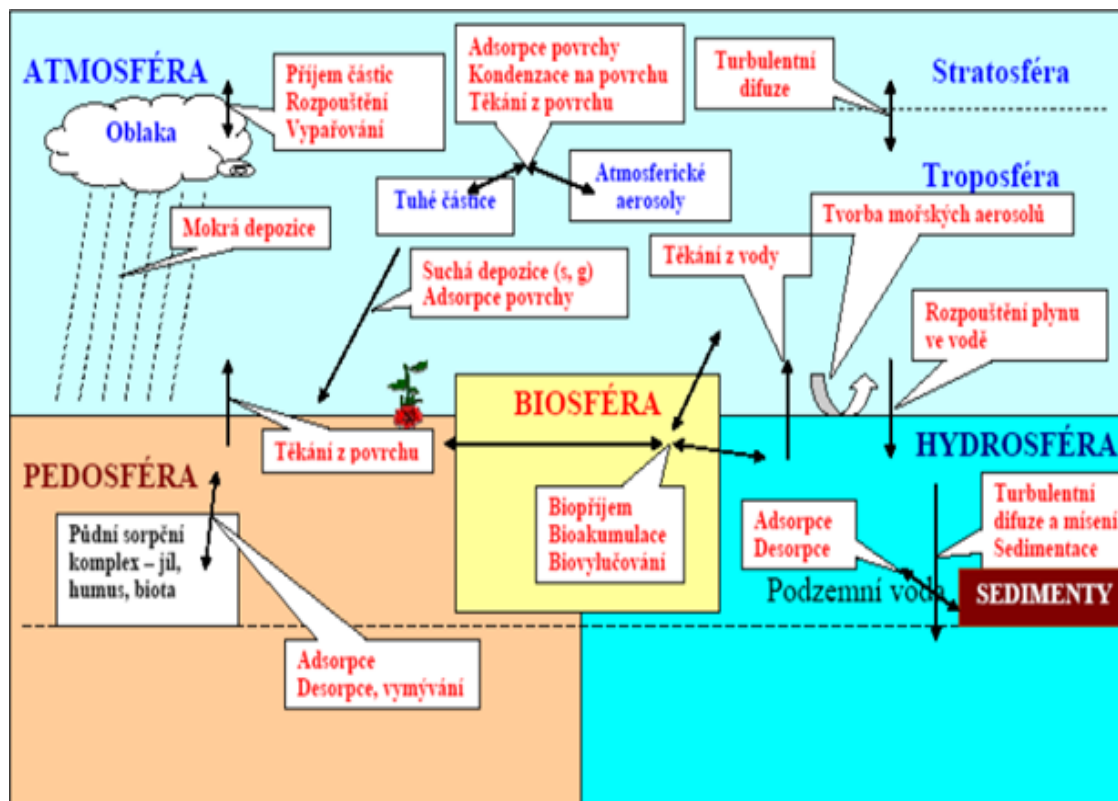
Xenobiotika (z řečtiny xenos = cizí, bios = život) jsou chemicky syntetizované sloučeniny, které jsou pro biosféru cizí [4] „*K těmto cizorodým látkám patří průmyslově vyráběné chemické sloučeniny (např. DDT a PCBs), léčiva, konzervační a stabilizační přísady do potravin, průmyslové chemikálie, složky kosmetických přípravků, syntetická hnojiva, pesticidy, saponáty aj.*“ [5].

Tyto antropogenní látky jsou rozptýleny do všech složek životního prostředí a jsou v mnoha případech vysoce odolné vůči fyzikálně-chemickým a biodegradačním pochodům, mohou tak přetrvávat v přírodě měsíce až roky. I když z definice xenobiotik vyplývá, že se jedná o látky, které jsou pro biosféru cizí, primárně z toho nevyplývá, že se jedná o toxické sloučeniny. Většina xenobiotik má však na živé organismy negativní vliv (estrogenní účinky aj.). Typickými znaky rezistentních xenobiotik jsou např. nízká rozpustnost ve vodě (ftaláty), přítomnost specifických skupin ve struktuře jako např. -O-R, -N=N- (azobarviva), -NO<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -SO<sub>3</sub>H, -F, -Cl, -Br. V neposlední řadě nelze opomenout také vysokou molekulovou hmotnost, která je typická pro nejrozšířenější xenobiotika - plasty. [4]

Mezi hlavní zdroje produkce xenobiotických sloučenin patří:

- farmaceutický a chemický průmysl (který vyrábí širokou škálu syntetických látek)
- papírenský průmysl (např. bělení papíru je hlavním zdrojem výroby syntetických organických chlorovaných sloučenin v životním prostředí)
- hornictví (zodpovědné za šíření těžkých kovů do biogeochemických cyklů)
- ropné látky (mohou být náhodně vypuštěné do ekosystému, kde následně tvoří ropné skvrny)
- zemědělství (vypouštění obrovských množství hnojiv, pesticidů, do životního prostředí) [4]

Pod pojmem osud (z anglického fate) chemické látky si lze představit vstup této látky do životního prostředí a její následný transport do dalších složek životního prostředí (pedosféra, hydrosféra, atmosféra). V jednotlivých složkách životního prostředí poté může docházet k transformaci těchto látek, která je doprovázená chemickými, fotochemickými, biochemickými nebo termickými reakcemi, viz obrázek 1.[6]



Obr. 1 Transport a transformace xenobiotik mezi jednotlivými složkami ŽP [6]

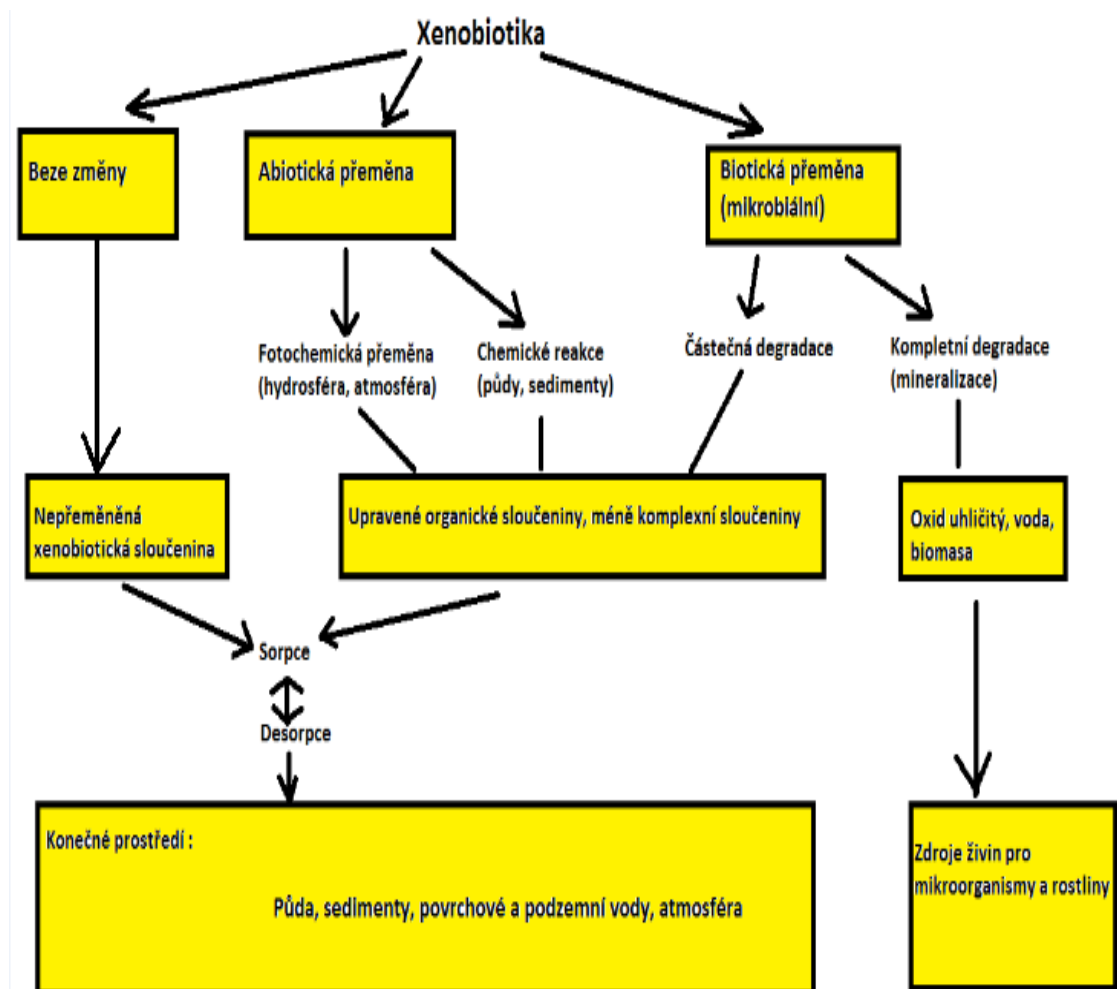
Osud xenobiotik je schematicky znázorněn na obr. 2. To, zda-li látka bude, či nebude v daném prostředí setrávat (doba, forma), závisí především na jejích fyzikálně-chemických vlastnostech, jako je molekulová hmotnost, rozpustnost ve vodě či v tucích, polarita, reaktivita, adsorpce a dále vlastnostech daného prostředí (pH, vlhkost), v němž se tyto látky vyskytují.

Po vstupu xenobiotik do životního prostředí následují tři možnosti jejich dalšího vývoje. Jedná se o procesy, které určí další osud těchto látek, přičemž mohou nastat dvě možnosti:

- a) chemická látka bude podléhat částečné degradaci (biotická a abiotická přeměna)
- b) chemická látka nebude podléhat degradačním pochodům a zůstává v ŽP beze změny

Při abiotické přeměně dochází buď k chemickým reakcím (v půdním prostředí a sedimentech), nebo fotochemické přeměně (v atmosféře a vodním prostředí). Takto vznikají „upravené“ chemické sloučeniny a v případě vysokomolekulárních látek depolymerizované sloučeniny. Ty však finálně putují do stejného prostředí jako nepřeměněné xenobiotické sloučeniny.

Nejvýznamnějším pochodem z hlediska životního prostředí je biotická (mikrobiální) přeměna. Při tomto typu přeměny dochází k částečné degradaci, nebo ke kompletní degradaci (mineralizace), může ale také vznikat celá řada toxických metabolitů, které jsou více toxické než původní sloučenina (např. biologický rozklad některých esterů kyseliny ftalové). V případě částečné biodegradace opět dochází ke stejným meziproductům a výsledku jako u abiotické přeměny, putují tedy do tzv. „konečného“ prostředí (sedimenty, půda, povrchová a spodní voda, atmosféra). Jinak je tomu u kompletní respektive totální degradace, kdy jsou hlavními produkty přeměny xenobiotik v aerobním prostředí oxid uhličitý, voda a biomasa a v anaerobním prostředí methan, oxid uhličitý, vodík, amoniak a biomasa.



Obr. 2 Osud xenobiotik v ŽP [4]

## 2 MOŽNOSTI STUDIA BIOLOGICKÉHO ROZKLADU XENOBIOTIK V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ

Mezi nejčastější metody, které se používají v testování biologického rozkladu, patří zejména metody gravimetrické (v případě ve vodě nerozpustných sloučenin) a respirometrické (stanovení produkce CO<sub>2</sub>, resp. spotřeby kyslíku). Mimo tyto standardní postupy lze využít i specifických metod, jako je např. infračervená spektroskopie; celá řada technik z oblasti molekulární biologie (PCR); elektrochemická impedanční spektroskopie (EIS), ta umožňuje stanovit i minimální změny vlastností studované látky (plastů) vystavené působení mikroorganismů. Při výběru vhodné metody pro stanovení biologického rozkladu xenobiotik v daném prostředí vždy bude záležet na fyzikálně-chemických vlastnostech sloučeniny. EIS je například vhodná pro vodou nerozpustné materiály (plasty), ale již není vhodná pro studium rozkladu vodou rozpustných pesticidů.

### 2.1 Obecně o degračních procesech

Chemické látky mohou být potenciálním zdrojem uhlíku a energie pro heterotrofní mikroorganismy včetně bakterií a v několika případech i plísní. Rozložitelnost chemických látek je velmi variabilní, a to od snadno rozložitelných až po makromolekulární látky odolné proti degradaci.

Za aerobních podmínek (při přítomnosti O<sub>2</sub>) jsou aerobní heterotrofní mikroorganismy většinou zodpovědné za degradaci komplexních sloučenin, takto se tvoří mikrobiální biomasa a CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O jsou konečné produkty. Naproti tomu za striktně anaerobních podmínek (za nepřítomnosti O<sub>2</sub>), jsou anaerobní mikroorganismy odpovědné za degradaci chemických látek a jejich produkty jsou mikrobiální biomasa, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> a H<sub>2</sub>O za methanogenních podmínek, nebo H<sub>2</sub>S, CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O za sulfidogenních podmínek. Oboje výše popsané podmínky se běžně vyskytují v životním prostředí, ale aerobní podmínky jsou schopné podporovat větší populace mikroorganismů než podmínky anaerobní. Mikrobiální asimilace<sup>1</sup> vysokomolekulárních látek je omezena strukturou buněčné membrány a enzymy mikroorganismů hrají významnou roli v depolymerizaci velkých polymerních molekul na menší celky. Těmito celky jsou např. oligomery, dimery a monomery, které mohou být

---

<sup>1</sup> Asimilace – přijímání a přeměna látek živým organismem pro výstavbu jeho těla [8]



využity v širším rozsahu pro mikroorganismy, kde uhlík slouží jako zdroj energie. Počáteční proces, kdy dochází k rozpadu polymerů, se nazývá depolymerizace. Pokud jsou konečné produkty anorganického typu, např.  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  nebo  $\text{CH}_4$ , tak se tento proces degradace nazývá mineralizace. Obecně platí pravidlo, že čím více se polymerní struktury podobají přírodním, tím snadněji je pak mohou degradovat a mineralizovat mikroorganismy. [7]

Měřítkem biodegradace organických látek je poměr BSK/CHSK<sub>cr</sub>, nebo BSK/TSK (v případě, že lze hodnotu TSK vypočítat). Je-li poměr menší než hodnota 0,2 jedná se o látky biologicky těžce rozložitelné. Pokud je poměr roven nebo větší než hodnota 0,5 značí to velmi dobrou biologickou rozložitelnost látek. Pohybuje-li se poměr mezi hodnotami 0,2 až 0,5 jedná se o látky biologicky středně rozložitelné. [9]

Mezi další významné stanovení organických látek patří stanovení celkového organického uhlíku (TOC). Jak stanovení CHSK, tak i TOC jsou metody založené na termické a katalytické oxidaci organicky vázaného uhlíku až na  $\text{CO}_2$ , který se stanovuje analyticky nejběžněji analýzou v IČ oblasti. Výhodou TOC oproti CHSK je, že se při termickém způsobu oxidují všechny organické látky. Dojde tedy ke stanovení organické látky bez ohledu na to, zda u ní dochází či nedochází k biologickému rozkladu. [10]

## 2.2 Metody biologického rozkladu

Předmětem diplomové práce je studium biologického rozkladu anoxomeru, který patří do skupiny polymerních látek s molekulovou hmotností 4000 daltonů, což jej řadí mezi látky s vysokou molekulovou hmotností. Z toho důvodu se pro stanovení biologického rozkladu anoxomeru jeví jako nejvhodnější níže popsané metody.

### 2.2.1 Respirometrické testy

Respirometrické testy jsou velmi efektivní. Sledují buď vyprodukovaný  $\text{CO}_2$  nebo spotřebovaný  $\text{O}_2$  v uzavřeném systému s řádnou údržbou nebo regulací vzduchu či dodáváním kyslíku. Tato technika je vhodná zejména pro potvrzení rozsahu mineralizace. Respirometrické testy lze využít při simulaci celé řady přírodních podmínek a na specifické nebo směsné kultury mikroorganismů, např. aerobní, anoxické i anaerobní podmínky, studium rozkladu v říčních vodách, sedimentech či skládkových vodách, studium rozkladu za přítomnosti čistých mikrobiálních kultur specifických typů mikroorganismů atd. [7]

Byla vyvinuta celá řada metod a postupů (ČSN, ASTM, DIN aj.) určených k testování biodegradace polymerních látek v simulovaných podmínkách pro životní prostředí a jejich působení na konkrétní mikroorganismy. Tyto metody a postupy jsou popsány do detailů v závislosti na konkrétních zkušebních podmínkách a experimentálních nastaveních. Vyžadují buďto specifické druhy mikroorganismů, nebo specifické prostředí, ve kterém je materiál rozkládán (např. zralé komposty nebo aktivované kaly z čistíren komunálních odpadních vod).

Kupříkladu metoda označená jako ASTM D5988 nám určuje stupeň a rychlost aerobní biologické rozložitelnosti materiálu v půdním prostředí - za jakou dobu a do jaké míry jsou tyto materiály mineralizovány půdními mikroorganismy. Výsledky těchto zkušebních metod nám umožňují odhadnout stupeň biologické rozložitelnosti za určité časové období. Tyto zkušební metody určují stupeň aerobní biodegradace za pomoci měření narůstajícího oxidu uhličitého v závislosti na čase, po který je materiál umístěn v půdním prostředí. K hodnocení biologické rozložitelnosti plastů v prostředí se jako inokulum používá půda. Půda musí být v průběhu celého experimentu udržována s ohledem na její vlhkost a dostupnost kyslíku. [11]

Dalším příkladem může být ČSN EN ISO 7827 - Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí (Metoda stanovení rozpuštěného organického uhlíku). Tato norma specifikuje metodu hodnocení úplné biologické rozložitelnosti organických látek při dané koncentraci aerobními mikroorganismy. Zkušební podmínky popsány v této normě neodpovídají vždy optimálním podmínkám, které by umožňovaly dosažení maximálního stupně biologického rozkladu.

Metoda je aplikovatelná pro organické látky, které

- a) jsou rozpustné v koncentracích odpovídajícím podmínkám zkoušky (DOC od 10mg/l až do 40mg/l);
- b) jsou netěkavé, nebo mají zanedbatelnou tenzi par za podmínek zkoušky
- c) se nevýznamně adsorbují na skle nebo aktivovaném kalu
- d) nepůsobí inhibičně na mikroorganismy v koncentracích zvolených pro zkoušku

Podstatou zkoušky je, že rozložitelnost organických látek se stanoví užitím aerobním organismů v biologickém médiu. Organická látka je jediným zdrojem organického uhlíku a energie v médiu.

Rozpuštěný organický uhlík (DOC) se stanoví na počátku zkoušky (0. den) a na konci zkoušky (28. den a případně déle, pokud je zapotřebí) a nejméně ještě ve třech dalších pravidelných mezech. Vypočte se procento odstranění DOC v těchto intervalech a na základě těchto údajů se hodnotí biologická rozložitelnost zkoušené látky. [12]

### 2.2.2 Gravimetrie

Gravimetrická metoda je nejrozšířenější technikou s dlouhou historií úspěchu. Pro použití gravimetrické metody je důležité, aby polymerní látky splňovaly několik základních podmínek. Polymer by měl být snadno tvarovatelný do neporušené fyzické formy a jednotlivé vzorky by neměly být citlivé na vlhkost. Hlavním cílem této metody je získat gravimetrické informace o vystavených vzorcích v různých časových intervalech. Gravimetrie může být také doplněna studiem chemické charakterizace, a to včetně molekulové hmotnosti, UV-VIS nebo FTIR spektroskopii. Gravimetrická metoda je také vhodná pro posouzení míry povrchové kolonizace mikroorganismy a následné izolování degradativních mikroorganismů. Například u vzorku acetátu celulózy bylo zjištěno, že největší podíl na jeho rozkladu mají konkrétně *Aktinomyce* a selektivní bakterie. Zejména byla izolována půdní bakterie *Pseudomonas paucimobilis*.

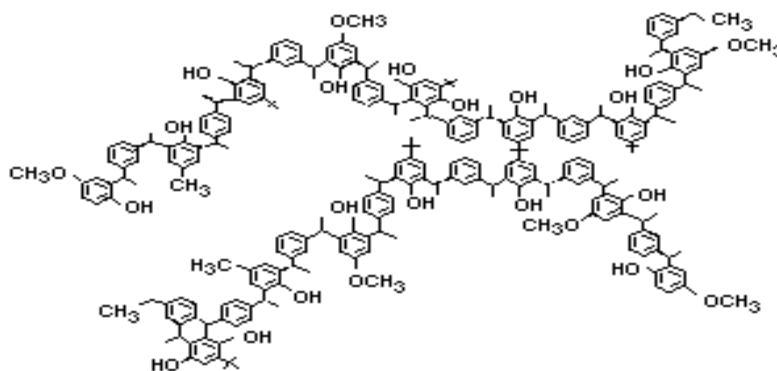
Mezi další výrazné výhody této metody patří jednoduchost a široká přizpůsobivost. Za nepřilíš výhodnou lze však považovat potřebu většího počtu vzorků k uskutečnění testu. Získané údaje by dále měly být interpretovány s opatrností, protože snížení tělesné hmotnosti materiálu může zahrnovat chemickou hydrolyzu nebo defragmentaci polymeru během expozice, k čemuž dochází zejména při vyšších teplotách a vlhkosti. Právě z těchto důvodů je vhodné aplikovat metodu na více vzorcích, aby mohly být výsledky pokusu dostatečně signifikantní. [7]

### 3 ANOXOMER

Anoxomer (Poly AO<sup>TM</sup>-79 a v potravinářství zkratka E323) je polymerní antioxidant fenolového typu, který byl vyvinut v roce 1978. Jedná se o synteticky vyráběnou látku, která vzniká kondenzační polymerací divynilbenzenu. Je produkován ve formě šedobílého prášku. Anoxomer je používán jako aditivum do potravinových olejů a tuků, jako antioxidant s vysokým účinkem ochrany před oxidací olejů při tepelném použití. Před oxidací chrání nejen tuky a oleje, ale i konečný produkt smažení.

Uvedením této látky na trh v roce 1980 předcházela celá řada studií, které sloužily ke zhodnocení biologické inertnosti tohoto produktu. Byly zde zahrnuty testy o vstřebání a metabolických pochodech u potkanů, myši, morčat a člověka. Jednalo se o subchronické studie prováděné na potkanech (po 90 dní) a psech (1 rok), teratologie na králicích a mnoho dalších testů. Výsledky testování bezpečnosti látky potvrdily počáteční předpoklady o tom, že anoxomer nemá toxické účinky.

Od svých předchůdců se tak liší především tím, že je nevstřebatelný pro lidský organismus. Nedochází k jeho akumulaci a je z těla vylučován ve stejné formě, ve které byl přijat. Doposud u něj nebyly zjištěny toxické ani nežádoucí účinky, a látka je proto považována za zcela bezpečnou. Z hlediska legislativy se anoxomer v ČR nesmí používat, paradoxem však je, že na rozdíl od antioxidantů běžně používaných v ČR (butylhydroxytoulén, butylhydroxyanisol) je anoxomer pro člověka zcela neškodný. V USA je použití anoxomeru povoleno. [13], [14]



Obr. 3 Strukturální vzorec Anoxomeru [13]

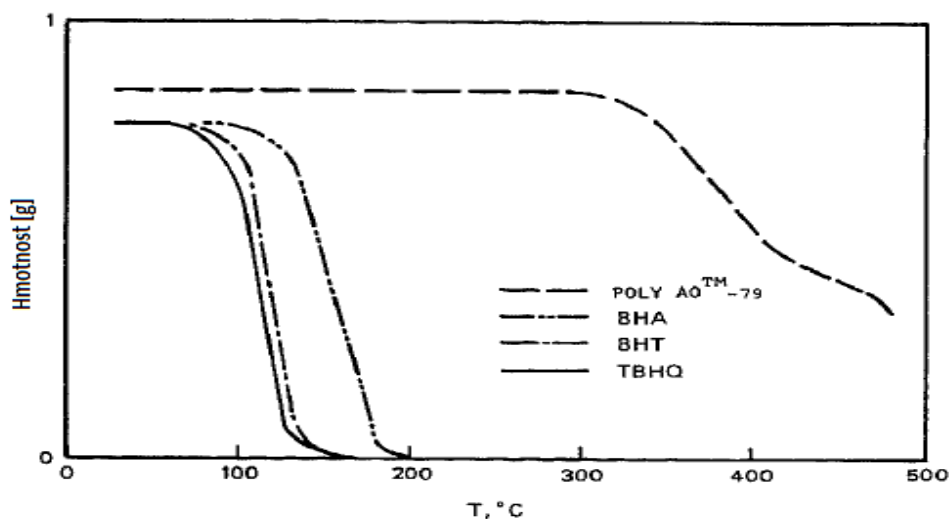
### 3.1 Vlastnosti Anoxomeru

Anoxomer je rozpustný v jedlých tucích, olejích i organických rozpouštědlech. Nerozpouští se naopak ve vodě, glycerinu a propylenglykolu. V tabulce I. je uvedena rozpustnost anoxomeru v gramech ve 100 ml nasyceného roztoku konkrétního organického rozpouštědla při teplotě 25 °C.

Tab. I. *Rozpustnost Anoxomeru v různých rozpouštědlech*

Rozpouštědlo	Rozpustnost při 25 °C
	(g/100 ml)
Voda	nerozpustný
Glycerin	nerozpustný
Propylen glykol	nerozpustný
Hexan	0,022
Ethanol	> 20
Diethyl Ether	> 100
Chloroform	>100
Dioxane	>100
Tetrahydrofuran	>100
Benzen	>100
Aceton	>100

Anoxomer je do olejů a tuků přidáván po mírném zahřátí a za neustálého míchání. Antioxidant, který je takto smíchán s olejem, nemá žádnou barvu, chuť ani zápach, a nenarušuje tak standardní vlastnosti oleje. Pro anoxomer je typická vysoká tepelná stabilita viz obr. 4, který znázorňuje termogravimetrickou analýzu vybraných typů antioxidantů na vzduchu, kde rychlost ohřevu vzduchu je 5 °C/min. K významným ztrátám hmotnosti u látek butylhydroxytoulenu (BHT), butylhydroxyanisolu (BHA) a terciálního butylhydrochinonu (TBHQ) (běžné antioxidanty) dochází již během prvních 30 až 60 minut při zahřátí vzduchu na teplotu 100 až 170 °C. Naopak k prvnímu úbytku hmotnosti u anoxomeru dochází až po 6 hodinách zahřívání vzduchu na teplotu 300 °C. [13]



Obr. 4 Termogravimetrická analýza anoxomeru, butylhydroxytoulenu (BHT), butylhydroxyanisolu (BHA) a terciálního butylhydrochinonu (TBHQ) na vzduchu při postupném zahřívání 5 °C/min

Odolnost anoxomeru vůči tepelné degradaci potvrdila také kapalinová chromatografie, která prokázala, že k depolymeraci anoxomeru nedochází po dobu šesti hodin při teplotách pohybujících se okolo 190 °C. [15]

Nejvýznamnější vlastností anoxomeru, kterou se odlišuje od ostatních antioxidantů na trhu je jeho nevstřebatelnost v lidském organismu. Důkazy o nevstřebatelnosti anoxomeru v lidském těle jsou popsány v následujícím textu, pro nějž byly hlavními zdroji vědecké práce T. M. Parkinsona [16]; J. P. Browna a R. J. Browna. [17]

Střevní absorpce anoxomeru byla měřena na skupině dobrovolníků, kterou tvořili zdraví dospělí muži. Všichni z této skupiny dobrovolníků požili anoxomer (radioaktivně značeným uhlíkem  $^{14}\text{C}$  ve formě želatinových kapslí. Po dobu čtyř dnů byly u všech testovaných subjektů odebírány vzorky krve, moči a stolice, ve kterých se následně stanovovala koncentrace  $^{14}\text{C}$ , nebo byla stanovována přímo na scintilačním spektrometru. Ve vzorcích krve nebyl anoxomer detekován. Vzorky moči obsahovaly 0,02 % a vzorky fekálií obsahovaly 93,7 % požití dávky anoxomeru. Bylo tedy potvrzeno že anoxomer je v těle člověka absorbován jen minimálně, stejně tak jako u dalších testovaných živočišných druhů (potkanů, myší, morčat a králíků). [16]

Dalším testem vědci zkoumali, do jaké míry anoxomer ovlivňuje nižší střevní flóru u krys. Po dobu 90-ti dnů byly krysy krmeny takovou dávkou anoxomeru, která odpovídá 5% jejich celkové hmotnosti. Během krmení došlo k mírnému poklesu koncentrace kvasinek ve stolici a ke zvýšení koncentrace laktobacilů a enterobakterií ve slepém střevě. Žádný ze zmíněných účinků však není považován za biologicky významný a následné toxikologické studie tak potvrdily, že anoxomer je látkou zcela bezpečnou. Dále byly cca po 90-ti dnech krmení krys testovány vzorky cekální mikroflóry, které byly poté inkubovány anaerobně in vitro po dobu 1-3 dnů. U těchto vzorků byly jednotlivé mikrobiální buněčné suspenze odstředěním rozděleny na buněčné a extracelulární frakce, které byly analyzovány na tenkovrstvé chromatografii. Nebyla zaznamenána žádná degradace u experimentálních ani kontrolních vzorků, což vede k závěru, že anoxomer je v podstatě inertní vzhledem ke střevní flóře krys. [17]

### 3.2 Osud Anoxomeru v ŽP

Osud Anoxomeru začíná vstupem do životního prostředí přes trávicí ústrojí člověka, ze kterého je vylučován fekální formou v původní podobě, v jaké do trávicího ústrojí vstoupil. Je tedy zřejmé, že je transportován splaškovými vodami na ČOV. Zde může být vystaven aerobním i anaerobním podmínkám. Vzhledem k dostupným informacím nepodléhá pravděpodobně aerobnímu ani anaerobnímu biologickému rozkladu, a bude tak procházet ČOV beze změny přímo do recipientu, kde může působit na říční biocenózu a také se šířit do dalších složek ekosystému. Pokud dojde k zachycení anoxomeru na biomase aktivovaného kalu např. sorpcí, je pravděpodobné, že se dostane do stabilizovaného kalu, který je v mnoha případech využíván jako druhotné hnojivo. Tudy pak vede přímá cesta anoxomeru do půdního prostředí.

Dostupných informací o osudu anoxomeru v jednotlivých složkách životního prostředí je v literatuře jen velmi málo. Nicméně byla studována jeho stabilita v čistírenských kalech a půdách.

Práce Josepha Browna a Thomase Parkinsona z roku 1986 se zabývá studiem biologického rozkladu anoxomeru v půdním prostředí. V laboratorních podmínkách byla stabilita anoxomeru sledována v jílovitých půdách (clay loam) a prašných jílovitých půdách (silty clay loam) po dobu 148 dnů, kdy koncentrace anoxomeru odpovídala 30 ppm. Při tomto respi-

rometrickém testu konečná degradace stanovená na základě produkce CO<sub>2</sub> činila méně než 0,7 %. U vzorků vystavených UV zářením se hodnoty degradace pohybovaly od 0,04 % až do 0,19 %, zatímco u vzorků, které nebyly vystaveny UV záření, byly hodnoty degradace vyšší v rozmezí od 0,26 % do 0,69 %.

Po skončení testů biodegradace v půdách byl anoxomer extrahován tetrahydrogenfuranem a byla stanovena molekulová hmotnost pomocí gelové permeační chromatografie. Gelová chromatografie následně zaznamenala významné zvýšení molekulové hmotnosti anoxomeru v porovnání s kontrolním polymerem. Zvýšení molekulové hmotnosti je autory přisuzováno pravděpodobným zesíťováním polymeru v životním prostředí

Míra mobility anoxomeru byla zkoumána v různých typech půdy. Bylo zjištěno, že dochází k zanedbatelnému snížení mobility. Obecně se očekává, že pokud dojde ke zvýšení molekulové hmotnosti anoxomeru, sníží se tím i jeho mobilita.

Testy biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu probíhaly po dobu 49 dní. Odolnost vůči biodegradaci v kalech byla potvrzena, ale nebyly zaznamenány významné škodlivé účinky anoxomeru na mikroflóru aktivovaného kalu. Použité koncentrace polymerního antioxidantu byly 25 ppm a 50 ppm (25 mg/l a 50 mg/l), což jsou koncentrace mnohonásobně vyšší, než které by se měly dostat v reálných podmínkách na ČOV. [15]

Na závěr své práce autoři hodnotí anoxomer jako inertní vůči biologickým pochodům probíhajícím jak ve vodném, tak i v půdním aerobním prostředí a změny, které byly při testech zaznamenány, považují za nevýznamné.



#### **4 CÍLE DIPLOMOVÉ PRÁCE**

Cílem diplomové práce je snaha o zjištění, zda dochází k biologickému rozkladu polymerního antioxidantu anoxomeru v jednotlivých složkách životního prostředí (aktivovaný kal, anaerobní kal, říční voda, říční sediment, půda) a zejména jsou-li tato prostředí a mikroorganismy v nich obsažené jeho přítomností negativně ovlivněny.

## 5 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 5.1 Testovaný vzorek, použité materiály, chemikálie, roztoky a přístrojová vybavení

#### Testovaný vzorek

Poly AO<sup>TM</sup> – 79; Anoxomer, 99 % [60837-57-2] ve formě granulátu, dodavatel International laboratory USA, elementární analýzou bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků v anoxomeru: C = 81,7 %; H = 11,2 %; prvky N a S anoxomer neobsahoval.

#### Chemikálie

Pro laboratorní pokusy byly použity chemikálie od firmy Penta a Sigma-aldrich a.s.

Kyselina sírová, chlorid draselný, síran amonný, dihydrogenfosforečnan draselný, hydrogenfosforečnan draselný dodekahydrát, chlorid vápenatý, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát, chlorid železitý hexahydrát, síran hořečnatý heptahydrát, kyselina boritá, molybdenan amonný tetrahydrát, síran manganatý tetrahydrát, síran kobaltnatý heptahydrát, kyselina chlorovodíková, soda lime (NaOH/CaO) s indikátorem, allylthiomocovina, benzoan sodný, azid sodný, bromid draselný, hexahydrát síranu amonno-železnatého, chlorid vápenatý dihydrát, standardní pufrы pH 4,0 a 9,0.

#### Biomédium I

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

- a) Fosfátový pufr pH = 7,2
  - 8,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 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) 27,5g  $\text{CaCl}_2$  – 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
- 0,75 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – kyselina boritá
  - 0,05 g  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  – molybdenan amonný tetrahydrát
  - 0,18 g  $\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – síran kobaltnatý heptahydrát
  - 0,5 g  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – síran manganatý tetrahydrát
  - 0,05 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  – síran měďnatý pentahydrát
  - 0,1 g  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – síran zinečnatý heptahydrát
  - 3,0 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – síran železnatý heptahydrát

#### Příprava biomédia I :

Do odměrné baňky o objemu 1 l bylo nadávkováno cca 800 ml destilované vody (min. 24 hodin provzdušňované). Dále se do destilované vody přidalo po 1 ml zásobních roztoků c); d); e); f). Nakonec bylo přidáno 5 ml roztoku b) a 20 ml zásobního roztoku a). Nadávkované zásobní roztoky byly v destilované vodě důkladně promíchány a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

#### **Biomédium II :**

Na přípravu 100ml standardního minerálního média pro říční vodu, byly použity zásobní roztoky fosforečnanů (připravené rozpouštěním v 1 l destilované vody) a zásobní roztok solí (připravený rozpouštěním jednotlivých chemikálií v 100 ml destilované vody).

- a) 9,07 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – dihydrogenfosforečnan draselný  
b) 23,9 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  – hydrogenfosforečnan draselný dodekahydrát

#### Zásobní roztok solí

- c) 1,0 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  – síran hořečnatý heptahydrát  
d) 0,3 g  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  – hexahydrát síranu amonno-železnatého  
e) 0,1 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  – chlorid vápenatý dihydrát  
f) 5,0 g  $\text{NaCl}$  – chlorid sodný  
g) 3,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – chlorid amonný

### Příprava biomédia II :

Do odměrné baňky 100 ml bylo nadávkováno cca 70 ml destilované vody (min. 24 h provzdušňované). Dále se do destilované vody přidaly 2 ml zásobního roztoku a) a 8 ml zásobního roztoku b). Nakonec se přidávaly zásobní roztoky solí c); d); e); f); g) po 1 ml. Nadávkované zásobní roztoky byly v destilované vodě důkladně promíchány a odměrná baňka byla doplněna destilovanou vodou po rysku.

### **Přístrojové vybavení:**

- Respirometr Micro-Oxymax, corp. Columbus instruments, USA
- Elektrochemický respirometr Bi-2000, Bioscience corp., USA
- Analyzátor celkového organického uhlíku TOC -5000 A, Shimadzu corp. Japonsko
- FTIR spektrometr, Nicolet iS10, software Omnic 8.0
- Centrifuga MPW-340, Warszawa a centrifuga Hettich Rotanta 460R, UK
- pH-metr Inolab pH/ION 735 s pH elektrodou SenTic 81
- Sušárna Memmert model 100, SRN
- Termostat MLW typ U2C, SRN
- Analytické váhy Satorius
- Laboratorní sklo a běžné vybavení

## **5.2 Biologický materiál**

### **Aktivovaný kal**

Aktivovaný kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích. V laboratoři zbaven hrubých nečistot filtrací přes síto a třikrát dekantován pitnou vodou. Takto upravený AK byl následně provzdušňován 24 hodin. AK byl před zahájením testu odstředěn na centrifuzě při 3000 ot/min, kde došlo k oddělení biomasy od supernatantu. Biomasa byla následně suspendována v zásobním roztoku biomédia I o takovém objemu, aby následná koncentrace sušiny kalu pro přípravu zásobní suspenze AK pro přípravu testu byla 5 g/l.

### **Anaerobní kal**

Anaerobní kal z městské čistírny odpadních vod v Malenovicích. V laboratoři zbaven hrubých nečistot filtrací přes síto. Takto upravený anaerobní kal byl před použitím probubláván inertním plynem  $N_2$  po dobu 10 až 15 minut, čímž se zajistilo „vystripování“ veškerého  $O_2$ .

### **Zemědělská zemina**

Kombinace hnědozemě a kaštanozemě s vysokým podílem písku (odběr v obci Lužice, okr. Hodonín, 2013). Prosyťím zeminy přes síto (o velikosti ok 5mm), byla zemina zbavena hrubých nečistot. Vlhkost zeminy průměrně činila 55,1% a hodnota  $pH_{KCl}$  byla 6,845. Elementární analýzou bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků v zemině: C = 0,119 %; prvky H; N a S nebyly stanoveny. Mikrobiologickým rozbohem byl zjištěn počet vláknitých plísni  $3 \cdot 10^2$  KTJ/g; aktynomicét  $3,5 \cdot 10^4$  KTJ/g a celkový počet mikroorganismů v zemině činil  $20 \cdot 10^4$  KTJ/g.

### **Zahradnický kompost**

Zahradnický kompost od firmy Agro (Agro CS a.s. Česká Skalice). Fyzikální a chemické vlastnosti kompostu uváděné výrobcem:  $pH = 6 \div 8$ , obsah rizikových prvků v mg/kg sušiny Cd 2; Pb 100; Hg 1; As 20; Cr 100; Cu 150; Mo 20; Ni 50; Zn 600 a množství nerozložitelných příměsí max. 2%. Vlhkost kompostu byla v laboratorních podmínkách stanovena cca na 65,1 % a  $pH_{KCl}$  bylo 6,902. Elementární analýzou bylo stanoveno procentuální zastoupení prvků: C =  $20,398 \pm 0,74$  %; H =  $2,314 \pm 0,07$  %; N =  $1,116 \pm 0,05$  %; S =  $0,229 \pm 0,02$  %. Mikrobiologickým rozbohem byl zjištěn počet vláknitých plísni  $17 \cdot 10^3$  KTJ/g; aktynomicét  $2 \cdot 10^5$  KTJ/g a celkový počet mikroorganismů v zahradnickém kompostu činil  $68 \cdot 10^4$  KTJ/g.

### **Směsná půda**

Směsná půda byla připravena podle normy ČSN EN ISO11721-1 s optimalizací pro potřeby respirometru BI-2000 a to smícháním zahradnického kompostu a zemědělské zeminy

v poměru 5:2 (1000 ml zahradnického kompostu a 400 ml zemědělské zeminy). Vlhkost směsné půdy byla cca 64,2 % a hodnota  $pH_{KCl}$  7,216. Mikrobiologickým rozbohem byl zjištěn počet vláknitých plísní  $19 \cdot 10^2$  KTJ/g; aktynomicét  $2 \cdot 10^5$  KTJ/g a celkový počet mikroorganismů ve směsné půdě činil  $32 \cdot 10^5$  KTJ/g.

### **Říční voda**

Odběr vody z řeky Dřevnice podle ČSN ISO 5667-6 (ve Zlíně 18. 2. 2013, Zlín - Střed). Po odběru nijak neupravována a provzdušňována 48h v laboratorních podmínkách.

### **Říční sediment**

Odběr z řeky Dřevnice (Ve Zlíně 18. 2. 2013, Zlín - Střed). Odběr byl proveden cca do 10cm hloubky sedimentu, poté byl v laboratorních podmínkách přesít přes hrubé síto (o velikosti ok 5mm) a zbaven tak hrubých nečistot. Dále neupravován.

## **5.3 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru**

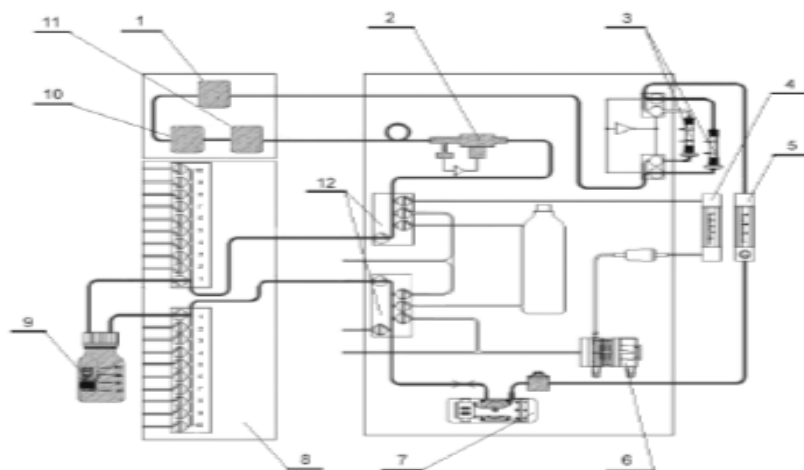
Pro hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru byly použity dva druhy respirometrů. Probíhal-li rozklad ve vodném prostředí (aktivovaný kal, říční voda, říční sediment) byl použit respirometr Micro-Oxymax. Probíhal-li rozklad v půdním prostředí (směsná půda), byl použit elektrochemický respirometr BI-2000.

### **5.3.1 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru respirometrem Micro-Oxymax**

Respirometr Micro-Oxymax je plně automatizovaný uzavřený systém, ve kterém dochází ke kontinuálnímu měření koncentrace  $O_2$  a  $CO_2$  v plynné fázi v jednotlivých baňkách.

Obecně lze respirometr charakterizovat jako variabilní systém jak svým počtem testovacích pozic, tak i typem jednotlivých detektorů ( $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $CH_4$ ,  $H_2S$ ,  $CO$ ,  $H_2$ ,  $SO_2$ ). Druhy detektoru jsou voleny podle toho, jaký zvolíme typ testu (aerobní, anaerobní podmínky). Jedna řídicí ventilová jednotka může měřit maximálně 10 testovacích pozic. Počet testovacích pozic byl v našem případě stanoven na 30 a přípojně detektory byly  $CO_2$ ,  $O_2$ ,  $CH_4$ , ale

přístroj je schopen měřit až 80 testovacích pozic najednou (8 řídicích ventilových jednotek). Objemy připojených testovacích baněk jsou taktéž variabilní, mohou nabývat objemů od 20ml až do desítek litrů. Každá z baněk obsahuje víčko se třemi rychloupínacími spojkami, které zajišťují plynotěsné připojení polyamidovými hadičkami k přepínací ventilové jednotce respirometru (obr. 5 pozice 8). Propojení všech částí respirometru s počítačem a řídicí „čerpací“ jednotkou je elektrické i pneumatické. [18]



Obr. 5 Schéma respirometru Micro-Oxymax pro měření koncentrace  $\text{CO}_2/\text{O}_2/\text{CH}_4$

1- paramagnetický analyzátor; 2- tlakový regulátor; 3- sušič analyzovaného plynu; 4- průtokoměr pro „REFRESH“; 5- průtokoměr analyzovaného plynu; 6- čerpadlo „REFRESH“; 7- čerpací jednotka; 8- ventilová jednotka s 10 měřicími pozicemi; 9- jedna testovací pozice; 10- IČ analyzátor  $\text{CO}_2$ ; 11- IČ analyzátor  $\text{CH}_4$ ; 12- ventilová skříň [18]

#### *Princip měření v aerobním režimu:*

Do detektorů je čerpán vzduch z jednotlivých testovacích lahví a následně je vracen zpět do testovacích lahví, tzn. že Micro-Oxymax pracuje v uzavřené smyčce. V plynné fázi jsou měřeny koncentrační změny  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ , které jsou přepočítávány jako produkce  $\text{CO}_2$  a spotřeba  $\text{O}_2$ . Koncentrace jsou vyhodnocovány v mg, nebo  $\mu\text{g}$  za časovou jednotku a jsou ihned přepočítávány na standardní podmínky. Externím počítačem jsou nastaveny a udržovány provozní podmínky a současně slouží k ukládání experimentálních dat. [18]

*Podmínky testu:*

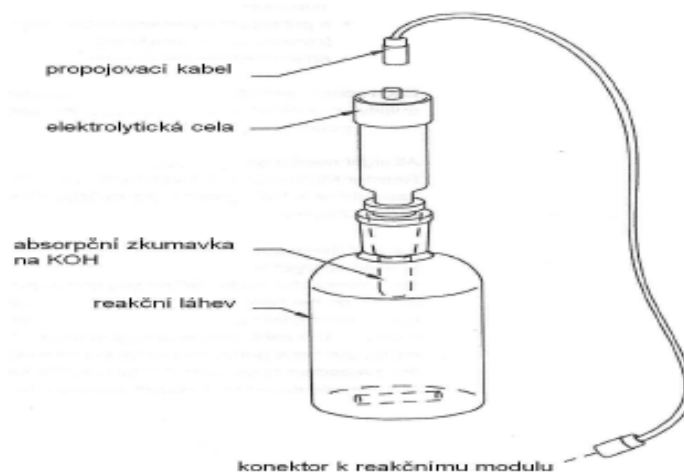
V respirometru Micro-Oxymax bylo obsazeno 30 testovacích pozic. Jednotlivé pozice byly tvořeny reakčními baňkami, do kterých bylo dávkováno minerální médium, inokulum a substrát (zkoumaná látka, standardní látka). Objem suspenze v baňce byl 50 ml, nebo 100 ml, záleželo na druhu použitého inokula. Koncentrace substrátu v reakčních baňkách je uvedena ve výsledkové části, liší se dle zvoleného typu inokula. U všech reakčních baňek bylo zajištěno promíchávání pomocí magnetických míchadel nastavených na 300 rpm.

**5.3.2 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru respirometrem BI-2000**

Elektrochemický respirometr BI-2000 byl použit u hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru v půdním prostředí. Tento typ respirometru je určen pro sledování mikrobiálních respirometrických pochodů v aerobním prostředí. Stanovuje se spotřebovaný kyslík, který je generován elektrolyticky. [19]

Aparatura respirometru BI-2000 je složena ze dvou oddělených reakčních modulů a osobního počítače. Reakční moduly obsahují temperovanou vodní lázeň s regulátory teploty a 8 reakčních nádob (objem 1l) s elektrolytickými celami. Součástí reakčních modulů je i elektronický hardware, který je důležitý pro vytváření kyslíku, snímání barometrického tlaku a teploty. Elektrolytické cely, reakční nádoby a absorpční zkumavky na KOH tvoří reaktor, který zajišťuje ideální podmínky pro experimenty. Všechny části reaktoru jsou vyrobeny z borosilikátového skla se zábrusy. Před zahájením experimentu je každý reaktor ponořen do vodní lázně a propojen spojovacími kabely k přednímu panelu reakčního modulu. [19]

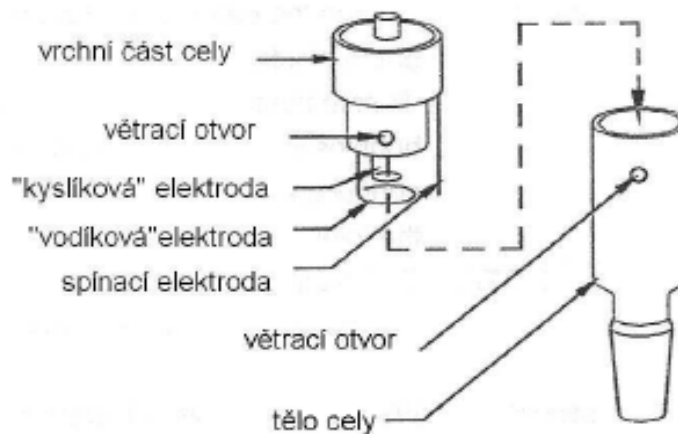




Obr. 6 Schéma jednotlivých částí reaktoru respirometru BI-2000 [19]

Elektrolytická cely se skládá z dvou hlavních částí:

- 1) tělo cely – pomocí zábrusu je napojeno na absorpční zkumavku
- 2) vrchní část cely – tvoří uzávěr těla cely a obsahuje 3 druhy elektrod (kyslíkovou, vodíkovou, spínací)



Obr. 7 Části elektrolytické cely respirometru BI-2000 [19]

*Princip měření:*

K přeměně chemických látek za pomoci mikroorganismů je potřeba neustálého přísunu kyslíku, ten je mikroorganismy získáván z plynné fáze. Respiračními pochody je vzniklý oxid uhličitý zachytáván v adsorpční zkumavce s obsahem hydroxidu sodného. Vzniká tak mírný podtlak, který způsobí pokles hladiny elektrolytu ve vnější části elektrolytické cely. Použitým elektrolytem je 1N (0,5M) kyselina sírová. Dojde-li k poklesu hladiny elektrolytu, dojde zároveň k přerušení kontaktu mezi elektrolytem a spínací elektrodou. Následně dochází k aktivaci cely a ta způsobí, že elektrický proud začne procházet mezi dvěma elektrodami ponořenými v elektrolytu.

Disociací kyseliny sírové v roztoku vzniknou záporné ionty  $\text{SO}_4^{2-}$  a kladné ionty  $\text{H}^+$ . Záporné ionty  $\text{SO}_4^{2-}$  putují ke kladné elektrodě, kde dochází k odevzdání přebytku elektronů a vznikají volné radikály  $\text{SO}_4$ . Takto vzniklé volné radikály okamžitě reagují s vodou za vzniku kyseliny sírové. To vše má za následek, že se při reakci na kladné elektrodě uvolní molekula kyslíku. Kladné ionty vodíku jsou přitahovány k záporné elektrodě, kde přijmou elektron. Vzniklé molekuly  $\text{H}_2$  jsou pomocí otvorů ve stěně cely vypouštěny do atmosféry. Celkové množství vyprodukovaného kyslíku je úměrné elektrickému proudu podle Faradayova zákona.

Ustálením tlaku uvnitř cely dochází k nárůstu hladiny elektrolytu ve vnější části cely, tím dochází k přerušení elektrolytické reakce. Vyprodukované množství kyslíku (v mg) je ukládáno v počítači. [19]

*Podmínky testu:*

Tento postup byl zvolen na základě dosažení uspokojivých výsledků v diplomové práci Genčurové M. a Pekařové S. [20], [23] Do každé z reakčních nádob bylo přidáno 250 ml směsné půdy, poté se přidal testovaný substrát (cca 1 g glukózy, nebo cca 2 g anoxomeru) a reakční nádoby byly doplněny dalšími 250 ml směsné půdy. Celkový objem v reakčních nádobách byl 500 ml. Všechny reakční nádoby byly vloženy do vytemperované vodní lázně s teplotou  $25 \pm 1$  °C. Poté, co byly všechny potřebné komponenty nasazené na reakční nádobu, byl spuštěn test těsnosti s následným zahájením experimentu. Všechny testy probíhaly ve tmě. Před zahájením testů a na konci testů byla stanovena sušina půdy a  $\text{pH}_{\text{KCl}}$  půdy.

### 5.3.3 Výpočet BSK, TSK a procenta biologického rozkladu u substrátu v respirometru Bi-2000 a respirometru Micro-Oxymax

Substrátová BSK byla vypočítána z rovnice 1.

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

Kde:

BSK.....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 bylo vypočítáno z rovnice 2.

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

Kde:

$\%_{TSK}$ .....procento biologického rozkladu vyjádřené jako poměr biologické spotřeby kyslíku k teoretické spotřebě kyslíku

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

TSK.....teoretická spotřeba kyslíku testovaného vzorku z rovnice 3 v [ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ ]

Výpočet teoretické spotřeby kyslíku dle normy ČSN EN ISO 9408 [21]

$$TSK = \frac{16 \cdot (2a + \frac{1}{2}b - c)}{M_r} \quad /3/$$

Kde:

TSK.....teoretická spotřeba kyslíku v TSK [ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ]

a.....počet atomů uhlíku

b.....počet atomů vodíku

c.....počet atomů kyslíku

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

#### 5.3.4 Modifikovaný Zahn – Wellensův test pro aerobní podmínky

Podle normy ČSN EN 29888 je tento druh testu používán pro sledování biologické rozložitelnosti látek ve vodním prostředí za aerobních podmínek. Konkrétně byla metoda použita pro sledování biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu a říční vodě.

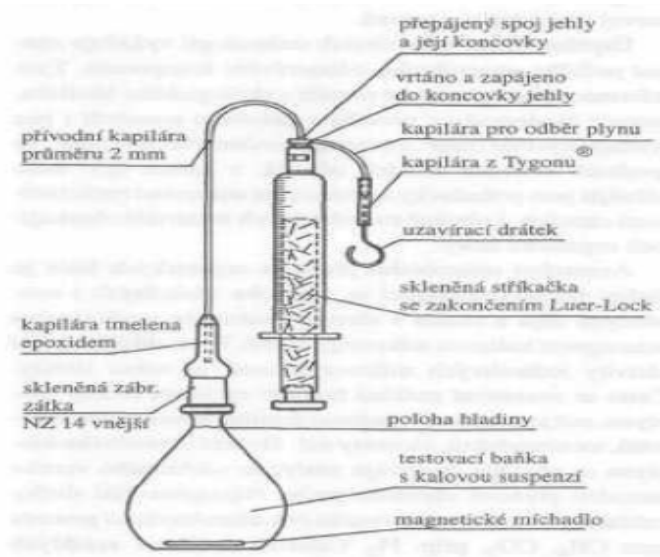
Test probíhal v pěti lahvích o objemu 500 ml, kde objem suspenze byl stanoven na 200 ml. Všechny láhve obsahovaly 200 ml aktivovaného kalu o koncentraci 500 mg/l, který byl suspendován v roztoku biomédia I. V jedné z pěti lahví byl obsažen pouze AK, tato láhev sloužila jako slepý pokus. Ve třech dalších lahvích byl mimo aktivovaného kalu obsažen i zkoumaný vzorek anoxomeru o koncentraci v reaktoru 200 mg/l. A poslední láhev obsahovala roztok glukózy, která sloužila jako standard - dobře biologicky rozložitelná látka o koncentraci 200 mg/l.

Pro pozorování biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě, byly použity čtyři láhve o objemu 500 ml. Všechny láhve obsahovaly říční vodu a minerální roztok pro říční vodu. Objem suspenze byl stanoven na 200 ml. Dvě láhve obsahovaly říční vodu s minerálním roztokem pro říční vodu (sloužily jako slepý pokus) a zbylé dvě láhve obsahovaly navíc i zkoumanou látku anoxomer o koncentraci 100 mg/l nebo 200 mg/l.

U všech vzorků bylo zajištěno kontinuální promíchávání suspenze a diskontinuální provzdušňování pomocí vzduchových čerpadel vždy jednou za 48 h po dobu 20 minut (tento interval byl zvolen na základě výsledku BSK z respirometrických testů). V průběhu testu byly u vzorku standardní látky glukózy odebrány vzorky suspenze ke stanovení celkového organického uhlíku, jako kontrola aktivity použitého inokula.

### 5.3.5 Volumetrické sledování anaerobního rozkladu

Tento druh testu je používán pro sledování biologického rozkladu látek za anaerobních podmínek. Princip spočívá v měření objemu uvolněného plynu (bioplynu) při konstantním tlaku. Tato metoda měla být pro sledování biologického rozkladu anoxomeru v anaerobním kalu.



Obr. 8 Aparatura pro volumetrické stanovení anaerobního rozkladu [22]

Do osmi baněk z aparatur pro sledování anaerobního rozkladu organických látek obr. 8 bylo nadávkováno 100 ml anaerobního kalu o koncentraci sušiny 28,77 g/l. Čtyři baňky obsahovaly pouze anaerobní kal (sloužily jako slepý pokus) a zbylé čtyři baňky obsahovaly i zkoumanou látku anoxomer o navážce cca 20 mg (koncentrace anoxomeru v baňce 200 mg/l). [22]

### 5.3.6 Abiotické testy

Abiotické testy byly provedeny pro pozorování abiotického rozkladu anoxomeru ve vodném i půdním abiotickém prostředí. Pro dosažení abiotického prostředí v aktivovaném kalu a říční vodě byl přidáván 1 ml azidu sodného o koncentraci 10g/l. Půdní abiotické prostředí bylo dosaženo sterilizací půdy v autoklávu při teplotě vodní páry 121 °C a tlaku 101,5 kPa po dobu 60 minut.

## 5.4 Laboratorní analýzy a postupy

### Stanovení sušiny kalu

Stanovení sušiny kalu bylo prováděno třikrát vedle sebe vakuovou filtrací 10 ml suspenze kalu na předem vysušený a zvážený filtrační papír (s plošnou hmotností  $85 \text{ g}\cdot\text{m}^2$ ). Filtrační papír byl poté vysušen do konstantní hmotnosti při teplotě  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  a po vychladnutí v exsikátoru byl zvážen na analytických vahách. Sušina kalu byla vyjádřena rozdílem hmotností v  $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

### Stanovení sušiny půdy

Nejprve byla Petriho miska i s víčkem vysušena při  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 30 minut a poté byla dána do exsikátoru, kde se chladila nejméně 45 minut. Vysušená miska se zvážíla včetně víčka a následně do ní bylo naváženo cca 5 g půdy s přesností na 10 mg. Otevřená Petriho miska se vzorkem půdy byla umístěna do sušárny vyhřáté na  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  a sušena včetně víčka (cca 3 h) do konstantní hmotnosti. Po vysušení byla miska se vzorkem vložena do exsikátoru. Vychladlá miska se vzorkem byla zvážena s přesností 10 mg. Sušina půdy byla vyjádřena rozdílem hmotnosti v %. Stanovení probíhalo třikrát vedle sebe. [23]

### Stanovení rozpuštěného organicky vázaného uhlíku (DOC)

Stanovení organicky vázaného uhlíku testovaných vzorků probíhalo pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu TOC 5000A.

Stanovení celkového uhlíku (TC) je založeno na oxidaci veškerého uhlíku ve vzorku uvnitř spalovací trubice s platinovým katalyzátorem v proudu kyslíku při  $650 \text{ }^\circ\text{C}$ . Vzniklý  $\text{CO}_2$  je naváděn na detektor NDR (Non-disperse infrared detektor), kde signál vzniklý absorpcí záření příslušné vlnové délky je registrován jako plocha píku přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku.

Při stanovení anorganického uhlíku (IC) je vzorek dávkován do proudu nosného plynu na inertní nosič s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění  $\text{CO}_2$ . Vyhodnocení signálu je zcela totožné jako u stanovení celkového uhlíku.

Množství organicky vázaného uhlíku (TOC) je dáno rozdílem celkového uhlíku (TC) a organického uhlíku (IC). [24]

Jelikož byly všechny vzorky před samotným měřením filtrovány, jednalo se o stanovení rozpuštěného organicky vázaného uhlíku (DOC), neboli součet koncentrací organicky vázaného uhlíku přítomného ve vodě ve sloučeninách, které projdou membránovým filtrem velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  [12].

### **Měření pH**

Měření pH probíhalo pomocí pH metru Inolab pH/ION 735 a pH elektrody SenTix 81, kdy nejdříve byla provedena kalibrace přístroje. Pro kalibraci byly použity komerční standardní pufrы o pH 9,0 a pH 4,0. Následně došlo k měření pH u vzorků, které byly současně promíchávány magnetickými míchadly.

### **Stanovení oxidačně-redukčního potenciálu (ORP)**

Oxidačně redukční potenciál byl měřen na konci testu u anaerobního kalu. K měření byl použit pH metr Inolab pH/ION 735.

### **Stanovení pH půdy – výměnná půdní reakce $\text{pH}_{\text{KCl}}$**

Do 250 ml Erlenmayerovy baňky bylo naváženo cca 20 g vzorku půdy a přidáno 50 ml roztoku 0,2 M KCl. Roztok byl se vzorkem půdy důkladně promíchán skleněnou tyčinkou. Po uplynutí 24 h se suspenze filtrovala přes filtrační papír a byla změřena hodnota pH.

### **Sušení testovaného vzorku**

Testované vzorky anoxomeru byly po ukončení jednotlivých testů vyndány z reakčního prostředí, očištěny a umyty destilovanou vodou, poté nejprve sušeny na vzduchu a následně v exsíkátoru nad  $\text{P}_2\text{O}_5$  do konstantní hmotnosti.

### Elementární analýza

Elementární analýza udává zastoupení stanovovaných prvků (C; H; N; S) v absolutních procentech vztažených na navážku vzorku. Stanovení chemického složení testovaných vzorků, bylo provedeno na přístroji Hermo Elektron Corporation Flash EA 1112 Series. Před stanovením byl testovaný vzorek půdy o hmotnosti  $2\pm 3$  g vysušen při  $105\text{ }^{\circ}\text{C}$  a přesít přes síto s velikostí ok 2 mm. Vzorek anoxomeru nebyl pro EA upravován.

### Příprava vzorků a měření FTIR spekter

Testované vzorky anoxomeru z jednotlivých reakčních prostředí (vysušené do konstantní hmotnosti v exsíkátoru nad  $\text{P}_2\text{O}_5$ ) byly smíchány s KBr (pro FTIR Sigma-aldrich). Do 180 mg KBr byl přidán 1 mg testovaného vzorku. Vzniklá směs byla rozmělněna a důkladně promíchána na achátových miskách, poté z ní byly pomocí lisového zařízení vytvořeny tabletky.

Vlastní měření FTIR spekter bylo realizováno na přístroji Nicolet iS10 ve spektrálním rozsahu  $4000$  až  $400\text{ cm}^{-1}$  při rozlišení  $4\text{ cm}^{-1}$  a s počtem skenů 32. Získaná spektra byla zpracována programem Omnic 8 (Thermo Science, USA).

### Mikrobiologický rozbor půdy

Mikrobiologickým rozbohem byl stanoven počet aktinomycét, vláknitých plísní, a celkový počet mikroorganismů v testovaných vzorcích půdy. Ke stanovení počtu aktinomycét byl použit Actinomycet agar, pro vláknité plísně půdní agar s přídavkem Bengálské červeně (BČ) a pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit TYA agar.

#### Příprava živného média:

- TYA agar: 8,4 g rozpuštěných ve 400 ml destilované vody
- Agar s obsahem BČ: 12,0 g rozpuštěných ve 400 ml destilované vody
- Agar Actinomycet: 8,8 g rozpuštěných ve 400 ml destilované vody

Živná média byla sterilizována po dobu 60 minut v autoklávu, po zchladnutí byla živná média rozlita do 24 plastových Petriho misek.



Příprava suspenčního roztoku:

- Tween 80: 0,15 g
- Difosforečnan sodný 0,4 g
- Chlorid sodný 0,5 g

Všechny látky jsou společně rozpuštěny ve 100ml destilované vody a důkladně promíchány.

*Postup:*

Do 50ml sterilizovaného suspenčního roztoku bylo naváženo 5 g půdy. Suspenční roztok s obsahem půdy byl protřepáván na třepačce 15 minut. Poté byla suspenze ponechána 1 minutu sedimentovat a následně bylo provedeno ředění vzorku desetinou řadou. Desetinné ředění se provádělo do čtyř zkumavek s obsahem 4,5 ml fyziologického roztoku (8,5 g NaCl na 1 l vody). Na Petriho misky s TYA agarem a Actinomycet agarem byla očkována ředění  $10^{-4}$  až  $10^{-6}$  a na Petriho misky s Agarem který obsahoval BČ byla očkována ředění  $10^{-1}$  až  $10^{-3}$ . Všechna ředění byla po celé ploše Petriho misek rozetřena sterilní hokejkou a byla provedena dvakrát vedle sebe. Kultivace mikroorganismů probíhala 7 dní ve tmě, při teplotě 25 °C. Odečet byl proveden na Petriho miskách s takovým ředěním, kde byly kolonie mikroorganismů nejlépe odečitatelné. Počty mikroorganismů byly vyhodnoceny v KTJ/1 g půdy. [25]

## **I. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části práce jsou uvedeny výsledky pokusů, které jsou zaměřeny na hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru. K tomuto účelu bylo vybráno pět rozdílných prostředí, do kterých by mohl anoxomer za reálných podmínek emitovat. Jako prostředí byly vybrány: aktivovaný kal, anaerobní kal, říční voda, říční sediment a půda. V uvedených prostředích bylo hodnocení biologického rozkladu anoxomeru prováděno pomocí:

- respirometrických testů
- Zahn-Wellensova testu
- FTIR analýzy

Jako další na základě literárních údajů vhodná metoda pro stanovení biologického rozkladu se jevila Elektrochemická impedanční spektroskopie. U této metody však nastal výrazný problém u vysušování vzorků vystavených působení mikroorganismů. Anoxomer nelze sušit za zvýšené teploty, protože již při cca 50 °C taje. Aby byla EIS aplikovatelná, muselo by u testovaných vzorků dojít k řadě optimalizací sušícího procesu (sušení nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> se ukázalo jako nedostačující), které z časových důvodů již nebylo možno v rámci této diplomové práce realizovat.

Původně měly být výsledky biologické rozložitelnosti vyhodnocovány z poměru BSK/CHSK<sub>Cr</sub>. Hodnota CHSK<sub>Cr</sub> u anoxomeru však nešla pomocí metody: Stanovení CHSK dvojjchromanovou metodou – Metoda ve zkumavkách (modifikovaná ČSN ISO 15705) stanovit z důvodu vysoké tepelné stability (cca 300°C). Výsledky biologické rozložitelnosti tak byly hodnoceny z poměru BSK/TSK. TSK byla vypočítána na základě stechiometrického vzorce anoxomeru uvedeného v publikaci T. M. Parkinsona a byla 2672 mg·g<sup>-1</sup> [16].

V případě respirometrických testů byl sledován též vliv anoxomeru na mikroorganismy ve výše zmíněných prostředích, který se projevil ve snížených hodnotách BSK oproti endogenní respiraci samotných mikroorganismů (sl. pokus). Veškeré tyto pokusy byly doplněny analýzami pH, hodnotami koncentrace organického uhlíku na počátku a konci pokusu a dále sušinou testovaného inokula. Řazení testů je uzpůsobeno dle užitého prostředí.

## 6.1 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru v aktivovaném kalu

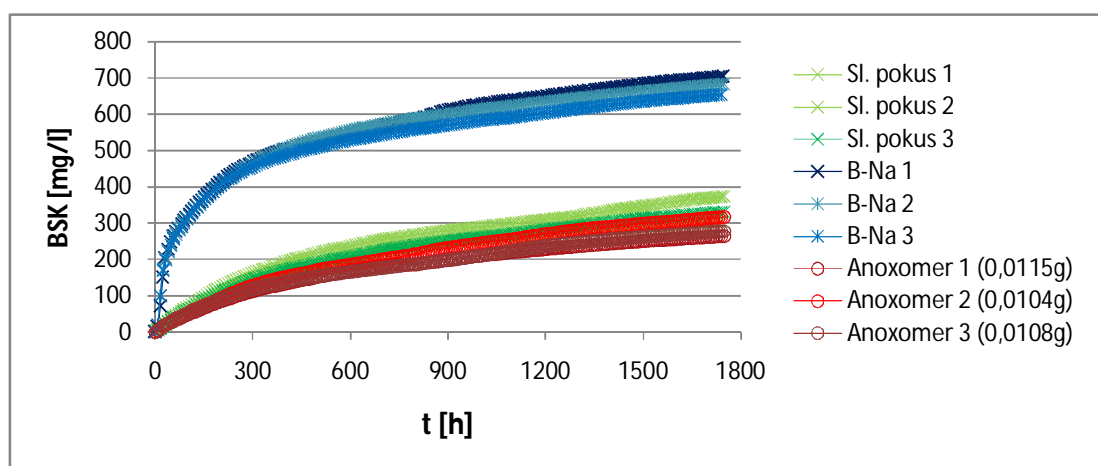
Prvním testovaným prostředím pro hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti anoxomeru byl zvolen aktivovaný kal z ČOV v Malenovicích. Měření bylo provedeno pomocí respirometru Micro-Oxymax (corp. Columbus instruments, USA), kdy v průběhu měření byla zaznamenávána biologická spotřeba kyslíku a procento biologického rozkladu bylo poté vyhodnocováno na základě poměru BSK/TSK. Všechna měření BSK byla provedena vždy třikrát vedle sebe. Test probíhal po dobu 73 dnů v biotickém i abiotickém prostředí, při standardní laboratorní teplotě  $25\pm 1^\circ\text{C}$ . Na základě průběžných výsledků respirometrického testu byl připraven také modifikovaný Zahn-Wellensův test pro získání dostatečného množství testovaného anoxomeru, pro realizaci navržených doplňkových analýz jako FTIR spektroskopie a elektronová skenovací mikroskopie.

### 6.1.1 Biologický rozklad anoxomeru – respirometrický test

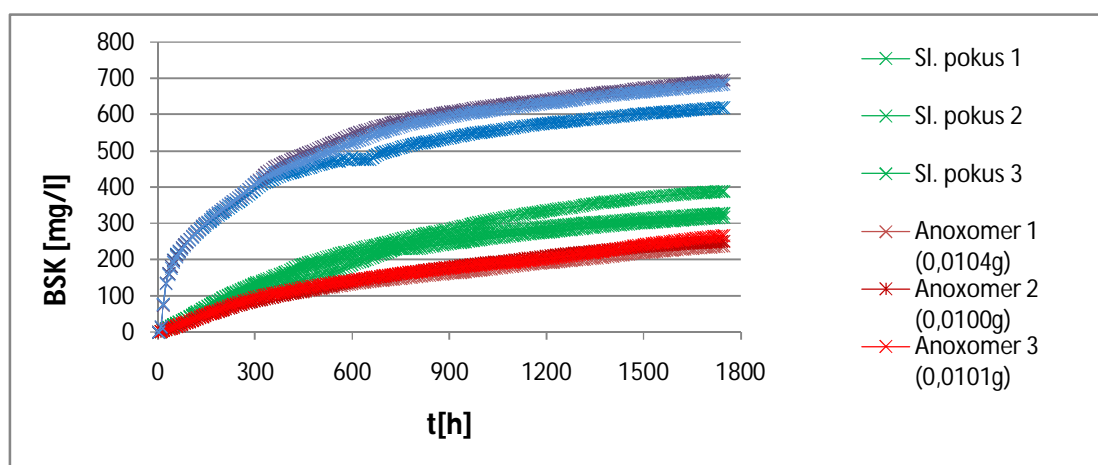
Objem suspenze v reaktoru byl zvolen na 50 ml (do 200 ml baněk). Obsah reakčních lahví byl tvořen inokulem, substrátem a biomédiem. Jako inokulum byl použit již zmíněný AK, jehož skutečná koncentrace v reakční lahvi odpovídala 510 mg/l. Substrátem byla buď zkoumaná látka anoxomer o koncentraci  $212\pm 4\text{ mg/l}$  (dávkován metodou přímé navážky), nebo standardní látka benzoan sodný (B-Na) o koncentraci 200 mg/l, dávkován ze zásobního roztoku o koncentraci 2,0057 g/l. K vytvoření abiotického prostředí byl do reakčních lahví dávkován 1 ml roztoku azidu sodného o koncentraci 10,0032 g/l. Vzhledem ke skutečnosti, že testovaný anoxomer byl technické čistoty a nebylo známo přesné složení daného produktu, byla do testů na biologickou rozložitelnost dávkována také ATM pro potlačení případných nitrifikačních pochodů. Do reakčních lahví byl dávkován 1 ml allylthiomocoviny ze zásobního roztoku o koncentraci 0,5060 g/l. Objemy všech reakčních lahví byly následně doplněny biomédiem I na stanovený objem 50 ml.

Vyhodnocení respirace bylo provedeno pouze pro biotické prostředí obr. 9 a 10. Respirace u abiotického prostředí nebyla vyhodnocena z důvodu naměření velmi nízkých až mezních hodnot spotřeby kyslíku, které je schopen respirometr Micro-Oxymax detekovat. Z obr. 9 lze pozorovat, že naměřené hodnoty BSK u suspenzí s obsahem anoxomeru se pohybují mírně pod hodnotami respirace slepého pokusu.

Biologický rozklad anoxomeru je za přítomnosti ATM znázorněn na obr. 10. Stejně jako u suspenzí bez přídavku ATM se hodnoty respirace u suspenzí s obsahem anoxomeru a ATM pohybují po celý průběh testu mírně pod hodnotami respirace slepého pokusu. Výsledky respirometrického testu tak naznačují, že při koncentracích cca 200 mg/l anoxomer do jisté míry inhibuje respiraci mikroorganismů obsažených v aktivovaném kalu. Přidaná ATM neměla na průběh respirace žádný významný vliv. Sledované parametry v průběhu testu u jednotlivých suspenzí jsou uvedeny v tabulce II.



Obr. 9 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu



Obr. 10 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu s přídavkem ATM

Tab. II Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu

Měřené parametry	Vzorek					
	slepý pokus	B-Na	Sl. pokus + ATM	B-Na + ATM	Anoxo-mer	Anoxomer + ATM
Doba testu [dny]	73	73	73	73	73	73
pH <sub>poč.</sub>	7,264	7,283	7,280	7,263	-	-
DOC <sub>poč.</sub> [mg/l]	25,13	139,90	36,14	148,72	178,14	166,01
Sušina kalu <sub>poč.</sub> [mg/l]	510					
pH <sub>kon.</sub>	6,380	6,658	6,299	6,576	-	-
DOC <sub>kon.</sub> [mg/l]	24,50	29,27	38,80	32,22	-	-
Sušina kalu <sub>kon.</sub> [mg/l]	108	115	108	115	104	104
Celková BSK <sub>73D</sub> [mg/l]	336,7±8,3 <sup>*</sup>	681,2±6,9	345,0±8,5	666,6±8,7	287,0±7,2	251,9±5,3
BSK/TSK [%]	-	> 95	-	93,8	-	-

<sup>\*</sup> směrodatná odchylka

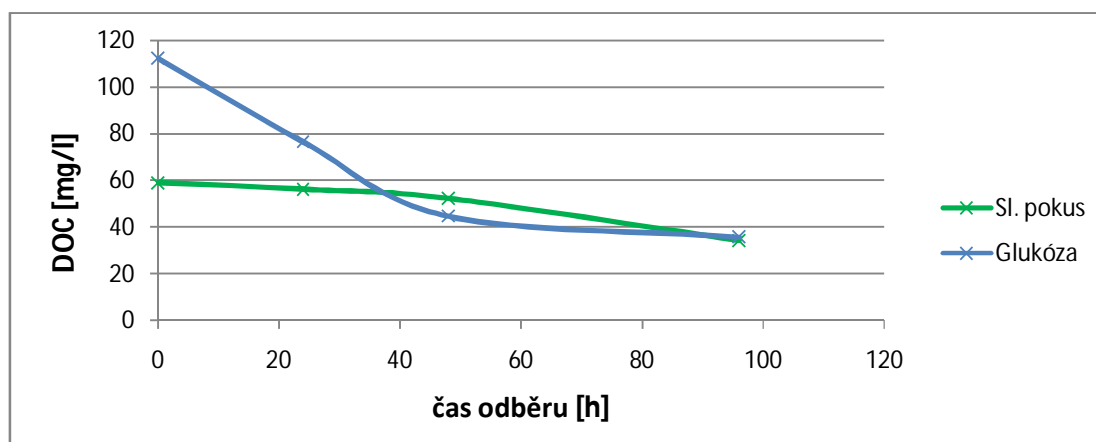
### 6.1.2 Biologický rozklad – modifikovaný Zahn-Wellensův test

Pro ověření biologické aktivity aerobního kalu v průběhu Zahn-Wellensova testu byla v tomto případě zvolena glukóza jako snadno biologicky rozložitelná látka (průběh rozkladu je pozvolnější oproti benzoanu sodnému, což je výhodnější z hlediska odběru vzorků 1x za 24 h). Během pěti dnů byly odebírány vzorky suspenze ke stanovení DOC. Z naměřených hodnot lze zpozorovat klesající tendenci množství DOC vůči odebíranému času. Poslední den odběru byly hodnoty DOC pro slepý pokus a glukózu téměř totožné, procento

biologického rozkladu podle DOC u glukózy bylo 96,02%. Potvrdilo se tak, že v průběhu testu docházelo k rozkladu glukózy a že použitý aktivovaný kal je dostatečně biologicky aktivní.

Tab. III. Naměřené hodnoty TOC Zahn-Wellensova testu pro slepý pokus a glukózu

Čas odběru [h]	vzorek	
	Sl. pokus	Glukóza
	DOC [mg/l]	
0	59,10	112,30
24	56,23	76,58
48	52,27	44,64
96	34,30	35,72

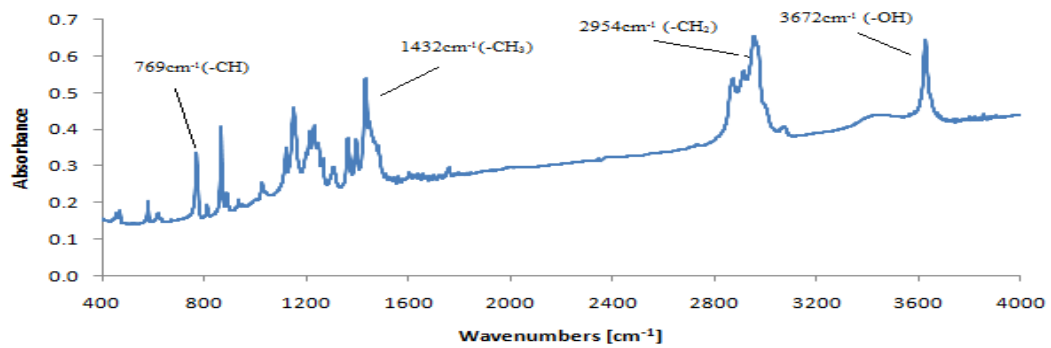


Obr. 11 Závislost naměřených hodnot TOC na čase odběru pro glukózu a sl. pokus

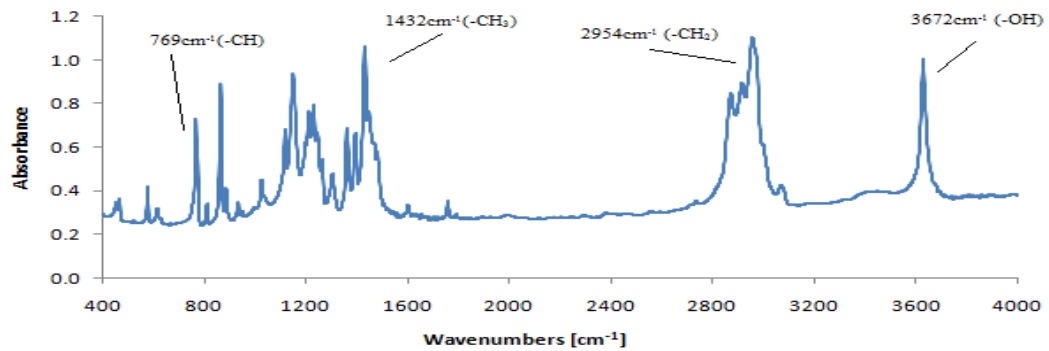
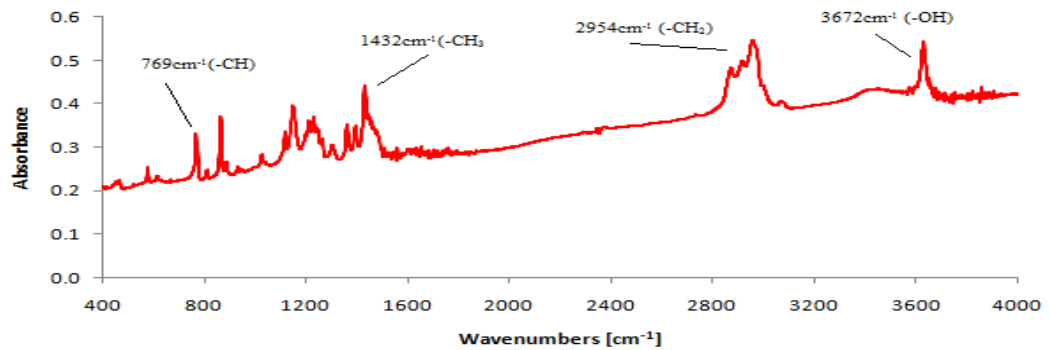
### 6.1.3 FTIR analýza anoxomeru vystaveného působení aktivovaného kalu

Po ukončení respirometrického testu a Zahn-Wellensova testu byly vzorky anoxomeru z biotického i abiotického prostředí podrobeny FTIR analýze.

FTIR spektra pro anoxomer, který byl vystaven působení biotického a abiotického prostředí s vyznačenými významnými specifickými funkčními skupinami, jsou znázorněny na obr. 13 a 14. Pro porovnání byl podroben FTIR analýze i vzorek „čistého“ anoxomeru na obr. 12 (jedná se o vzorek, který nebyl vystaven působení mikroorganismů).



Obr. 12 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru

Obr. 13 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů  
aktivovaného kaluObr. 14 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného abiotickým podmínkám  
(vodné prostředí)



Srovnávány byly oblasti s významnými charakteristickými vibračními pásy:

- $3627\text{ cm}^{-1}$ : volné hydroxylové skupiny
- $2952 - 2871\text{ cm}^{-1}$ : asymetrické a symetrické C-H valenční vibrace  $-\text{CH}_2$  skupiny
- $1432\text{ cm}^{-1}$ : deformační vibrace  $-\text{CH}_3$  skupiny
- $1230$  a  $1150\text{ cm}^{-1}$ : -CH vibrace 1,2-substituovaného fenylu
- $866\text{ cm}^{-1}$ : -CH vibrace p-disubstituovaného fenylu
- $769\text{ cm}^{-1}$ : mimorovinná vibrace skupiny -CH a vibrace aromatického jádra

Z naměřených FTIR spekter je patrné, že v průběhu testů nedošlo k žádným významným strukturním změnám, změny nastaly pouze u rozsahu naměřené absorbance. Pro lepší srovnání případných kvantitativních změn byly ze spekter odečteny plochy významných charakteristických vibračních pásů v rozsahu vlnových délek  $3720\text{cm}^{-1}\div 3550\text{cm}^{-1}$ ;  $3310\text{cm}^{-1}\div 2740\text{cm}^{-1}$ ;  $1550\text{cm}^{-1}\div 1400\text{cm}^{-1}$ ;  $1275\text{cm}^{-1}\div 1063\text{cm}^{-1}$ ;  $769\text{cm}^{-1}$  a vypočítány byly následující poměry, které jsou uvedeny v tab. 3. Vibrace aromatického jádra ( $769\text{cm}^{-1}$ ) byla vybrána jako referenční, a to na základě předpokládané rezistence anoxomeru vůči degradačním pochodům.

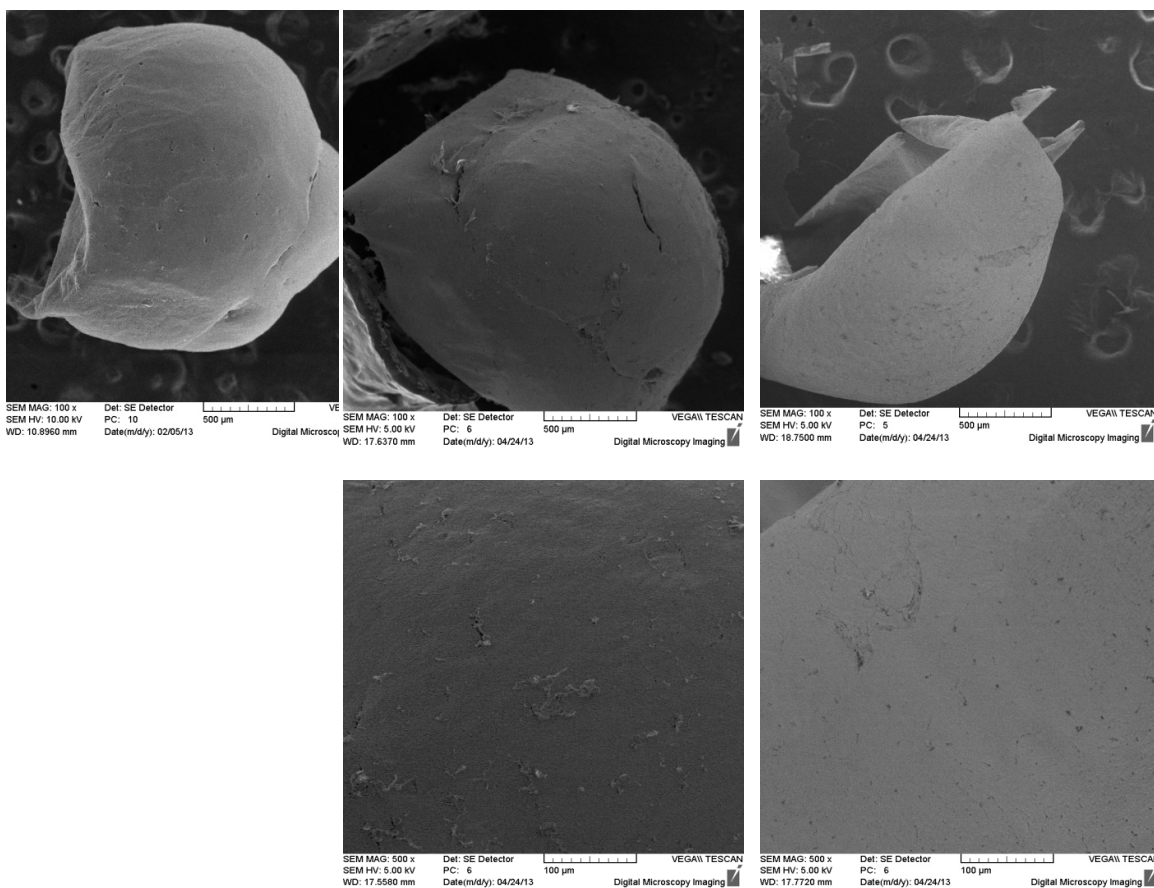
Tab. IV. Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením aerobního kalu

Měřené parametry		Vzorek Anoxomeru		
		Čistý	Z biotického prostředí	Z abiotického prostředí
Doba expozice [dny]		0	73	73
-OH	$\frac{A_{3720} - A_{3550}}{A_{769}}$	2,68	2,74	2,71
C-H; -CH <sub>2</sub>	$\frac{A_{3110} - A_{2740}}{A_{769}}$	12,21	11,8	11,9
-CH <sub>3</sub>	$\frac{A_{1660} - A_{1400}}{A_{769}}$	3,51	2,97	3,54
-CH	$\frac{A_{1275} - A_{1063}}{A_{769}}$	6,79	6,16	6,44

Srovnáním hodnot poměrů ploch pro jednotlivé oblasti, nebyly mezi vypočítanými hodnotami poměrů zpozorovány žádné výrazné rozdíly. Největší změny (v poklesu) byly zaznamenány u anoxomeru vystaveného biotickému působení aktivovaného kalu, a to u vibračních pásů v rozsahu vlnových délek  $1550\text{cm}^{-1} \div 1400\text{cm}^{-1}$  a  $1275\text{cm}^{-1} \div 1063\text{cm}^{-1}$ . V těchto vlnových délkách je pravděpodobné, že bude docházet ke změnám u koncových -CH<sub>3</sub> a -CH skupin vlivem působení mikroorganismů v aktivovaném kalu. V abiotickém prostředí nebyly zaznamenány žádné výrazné změny, snad pouze v oblasti  $3720\text{cm}^{-1} \div 3550\text{cm}^{-1}$ , kdy u obou prostředí bylo zaznamenáno mírné navýšení hodnot poměrů ploch, které mohlo být podle poznatků z vědecké práce J. Browna a T. Parkinsona [15] způsobeno síťováním polymerů, tato teorie však vyžaduje řadu dalších analýz. Z naměřených výsledků je však patrné, že u anoxomeru v aktivovaném kalu po dobu 73 dní nedošlo k biologickému rozkladu.

### 6.1.4 Skenová elektronová mikroskopie

Pro potvrzení, že anoxomer nepodléhá biologickému rozkladu v aktivovaném kalu, byly zhotoveny snímky skenovací elektronovou mikroskopií (SEM snímky povrchu anoxomeru v rozlišení 500  $\mu\text{m}$  a 100  $\mu\text{m}$ ). Ze snímků na obr. 15 lze zpozorovat, že na povrchu anoxomeru vystaveného biotickým i abiotickým podmínkám nedochází ke vzniku trhlin či pórů, které by mohly být typickým indikátorem pro biodegradaci. Naopak povrch zkoumané látky zůstává relativně hladký i po expozici 73 dní v aktivovaném kalu. To koresponduje s výsledky respirometrického testu FTIR analýzy, že anoxomer je vůči biologickým pochodům v aktivovaném kalu po dobu 73 dnů zcela inertní.



čistý anoxomer – doba  
expozice 0 dní

biotické podmínky – doba  
expozice 73 dní

abiotické podmínky – doba  
expozice 73 dní

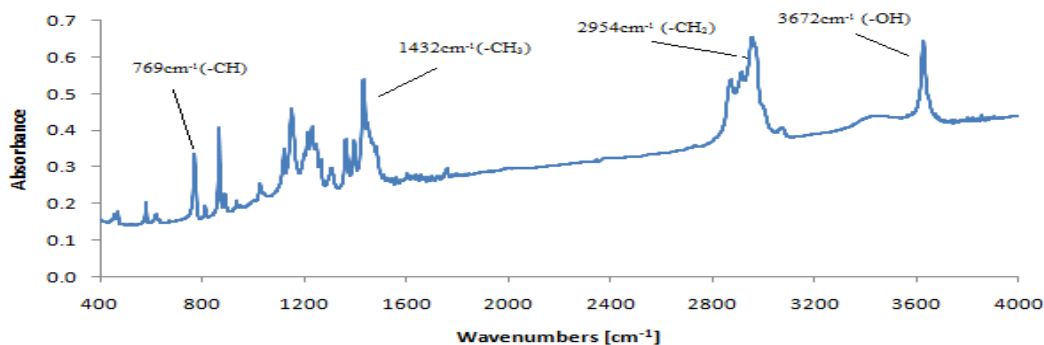
Obr. 15 SEM snímky povrchu anoxomeru před a po expozici v aktivovaném kalu

## 6.2 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru v anaerobním kalu

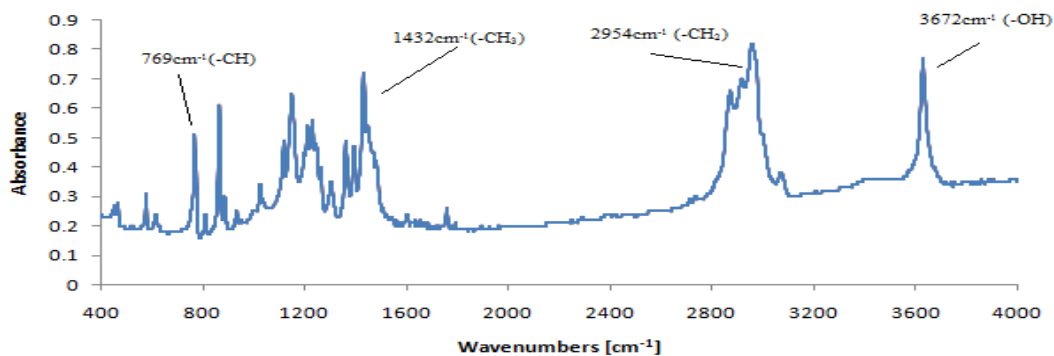
Hodnocení anaerobní biologické rozložitelnosti anoxomeru v anaerobním kalu probíhalo v aparaturách pro volumetrické stanovení anaerobního rozkladu. Inokulem byl zvolen anaerobní kal z ČOV v Malenovicích. Test probíhal pouze pro biotické prostředí po dobu 46 dnů v termostatu (MLW typ U2C) při teplotě  $35 \pm 1^\circ\text{C}$ . Biologická aktivita anaerobního kalu byla potvrzena vyprodukovaným množstvím bioplynu, což se projevilo tak, že píšť skleněné stříkačky se zakončením Luer-Lock byl vyprodukovaným množstvím bioplynu vytlačen ven ze skleněné stříkačky. Avšak z důvodů reprodukovatelnosti dat (objem vyprodukovaného bioplynu) dané stářím volumetrické aparatury, nemohlo být aplikováno volumetrické stanovení anaerobního rozkladu. Pro zhodnocení biologického rozkladu byla tedy použita pouze FTIR analýza. Anaerobní podmínky na konci testu byly kontrolovány stanovením ORP v jednotlivých testovacích baňkách a pohybovalo se pod hodnotami 150 mV.

### 6.2.1 FTIR analýza anoxomeru vystaveného působení anaerobního kalu

FTIR analýza anoxomeru z prostředí anaerobního kalu s vyznačenými významnými specifickými funkčními skupinami na obr. 17. se vůči FTIR analýze „čistého“ anoxomeru na obr. 16 liší pouze v naměřených hodnotách absorbance. Tak jako u anoxomeru vystaveného působení aerobního kalu, byly pro lepší srovnání kvantitativních změn vypočteny poměry oblastí ploch s významnými charakteristickými vibračními pásy uvedené v tab. V.



Obr. 16 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru



Obr. 17 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů anaerobního kalu

Tab. V. Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením anaerobního kalu

Měřené parametry		Vzorek anoxomeru	
		čistý	Z anaerobního kalu
Doba expozice [dny]		0	46
-OH	$\frac{A_{3720} - A_{3550}}{A_{769}}$	2,68	2,90
C-H; -CH <sub>2</sub>	$\frac{A_{3110} - A_{2740}}{A_{769}}$	11,9	12,23
-CH <sub>3</sub>	$\frac{A_{1550} - A_{1400}}{A_{769}}$	3,54	3,02
-CH	$\frac{A_{1275} - A_{1063}}{A_{769}}$	6,44	6,19

U hodnot jednotlivých poměrů ploch nedochází k žádným výrazným změnám. Největší rozdíl poměrů ploch byl zaznamenán u vibračních pásů v rozsahu vlnových délek  $1550\text{cm}^{-1} \div 1400\text{cm}^{-1}$ . V těchto vlnových délkách je pravděpodobné, že bude docházet ke změnám pouze u koncových -CH<sub>3</sub> a -CH skupin vlivem působení mikroorganismů v anaerobním kalu. Tyto drobné změny však nic nemění na skutečnosti, že u anoxomeru v anaerobním kalu během 46 dní nedošlo k biologickému rozkladu.

### 6.3 Hodnocení biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě

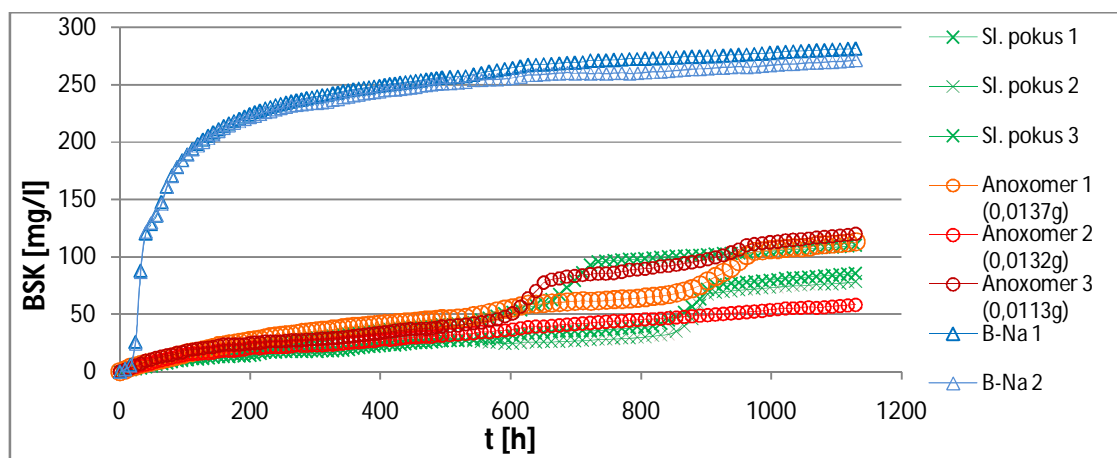
K hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti anoxomeru v říční vodě byla jako inokulum zvolena říční voda z řeky Dřevnice (odběrové místo Zlín-střed). Měření aerobního biologického rozkladu bylo provedeno pomocí respirometru Micro-Oxymax (corp. Columbus instruments, USA), kdy v průběhu měření byla zaznamenávána biologická spotřeba kyslíku a procento biologického rozkladu bylo hodnoceno na základě poměru BSK/TSK. Všechna měření BSK byla provedena při standardní laboratorní teplotě  $25\pm 1^\circ\text{C}$  vždy třikrát vedle sebe pro biotické i abiotické prostředí. Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru bylo rozděleno na dva po sobě jdoucí nezávislé testy. V prvním testu, který probíhal 47 dní, byla nedopatřením koncentrace anoxomeru v reakčních lahvích pouze 127 mg/l. Z důvodu lepšího srovnání výsledků BSK u jednotlivých testovaných prostředí byl proveden i druhý test. Tento test byl již optimalizován, trval 27 dní a koncentrace anoxomeru v reakčních lahvích byla 205 mg/l. Na základě průběžných výsledků (prvního) respirometrického testu byl připraven také modifikovaný Zahn-Wellensův test pro získání dostatečného množství testovaného anoxomeru, aby bylo možno realizovat FTIR analýzu a případně další charakteristiky.

#### 6.3.1 Biologický rozklad anoxomeru – respirometrický test I

Do reakčních lahví o objemu 200 ml bylo dávkováno 99 ml říční vody a 1 ml zásobního roztoku biomédia I. Koncentrace substrátu v reakčních lahvích byla 127 mg/l. Substrátem byla buď zkoumaná látka anoxomer, nebo standardní látka benzoan sodný. Přidáním zásobního roztoku biomédia I do říční vody došlo zároveň k jeho vysrážení, což pro mikroorganismy v říční vodě nebylo ideální. Na průběh biologického rozkladu standardní látky vysrážení biomédia I vliv nemělo, z tohoto důvodu bylo dále v testu pokračováno po dobu již zmíněných 47 dní.

Z průběhu respirace, která je graficky znázorněna na obr. 18, lze zpozorovat, že hodnoty BSK u suspenzí s obsahem anoxomeru se pohybují okolo hodnot  $97,3\pm 7,9$  mg/l a tudíž na úrovni hodnot BSK slepého pokusu ( $91,4\pm 4,9$  mg/l). Anoxomer o koncentraci 127 mg/l v říční vodě tak nemá na průběh respirace mikroorganismů žádný negativní vliv. Zvýšení hodnot BSK v době testu 600-800 hodin, které nastaly u jednotlivých respiračních křivek jak pro slepý pokus, tak i pro anoxomer, jsou nejspíše způsobeny nitrifikačními pochody

(obsah dusíkatých látek v říční vodě nebyl stanoven). Sledované parametry v průběhu testu jsou uvedeny v tab. VI.



Obr. 18 Průběh biologického rozkladu anoxomeru s nižší koncentrací v říční vodě

Tab. VI Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě – respirometrický test I

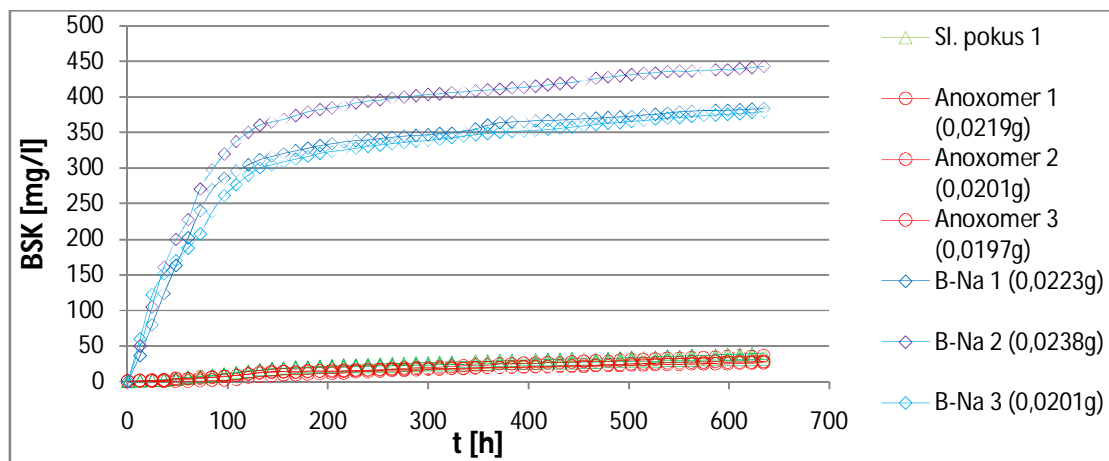
Měřené parametry	Vzorek		
	slepý pokus	B-Na	Anoxomer
Doba testu [dny]	47	47	47
pH <sub>poč.</sub>	7,721	7,753	-
DOC <sub>poč.</sub> [mg/l]	28,97	51,15	104,0
pH <sub>kon.</sub>	7,811	7,804	-
DOC <sub>kon.</sub> [mg/l]	2,030	4,687	-
BSK <sub>47D</sub> [mg/l]	91,4±4,9*	276,4±3,2*	97,3±7,9*
BSK/TSK [%]	-	100	-

\* směrodatná odchylka

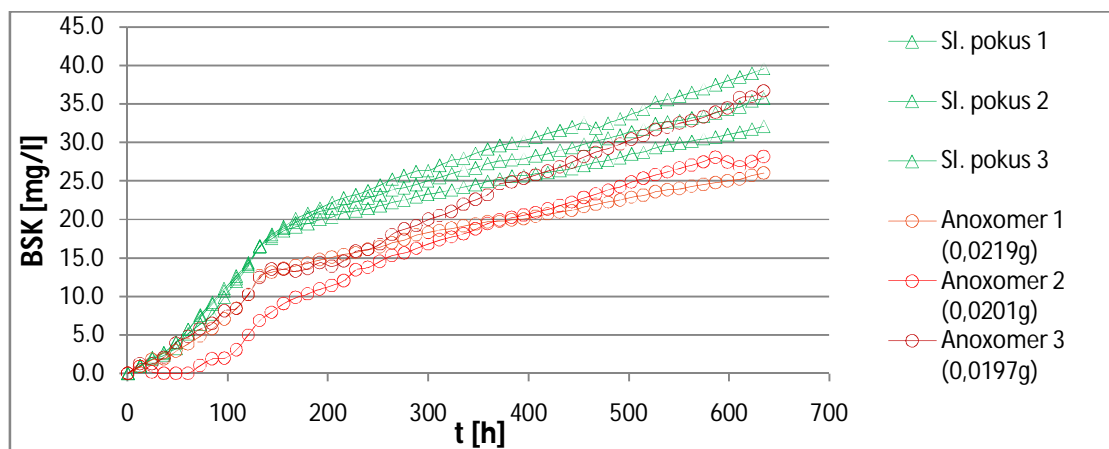
### 6.3.2 Biologický rozklad anoxomeru – respirometrický test II

Změna postupu pro respirometrický test II nastala pouze ve změně koncentrace substrátu (dvojnásobná navážka) a optimalizovaného složení použitého biomédia. Biomédium II obsahovalo podstatně méně nutričních prvků: N, S, P. Průběh biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě je graficky znázorněn na obr. 19. Pro lepší orientaci v grafu však byl

použit obr. 20, na kterém není zobrazena respirace standardní látky (benzoanu sodného). Na obr. 20 tak můžeme vidět, že hodnoty BSK u suspenzí s obsahem anoxomeru ( $BSK_{27D} 30,3 \pm 3,3$ ) se pohybují mírně pod hodnotami BSK slepého pokusu ( $BSK_{27D} 35,8 \pm 2,7$ ) po celý průběh testu. Také zároveň platí, že čím větší byla navážka anoxomeru, tím menších hodnot BSK bylo na konci respirometrického testu dosaženo. Zvýšení koncentrace anoxomeru ze 127 mg/l na 205 mg/l má za následek, že respirace mikroorganismů v říční vodě je mírně inhibována. Výsledky těchto testů tak naznačují, že s rostoucí koncentrací anoxomeru (potenciální akumulace v jednotlivých složkách ŽP) bude docházet ke zvýšení jeho negativního vlivu na ŽP. Sledované parametry v průběhu testu jsou uvedeny v tabulce VII.



Obr. 19 Průběh biologického rozkladu anoxomeru s vyšší koncentrací v říční vodě



Obr. 20 Průběh respirace slepého pokusu a říční vody s obsahem anoxomeru



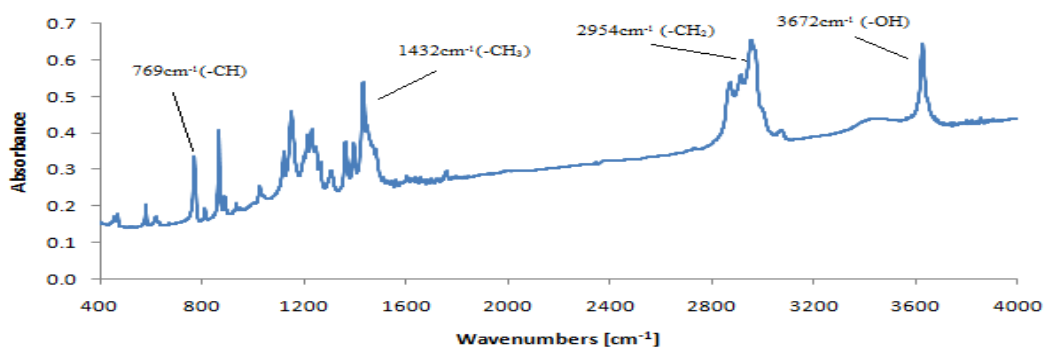
Tab. VII. Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě – respirometrický test II

Měřené parametry	Vzorek		
	slepý pokus	B-Na	Anoxomer
Doba testu [dny]	27	27	27
pH <sub>poč.</sub>	7,803	7,885	-
DOC <sub>poč.</sub> [mg/l]	21,96	162,8	168,0
pH <sub>kon.</sub>	7,940	7,913	-
DOC <sub>kon.</sub> [mg/l]	7,020	35,13	-
BSK <sub>27D</sub> [mg/l]	35,8±2,7*	402,1±8,0	30,3±3,3
BSK/TSK [%]	-	100	-

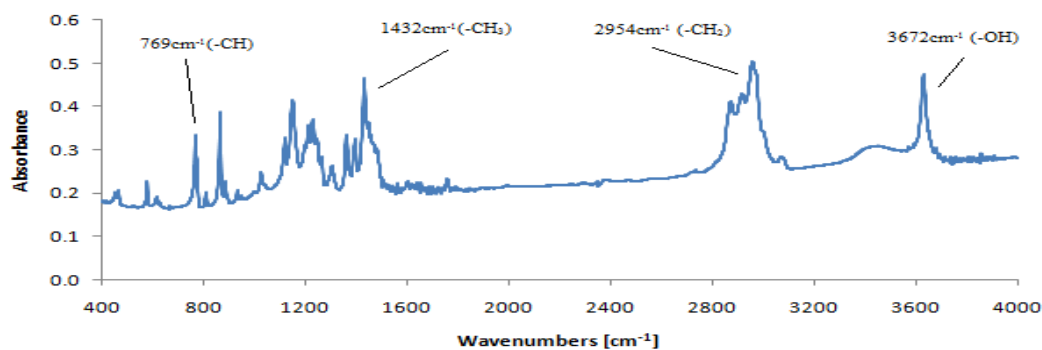
\*směrodatná odchylka

### 6.3.3 FTIR analýza anoxomeru vystaveného působení říční vody

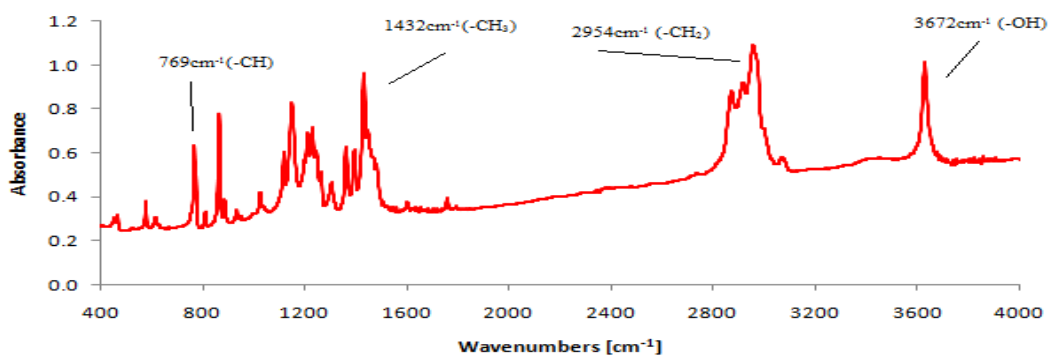
Vzorky anoxomeru z testu II byly podrobeny FTIR analýze. Naměřená FTIR spektra pro biotické i abiotické prostředí s vyznačenými významnými funkčními skupinami jsou uvedena na obr. 22 a 23 a porovnávána s naměřeným spektrem „čistého“ anoxomeru obr. 21.



Obr. 21 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru



Obr. 22 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů říční vody



Obr. 23 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného abiotickým podmínkám (vodné prostředí)

Porovnáme-li singulární FTIR spektra, dojdeme opět k závěru, že ke změnám mezi naměřenými spektry dochází pouze u rozsahu naměřené absorbance. Pro průkaznější kvantitativní porovnání byly z naměřených FTIR spekter spočteny poměry ploch píků, které jsou uvedeny v tab. VIII.

Tab. VIII. Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením říční vody

Měřené parametry		Vzorek Anoxomeru		
		Čistý	Z biotického prostředí	Z abiotického prostředí
Doba expozice [dny]		0	27	27
-OH	$\frac{A_{3720} - A_{3650}}{A_{769}}$	2,68	2,80	2,69
C-H; -CH <sub>2</sub>	$\frac{A_{3110} - A_{2740}}{A_{769}}$	12,21	12,14	11,73
-CH <sub>3</sub>	$\frac{A_{1550} - A_{1400}}{A_{769}}$	3,51	3,26	3,29
-CH	$\frac{A_{1275} - A_{1068}}{A_{769}}$	6,79	6,65	6,62

U „čistého“ anoxomeru, stejně tak jako u anoxomeru vystaveného působení říční vody, se získané hodnoty poměru ploch píků pro jednotlivé oblasti FTIR spektra nikterak zásadně neodlišují (v rámci chyby měření), z čehož plyne, že zkoumaná látka anoxomer nepodléhá během 27 dnů biologickému rozkladu v říční vodě.

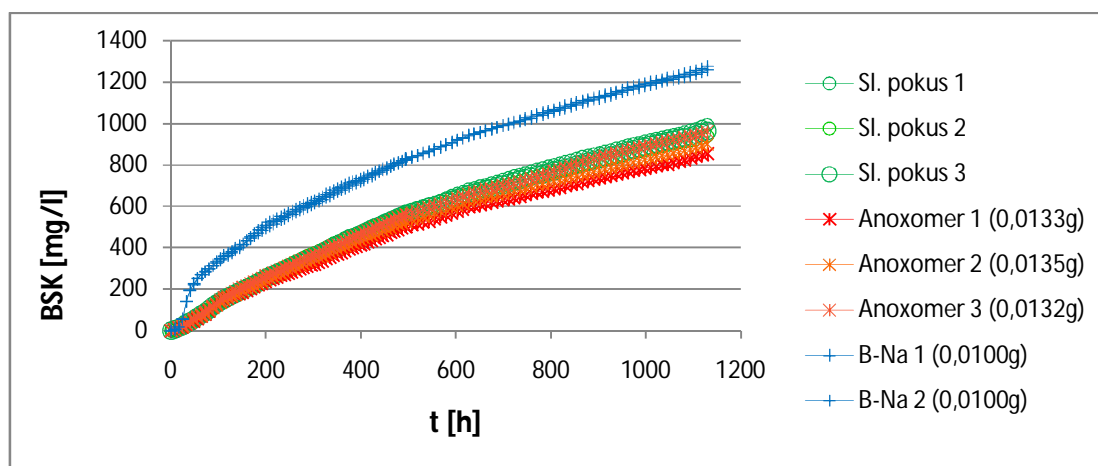
#### 6.4 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru v říčním sedimentu

Pro hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti anoxomeru v říčním sedimentu byl jako inokulum zvolen říční sediment z vody Dřevnice (místo odběru Zlín-střed). Měření bylo provedeno pomocí respirometru Micro-Oxymax (corp. Columbus instruments, USA), kdy v průběhu měření byla zaznamenávána biologická spotřeba kyslíku a procento biologického rozkladu bylo hodnoceno na základě poměru BSK/TSK. Všechna měření BSK byla provedena vždy třikrát vedle sebe. Test probíhal po dobu 47 dnů pouze pro biotické prostředí, při standardní laboratorní teplotě 25±1°C. Po ukončení respirometrického testu byly vzorky anoxomeru z říčního sedimentu podrobeny FTIR analýze.

Objem suspenze v reaktoru byl stanoven na 50ml do 200ml reakčních lahvích. Sediment v reakčních lahvích byl tvořen vodnou (říční voda – Dřevnice, odběrové místo Zlín–Střed) a tuhou fází v poměru 1:1. Do vodné fáze byl navíc přidáván 1ml zásobního roztoku biomédia II. Koncentrace anoxomeru v suspenzi byla 266 mg/l. Jako standardní látka byl použit benzoan sodný.

#### 6.4.1 Biologický rozklad anoxomeru – respirometrický test

Z průběhu biologického rozkladu anoxomeru v říčním sedimentu, který je znázorněn na obr. 24, lze vyvodit, že anoxomer mírně inhibuje respiraci mikroorganismů v říčním sedimentu. A to z důvodu, že naměřené hodnoty (se směrodatnými odchylkami) u suspenzí s obsahem anoxomeru ( $BSK_{47D} 943,0 \pm 8,0$ ) se pohybují lehce pod hodnotami slepého pokusu ( $BSK_{47D} 965,7 \pm 5,5$ ) po celou dobu testu. V tab. IX jsou uvedeny sledované parametry u říčního sedimentu.



Obr. 24 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v říčním sedimentu

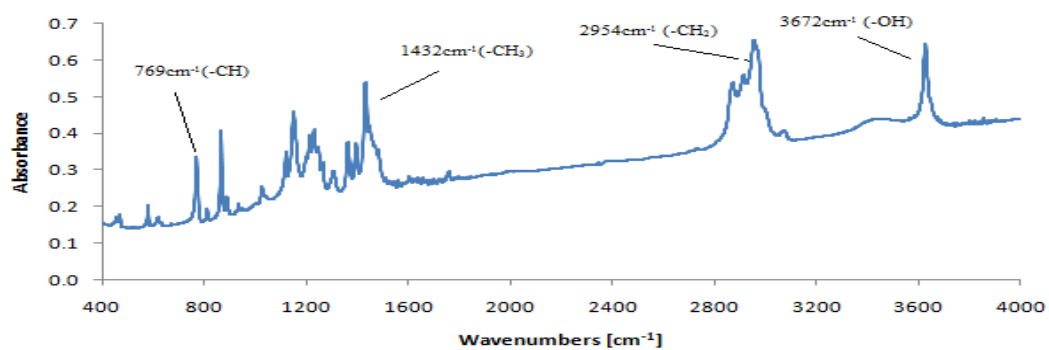
Tab. IX. Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říčním sedimentu

Měřené parametry	Vzorek		
	slepý pokus	B-Na	Anoxomer
Doba testu [dny]	47	47	47
pH <sub>poč.</sub>	7,136	7,201	-
pH <sub>kon.</sub>	7,519	7,603	-
BSK <sub>47D</sub> [mg/l]	965,7±5,5*	1265,3±4,6	943,0±8,0
BSK/TSK [%]	-	>95	-
Spalitelná část vodné fáze sedimentu [%]	97,69		
Spalitelná část tuhé fáze sedimentu [%]	20,11		

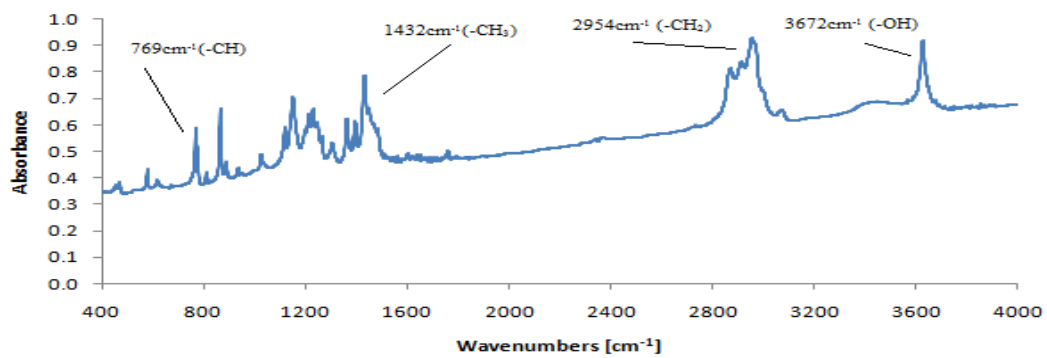
\* směrodatná odchylka

#### 6.4.2 FTIR analýza anoxomeru vystaveného působení říčního sedimentu

Po ukončení respirometrického testu byly vzorky anoxomeru z biotického prostředí říčního sedimentu podrobeny FTIR analýze obr. 26 a srovnávány s naměřeným FTIR spektrem pro „čistý“ anoxomer na obr. 25. Tak jako u předchozích prostředí nastává změna u vyhodnocených FTIR spekter pouze v hodnotách naměřené absorbance. V tab. X jsou pro průkaznější kvantitativní porovnání vypočteny poměry ploch píků pro jednotlivé oblasti spektra.



Obr. 25 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru



Obr. 26 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí říčního sedimentu

Tab. X. Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer z biotického prostředí říčního sedimentu

Měřené parametry		Vzorek anoxomeru	
		čistý	Z anaerobního kalu
Doba expozice [dny]		0	47
-OH	$\frac{A_{2720} - A_{2850}}{A_{769}}$	2,68	2,65
C-H; -CH <sub>2</sub>	$\frac{A_{3110} - A_{2740}}{A_{769}}$	11,9	11,45
-CH <sub>3</sub>	$\frac{A_{1550} - A_{1400}}{A_{769}}$	3,54	3,04
-CH	$\frac{A_{1275} - A_{1063}}{A_{769}}$	6,44	6,17

Srovnáním hodnot poměrů ploch pro jednotlivé oblasti nebyly mezi vypočítanými hodnotami zpozorovány výraznější změny. Největších rozdílů bylo dosaženo v oblastech vlnových délek  $1550\text{cm}^{-1} \div 1400\text{cm}^{-1}$  a  $1275\text{cm}^{-1} \div 1063\text{cm}^{-1}$ . V těchto vlnových délkách je pravděpodobné, že bude docházet ke změnám u koncových -CH<sub>3</sub> a -CH skupin vlivem působení mikroorganismů v říčním sedimentu. Stejně tak jako u předchozích prostředí tyto malé změny nemají vliv na celkový biologický rozklad anoxomeru. U anoxomeru tak po dobu 27 dní v říčním sedimentu nedošlo k biologickému rozkladu.

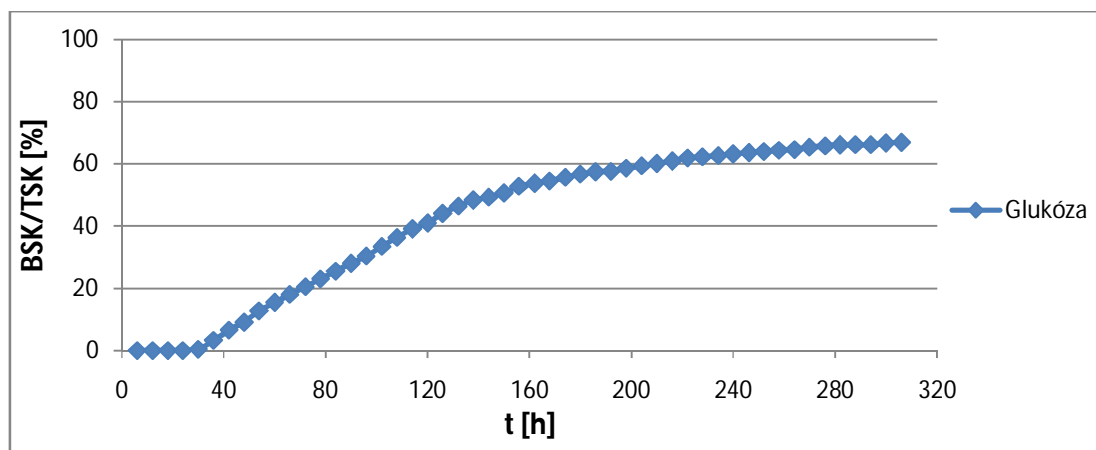
## 6.5 Hodnocení biologické rozložitelnosti anoxomeru v půdním prostředí

Posledním testovaným prostředím pro hodnocení aerobní biologické rozložitelnosti anoxomeru bylo zvoleno půdní prostředí. Před samotným měřením byla provedena optimalizace testu, která zahrnovala zvolení vhodného typu půdy. Za inokulum byla zvolena podle normy ČSN EN ISO 11721-1 půdní směs (viz kapitola 5.2). Měření bylo provedeno pomocí elektrochemického respirometru Bi-2000 (Bioscience corp., USA). Bylo tedy nutné, aby byly během měření na respirometru Bi-2000 dodrženy dvě zásadní podmínky:

- a) Zajištění co největší prodyšnosti půdy z důvodu dobrého přestupu kyslíku z plynné do pevné fáze. Z tohoto důvodu byla vytvořena směs zemědělské zeminy a komerčního kompostu.
- b) Zabezpečit co největší spotřebu kyslíku, aby v průběhu měření nedocházelo k výrazným chybám, které mohou být způsobeny vlivem změn atmosférického tlaku a teploty, protože měřicí cely nejsou umístěny v uzavřeném a temperovaném prostoru. Z tohoto důvodu je nutné dávkovat přibližně 1 g rozložitelné látky na 500 ml půdy do reakční láhve o objemu 1000 ml, v případě špatně rozložitelných látek je nutné množství studované látky navýšit až na 2 g na 500 ml půdy v 1000 ml reakční lahvi. V případě anoxomeru se tak jedná o extrémně vysoké testované koncentrace, které v reálných podmínkách nenastanou.

V průběhu měření byla zaznamenávána biologická spotřeba kyslíku. Všechna měření BSK byla provedena vždy čtyřikrát vedle sebe. Test probíhal po dobu 68 dnů v biotickém i abiotickém prostředí, při standardní laboratorní teplotě  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Po ukončení respirometrického testu následovaly doplňkové analýzy FTIR spektroskopie a mikrobiologický rozbor půd.

Pro ověření biologické aktivity v půdní směsi byla použita glukóza jako snadno biologicky rozložitelná látka. Experiment probíhal 13 dní, kdy pro půdní směs bylo dosaženo 60% rozkladu glukózy. To značí, že mikroorganismy v půdní směsi jsou biologicky aktivní. Průběh biologického rozkladu glukózy je znázorněn na obr. 27.

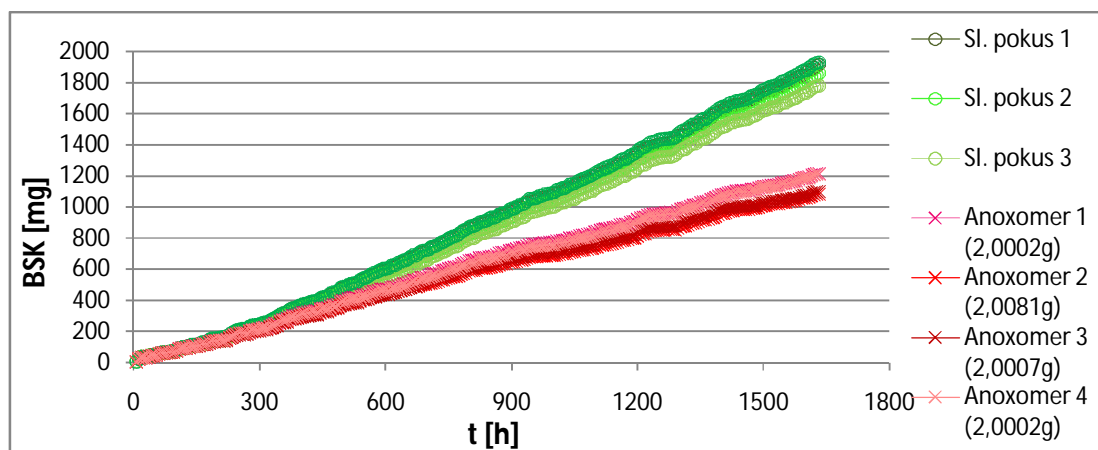


Obr. 27 Průběh biologického rozkladu glukózy v půdním prostředí



### 6.5.1 Biologický rozklad anoxomeru – respirometrický test

Vyhodnocení respirace proběhlo pouze pro biotické prostředí. Z průběhu respirace (obr. 28) lze vidět, že od 0-200 hodiny testu se hodnoty BSK pro slepý pokus a pro půdní směs s obsahem anoxomeru pohybovaly na stejné úrovni. Po 200 hodinách testu však nastává zlom. Respirace mikroorganismů v samotné půdní směsi (slepý pokus) kontinuálně roste, zatímco u půdní směsi s obsahem anoxomeru dochází k poklesu hodnot kumulativní BSK a hodnoty naměřené BSK u půdy s obsahem anoxomeru ( $BSK_{68D} 1152,4 \pm 11,5$ ) se pohybují výrazně pod hodnotami slepého pokusu ( $BSK_{68D} 1875,4 \pm 12,3$ ). S narůstajícím časem se rozdíl naměřených hodnot BSK neustále zvětšuje. Z toho vyplývá, že anoxomer v testované koncentraci 2 g/500 ml půdy výrazně ovlivňuje respiraci mikroorganismů v půdním prostředí. Sledované parametry v průběhu testu jsou uvedeny v tab. XI



Obr. 28 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v půdním prostředí

Tab. XI. Sledované parametry během biologického rozkladu anoxomeru v půdě

Měřené parametry	Vzorek		
	slepý pokus	Glukóza	Anoxomer
Doba testu [dny]	68	13	68
pH <sub>poč.</sub>	6,845	6,845	6,845
pH <sub>kon.</sub>	6,283	6,809	6,102
Vlhkost půdy <sub>poč</sub> [%]	59,8	59,8	59,8
Vlhkost půdy <sub>kon</sub> [%]	57,6	60,0	60,4
BSK <sub>68D</sub> [mg/l]	1875,4±12,3*	962,6±11,4	1152,4±11,5
BSK/TSK [%]	-	67,3	-

\* směrodatná odchylka

### 6.5.2 Mikrobiologický rozbor půdy

Mikrobiologickým rozbohem půd bylo hodnoceno do jaké míry anoxomer ovlivňuje počet mikroorganismů obsažených v půdní směsi. Porovnávány byly počty aktynomycét, vláknitých plísní a celkový počet bakterií viz tab. XII. Změna se projevila pouze v celkovém počtu bakterií, kde hodnoty u směsné půdy s obsahem anoxomeru byly o řád nižší než hodnoty pro směsnou půdu bez obsahu anoxomeru. Tyto malé změny však nemění nic na tom, že anoxomer se vůči mikroorganismům obsažených v půdě chová netoxicky.

Tab. XII. Počet aktinomycét, vláknitých plísní a celkový počet mikroorganismů obsažený u směsné půdy bez anoxomeru a s obsahem anoxomeru

Měřené parametry	typ půdy	
	směsná půda	směsná půda + anoxomer
doba expozice [dny]	0	68
počet aktynomycét v 1g půdy	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$
počet vláknitých plísní v 1g půdy	$19 \cdot 10^2$	$19 \cdot 10^2$
počet celkových bakterií [KTJ/g]	$33 \cdot 10^5$	$68 \cdot 10^4$

Ve spolupráci s M. Bartuňkovou bylo stanoveno množství dusíku a uhlíku v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou. Z výsledků uvedených v tab. XIII, lze zpozorovat, že hodnoty celkového uhlíku a dusíku v půdní mikrobiální biomase u půdní směsi

s obsahem anoxomeru jsou nižší než u půdní směsi bez obsahu anoxomeru. Lze tak tvrdit, že anoxomer přítomný v půdní směsi negativně ovlivňuje (snižuje) množství celkového uhlíku a dusíku v mikrobiální biomase.

Tab. XIII. Stanovení dusíku a uhlíku v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou

Stanovení uhlíku půdní mikrobiální biomasy			
	TOC <sub>F</sub>	TOC <sub>N</sub>	TOC <sub>PMB</sub>
Směsná půda	91,131	30,084	61,047
Směsná půda + anoxomer	67,013	28,598	38,415
Stanovení dusíku půdní mikrobiální biomasy			
	TN <sub>F</sub>	TN <sub>N</sub>	TN <sub>PMB</sub>
Směsná půda	23,757	20,515	3,242
Směsná půda + anoxomer	19,666	17,623	2,043

Kde:

TOC<sub>F</sub>..... celkový organický uhlík – fumigovaná směs

TOC<sub>N</sub>..... celkový organický uhlík – nefumigovaná směs

TOC<sub>PMB</sub>..... celkový organický uhlík – půdní mikrobiální biomasy

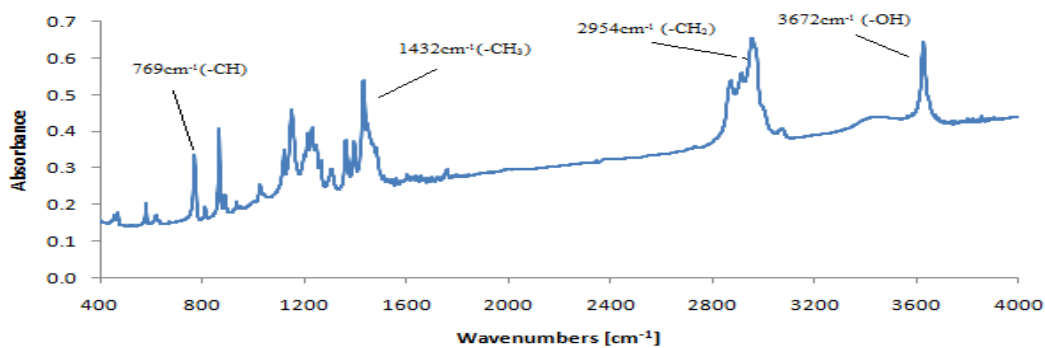
TN<sub>F</sub>..... celkový dusík – fumigovaná směs

TN<sub>N</sub>..... celkový dusík – nefumigovaná směs

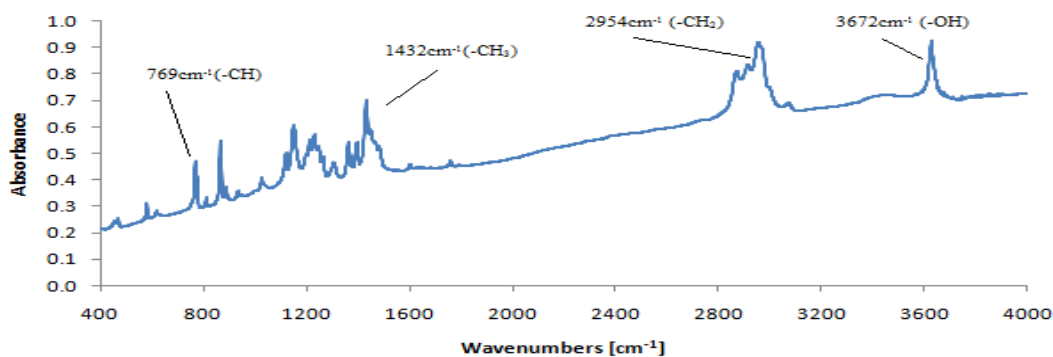
TN<sub>PMB</sub> ..... celkový dusík – půdní mikrobiální biomasa

### 6.5.3 FTIR analýza anoxomeru vystaveného působení půdy

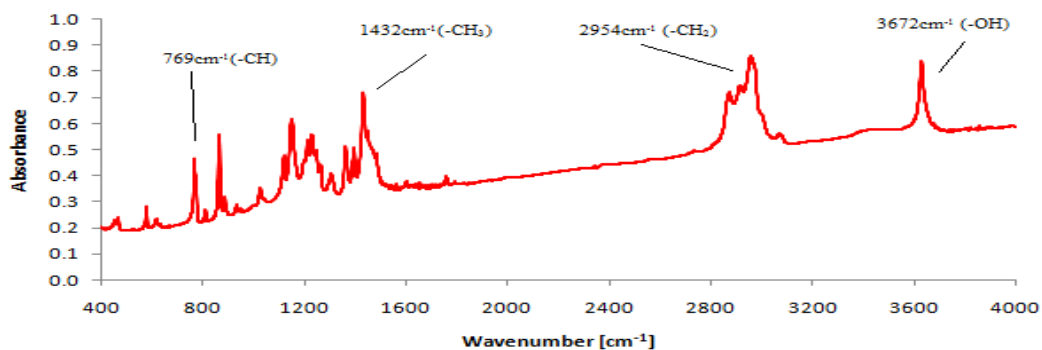
Vzorky anoxomeru z půdní směsi byly podrobeny FTIR analýze. Naměřená FTIR spektra pro biotické i abiotické prostředí s vyznačenými významnými funkčními skupinami jsou uvedena na obr. 30 a 31 a porovnávána s naměřeným spektrem „čistého“ anoxomeru obr. 29.



Obr. 29 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru



Obr. 30 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí půdy



Obr. 31 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí půdy

Porovnáme-li jednotlivá FTIR spektra, pozorujeme změny pouze v rozsahu naměřené absorbance jako v předcházejících studovaných prostředích. Pro průkaznější kvantitativní porovnání byly z naměřených FTIR spekter spočteny poměry ploch píků, které jsou uvedeny v tab. XIV.

Tab. XIV. Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působení půdy

Měřené parametry		Vzorek Anoxomeru		
		Čistý	Z biotického prostředí	Z abiotického prostředí
Doba expozice [dny]		0	68	68
-OH	$\frac{A_{3720} - A_{3550}}{A_{769}}$	2,68	2,64	2,51
C-H; -CH <sub>2</sub>	$\frac{A_{3110} - A_{2740}}{A_{769}}$	12,21	12,17	11,20
-CH <sub>3</sub>	$\frac{A_{1550} - A_{1400}}{A_{769}}$	3,51	3,32	3,03
-CH	$\frac{A_{1275} - A_{1063}}{A_{769}}$	6,79	6,55	6,69

U „čistého“ anoxomeru, stejně tak jako u anoxomeru vystaveného působení půdy, se získané hodnoty poměru ploch píků pro jednotlivé oblasti FTIR spektra nikterak zásadně neliší. Největší změna je zaznamenána u vibračních pásů v rozsahu vlnových délek  $3110\text{cm}^{-1} \div 2740\text{cm}^{-1}$  a  $1550\text{cm}^{-1} \div 1400\text{cm}^{-1}$  pro abiotické prostředí. V těchto vlnových délkách je pravděpodobné, že bude docházet ke změnám pouze u koncových -CH<sub>3</sub> a -CH skupin vlivem vlhkosti půdy. Ale ani tyto změny nemají vliv na biologický rozklad anoxomeru v půdním prostředí. Anoxomer se tak po dobu 68 dní v půdním prostředí biologicky nerozložil.

## ZÁVĚR

Tato práce se zabývá studiem biologického rozkladu polymerního antioxidantu anoxomeru v čistírenských procesech a v jednotlivých složkách životního prostředí. Kromě biologického rozkladu anoxomeru se práce zabývá zjištěním, zda jsou jednotlivé složky životního prostředí a především mikroorganismy v nich obsažené přítomností anoxomeru negativně ovlivňovány.

Pokusy o rozložení anoxomeru probíhaly v pěti vybraných prostředích. Konkrétně v aktivovaném kalu, anaerobním kalu, říční vodě, říčním sedimentu a půdě. Průběh biodegradčních procesů byl sledován měřením BSK. Vyhodnocování biologického rozkladu bylo prováděno pomocí respirometrického testu, modifikovaného Zahn-Wellenova testu a FTIR analýzy, popřípadě dalších vhodných doplňkových analýz. Všechny testy byly prováděny za srovnatelných laboratorních podmínek.

V žádném z výše zmíněných prostředí nedošlo k biologickému rozkladu anoxomeru. Pouze pomocí FTIR analýzy došlo k zaznamenání menších změn u vibračních pásů v rozsahu vlnových délek  $1550\text{cm}^{-1}$ – $1400\text{cm}^{-1}$  a  $1275\text{cm}^{-1}$ – $1063\text{cm}^{-1}$ . V těchto vlnových délkách je pravděpodobné, že bude docházet ke změnám u koncových  $-\text{CH}_3$  a  $-\text{CH}$  skupin, k čemuž dochází vlivem působení mikroorganismů (u anoxomeru vystaveného působení abiotických podmínek tyto změny zaznamenány nebyly). Tyto drobné změny však nic nemění na skutečnosti, že v průběhu testů u anoxomeru k biologickému rozkladu nedošlo.

Z hlediska ovlivnění mikroorganismů v prostředí, které byly působení anoxomeru vystaveny, vyšlo najevo, že ve čtyřech z pěti prostředí (aktivovaný kal, anaerobní kal, říční voda, říční sediment) byla zaznamenána mírná inhibice respirace mikroorganismů pro koncentraci anoxomeru cca 200 mg/l. V pátém – půdním prostředí – byla zaregistrována výrazně vyšší míra inhibice respirace mikroorganismů. Což však bylo způsobeno daleko vyšší koncentrací užitého anoxomeru, a to cca 2 g/500 ml půdy. Z toho vyplývá, že pravděpodobně s rostoucí koncentrací použitého anoxomeru přímo úměrně poroste míra inhibice respirace mikroorganismů.

Koncentrace anoxomeru, které byly v testech této práce použity, jsou však mnohonásobně vyšší, než jaké by se při reálném užívání anoxomeru v prostředí mohly vyskytovat – viz vědecká práce T. M. Parkinsona a J. P. Browna[15].

Ačkoli v žádném z testovaných prostředí k biologickému rozkladu anoxomeru nedošlo, je velmi pravděpodobné, že s jeho používáním bude v daných prostředích docházet k jeho akumulaci a tím i neustálému zvyšování jeho koncentrace v prostředí, což by se na respiraci mikroorganismů a tím i na mikroorganismech samotných mohlo v budoucnu teoreticky negativně projevit.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

- [1] MUSILOVÁ, L., UHLÍK, O., MACKOVÁ, M., MACEK, T. Úloha sekundárních metabolitů rostlin v bakteriální degradaci organických xenobiotik. *Chemické listy* 106. 2012 str. 1029
- [2] KOTYZA, J., SOUDEK, P., KAFKA, Z., VANĚK, T. „Nový“ environmentální polutant. *Chemické listy* 103. 2009 str.540
- [3] VRBOVÁ, T. Víme co jíme? Aneb průvodce „Éčky“ v potravinách. 2001 ISBN: 80-238-7504-3
- [4] FETZNER, S. Biodegradation of xenobiotics. *Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS)*. [online]. [Cit. 2013-02-10]. Dostupný z WWW: <http://www.eolss.net/>
- [5] Xenobiotika [online]. [Cit. 2013-02-18]. Dostupný z WWW: <http://oldweb.izip.cz/ds3/hypertext/AJEBC.htm>
- [6] HOLOUBEK, I. Osud chemických látek v prostředí. [online]. [Cit. 2013-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.recetox.muni.cz/>
- [7] GU, JI-GUANG., GU, JI-DONG. Methods currently used in microbiological degradation and deterioration. *Journal of Polymers and the Environment*, Vol.13, No.1, January 2005 DOI 10.1007/s10924-004-1230-7
- [8] Asimilace. *Biotech slovník* [online]. [Cit. 2013-02-22]. Dostupný z WWW: <http://www.gate2biotech.cz/dictionary.php?word=370>
- [9] HOFFMAN, J., ŘEZNÍČKOVÁ, I., RŮŽIČKA, J. Technologická cvičení z ochrany životního prostředí II. Zlín, srpen 2000
- [10] ASTM [online]. [Cit. 2013-02-18]. Dostupný z WWW: <http://www.astm.org>
- [11] Celkový organický uhlík a chemická spotřeba kyslíku [online]. [Cit. 2013-03-17]. Dostupný z WWW: <http://www.irz.cz/node/125>
- [12] ČSN EN ISO 7827: 1997, *Jakost vod. Hodnocení úplné aerobní biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení rozpuštěného organického uhlíku (DOC)*



- [13] WEINSHENKER, NED M. Anoxomer a new nonabsorbable antioxidant. *Food Technology 1980*
- [14] *Emulgátory* [online]. [Cit. 2013-01-25]. Dostupný z WWW: <http://www.emulgatory.cz/seznam-ecek?prisada=E323>
- [15] BROWN, J.P., PARKINSON, T.M. Nonabsorbable food additives through polymeric design. *Drug metabolism reviews*, 16 (4), 389-422 (1985-86)
- [16] PARKINSON, T.M. Intestinal absorption of two potential polymeric food additives in man. *Department of Biological Sciences*, Dynapol, Palo Alto, California 94304, USA
- [17] BROWN, J.P., BROWN, R.J. Gut microflora interactions with two experimental polymeric food additives in the rat. *Department of Biological Sciences*, Dynapol, 1454 Page Mill Road, Palo Alto. CA 94304, USA
- [18] DŘÍMAL, P., HOFFMAN, J. Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí. *Chemické listy 102*, 139-147 (2008)
- [19] Bioscience, Inc.: *BI-2000 Electrolytic Respirometer User's Reference Manual and Troubleshooting Guide. 2001*
- [20] GENČUROVÁ, M., *Biodeteriorácia PVC/DOP/MMT nanokompozitov vo vodnom a pôdnom prostredí*, diplomová práce, Zlín, 2011, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [21] ČSN EN ISO 9408: 1995, *Jakost vod. Hodnocení úplné biologické rozložitelnosti organických látek ve vodním prostředí. Metoda stanovení spotřeby kyslíku v respirometru*
- [22] Hrnčířík, J., Klíma, J., Kupec, J. Aparatura pro volumetrické sledování anaerobního rozkladu organických látek. *Chemické listy 91*, 877-883 (1997)
- [23] Pekařová, S., *Iniciace biologického rozkladu polyvinylalkoholu v půdním prostředí*, diplomová práce, Zlín, 2012, Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická
- [24] *Instruction manual Total organic carbon analyser model TOC – 5000A*, Shimadzu Corporation, Japan, 1996
- [25] Růžička, J. Mikrobiologická cvičení - skriptum. Zlín, Univerzita Tomáše Bati, 2001. ISBN 80-7318-017-0.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AK	Aktivovaný kal
ATM	Allylthiomocovina
BFRs	Polybromované retardátory hoření
BHA	Butylhydroxyanisol
BSK	Biochemická spotřeba kyslíku
CHSK	Chemická spotřeba kyslíku
ČOV	Čistička odpadních vod
ČSN	Česká státní norma
DOC	Rozpuštěný organický uhlík
DDT	1,1,1-trichlor-2,2-bis(4-chlorfenyl)ethan
EIS	Elektrochemická impedanční spektroskopie
KOH	Hydroxid draselný
KTJ	Kolonie tvořící jednotku
PAH	Polycyklické aromatické uhlovodíky
PCBs	Polychlorované bifenyly
TBHQ	Terciální butylhydrochinon
TOC	Celkový organický uhlík
ŽP	Životní prostředí

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Transport a transformace xenobiotik mezi jednotlivými složkami ŽP.....	13
Obr. 2 Osud xenobiotik v ŽP .....	15
Obr. 3 Strukturální vzorec Anoxomeru .....	20
Obr. 4 Termogravimetrická analýza anoxomeru a ostatních antioxidantů na vzduchu při postupném zahřívání 5 °C/min .....	22
Obr. 5 Schéma respirometru Micro-Oxymax pro měření koncentrace CO <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> /CH <sub>4</sub> .....	31
Obr. 6 Schéma jednotlivých částí reaktoru respirometru BI-2000 .....	33
Obr. 7 Části elektrolytické cely respirometru BI-2000 .....	33
Obr. 8 Aparatura pro volumetrické stanovení anaerobního rozkladu .....	37
Obr. 9 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu .....	45
Obr. 10 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu s přidavkem ATM .....	45
Obr. 11 Závislost naměřených hodnot TOC na čase odběru pro glukózu a sl. pokus .....	47
Obr. 12 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru.....	48
Obr. 13 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů aktivovaného kalu .....	48
Obr. 14 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného abiotickým podmínkám (vodné prostředí).....	48
Obr. 15 SEM snímky povrchu anoxomeru před a po expozici v aktivovaném kalu .....	51
Obr. 16 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru.....	52
Obr. 17 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů anaerobního kalu .....	53
Obr. 18 Průběh biologického rozkladu anoxomeru s nižší koncentrací v říční vodě .....	55
Obr. 19 Průběh biologického rozkladu anoxomeru s vyšší koncentrací v říční vodě.....	56
Obr. 20 Průběh respirace slepého pokusu a říční vody s obsahem anoxomeru.....	56
Obr. 21 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru.....	57
Obr. 22 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného působení mikroorganismů říční vody.....	58
Obr. 23 FTIR spektrum anoxomeru vystaveného abiotickým podmínkám (vodné prostředí).....	58
Obr. 24 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v říčním sedimentu.....	60
Obr. 25 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru.....	62

---

Obr. 26 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí říčního sedimentu.....	62
Obr. 27 Průběh biologického rozkladu glukózy v půdním prostředí .....	64
Obr. 28 Průběh biologického rozkladu anoxomeru v půdním prostředí .....	65
Obr. 29 FTIR spektrum „čistého“ anoxomeru.....	68
Obr. 30 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí půdy.....	68
Obr. 31 FTIR spektrum anoxomeru v biotickém prostředí půdy.....	68

**SEZNAM TABULEK**

- Tab. I. *Rozpustnost Anoxomeru v různých rozpouštědlech*
- Tab. II. *Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v aktivovaném kalu*
- Tab. III. *Naměřené hodnoty TOC Zahn-Wellensova testu pro slepý pokus a glukózu*
- Tab. IV. *Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením aerobního kalu*
- Tab. V. *Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením anaerobního kalu*
- Tab. VI. *Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě – respirometrický test I*
- Tab. VII. *Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říční vodě – respirometrický test II*
- Tab. VIII. *Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působením říční vody*
- Tab. IX. *Sledované parametry jednotlivých suspenzí během biologického rozkladu anoxomeru v říčním sedimentu*
- Tab. X. *Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer z biotického prostředí říčního sedimentu*
- Tab. XI. *Sledované parametry během biologického rozkladu anoxomeru v půdě*
- Tab. XII. *Počet aktinomycét, vláknitých plísní a celkový počet mikroorganismů obsažený u směsné půdy bez anoxomeru a s obsahem anoxomeru*
- Tab. XIII. *Stanovení dusíku a uhlíku v půdní mikrobiální biomase fumigačně extrakční metodou*
- Tab. XIV. *Vypočítané poměry ploch FTIR spekter pro „čistý“ anoxomer a pro anoxomer vystavený působení půdy*

