

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

**Předúprava polyvinylpyrrolidonu před
biologickým rozkladem**

Bc. Lenka Červenáková

Diplomová práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Lenka ČERVENÁKOVÁ**

Studijní program: **N 2808 Chemie a technologie materiálů**

Studijní obor: **Inženýrství ochrany životního prostředí**

Téma práce: **Předúprava polyvinylpyrrolidonu před biologickým rozkladem**

Zásady pro vypracování:

1. Vypracujte literární studii týkající se předúpravy polyvinylpyrrolidonu před jeho potenciálním biologickým rozkladem.
2. Navrhněte výběr a využití vhodných testů biologického rozkladu a analytických postupů pro stanovení uvedeného polymeru.
3. Proveďte příslušné zkoušky a analýzy s ohledem na výsledky předešlých dvou bodů (přístroje MicroOxymax, Bial).
4. Naměřené výsledky zpracujte s využitím vhodných počítačových programů, kriticky zhodnoťte a vyvodte relevantní závěry.

Rozsah práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

Vybrané databáze dostupné na síti UTB.

Primární prameny podle dispozic vedoucího práce.

Vedoucí diplomové práce:

prof. Ing. Jan Kupec, CSc.

Ústav inženýrství ochrany živ. prostředí

Datum zadání diplomové práce:

15. února 2010

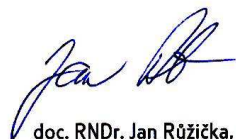
Termín odevzdání diplomové práce:

14. května 2010

Ve Zlíně dne 15. února 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan



doc. RNDr. Jan Růžička, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 14. 5. 2010

.....

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je polymer hojně využívaný hlavně ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Jeho osud v přírodě vzhledem k biologické rezistenci není znám; zatím jedinou cestou k jeho odstranění je předúprava polymeru a teprve následná degradace. Experimentální část se věnuje testování komerčního vzorku PVP K15. Uvedený vzorek PVP byl podroben bazické hydrolyze a hydrolyzát byl testován na biologickou rozložitelnost v aerobních podmínkách (aktivovaný kal) ve vodném prostředí. Po hydrolyze je zřejmé, že tato cesta je reálná. Byla také vyzkoušena možnost využití specifických enzymů (γ -laktamasa, amidasy), případně heterogenních kultur z farmaceutické výroby s potenciální přítomností zmíněných enzymů.

Klíčová slova: polyvinylpyrrolidon, degradace, předúprava, alkalická hydrolyza, biodegradace, enzymy

ABSTRACT

Polyvinylpyrrolidone (PVP) is polymer plentifully use as in the pharmacy and in the grocery. Its destiny isn't know with regard to biological resistance in the nature; for the present only way to its elimination is pre-treatment of the polymer and until after degradation. Experimental part describes of testing commercial sample of PVP K15. The mentioned sample PVP passed be to basic hydrolysis and the hydrolysate was testing up to biodegradation in the aerobic conditions (activated sludge) in the water space. After hydrolysis is obviously, that this way is real. The possibility use of specific enzymes (γ .lactamasa, amidases), eventually of heterogeneous cultures from pharmaceutical production with possible occurrence mentioned enzymes was proved too.

Keywords: polyvinylpyrrolidone, degradation, pre-treatment, alkaline hydrolysis, biodegradation,enzymes

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucímu své diplomové práce Prof. Ing. Janu Kupcovi, CSc. za odborné vedení trvalý zájem a cenné rady, které mi v průběhu práce poskytoval. Ing. Markétě Julinové, Ph.D. děkuji za odborné vedení, vstřícnost a cenné rady v průběhu práce v laboratořích a doc. RNDr. Janu Růžičkovi, Ph.D., Ing. Josefovi House- rovi, Ph.D. za jejich cenné rady. Jsem také zavázána za teoretické připomínky Prof. RNDr. Marku Šebelovi, Ph.D. z katedry biochemie PřF UP v Olomouci. Dále děkuji paní Lence Machálkové, která vždy ochotně pomáhala v otázkách realizace a průběhu laboratorních pokusů této diplomové práce a celému kolektivu Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí. Zvláštní poděkování patří RNDr. Františku Kesnerovi, Ph.D. a Ing. Lukáši Vaň- kovi z firmy Nicolet CZ, s.r.o. za pomoc při interpretaci IČ spekter.

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

Ve Zlíně, 14. 5. 2010

.....

Podpis

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)	12
1.1 VLASTNOSTI	13
1.2 VÝROBA	13
1.3 POUŽITÍ	14
2 N-METHYL-2-PYRROLIDON (NMP)	15
2.1 VLASTNOSTI	15
2.2 POUŽITÍ	15
2.3 DETEKCE NMP.....	15
2.4 NMP V ŽIVOTNÍM PROSTŘEDÍ.....	16
2.5 DEGRADACE A TOXICITA NMP	16
3 MOŽNOSTI DEGRADACE	18
3.1 FOTODEGRADACE.....	18
3.2 TERMICKÁ DEGRADACE.....	19
3.3 MECHANICKÁ A ULTRAZVUKOVÁ DEGRADACE.....	19
3.4 CHEMICKÁ (KATALYTICKÁ) DEGRADACE	19
3.5 BIODEGRADACE	20
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, CEMIKÁLIE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL A VZORKY	25
4.1 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ	25
4.2 POUŽITÉ CHEMIKÁLIE	25
4.3 BIOLOGICKÝ MATERIÁL	26
4.4 TESTOVANÉ VZORKY	27
4.5 BAZICKÁ HYDROLÝZA	28
5 METODY STANOVENÍ	29
5.1 STANOVENÍ BIOLOGICKÉ SPOTŘEBY KYSLÍKU NA PŘÍSTROI BIAL.....	29
5.2 STANOVENÍ PRODUKCE OXIDU UHLIČITÉHO ANALYZÁTOREM MICRO- OXYMAX	30
5.3 STANOVENÍ SUŠINY KALU	30
5.4 STANOVENÍ PH	31
5.5 STANOVENÍ ROZPUŠTĚNÉHO UHLÍKU	31

5.6	STANOVENÍ KONCENTRACE VZORKŮ PVP JODOMETRICKOU METODOU	31
5.7	ANALÝZA VZORKŮ PVP INFRAČERVENOU SPEKTROSKOPÍ.....	32
5.8	STANOVENÍ CELKOVÉHO UHLÍKU A CELKOVÉHO DUSÍKU	33
5.9	ZAHN – WELLENS TEST.....	33
5.10	STANOVENÍ DUSIČNANŮ PŘÍMOU POTENCIOMETRIÍ.....	33
6	ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT.....	35
7	VÝSLEDKY A DISKUSE	37
7.1	ROZKLAD PVP RŮZNÝMI TYPY AKTIVOVANÝCH KALŮ	37
7.2	ROZKLAD PVP RŮZNÝMI TYPY KALŮ ADAPTOVANÝCH NA 1-METHYL-2-PYRROLIDON (NMP)	40
7.3	CHARAKTERISTIKY VZORKŮ PVP UPRAVENÝCH BAZICKOU HYDROLÝZOU.....	43
7.4	BIOLOGICKÝ ROZKLAD VZORKŮ PVP UPRAVENÝCH BAZICKOU HYDROLÝZOU	47
	ZÁVĚR	52
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	54
	SEZNAM OBRÁZKŮ	59
	SEZNAM TABULEK.....	61

ÚVOD

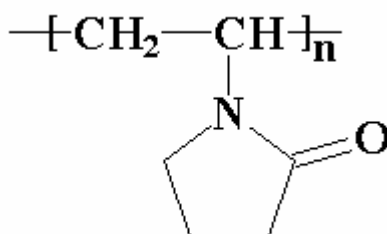
V posledních desetiletích se setkáváme s termínem, který je uváděn jako „nové“ environmentální polutanty. Jedná se o antropogenní kontaminanty, které jsou uvolňovány do životního prostředí a o jejich osudu a vlivu na přírodu je toho známo většinou velmi málo. O tento fenomén se lidé začali zajímat teprve nedávno. Jedná se především o tzv. perzistentní organické polutanty. Do této skupiny patří i nechvalně proslulé DDT a další velmi dobře známé polutanty jako jsou polychlorované bifenyly (PCB), polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), celá řada organických pesticidů, ale také léčiva. Podskupina léčiv známých široké veřejnosti díky jejich negativním vlivům, jsou látky jež napodobují účinky nejrůznějších hormonů. Mezi nejvýznamnější látky této skupiny patří estrogény nebo sloučeniny s estrogení aktivitou. Problém v životním prostředí nejsou jen samotné účinné látky v lécích, ale také substance které nemají povahu léčiv; jsou to doprovodné látky např. ty kterými jsou léčiva ředěna, matrice a jiné. Některé jsou obvykle odolné vůči všem čistírenským procesům. Dalším problémem je stanovit látky, které pronikly do oblastí životního prostředí (př. odpadní voda) a vzhledem ke složitosti matrice je v mnoha případech jejich detekce obtížná. Zdaleka ne u všech látek podobného typu je známé působení na životní prostředí. Přesto je více než jasné, že představují vážný potenciální problém pro člověka i pro ekosystémy.¹ Zajímavou látkou je např. polyvinylpyrrolidon, který v uvedené problematice zaujímá významné místo. Z tohoto důvodu byl vybrán jako objekt našeho zkoumání.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POLYVINYLPIRROLIDON (PVP)

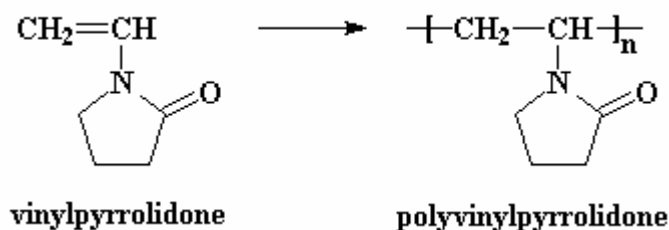
PVP je polymer s širokým záběrem použití v průmyslu, zejména ve farmacii a potravinářství. Důvod rozsáhlého používání tkví v jeho vynikajících technologických vlastnostech a nulové toxicitě vůči živým organismům. Přesto je tento polymer v hledáčku pozornosti řady odborných prací. Zájem o PVP pramení z jeho odolnosti vůči biologické degradaci (prochází např. systémem ČOV i zažívacím traktem beze změny) a jeho možnému hromadění v přírodě. Nicméně dopad na životní prostředí byl studován zatím jen okrajově.

PVP (C_6H_9NO)_n (obr.1) (známý také pod názvy: 1-ethenyl-2 pyrrolidon monomer, 1-vinyl-2pyrrolidon-polymer, Povidone, Kollidon aj.) je dobře rozpustný ve vodě a molekulová hmotnost se pohybuje mezi 2,5 až 1200 kDa.²



Obr. 1: Struktura PVP

Z chemického hlediska jde o lineární uhlíkatý řetězec, na kterém je přes terciární amin navázán laktamový pětičlenný kruh. Nachází se v řadě výrobků např. PVP byl hlavní složkou v prvním úspěšném vlasovém spreji (lak na vlasy) na počátku roku 1950.³ PVP je polymer vinylu; poprvé byl připraven v Německu v roce 1939 v I.G. Farben W. Reppem et al.⁴ polymerací volným radikálem monomeru N -vinylpyrrolidonu.²



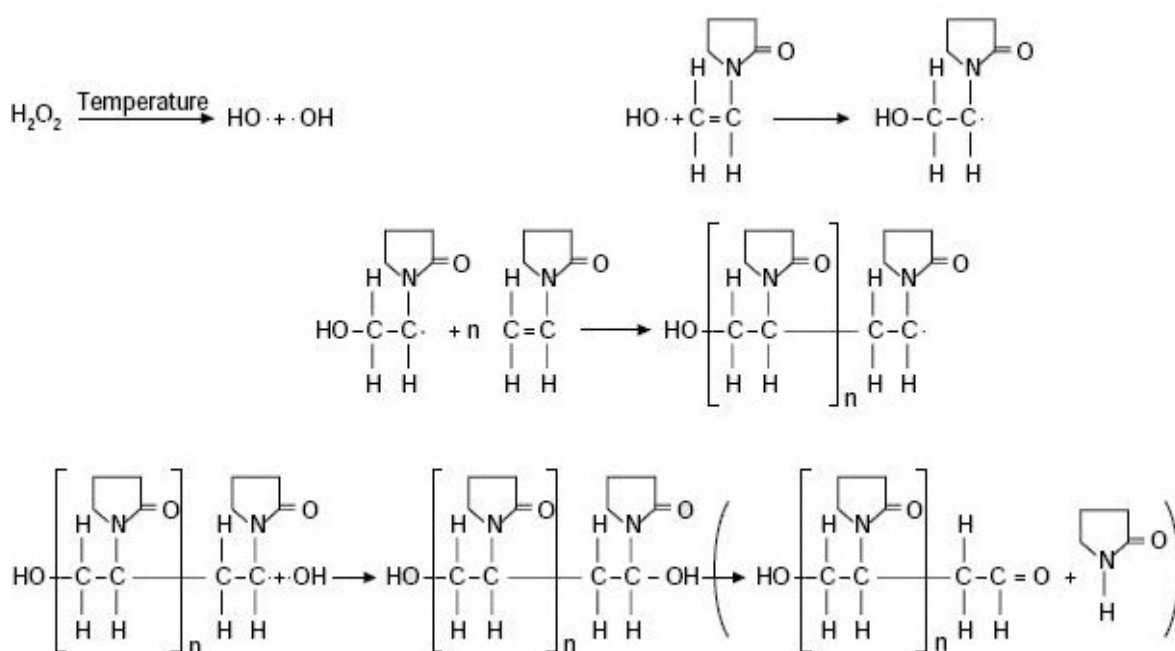
Obr. 2: Vznik PVP

1.1 Vlastnosti

Výhodná chemická vlastnost PVP je interakce s nízko- i vysokomolekulárními sloučeninami ve vodných roztocích jako jsou anorganické ionty, organické sloučeniny (např. fenoly), aminokyseliny, povrchově aktivní látky, polymery, proteiny a farmakologické aktivní látky. Tato okolnost je zvláště významná ve farmakologickém průmyslu.² Spolu s nízkou toxicitou, adhezí, filmformací, neobvyklými komplexotvornými schopnostmi, odolností vůči solím a kyselinám a rezistencí vůči tepelné degradaci je využíváno jeho rozpustnosti⁵ v organických rozpouštědlech i ve vodě. Vodný roztok má pH v rozmezí 4 – 5. Pro praktické účely může být limitující pouze viskozita konečného roztoku. Viskozita je závislá na jeho molekulární hmotnosti. V pevném stavu je bílý až nažloutlý prášek.⁶

1.2 Výroba

Polyvinylpyrrolidon je připravován polymerací N – vinylpyrrolidonu ve vodě nebo v isopropanolu volným radikálem. Jako iniciátor reakce slouží peroxid vodíku.⁴



Obr. 3: Polymerace PVP³

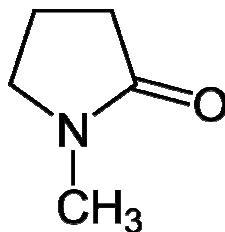
1.3 Použití

PVP s různými molekulovými hmotnostmi je označován písmenem K a doprovodným číslem (př. K12, K17, K25, K30), které udává průměrnou molekulovou hmotnost.

PVP byl poprvé akceptován během druhé světové války jako náhražka krevní plazmy. V té době se jeho použití za tímto účelem zdálo výhodné zejména z důvodu jeho syntetického původu, což zamezovalo infikování různými nemocemi přes krevní plazmu. Od tohoto užívání bylo upuštěno pro jeho vysokou molekulární hmotnost, protože po intravenózním podávání se ukládal v lidském těle a nepodléhal metabolickým přeměnám. Díky této skutečnosti je dnes použití PVP omezeno na orální podávání. Je v tabletách jako pojivo, potahový materiál, je součástí např. antibiotik, analgetik, očních kapek aj. Vylučování PVP z těla závisí na molekulové hmotnosti; produkty s molekulovou hmotností nižší než 70 kDa jsou z těla vyloučeny ledvinami.⁴ PVP je např. součástí dezinfekčního prostředku PVP s jodem² (Povidone - iodine). V potravinářském průmyslu se PVP používá jako stabilizátor v umělých sladidlech a vitamínech, dále jako barevný stabilizátor některých nápojů, jako látka zabraňující krystalizaci přípravků kapalných umělých sladidel, k ředění potravinářských barev, přidává se do obalového materiálu, který je v kontaktu některými druhy potravin aj. Povolena denní dávka PVP jako přídatku do potravin je podle WHO v rozmezí do 50 mg. kg⁻¹. den⁻¹ (pro člověka). PVP a jeho kopolymery jsou používány i v kosmetickém průmyslu. Zvláště vhodný je jako pomocná látka v pleťových krémech, pleťových čistících přípravcích, šampónech a dalších vlasových přípravků. Dokonce je i součástí detergentů, uplatnění našel jako ochranný koloid ve fotografickém průmyslu; při výrobě papíru je přidáván jako barvicí dispergovadlo, působí jako stabilizátor vodných suspenzí a emulzí. Ve stavebnictví našel uplatnění v lepidlech a pečeticích směsích.⁴

2 N-METHYL-2-PYRROLIDON (NMP)

N-methyl-2-pyrrolidon (C_5H_9NO) je také znám jako NMP, 1-methyl-2-pyrrolidon nebo 1-methyl-2-pyrrolidon a N-methylpyrrolidon.⁸



Obr. 4: Chemická struktura NMP

Tato látka byla používána jako „náhradní“ monomerní jednotka PVP, protože vinylpyrrolidon, z kterého je PVP komerčně vyráběn, je nestabilní, těkavý a z hlediska našich pokusů nevhodná sloučenina.

2.1 Vlastnosti

NMP je polární sloučenina, vzdušné oxidaci podléhá jen velmi pozvolna a lze ji snadno čistit frakční destilací. NMP je s vodou mísitelné organické rozpouštědlo. Je vysoce rozpustný v nižších alkoholech, nižších ketonech, éterech, octanu ethylnatém, chloroformu, benzenu a mírně rozpustný v alifatických uhlovodících. Je to hyroskopická, bezbarvá kapalina s mírnou aminovou vůní.⁷

2.2 Použití

NMP je používán převážně v petrochemickém průmyslu jako rozpouštědlo, jako reaktivní činitel v polymeracích a jiných chemických reakcích, v mikroelektronickém průmyslu, při výrobě nejrůznějších sloučenin včetně pigmentů, kosmetiky, léčiv, herbicidů, fungicidů a přípravků proti hmyzu. Použití NMP roste, protože je používán místo chlorovaných uhlovodíků.⁷

2.3 Detekce NMP

Odběr vzorků z ovzduší může být realizován adsorpcí na pevný nosič a následnou desorpcí pomocí organických rozpouštědel. Analýza NMP v kapalně fázi je nejčastěji detekována plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem (FID) nebo du-

sík–fosfor detektorem (NPD). Limity detekce odpovídají koncentracím NMP v ovzduší 0,1 mg · m⁻³ (FID) a 0,01 mg · m⁻³ (NPD). NMP v biologických vzorcích může být stanoven výkonnými kapalnými chromatografickými metodikami. Alternativně může být např. ze vzorků krve a moči extrahován organickými rozpouštědly a analyzován plynovou chromatografií. Pravděpodobně není popsána žádná analytická metoda pro NMP ve vodných vzorcích.⁷

2.4 NMP v životním prostředí

Nejsou známe žádné přírodní zdroje NMP. NMP se může dostat do environmentu během své výroby či používání. NMP se může dostat do environmentu v podobě emisí. V atmosféře je NMP pravděpodobně odstraněn vlhkou depozicí nebo fotochemickými reakcemi s hydroxylovým radikálem. NMP může kontaminovat vody. Podle fyzikálních a chemických vlastností sloučeniny, lze předpokládat, že 99 % NMP uvolněného do životního prostředí je rozpuštěno ve vodě (usuzuje se tak i podle toho, že dosud byl NMP identifikován v přírodě pouze ve vodném prostředí nikoli v ovzduší či v půdě). Sloučenina je mobilní v půdě, je vyluhovatelná ze skládek odpadů a může tak dojít snadno ke znečištění podzemní vody. Vzhledem k úplné mísitelnosti NMP s vodou není očekáváno adsorbování NMP na usazeniny nebo organickou hmotu.⁷

2.5 Degradace a toxicita NMP

NMP lze degradovat chemickou hydrolyzou. Data z testu biodegradability ukázaly, že NMP je rychle biologicky rozložitelný. Studie s použitím aktivovaného kalu prokázaly že NMP je biologicky odbouratelný v aerobním prostředí během několika dní po naočkování. Po týdnu byl zjištěn úbytek 95 % původního množství NMP. Jako produkt rozkladu byla identifikována stabilní karbonylová sloučenina. Z výše uvedených závěrů je NMP klasifikován jako snadno biologicky rozložitelná látka v aerobních podmínkách.⁷ Čistírna odpadních vod má základní kapacitu k tomu, aby odstranila samovolně až 10 mg · l⁻¹ bez adaptace (adaptace pro vyšší koncentrace je velmi rychlá), pokud není čistírna přetížena. NMP je pro vodní organismy netoxický.⁹ Z těla krysy je asi 80 % dávky vyloučeno během 24 hodin. NMP je částečně metabolizován, významnější metabolit je 5-hydroxy-N-methyl-2-pyrrolidon. NMP i metabolity jsou vyloučeny převážně močí. Studie provedené na lidském organismu ukázaly srovnatelné výsledky. Podle studie akutní toxicity v hlodavcích byla

zjištěna nízká toxicita. Nebyly prokázány karcinogenní účinky a jen velmi malé mutagenní účinky. Bylo ale zjištěno, že dráždí oči, dýchací orgány a kůži. Může poškodit reprodukční schopnosti jedince nebo plod v těle matky. NMP by ale neměl představovat významné environmentální riziko.⁷

3 MOŽNOSTI DEGRADACE

Degradací polymerů rozumíme změny vlastností v důsledku chemických, fyzikálních nebo biologických reakcí, případně jejich kombinací, které mají za následek rozštěpení vazby a následující transformace. Změny ve vlastnostech polymerů mohou být vyvolány vnitřními a vnějšími vlivy např. termodynamická nerovnováha, teplo, sluneční záření, mikroorganismy atd. Podle činitelů způsobujících zahájení degradace rozlišujeme následující typy :

- fotodegradace
- termická
- mechanická a ultrazvuková
- chemická (katalytická)
- biodegradace

Jaký typ degradace bude účinný na konkrétní typ polymeru závisí nejen na vnějších podmínkách, ale především na vlastnostech konkrétního polymeru (molekulová hmotnost, typ vazeb aj.).¹⁰

3.1 Fotodegradace

Fotodegradace je skupina fyzikálních procesů, které se s úspěchem uplatňují při degradaci plastů se zkrácenou životností.¹⁰ Byly prováděny pokusy fotodegradace PVP v disperzi $\text{TiO}_2/\text{H}_2\text{O}$. V prvním kroku se PVP adsorbuje (nebo tvoří sraženinu) na TiO_2 částicích. Druhý krok zahrnuje atak OH^\bullet nebo OOH^\bullet radikálů na PVP. Dochází k rozštěpení hlavního řetězce polymeru a otevření laktamového kruhu.¹¹ Byla popsána i metodika působení peroxidu vodíku v kombinaci s UV zářením s výsledkem jakési preoxidace PVP, při které je polymerní řetězec PVP narušen a vzniklé degradační produkty lze podrobit biologickému rozkladu.¹² Fotodegradace je podmíněna působením světelného záření, zejména působením ultrafialového záření na materiál. Fotodegradace mění fyzikální a optické vlastnosti plastu; aby mohla probíhat, musí materiál absorbovat světelné záření. Některé materiály jsou ošetřeny proti tomuto jevu vrstvou, která zabraňuje absorpci světelného záření např. jeho odražením.¹⁰

3.2 Termická degradace

Termickou degradací rozumíme rozklad způsobený tepelnou energií. Většina polymerů podléhá tepelné degradaci při vyšších teplotách. Tato degradace polymerů má charakter náhodného štěpení řetězce polymeru nebo řetězové rozštěpení koncových vazeb mezi uhlíky (štěpení zipovým mechanismem – z konců polymeru se odštěpují monomerní jednotky). Jako náhodnou degradaci označujeme štěpení řetězce ve statisticky náhodném místě řetězce polymeru, kdy dochází ke snižování molekulové hmotnosti. Tepelná degradace řetězce může být odstartována na funkční skupině, která se v řetězci objevuje ojediněle – nebo jistá „nedokonalost“ řetězce či nečistota (ether, peroxid aj.).¹⁰ Termická degradace je celkem nenáročný typ rozkladu. Např. PVP byl podroben působení tepelné energie a významnější hmotnostní ztráta byla zaznamenána v oblasti 380 – 550 °C, způsobené ztrátou malého množství (4 – 5 %) netěkavé hmoty PVP.¹³

3.3 Mechanická a ultrazvuková degradace

Mechanická degradace polymerů je způsobena mechanickým namáháním (např. mletí, mechanické míchání) nebo silným ultrazvukem. Při působení silných mechanických sil dochází k přerušení molekuly řetězce polymeru a současně ke vzniku volných radikálů. Ultrazvuk působí na molekuly polymeru vysokými vibracemi, které vedou k přetržení řetězce.¹⁰

3.4 Chemická (katalytická) degradace

Chemickou degradací rozumíme využití chemických činidel, které reagují s funkčními skupinami obsaženými v polymeru. Je zřejmé, že čím více funkčních skupin bude obsahovat polymer, tím snadněji bude degradace probíhat.¹⁰ Jako příklad chemické degradace lze uvést bazickou hydrolýzu PVP. PVP je mnohem odolnější hydrolýze než nízkomolekulární laktamy.¹⁴ Sama laktamová vazba v polymeru je poměrně odolná vůči hydrolýze.¹⁵ Tento efekt je způsoben polyamfolýtním charakterem polymerní aminokyseliny vytvořené během hydrolýzy. S časem roste úbytek hmotnosti. A stejná úměra platí i u vlivu pH; čím zásaditější hydrolýza tím je úbytek PVP větší.¹⁴ Stejně jako hodnota pH, může i teplota při které je hydrolýza prováděna, ovlivnit množství PVP, které podlehe degradaci.¹⁵

Katalytická degradace je formou chemické degradace s přidavkem katalyzátoru. Díky katalýze může docházet k degradaci např. v kratším časovém úseku, za nižší teploty případně ovlivnit produkty degradace. Jako katalyzátory se používají např. zeolity (kyselý katalyzátor – přenos vodíku), oxid křemičitý či hlinitý, z kovů např. chrom, nikl, molybden, kobalt a železo.¹⁰

3.5 Biodegradace

Biodegradace je specifický druh rozkladu, kdy jde o biochemické přeměny organických sloučenin, které jsou metabolizovány mikroorganismy. Probíhá v aerobních podmínkách tedy za přístupu kyslíku na konečné produkty mineralizace oxid uhličitý a vodu. Může probíhat i v anaerobních podmínkách (za nepřístupu kyslíku) na konečné produkty mineralizace methan a oxid uhličitý. V obou případech tento proces doprovází produkce vody a růst biomasy. Přírodní polymery podléhají biorozkladu v různých prostředích (voda, půda, kompost), dokonce i některé syntetické polymery (polyvinylalkohol) podléhají biorozkladu. Záleží na typu polymeru, prostředí i druhové skladbě mikroorganismů a dalších faktorech.¹⁰

Např. biodegradaci může umožnit vznik a následný biorozklad sloučenin, které by bez „předúpravy“ nepodléhaly biologickému rozkladu; může se jednat např. o narušení polymerního řetězce. Následně je nutné zajistit optimální podmínky pro mikroorganismy, respektive enzymy, které biorozklad podmiňují. PVP je vůči biodegradaci odolný, ale po předúpravách jeho biorozklad není pak problémem. Byla prováděna např. předúprava Fentonovou reakcí ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Fe}^{+3}$) nebo kombinovanou fotooxidační degradací (UV/ H_2O_2). Takto předupravené vzorky PVP byly testovány na biologickou rozložitelnost v aerobním a anaerobním vodném prostředí. Byla zaznamenána vyšší produkce methanu v anaerobním prostředí (do cca 45%); v aerobním prostředí byla zaznamenána vyšší biologická spotřeba kyslíku (dle bilance TOC byly upravené vzorky rozkládány asi z poloviny).¹⁶ N-methyl-2-pyrrolidon byl rozkládán aklimatizovaným aktivovaným kalem ve srovnatelné době jako snadno rozložitelné sloučeniny (např. ethylen glykol, anilin nebo kyselina salicylová). První krok během biorozkladu takových sloučenin je dehydrogenace C-N vazby. Jako degradační meziprodukt vzniká sloučenina s nenasycenou vazbou (-N=CH-), která je následně odštěpena hydrolýzou i produkty rozkladu jsou amino-sloučeniny a aldehydy.¹⁷

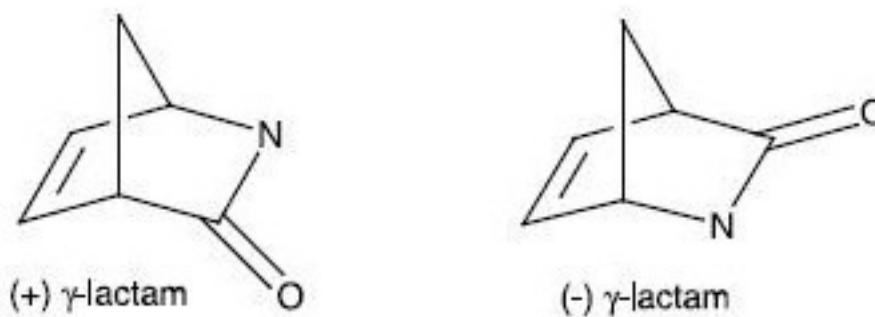
V literatuře⁶ je popsána schopnost PVP stabilizovat některé enzymy a aktivní látky; tvoří s nimi komplexy nebo se sorbují. Nedochozí tedy k enzymatickému ataku PVP; jedná se např. o asparaginasu, dehydrogenasu, peroxidasu, transaminasu, ureasu a další.⁶ Odolnost PVP vůči působení enzymů potvrzuje i další publikace. Hydrogel PVP byl testován in vitro v přítomnosti hydrolás trypsinu a kolagenázy. Po dobu čtyř týdnů byl hydrogel PVP vystaven účinkům hydrolás. Následné testy neprokázaly biodegradaci. Hydrogel PVP byl také vstříknut do skelného humoru králíků a po čtyřech týdnech bylo zjištěno, že 50% polymeru bylo odstraněno. Histopatologická zkouška odhalila velký počet epitelových buněk a makrofágů, které mají schopnost fagocytózy. V tomto případě asi nejde o biorozklad; rozptýlení hydrogelu PVP bylo dosaženo mechanismem fagocytózy.¹⁸

PVP obsahuje ve své struktuře laktamový kruh, jedná se o γ laktam. γ laktam má tři atomy uhlíku v heterocyklu pomineme-li karbonylovou skupinu, proto označení takového laktamového kruhu jako γ z řecké abecedy (třetí v pořadí). γ laktamy podléhají ataku enzymu γ laktamasy. γ laktamasa, byla objevena poměrně nedávno; svědčí o tom poměrně málo odborných publikací.

Z teoretického i praktického hlediska by bylo zajímavé použít jako základního kameně biorozkladu PVP zmíněnou γ -laktamasu. Narušení laktamového kruhu by mohla být prvním krokem primárního biorozkladu tohoto polymeru (viz. níže).

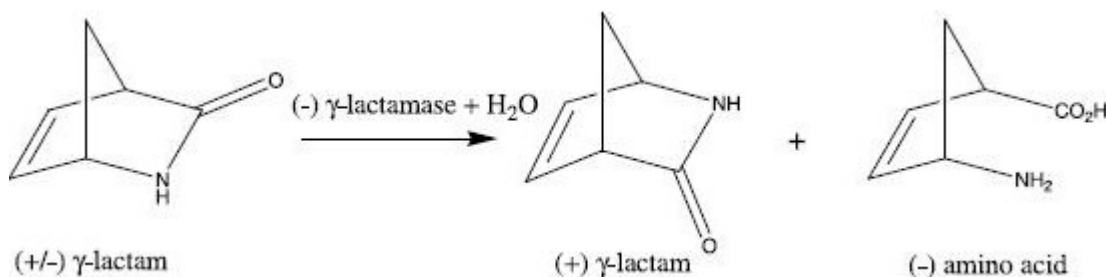
Vzorky z environmentu byly zkoumány pro jejich hydrolytickou aktivitu na (+) γ laktamu (2-azabicyclo[2.2.1]hept-5-en-3-one; jde o bicyklický laktam). Druh identifikovaný jako *Pseudomonas fluorescens*, produkoval laktamasu. Následně byly identifikovány dva vnitrobuněčné enantiomery (+) laktamasa a (-) laktamasa. (+) laktamasa byla velmi selektivní pro (+) laktam (má úzkou substrátovou specifikou).¹⁹ Jiná práce se zabývá purifikací a charakterizací enzymu (-) γ laktamasy, který byl izolován z bakteriálního druhu *Microbacterium hydrocarbonoxydans*. Tento enzym měl specifickou aktivitu (61,3 +/- 2,5 U mg⁽⁻¹⁾) pro 2-azabicyclo [2.2.1] hept-5-en-3-one [(-) γ -laktam]. Tato (-) γ laktamasa z určité části atakovala i (+) γ laktam (enantioselectivity factor 9,5 +/- 0,8).²⁰ Imobilizovaný enzym γ laktamasa byl studován v mikroreaktoru, byla sledována jeho stabilita, aktivita, kinetika a substrátová specifita. Výsledky ukázaly, že tento enzym je poměrně teplotně stálý (při 80°C po šesti hodinách vykazoval 100% z počáteční aktivity). Byly srovnávány výsledky imobilizovaného a volného enzymu. Imobilizovaný enzym ukázal vysokou stabilitu, ale imobilizační proces ovlivnil kinetiku a aktivitu enzymu (která byla snížena až o

70%). V tomto experimentu byl jako substrát použit akrylamid.²¹ Nejen bakterie, ale i některá archaea (mikroorganismy prokaryotického typu obsahující některé znaky eukaryotického typu, jsou podobné bakteriím, žijí ve specifických až extrémních podmínkách) mohou produkovat γ laktamasu. Příkladem je *Sulfolobus solfataricus* MT4, který produkuje termostabilní γ laktamasu. Tento enzym selektivně štěpí (+) enantiomer v racemické směsi γ laktamů. Zdá se, že schopnost produkovat γ laktamasu má více mikroorganismů; některé produkují γ laktamasu, která dokáže štěpit (-) γ laktamy (*Rhodococcus sp.* (ENZA1), *Aureobacterium sp.* (ENZA25)), zatímco jiné druhy mikroorganismů tvoří γ laktamasu štípaající (+) γ laktamy (*Pseudomonas solanacearum* (ENZA20), *P. cepacia* a *P. fluorescens* (ENZA22), *Comomonas acidovorans*).²²



Obr. 5: Struktura (+) a (-) γ laktamu²²

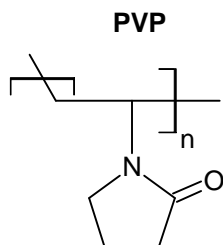
Některé půdní bakterie jsou schopny využít N-acyl jako jediný zdroj uhlíku a energie a schopnost tvořit γ laktamasu. (-) γ laktamasa štěpí amidovou vazbu v heterocyklickém kruhu (-) γ laktamu za vzniku odpovídající kyseliny.²³



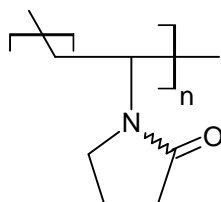
Obr. 6: Mechanismus ataku (-) γ laktamasy

Vzhledem k vlastnostem γ laktamasy předpokládáme následující cestu biorozkladu²⁴ (obr. 6).

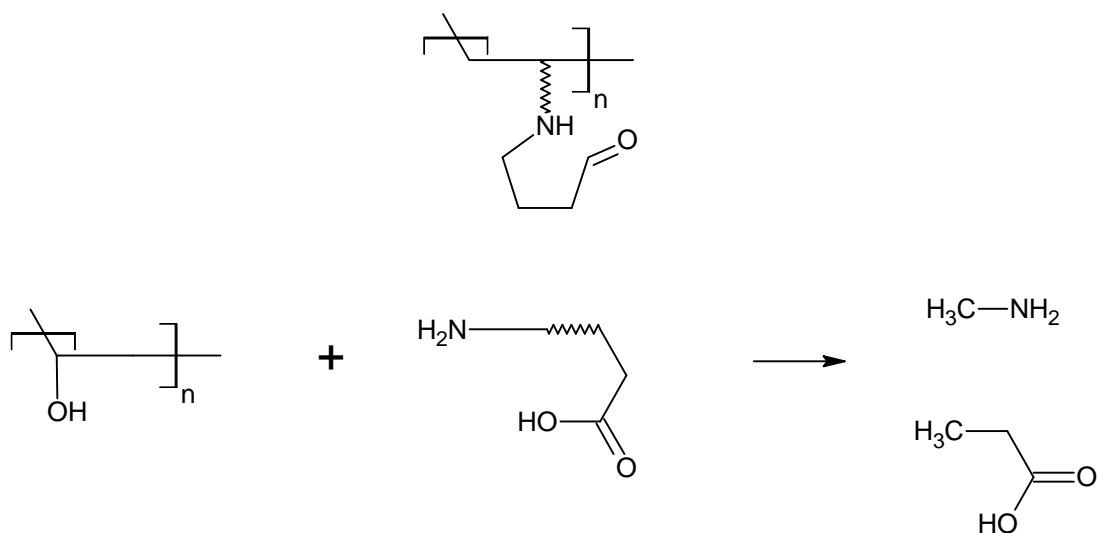
1. krok (otevření laktamového kruhu účinkem γ laktamasy na rigidním terciární dusíku a vznik sekundárního aminu)



2. krok (rozklad sekundárního aminu a štěpení jeho vazby některou aminoxidasou)



3. krok (vznik předpokládaných konečných produktů schopných biorozkladu)



Obr. 7: Předpokládaná cesta rozkladu PVP, vznik meziproduktů (fragmentů) a konečných substrátů potenciálně schopných biorozkladu

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 PŘÍSTROJOVÉ VYBAVENÍ, CEMIKÁLIE, BIOLOGICKÝ MATERIÁL A VZORKY

4.1 Přístrojové vybavení

Analyzátor celkového organického uhlíku TOC-5000 A, Shimadzu Corp., Rakousko

Centrifuga Rotanta 460 R (Hettich Zentrifugen, SRN)

Dusičnanová elektroda 07-35, Crytur

InfoLab pH / ION 735 (WTW Series)

Infračervený spektrometr FTIR ATR Nicolet 5PC, Hermo scientific, Nicolet CZ s.r.o.

Kyslíková elektroda EO-12 (WTW)

Laboratorní váhy Sartorius, Německo

Laboratorní chlazená centrifuga JOUAN MR23i

Mikrorespirometr MicroOxymax, Columbus Ins., Ohio, USA

Respirometr BIAL BOD10 (BSK metr), Slušovice, CZ

Sušárna lab. UM200, ČR

TOC/TN Analyzer, Skalar Analytical B. V., Nizozemí

UV-VIS Spektrometr Unicam UV 500, Helios Epsilon (325 – 1100 nm), UK

Běžné laboratorní vybavení a pomůcky

4.2 Použité chemikálie

Použité chemikálie byly čistoty p.a., pocházející od firmy Lachema a.s., ČR, Penta a Fluka.

KH_2PO_4 dihydrogenfosforečnan draselný

K_2HPO_4 hydrogenfosforečnan draselný

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ síran amonný

H_3BO_3 kyselina boritá

CaCl_2	chlorid vápenatý
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	hexahydrát chloridu železitého
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu hořečnatého
KI	jodid draselný
I_2	jod
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu železnatého
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu zinečnatého
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát síranu manganatého
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	pentahydrát síranu měďnatého
$\text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	heptahydrát síranu kobaltnatého
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	tetrahydrát molybdenanu amonného
HCl	kyselina chlorovodíková
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	monohydrát kyseliny citronové
NaOH	hydroxid sodný
KOH	hydroxid draselný
$\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_2\text{Na}$	benzoan sodný
$\text{C}_4\text{H}_8\text{N}_2\text{S}$	N-Allylthiomocovina
HgCl_2	chlorid rtuťnatý
PVP K15	polyvinylpyrrolidon ($M_r \approx 10\,000$)
PVP K30	polyvinylpyrrolidon ($M_r \approx 40\,000$)
$\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}$	1-methyl-2-pyrrolidon

4.3 Biologický materiál

Pro testování biologické degradace za aerobních podmínek byl použit aerobní kal z čistírny komunálních odpadních vod Zlín – Malenovice. Aerobní kal z čistírny odpadních vod ze společnosti Zentiva a. s. (výroba léčiv), Hlohovec. Aerobní kal ze společnosti ČOV

a.s., Slovenská L'upča, která čistí odpadní vody i pro společnost Biotika a.s. (výroba léčiv, převážně antibiotik). Po dovezení AK z ČOV byl zbaven hrubých nečistot přes síto. Po odebrání potřebného objemu kalu byl kal centrifugován při 3000 ot/min a po odstředění supernatantu byla odstředěná biomasa suspendována v biomédium. Před vlastním použitím byla suspenze aktivovaného kalu 24 hodin provzdušňována. Pro testování biologické degradace za aerobních podmínek bylo použito i odpadní mycelium z výroby antibiotik ze společnosti Biotika a.s., kde je předpoklad výskytu penicilinas. Dále byl použit fakultativně anaerobní kal z téže společnosti.

Biomédium – příprava 1 litru:

1 ml $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	$22,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
1 ml CaCl_2	$27,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
1 ml $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	$0,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
5 ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	$10 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$
20 ml fosfátového pufru:	$8,2 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{KH}_2\text{PO}_4$
	$44,7 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$
	$21,8 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{K}_2\text{HPO}_4$
1 ml stopové prvky:	$0,75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{H}_3\text{BO}_3$
	$3 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	$0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	$0,5 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$
	$0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
	$0,1813 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} \text{CoSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$
	$0,05 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1} (\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$

4.4 Testované vzorky

Pro testování byl použit polymer PVP K15, jehož molární hmotnost je 10 000 g. mol^{-1} , obsah celkového uhlíku v procentech je 60,43 a TSK 2018,02 mg $\text{O}_2 \cdot \text{g}^{-1}$. Obsah uhlíku u vzorku byl zjištěn pomocí analyzátoru uhlíku Shimadzu, model 5000 A.¹⁶

Příprava vzorku PVP byla vždy provedena přidáním naváženého množství prášku PVP do rozpouštědla (destilovaná voda). Roztok byl míchán, aby nedošlo k vytváření hrudek.

Jako testované vzorky pro aerobní pokusy byly použity: PVP K15, hydrolyzáty PVP K15 nebo 1-methyl-2-pyrrolidon, který v některých testech sloužil jako modelová látka. Jako srovnávací látka pro ověření správné činnosti přístroje a inokula byl použit také benzoan sodný, který je snadno rozložitelný. Roztoky vzorků byly dávkovány do biomédia. Obsah organického uhlíku byl před začátkem a po skončení pokusu stanovován analyzáto-rem uhlíku. Dále bylo měřeno pH a stanovena sušina před začátkem pokusu a na jeho konci.

4.5 Bazická hydrolýza

Jako možná předúprava vzorků PVP byla použita bazická hydrolýza¹⁴, protože jiné postupy (fentonova reakce, fotooxidační degradace, oxidační degradace) použila ve své diplomové práci Marušincová.¹⁶ Experiment spočíval v přípravě 2 % roztoku PVP K15 a úpravě jeho pH z kyselé do zásadité oblasti přidávkem 1M, 5M nebo 20M NaOH na hodnotu přibližně 10, 11, 12 nebo 13 pH. Následovalo vystavení varu vzorku po dobu 24, 48 nebo 72 hodin. Po ochlazení vzorku byla změřena hodnota pH a přidávkem 1M nebo 4M HCl bylo pH upraveno do neutrální oblasti. Následně byla pomocí jodometrické metody změřena koncentrace PVP, 140 ml bylo vysušeno a použito na výrobu tablety do IČ spektroskopii. 5 ml hydrolyzátu bylo podrobena biorozkladu na mikrorespirometru Micro-Oxymax.

5 METODY STANOVENÍ

Stanovení biologického rozkladu bylo provedeno ve vodném prostředí za aerobních podmínek.

5.1 Stanovení biologické spotřeby kyslíku na přístroji BIAL

Stanovení biologického rozkladu ve vodném prostředí za aerobních podmínek bylo provedeno na přístroji BIAL BOD 10, resp. BSK metr SL-01. Princip stanovení biologického rozkladu na těchto přístrojích je založen na sledování změny tlaku plynné fáze, ke které dochází v důsledku přestupu a spotřeby kyslíku do respirující kapalné fáze. Přístroj je složen z deseti dvoučlenných měřících lahvíček (měrné v přední části a kompenzační v zadní části upínacího roštu), které pracují za konstantního objemu kapalné i plynné fáze. Lahvičky upevněné v roštu, který třepáním umožňuje promíchávání obsahu v baňkách. Třepáním je zabezpečen lepší přechod kyslíku z plynné fáze do kapalné. Lahvičky jsou pomocí gumových hadiček napojeny k U – trubici, která je naplněná manometrickou kapalinou. Tato kapalina se při změně tlaku v uzavřeném systému posouvá, při tom dochází k vyrovnávání tlaku v měrné a kompenzační lahvičce. Základní objem kapaliny v lahvičkách je 50 ml.¹⁶ 5 ml připraveného testovaného vzorku o koncentraci 100 mg. l⁻¹ (v měrné baňce) je rozpuštěno v biomédiu a vpraveno do lahvičky. Lahvička byla doplněna biomédiem na objem 50 ml. Nakonec bylo do připravených měrných baněk dávkováno 5 ml připraveného inokula aerobního kalu o sušině 1000 mg. l⁻¹ (v měrné baňce 100 mg. l⁻¹). To bylo centrifugováno a následně získaná biomasa byla ředěna biomédiem. Přidávky substrátu probíhaly následujícím způsobem: po spotřebování substrátu byl přidán opět stejný substrát (NMP) 0,5 mililitrovým přídatkem, tak aby bylo dosaženo opět koncentrace 100 mg . l⁻¹ (v měrné baňce). Po spotřebování přídatku substrátu byl 0,5 mililitrovým přídatkem dodán PVP o takové koncentraci aby reakční baňka obsahovala 100 mg PVP. l⁻¹. Kompenzační lahvičky byly naplněny 49 ml provzdušňované destilované vody a 1 ml HgCl₂ (2,5 g. l⁻¹), který zajišťuje abiotické prostředí. Do těsnění plastových uzávěrů byly zasunuty absorpční zkumavky (epruvetky) s třemi pecičkami NaOH a tato uzávěry byly našroubovány na všechny lahvičky a pevně dotaženy. Takto připravené lahvičky byly upevněny na rošt, který byl ponořen ve vodní lázni a lahvičky byly pomocí gumových hadiček napojeny k U – trubici ponechány 15 minut temperovat na teplotu 25 °C. Po uplynutí této doby se přístroj zastaví a případně se nastaví a upraví manometrická kapalina na vý-

chozí hodnotu. Ventilky lahviček se uzavřou a pokud se stav nemění ukazuje to na požadovanou těsnost systému. Posun manometrické kapaliny v U – trubici je v časových intervalech odečítán. Pokud se manometrická kapalina posune až k maximu (130 dílek), je nutné systém zavzdušnit. Na počátku a na konci experimentu byly stanoveny hodnoty pH a TOC všech vzorků.

5.2 Stanovení produkce oxidu uhličitého analyzátozem Micro-Oxymax

Na analyzátoru Micro-Oxymax bylo prováděno kontinuální měření koncentrace O₂ a CO₂ v plynné fázi uzavřených testovacích baněk. Na tomto analyzátoru jsme sledovali biologický rozklad vzorků PVP předupravených bazickou hydrolýzou za aerobních podmínek ve vodném prostředí. Během degradace vzorků docházelo ke změně obsahu O₂ a CO₂ v plynné fázi, které byly periodicky měřeny a koncentrační změny přepočítávány jako spotřeba O₂ a produkce CO₂ v mg. Hodnoty jsou přístrojem ihned přepočítávány na standardní podmínky. Výsledky mohou být rovněž vyjadřovány v mmol nebo ml za zvolenou časovou jednotku. Detektor CO₂ pracuje na principu infračervené spektroskopie (jednopaprskové), detektor O₂ na principu paramagnetické rezonance.²⁵

Aerobní kal (z ČOV Slovenská L'upča) byl nejprve odstředěn při 4500 ot. min⁻¹ po dobu 10 minut a teplotě 20 °C. Po odstředění byl kal resuspendován v biomédiu a provzdušňován. Takto upravený kal byl přidán na závěr do měrných baniček, tak aby sušina kalu v baničkách byla 500 mg .l⁻¹. Do baniček bylo dávkováno 5 ml vzorku PVP předupravených bazickou hydrolýzou, tak aby koncentrace TOC v testovaných baničkách odpovídala cca 150 mg. U slepého pokusu byla místo vzorku přidána destilovaná voda a u kontrolního pokusu byl přidán vzorek 1-methyl-2-pyrrolidon. Do objemu 50 ml byly testované baničky doplněny biomédiem.

5.3 Stanovení sušiny kalu

Stanovení sušiny kalu bylo provedeno vakuovou filtrací přes předem vysušené a zvážené filtry (červená páska). Daný objem kalu byl přefiltrován a vysušen do konstantní hmotnosti (sušení 2-3 hodiny ve 105 °C). Koncentrace sušiny kalu byla vyjádřena v g . l⁻¹.

5.4 Stanovení pH

Před začátkem i po ukončení experimentu bylo změřeno pH u každého vzorku. Před měřením byl přístroj nakalibrován pomocí dvou roztoků s hodnotou pH 4 a 7.

5.5 Stanovení rozpuštěného uhlíku

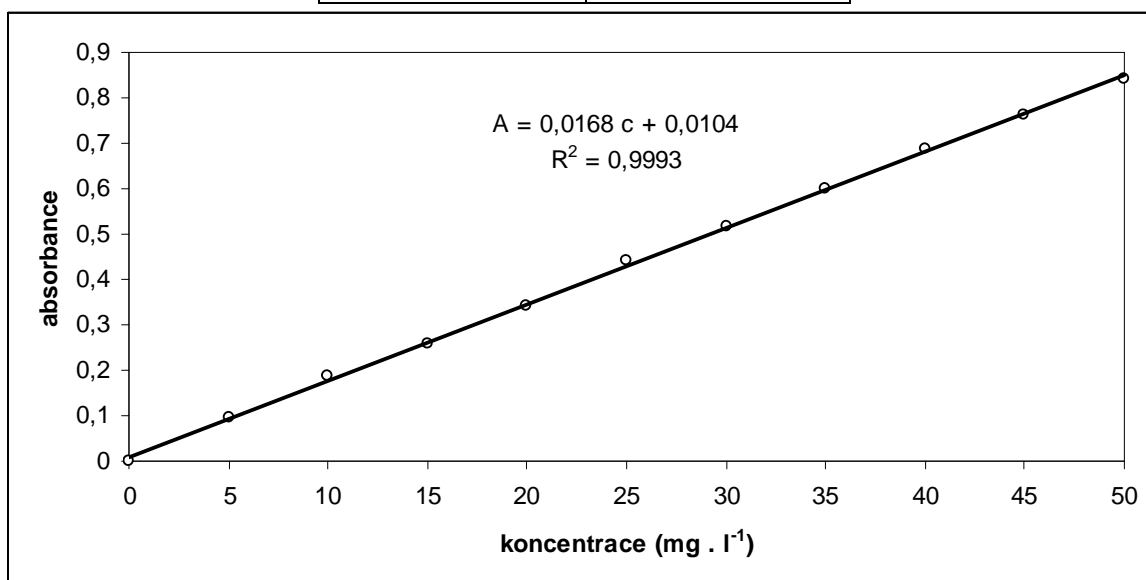
Celkový organický uhlík (TOC) testovaných vzorků byl stanoven pomocí analyzátoru celkového organického uhlíku Shimadzu, model 5000 A. Princip stanovení celkového uhlíku TC je založen na oxidaci veškerého uhlíku ve vzorku, který vniká spalováním vzorku ve spalovací trubici s platinovým katalyzátorem při teplotě 680 °C v proudu kyslíku. Nosný plyn obsahující produkt spalování CO₂ prochází přes IC reaktor, je ochlazen a vysušen. Vzniklý oxid uhličitý je dále veden do detektoru, který pracuje v infračervené oblasti spektra. Signál vzniklý absorpcí záření příslušné vlnové délky, se registruje jako pík; jeho výška peaku je přímo úměrná koncentraci TC ve vzorku (mg · l⁻¹). Při stanovení anorganického uhlíku IC je vzorek nastříknut v proudu kyslíku do reaktorové nádoby s kyselinou fosforečnou, kde dochází k vytěsnění oxidu uhličitého. Stanovení koncentrace IC je stejné jako u stanovení TC. Koncentrace organického uhlíku TOC je určena rozdílem koncentrace TC a IC.¹⁶

5.6 Stanovení koncentrace vzorků PVP jodometrickou metodou

Dle literatury⁶ ke stanovení koncentrace rozpuštěného PVP byla použita jodometrická metoda. K připraveným vzorkům o určitém objemu (5 ml) obsahujících PVP byly přidány 2 ml 0,0006 N roztoku KI s I₂ (0,81 g I₂ s 1,44 KI bylo rozetřeno v třecí misce s malým množstvím destilované vody, kvantitativně převedeno do 1 litrové baňky a po rysku doplněno destilovanou vodou) a 5 ml 0,2M kyseliny citronové. Dle množství PVP v roztoku vzniká zbarvení od žluté po tmavě oranžové (toto zbarvení je po 10 minutách stálé, po uplynutí této doby zbarvení slábne a může negativně ovlivnit výsledky). PVP tvoří s jodem komplex. Absorbance zbarvení byla proměřena spektrometrem při vlnové délce 470 nm. Jako slepý pokus (blank) byla použita destilovaná voda, ke které byly přidány 2 ml 0,0006 N roztoku KI s I₂ a 5 ml 0,2M kyseliny citrónové.⁶

Tab. 1: Kalibrace roztoku PVP K15

c_{PVP} (mg. l ⁻¹)	A
0	0
5	0,094
10	0,188
15	0,260
20	0,340
25	0,442
30	0,516
35	0,600
40	0,688
45	0,764
50	0,840



Obr. 8: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVP K15

5.7 Analýza vzorků PVP infračervenou spektroskopií

Infračervené spektrum vzorků bylo měřeno pomocí infračerveného spektrometru FTIR Nicolet 5PC. Principem metody je absorpce infračerveného záření při průchodu vzorkem, při níž dochází ke změnám rotačně vibračních energetických stavů molekuly v závislosti na změnách dipólového momentu molekuly. Analytickým výstupem je infračervené spektrum, které je grafickým zobrazením funkční závislosti energie, většinou vyjádřené v procentech transmittance (T) nebo jednotkách absorbance (A) na vlnové délce dopadajícího záření. Vzorky (140 ml) PVP předupraveného bazickou hydrolyzou byly vysušeny a použity na výrobu tablet (s KBr). Jako pozadí pro měření IČ spekter byl použit slepý po-

kus, který byl připraven stejným způsobem jako vzorky PVP jen místo roztoku PVP byla použita destilovaná voda.

5.8 Stanovení celkového uhlíku a celkového dusíku

Celkový uhlík a celkový dusík je stanoven na přístroji Formacs^{HT} Total Organic Carbon/ Total Nitrogen Analyzer. Princip stanovení celkového dusíku je založen na oxidační pyrolýze chemicky vázaného dusíku, který je přeměněn na oxid dusnatý, který je měřen chemiluminiscenčním detektorem. Oxidační pyrolýza probíhá při teplotě 850 °C. Princip stanovení celkového uhlíku je obdobný jako v případě stanovení celkového dusíku.²⁶

5.9 Zahn – Wellens test

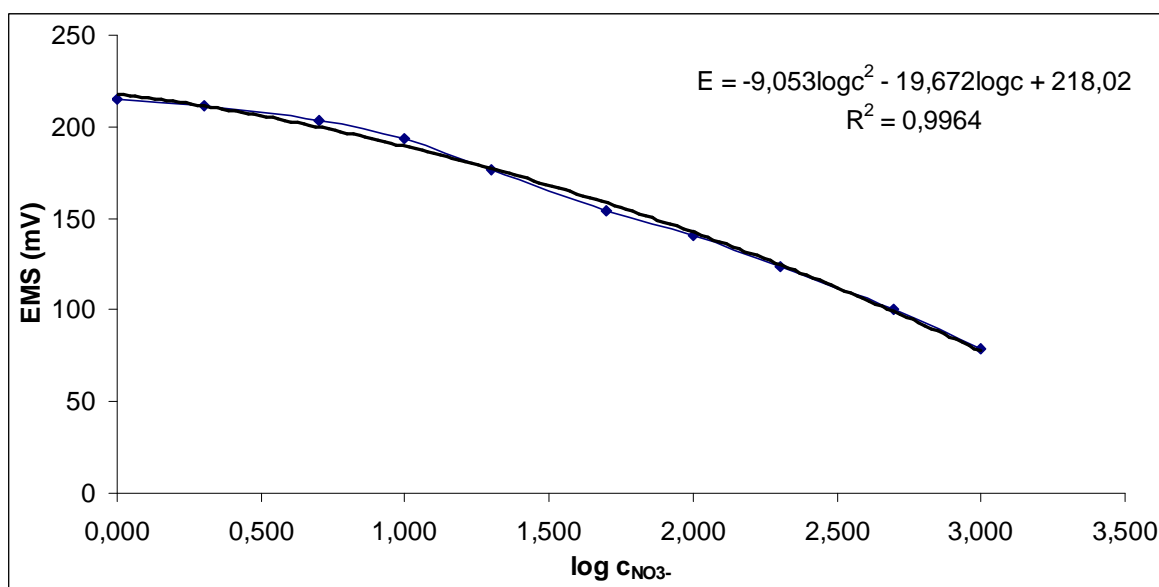
Zahn – Wellens test (ČSN EN 29888, OECD 302B) je klasický test k určení rozložitelnosti ve vodě rozpustných netěkavých organických látek. Látka je rozpuštěna v biomédiu, kde je přítomen aktivovaný kal či inokulum. Vzorky jsou odebírány v pravidelných intervalech a je měřen úbytek TOC v čase. Zároveň s testovaným vzorkem je sledován slepý pokus (bez substrátu) a referenční látka (snadno rozložitelná), což slouží jako kontrola správné funkce inokula. Test probíhá obvykle 28 dní.²⁷

5.10 Stanovení dusičnanů přímou potenciometrií

Stanovení dusičnanů přímou potenciometrií s iontově selektivní elektrodou (ISE). Přesnost a citlivost stanovení je závislá na celkovém složení analyzovaného vzorku. Do kádinky (50 ml) se vloží magnetické míchadlo a pipetuje se 15 ml vzorku (kalibračního standardu). K měřeným vzorkům byl přidán roztok oxidu stříbrného, který srážením odstraňuje chloridy, které ruší stanovení. Kádinka se umístí na elektromagnetickou míchačku a roztok je míchán (konstantní otáčky). Do roztoku se umístí dusičnanová a referenční elektroda. Po třech minutách se odečte hodnota EMS – potenciál článku (mV). Po odečtení EMS se elektrody z roztoku vyjmou, opláchnou, osuší a stejným způsobem se měří další vzorek. Z hodnot koncentrací dusičnanů a hodnot EMS kalibračních standardů je sestrojena kalibrační křivka (obr.9). Koncentrace vzorků je odečtena z této kalibrační křivky.²⁸

Tab. 2: Koncentrace, logaritmus koncentrace
 NO_3^- a EMS kalibračních standardů

$c_{\text{NO}_3^-}$ (mg. l ⁻¹)	log $c_{\text{NO}_3^-}$	EMS (mV)
1000	3,000	78,533
500	2,699	100,633
200	2,301	123,333
100	2,000	141,066
50	1,699	154,1
20	1,301	176,133
10	1,000	193,966
5	0,699	203,833
2	0,301	211,133
1	0,000	215,066



Obr. 9: Kalibrační křivka závislosti potenciálu na logaritmu koncentrace NO_3^-

6 ZPRACOVÁNÍ NAMĚŘENÝCH HODNOT

Celkový organický uhlík TOC (mg. l⁻¹):

$$\text{TOC} = \text{TC} - \text{IC}$$

/1/

kde:

TC – celkový uhlík stanovený na analyzátoru uhlíku Shimadzu (mg. l⁻¹)

IC – anorganický uhlík stanovený na analyzátoru uhlíku Shimadzu (mg. l⁻¹)

Celková biochemická spotřeba kyslíku BSK_c (mg. l⁻¹):

$$\text{BSK}_c = N \cdot k$$

/2/

kde:

N – počet dílků v čase t ()

N₀ – počet dílků na začátku experimentu ()

k – přepočtový koeficient (tab. 3) ()

Tab. 3: ředění vzorků pro měření BSK na přístroji BIAL

Ředění	Objem vzorku (ml) do 50 ml	Rozsah stanovení BSK (mg. l ⁻¹)	Přepočtový koeficient <i>k</i>
1	50	130	1,024
0,5	25	260	2,048
0,2	10	640	5,12
0,1	5	1300	10,24
0,05	2,5	2600	20,48
0,04	2	3200	25,6
0,02	1	6400	51,2

Stanovení sušiny X ($g \cdot l^{-1}$):

$$X = \frac{m_n - m_0}{m_n} \cdot V_{pip} .$$

/3/

kde:

m_0 – hmotnost filtračního papíru (g)

m_n – hmotnost po vysušení kalu (g)

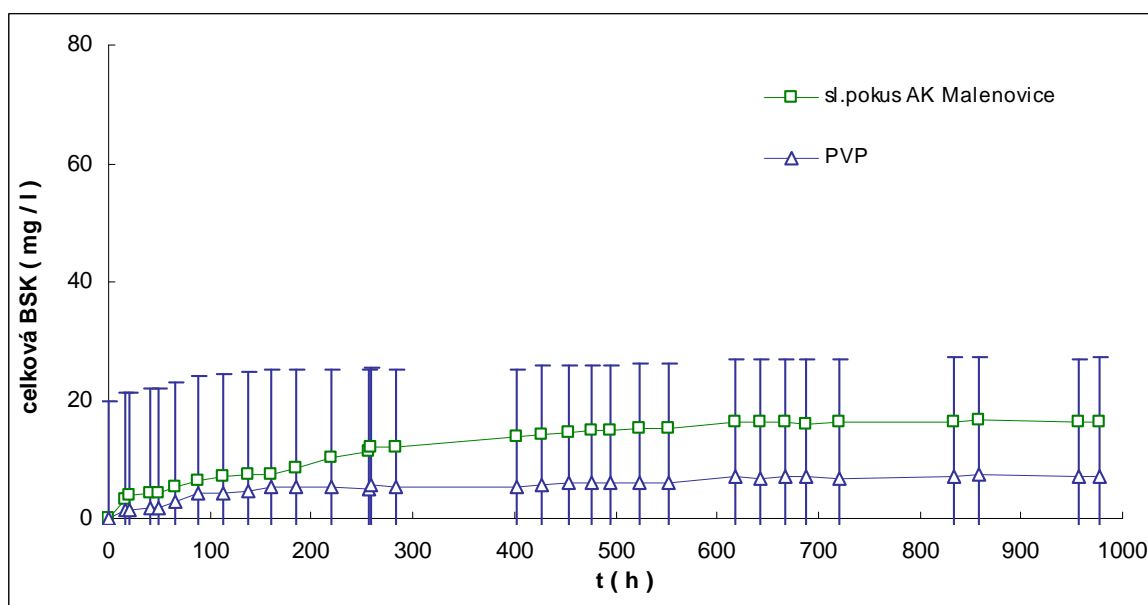
V_{pip} – pipetovaný objem (l)

7 VÝSLEDKY A DISKUSE

7.1 Rozklad PVP různými typy aktivovaných kalů

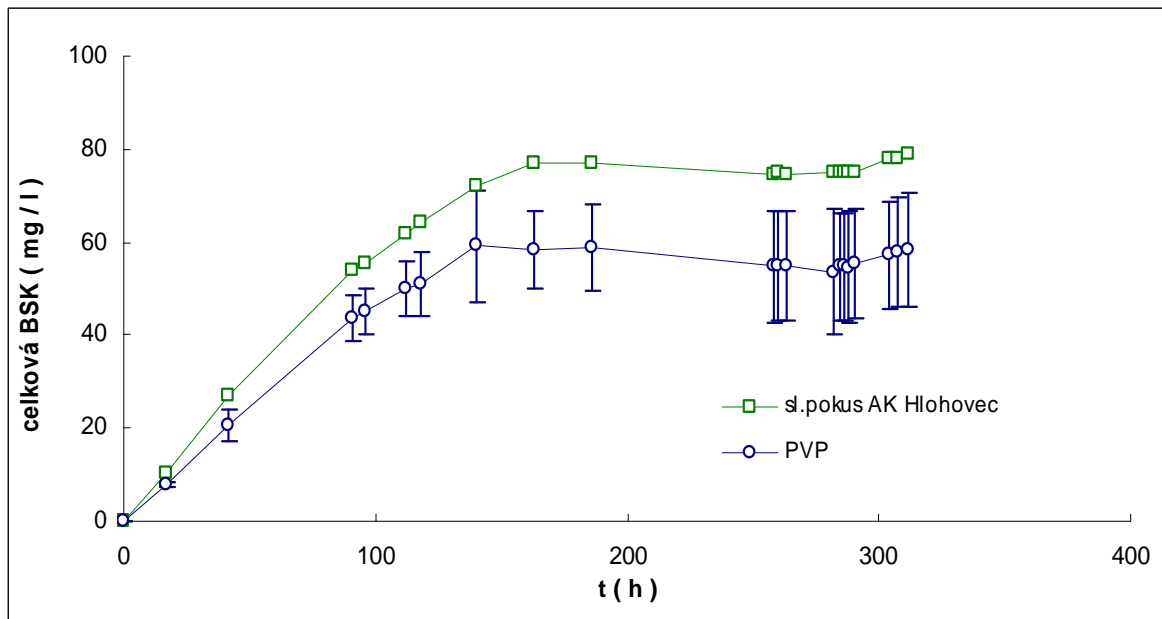
Cílem této části práce bylo testování biologické rozložitelnosti roztoku PVP různými typy aktivovaných kalů v aerobním vodném prostředí na přístroji BIAL. Biologická spotřeba kyslíku (dále jen BSK) byla sledována u čtyř druhů aktivovaných kalů (kap. 5.1).

Nejprve byl použit aerobní aktivovaný kal z ČOV Zlín–Malenovice, která čistí městské odpadní vody. BSK vzorku PVP se pohybovala pod hodnotami endogenní respirace (obr. 10).



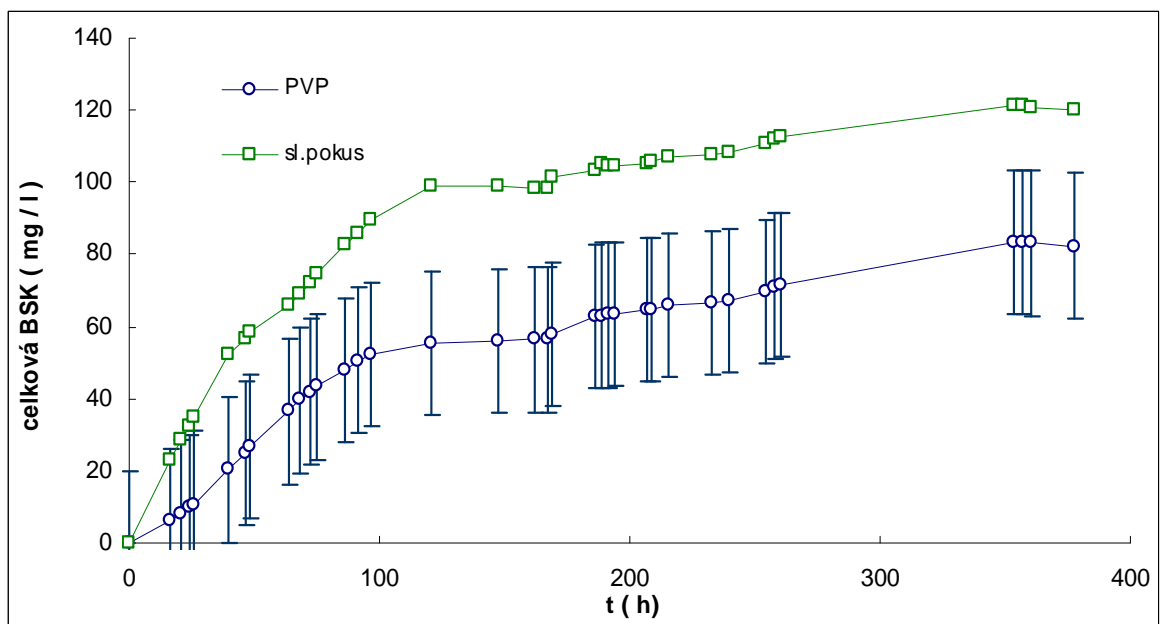
Obr. 10: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci $103,16 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ AK Zlín-Malenovice o sušině $100 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$

Dále byl použit aerobní aktivovaný kal z ČOV ze společnosti Zentiva a. s., Hlohovec, kde probíhá výroba léčiv na bázi morfinů. BSK vzorku PVP je také pod hodnotami endogenní respirace (obr. 11).



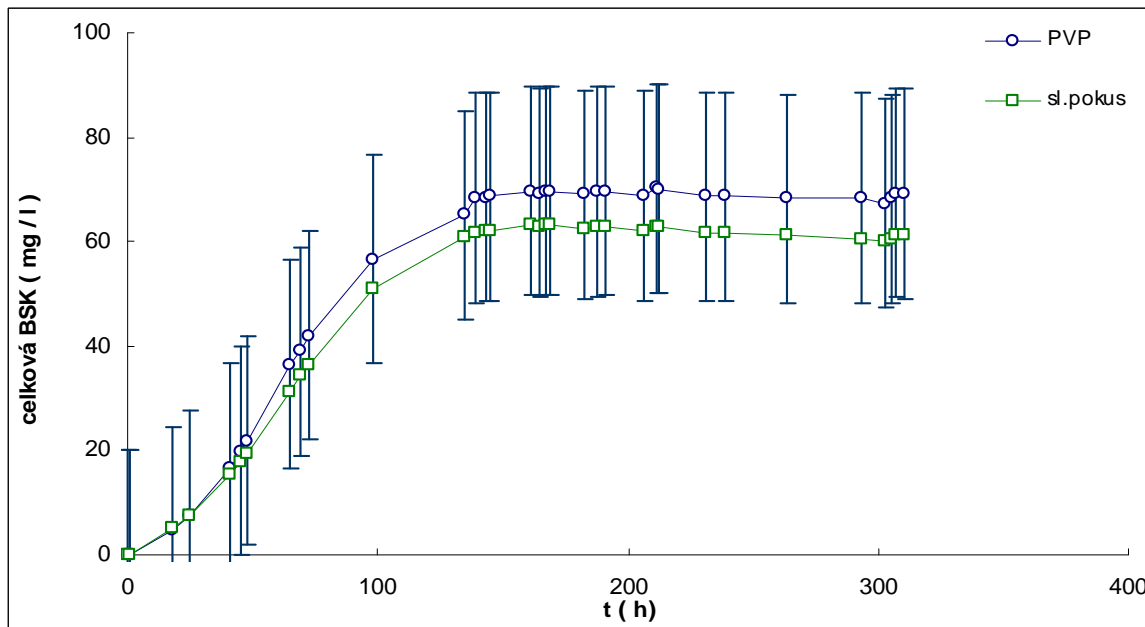
Obr. 11: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci $100,37 \text{ mg. l}^{-1}$ AK Hlohovec o sušině 100 mg. l^{-1}

Jako další byl použit aerobní aktivovaný kal ze společnosti ČOV a.s., Slovenská L'upča, která čistí odpadní vody i pro společnost Biotika a.s., která vyrábí různé druhy léčiv. Hodnoty BSK vzorku PVP se pohybují také pod hodnotami endogenní respirace (obr. 12).



Obr. 12: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci $109,54 \text{ mg. l}^{-1}$ AK I Slovenská L'upča o sušině 100 mg. l^{-1}

K poslednímu testování byl použit aerobní kal ze stejné ČOV, kde ale v době odběru byla vyráběna antibiotika. V tomto experimentu se BSK vzorku PVP pohybuje nad hodnotami endogenní respirace (obr. 13).



Obr. 13: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci 100 mg. l⁻¹ AK II Slovenská L'upča o sušíně 100 mg. l⁻¹

Tento test v současné době pokračuje, proto tab. 4 neuvádí hodnoty pH a TOC na výstupu.

Tab. 4: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu

Vzorek	TOC _{vstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{vstup}	TOC _{výstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{výstup}
slepý pokus-AK Malenovice	5,749	7,401	4,807	7,625
PVP-AK Malenovice	63,91	7,402	60,02	7,711
slepý pokus-AK Hlohovec	8,612	7,372	3,783	6,739
PVP-AkK Hlohovec	57,32	7,456	55,04	6,726
slepý pokus-AK Slovenská L'upča	3,284	7,635	6,400	6,81
PVP-AK Slovenská L'upča	65,7	7,573	67,2	7,025
slepý pokus-AK Slovenská L'upča II	3,142	7,857	-	-
PVP-AK Slovenská L'upča II	56,13	7,777	-	-

PVP nepodléhá biorozkladu a snižuje respiraci kalu. Proto v těchto pokusech nebyla přidána allylthiomocovina, která by snižovala BSK. Přes naše tvrzení o rigiditě PVP vůči biorozkladu pokus s posledním typem kalu – AK Slovenská L'upča II (obr. 13) jako jediný

vykazuje malou, ale prokazatelnou respiraci během prvních cca 300 h testu. Je možné, že při výrobě penicilinu (během a po této operaci) došlo alespoň k jisté indukci penicilinas, které by mohly být odpovědné za tento kladný trend.

7.2 Rozklad PVP různými typy kalů adaptovaných na 1-methyl-2-pyrrolidon (NMP)

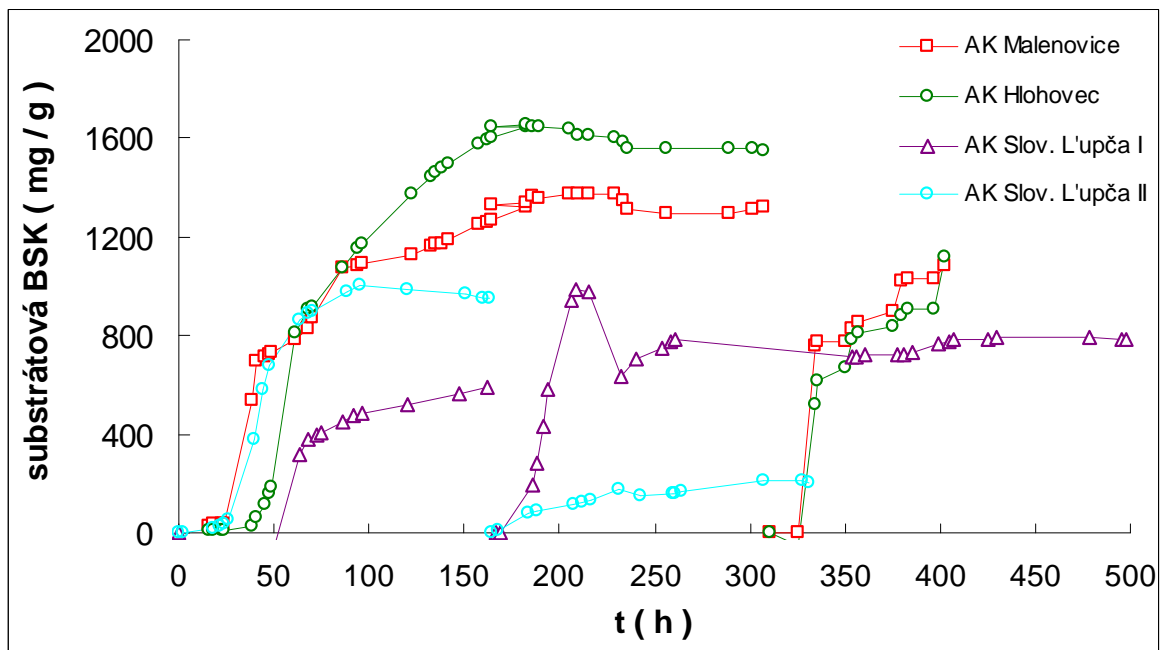
Podle výsledků uvedených v předchozí kapitole, PVP nepodléhá biorozkladu. Byl uskutečněn pokus na něj adaptovat aerobní aktivovaný kal, ale podle metody Zahn-Wellense bez úspěchu (kap. 5.9). Po přidavku PVP byla hodnota TOC nižší pravděpodobně v důsledku jisté sorpce PVP na aktivovaný kal²⁹. Proto jsme přistoupili k adaptaci aerobních aktivovaných kalů na látku, která ve své struktuře obsahuje také laktamový kruh – NMP a je blízká monomeru PVP – nestálému, těkavému vinylpyrrolidonu.

Tento typ experimentu byl prováděn opět na přístroji BIAL v aerobním vodném prostředí. Byly použity různé typy aktivovaných kalů, obdobně jako v předchozí kapitole.

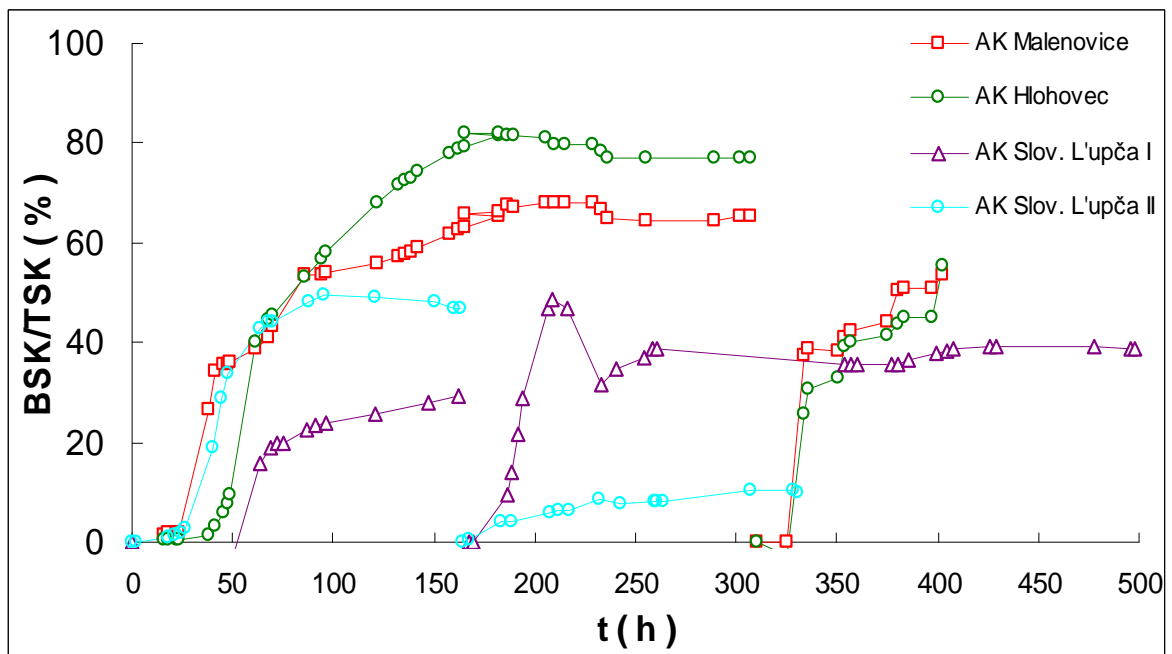
Na obr. 14 lze vidět průběh adaptace aktivovaných kalů na 1-methyl-2-pyrrolidon, tedy hodnoty substrátové BSK a na obr. 16 hodnoty substrátové BSK po přidavku PVP. Obr. 15 a 17 ukazují hodnoty BSK vs. TSK (teoretická spotřeba kyslíku). Tímto způsobem jsme provedli korekci spotřeby kyslíku na nitrifikaci dle normy ČSN ISO 10707. V tab. 5 nejsou zahrnuty výsledky pH a TOC na výstupu z posledního experimentu, který v současné době stále probíhá. Jak lze vidět z obr. 14 a 15 substrátová BSK a BSK/TSK nejvyšších hodnot dosahuje překvapivě s AK Hlohovec za přítomnosti substrátu NMP.

Tab. 5: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu

Vzorek	TOC _{vstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{vstup}	TOC _{výstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{výstup}
slepý pokus-AK Malenovice	4,857	7,479	4,634	6,923
NMP-AK Malenovice	68,64	7,502	63,995	6,361
slepý pokus-AK Hlohovec	3,787	7,481	4,670	7,425
NMP-AK Hlohovec	49,54	7,478	63,09	6,563
slepý pokus-AK Slovenská L'upča	3,284	7,635	6,400	6,810
NMP-AK Slovenská L'upča	71,95	7,589	64,06	6,396
slepý pokus-AK Slovenská L'upča II	6,177	7,800	-	-
NMP-AK Slovenská L'upča II	73,07	7,642	-	-



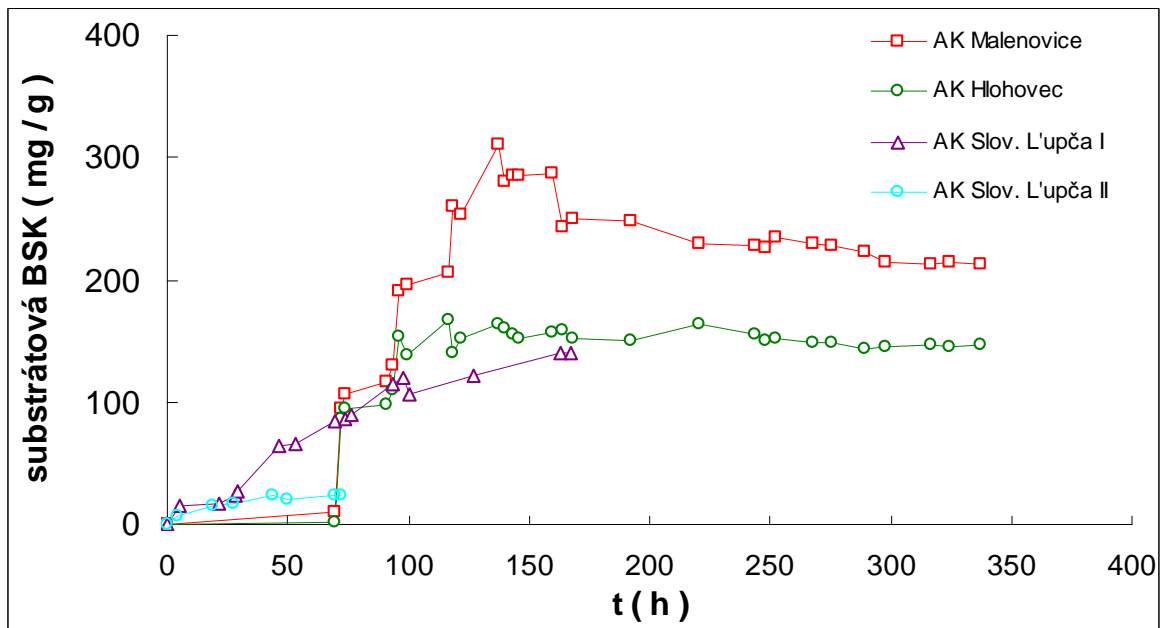
Obr. 14: Průběh adaptace aktivovaných kalů na 1-methyl-2-pyrrolidon – substrátové BSK



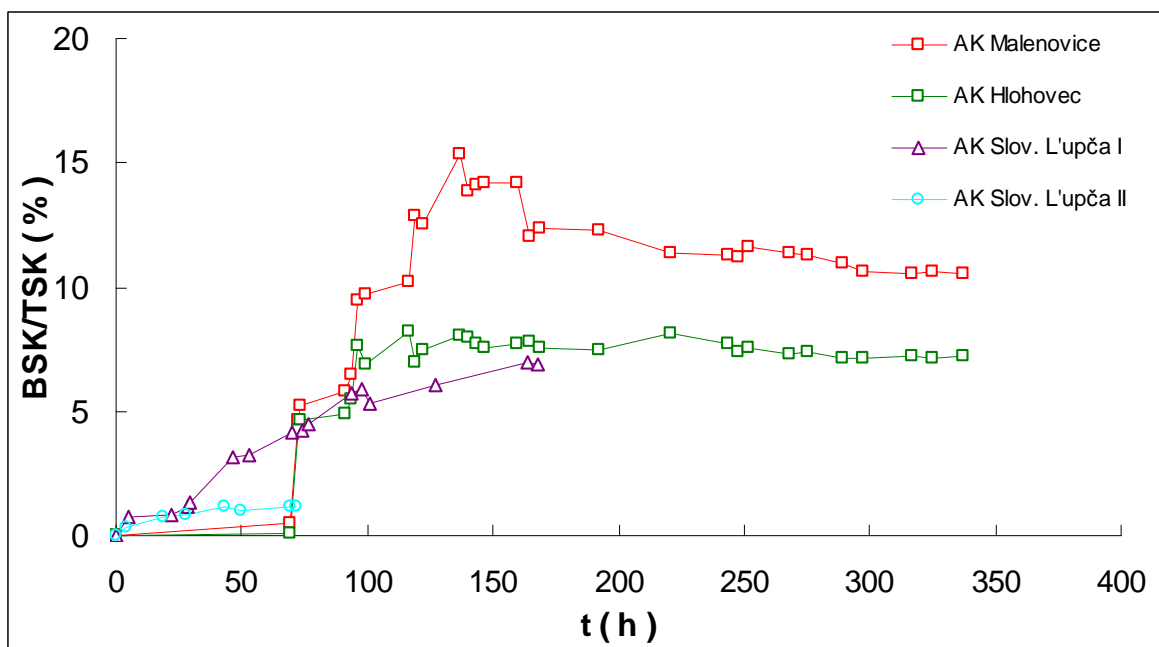
Obr. 15: Hodnoty BSK/TSK pro 1-methyl-2-pyrrolidon

Dále lze pozorovat, že AK Slovenská L'upča II je podle očekávání adaptabilnější než AK Slovenská L'upča I (odebrána v době odstávky výroby penicilinu). Podle výsledků zobrazených na obr. 16 a 17 substrátové BSK a BSK/TSK nejvyšších hodnot sice překva-

pivě dosahuje AK Malenovice, ale do výsledků nejsou zahrnuty z časových důvodů hodnoty z experimentu kdy byl použit AK Slovenská L'upča II.



Obr. 16: Substrátová BSK pro PVP



Obr. 17: Hodnoty BSK/TSK pro PVP

7.3 Charakteristiky vzorků PVP upravených bazickou hydrolyzou

Byly provedeny analýzy, které měly charakterizovat složení původního vzorku PVP i hydrolyzátů (analýza TOC, TN, dusičnanů a jodometrie) (kap. 4.5), případně změněnou strukturu vzorků (IČ) viz tab. 6 - 9 a obr. 18 – 20. Pro variabilitu výsledků stanovení nelze sledovat jakýkoli trend. Výsledky analýz TOC a TN jsou nesourodé což může způsobovat sorpce na aktivovaný kal²⁹, velikost a distribuce částic kalu, druhová heterogenita mikroorganismů atd.

Tab. 6: Hodnoty TOC a TN u vzorku PVP a hydrolyzátů

Vzorek	TOC (mg. l ⁻¹)	TN (mg. l ⁻¹)
2% roztok PVP	1129,5	228,75
hydrolyzát pH10,24h	1126	226,75
hydrolyzát pH10,48h	1495,5	277,5
hydrolyzát pH10,72h	1190	241,5
hydrolyzát pH12,24h	1124,25	232,25
hydrolyzát pH12,48h	1128,75	234,25
hydrolyzát pH12,72h	1105,5	228,5
hydrolyzát pH13,24h	1244,25	241,75

Na základě rozdílných výsledků těchto analýz nelze posoudit změny vzorků PVP upravených bazickou hydrolyzou. Tuto okolnost lze přičíst na vrub pravděpodobné velké chybě spočívající v samotném principu jodometrické metody.

Tab. 7: Koncentrace PVP u hydrolyzátů stanovené pomocí jodometrické metody

Vzorek	c _{PVP} (mg. l ⁻¹)
2% roztok PVP	408,4
hydrolyzát pH10, 24 h var	407,2
hydrolyzát pH10, 48 h var	409
hydrolyzát pH10, 72 h var	405,3
hydrolyzát pH12, 24 h var	405,6
hydrolyzát pH12, 48 h var	403,8
hydrolyzát pH12, 72 h var	398,1
hydrolyzát pH13, 24 h var	394,3 *
hydrolyzát pH11, 24 h var	399,3

* nepodařilo se upravit pH do neutrální oblasti

U hydrolyzátů bylo provedeno stanovení dusičnanů (tab.8). Stanovení dusičnanů bylo provedeno i u vzorků hydrolyzátů po provedené biodegradaci (tab. 9); ze stanovených hodnot nelze jednoznačně vysledovat jakýkoli trend. Částečně lze tuto skutečnost přičíst chybě měření. Ale je zřejmé, že po biodegradaci hydrolyzátů se hodnoty dusičnanů zvýšily, což ukazuje na nitrifikaci. U hydrolyzátu při pH 13, pravděpodobně stanovení rušila velká koncentrace chloridových iontů, které byly do vzorku vneseny při úpravě pH.

Tab. 8: Koncentrace, logaritmus koncentrace NO_3^- a EMS hydrolyzátů

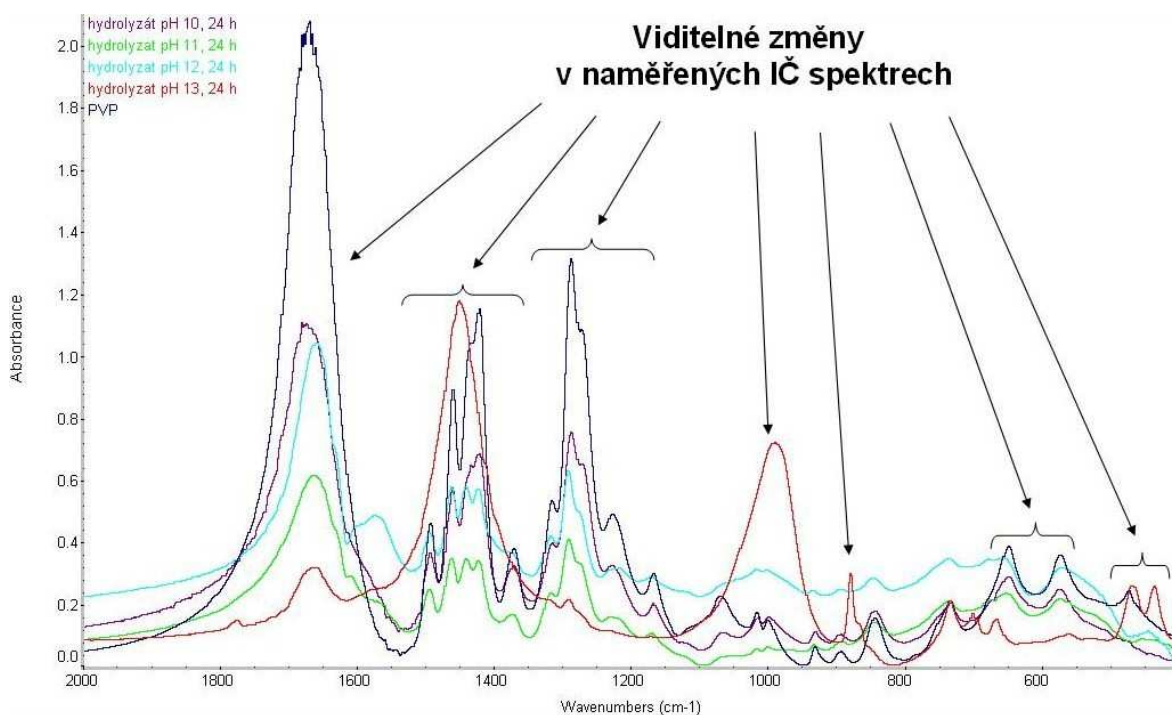
Vzorek	EMS (mV)	\log_{reg}	c_{reg}	$c_{\text{NO}_3^-}$ (mg. l ⁻¹)
hydrolyzát pH10, 24 h var	137,75	2,10	125,89	126,33
hydrolyzát pH10, 48 h var	144,6	2,01	102,33	102,69
hydrolyzát pH10, 72 h var	193,65	1,13	13,49	13,54
hydrolyzát pH12, 24 h var	137,1	2,11	128,82	129,27
hydrolyzát pH12, 48 h var	147,3	1,97	93,33	93,66
hydrolyzát pH12, 72 h var	130,55	2,20	158,49	159,04
hydrolyzát pH11, 24 h var	174,5	1,52	33,11	33,23
sl. pokus pH11, 24 h var	135,9	2,13	134,9	135,37
hydrolyzát pH13, 24 h var	42,2	3,21	1621,81	1627,49

Tab. 9: Koncentrace, logaritmus koncentrace NO_3^- a EMS hydrolyzátů podrobených biorozkladu

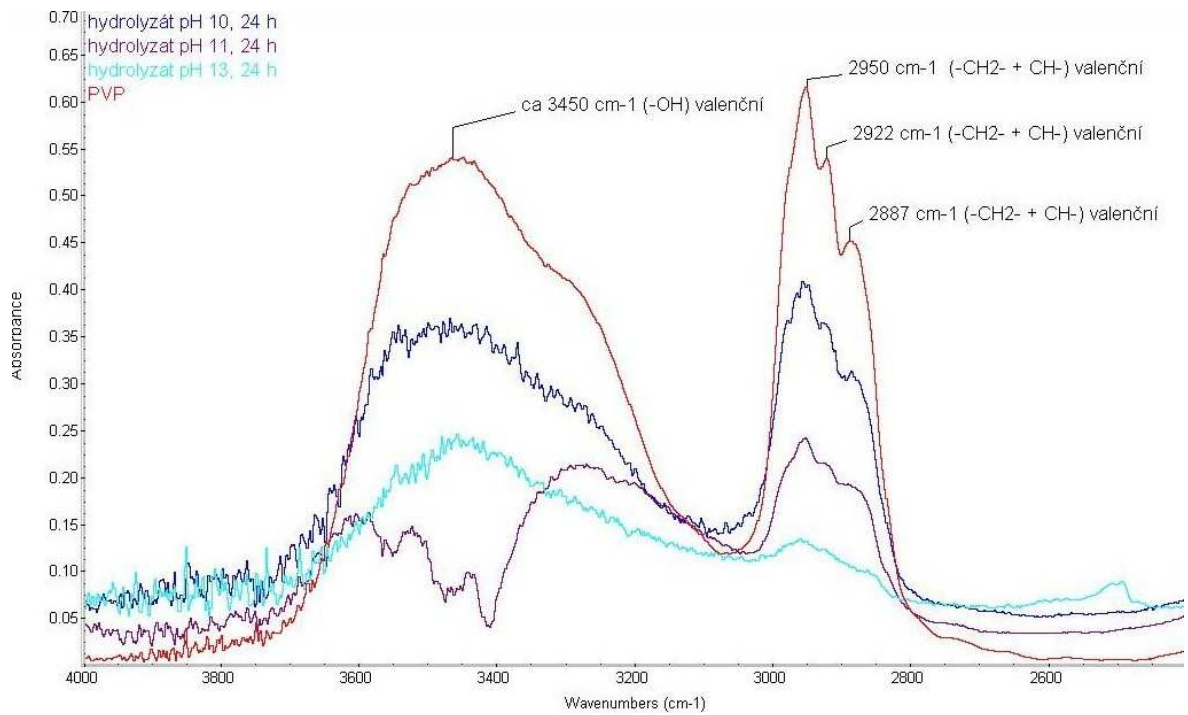
Vzorek	EMS (mV)	\log_{reg}	c_{reg}	$c_{\text{NO}_3^-}$ (mg. l ⁻¹)
slepý pokus	106,4	2,59	389,05	390,41
NMP	93,15	2,78	602,56	604,67
hydrolyzát pH10, 24 h var	80,9	2,95	891,25	894,37
hydrolyzát pH10, 48 h var	78	2,99	977,24	980,66
hydrolyzát pH10, 72 h var	55,5	3,29	1949,85	1956,67
hydrolyzát pH12, 24 h var	56,55	3,27	1862,09	1868,61
hydrolyzát pH12, 48 h var	47,05	3,39	2454,71	2463,30

Proto bylo ke stanovení změn struktury vzorků PVP upravených bazickou hydrolyzou použito IČ spektroskopie. Z IČ spekter lze vidět změny u vzorků PVP upravených bazickou hydrolyzou v závislosti na pH v průběhu hydrolyzy, v menší míře na různé době po kterou byl vzorek vystaven hydrolyze. Z jednotlivých naměřených IČ spekter je patrné (obr. 18 - 20), že hydrolyzou za definovaných podmínek (kap. 4.5) se naměřená IČ spektra jednotlivých vzorků od sebe liší. Obecně je zřejmé, že se zvyšováním hodnoty pH dochází

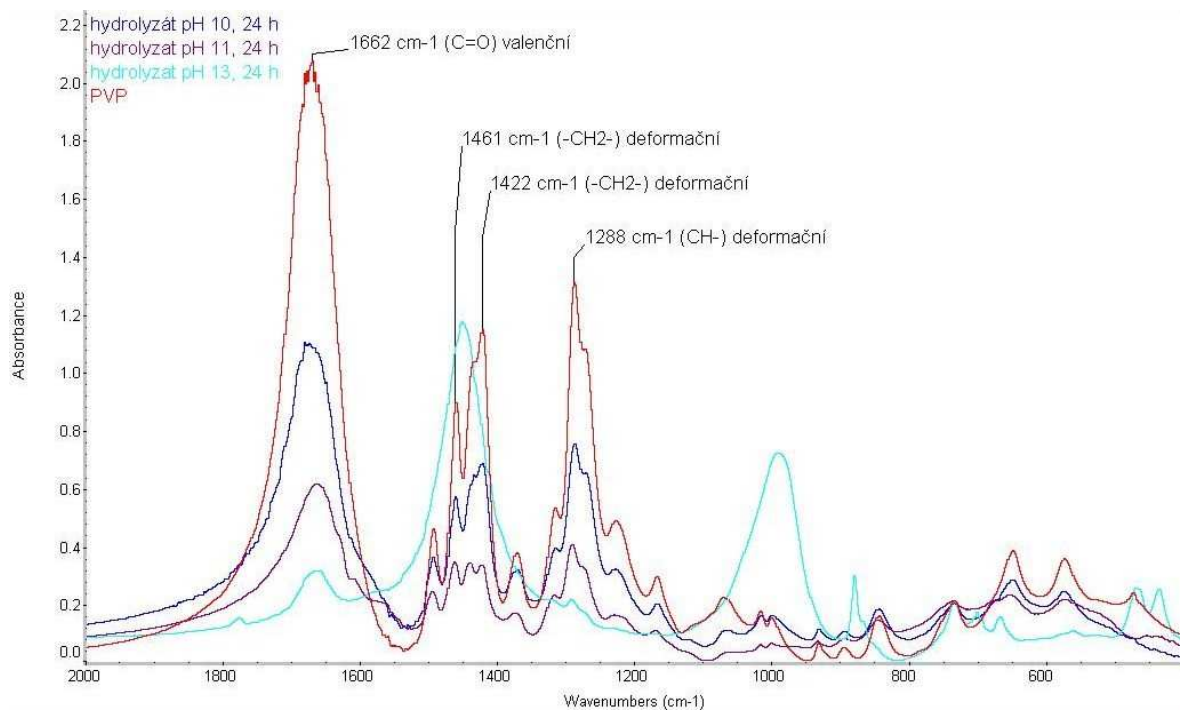
k poklesu intenzity pásu valenční vibrace –OH skupiny. Se zvyšující se hodnotou pH (10, 11 a 13) dochází k poklesu intenzity těchto pásů z čehož plyne, že se snižuje množství –CH₂ a –CH skupin. Shodný trend, pokles intenzity se zvyšující se hodnotou pH (10, 11 a 13), je pozorován i u pásu při vlnočtu 1662 cm⁻¹, který odpovídá valenční vibraci skupin C=O. To by odpovídalo otevření laktamového kruhu u některých polymerních jednotek. Pozorovaný trend poklesu intenzit (doba hydrolyzy 24 h) odpovídá následujícímu pořadí měřených vzorků: čistý PVP > hydrolyzát pH 10 > hydrolyzát pH 11 > hydrolyzát pH 13. Z těchto změn vyplývá, že studovanou reakcí dochází ke změnám výchozí látky. Spektrum hydrolyzátu pH 12 se vymyká ostatním; nabízí se otázka, zda při hydrolyze již mohlo dojít u tohoto k výraznějším strukturálním změnám. Pro potvrzení této domněnky by bylo vhodné použít dalších instrumentálních technik (např. NMR, MS). U hydrolyzátu pH 13 došlo ke splynutí několika drobných pásů při vlnočtu cca 1400-1500 cm⁻¹ v jeden intenzivní silný pás s maximem při vlnočtu 1452 cm⁻¹; dále se ve spektru objevily nové intenzivní pásy při vlnočtech 991 a 880 cm⁻¹ a 468 a 436 cm⁻¹ a zmizely pásy při vlnočtech 845, 650 a 573 cm⁻¹. Z těchto změn vyplývá, že hydrolyzou dochází ke značným změnám výchozí látky. Tak jako u hydrolyzátu pH 12 i zde by bylo vhodné využít dalších instrumentálních technik.³⁰



Obr. 18: IČ spektra hydrolyzátů – vliv pH



Obr. 19: IČ spektra hydrolyzátů – přiřazení známých pásů v oblasti funkčních skupin



Obr. 20: IČ spektra hydrolyzátů – přiřazení známých pásů v oblasti „fingerprint“

7.4 Biologický rozklad vzorků PVP upravených bazickou hydrolyzou

Biologická rozložitelnost uvedených vzorků byla testována v aerobním vodném prostředí na přístroji Micro-Oxymax.

Hodnoty pH a TOC na výstupu testu vlivu různého pH při bazické hydrolyze na bio-rozklad nejsou zpracovány, protože v současné době experiment pokračuje dále (tab. 11).

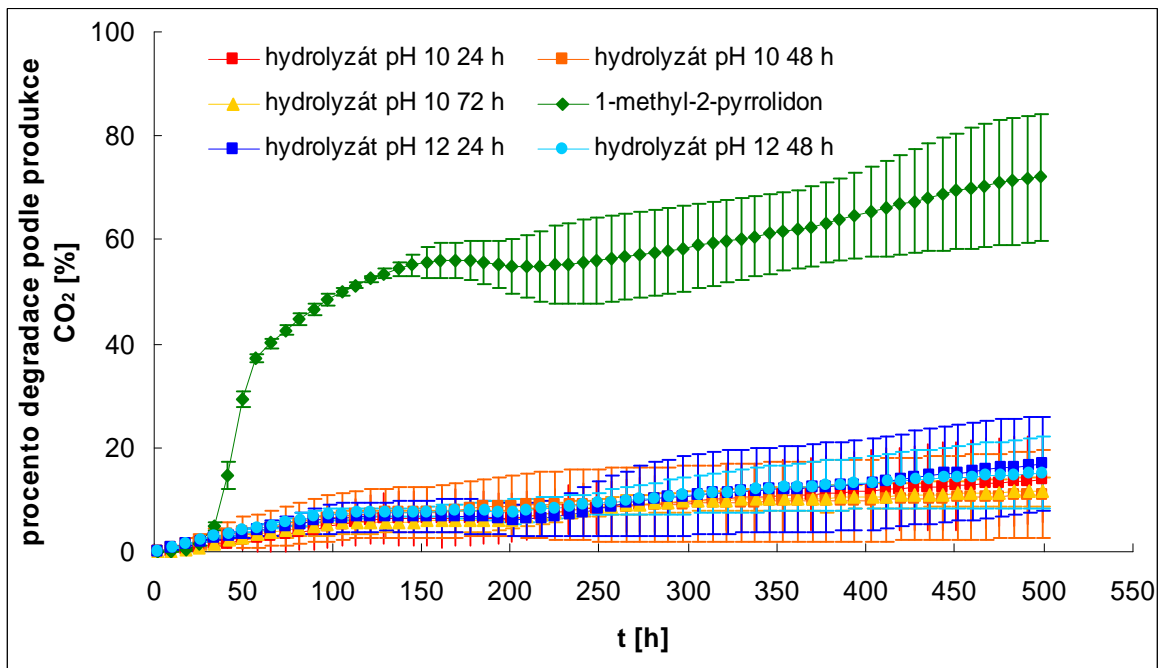
Tab. 10: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu (sledování vlivu doby)

Vzorek	TOC _{vstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{vstup}	TOC _{výstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{výstup}
slepý pokus	7,312	7,058	14,19	4,634
NMP	123,8	7,057	29,52	4,62
hydrolyzát pH 10, 24h	121,6	7,094	138,7	4,63
hydrolyzát pH 10, 48h	132,3	7,091	111,9	4,65
hydrolyzát pH 10, 72h	125,8	7,111	145,0	4,734
hydrolyzát pH 12, 24h	118,6	7,135	138,2	4,63
hydrolyzát pH 12, 48h	220,9	7,099	135,0	4,676

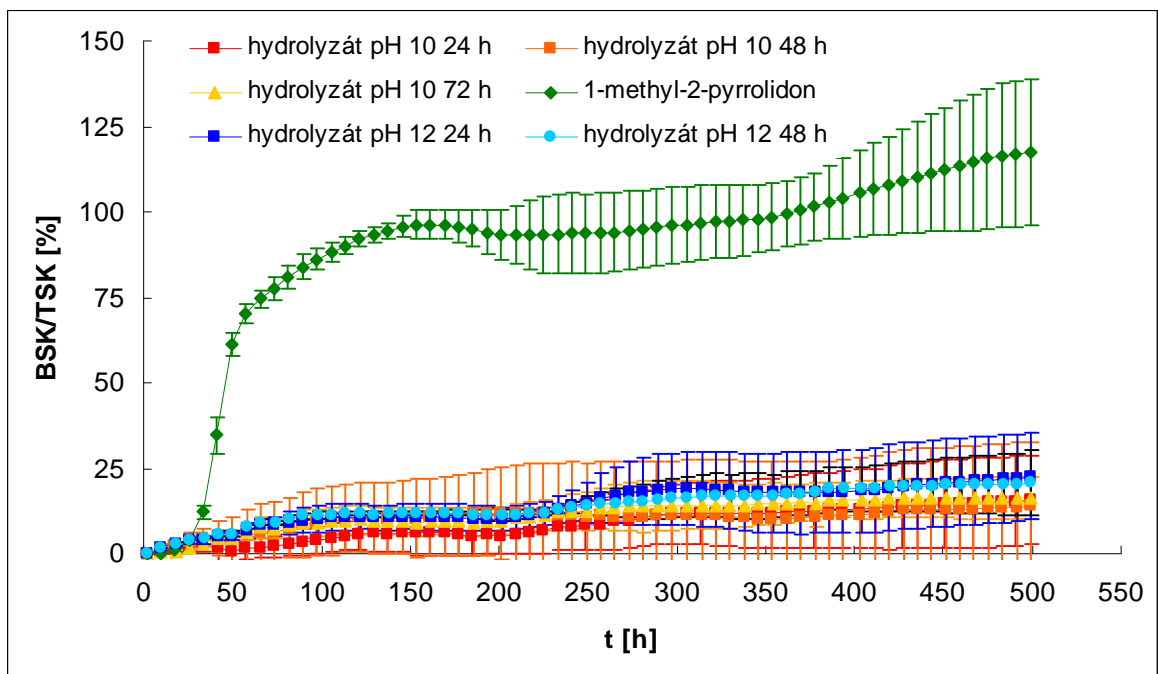
Tab. 11: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu (vliv pH)

Vzorek	TOC _{vstup} (mg. l ⁻¹)	pH _{vstup}
slepý pokus	9,987	7,541
NMP	59,45	7,590
hydrolyzát pH 10, 24h	112,8	7,590
hydrolyzát pH 11, 24h	129,5	7,588
hydrolyzát pH 12, 24h	126	7,571

První experiment spočíval ve sledování doby hydrolyzy na následnou biologickou rozložitelnost (AK Slovenská L'upča I). Na obr. 21 jsou znázorněna procenta degradace podle produkce CO₂. Z výsledků testu lze říci, že čas po který je vzorek hydrolyzován v našem případě nehraje významnou roli při jeho následném biorozkladu. Podle procent produkce CO₂ podléhal biodegradaci pozorovatelně vzorek hydrolyzovaný 24 hodin při pH 12. Hodnoty BSK/TSK (obr. 22) testovaných vzorků PVP tedy potvrzují, že čas po který jsou vzorky vystaveny bazické hydrolyze nehraje prakticky žádnou roli při biorozkladu v našem experimentu.

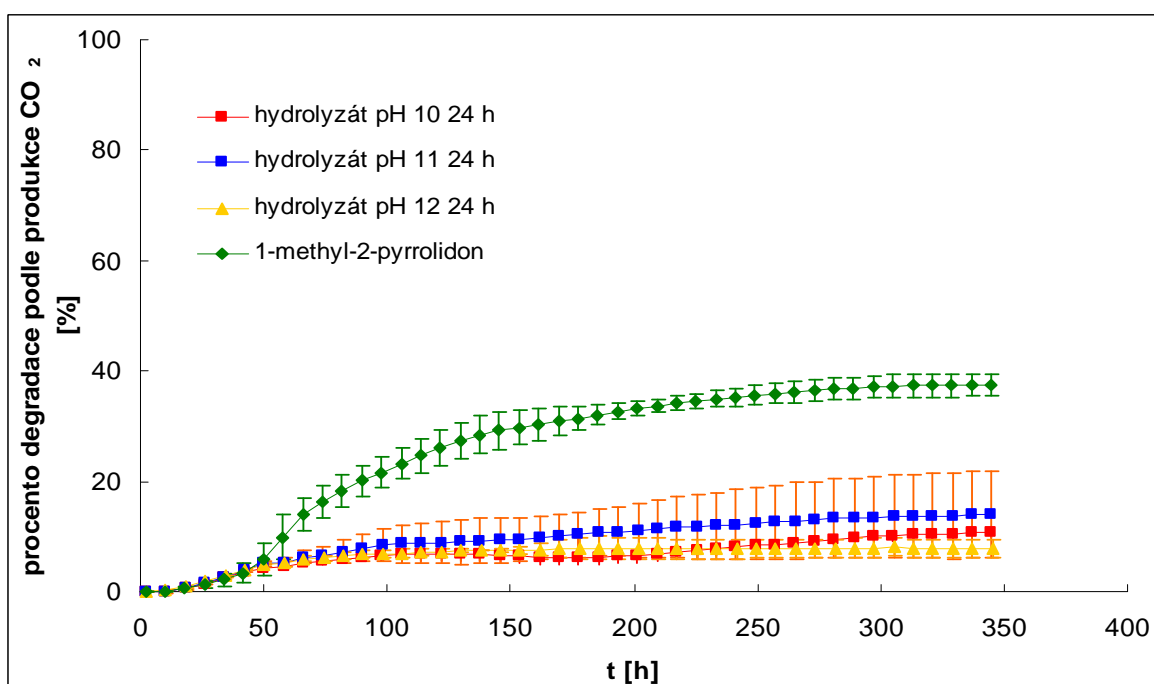


Obr. 21: Procenta degradace podle produkce CO₂ hydrolyzátů a vzorku 1-methyl-2-pyrrolidonu (sledování vlivu doby) – AK Slovenská L'upča I

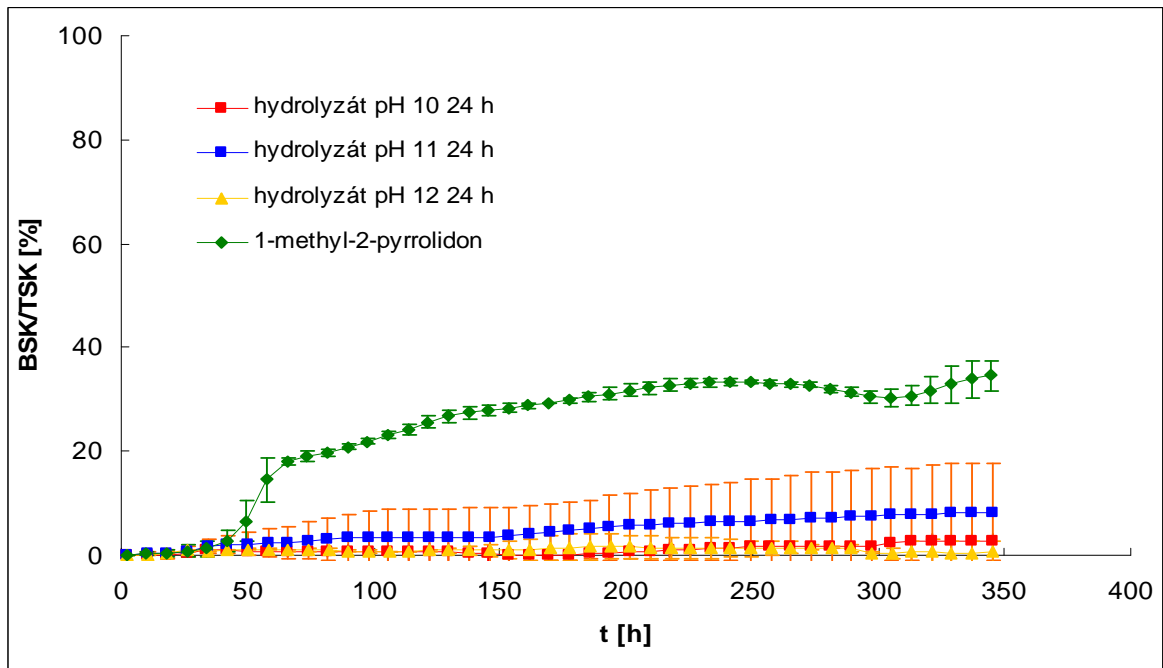


Obr. 22: Hodnoty BSK/TSK pro testované vzorky PVP upravené bazickou hydrolyzou a 1-methyl-2-pyrrolidon (sledování vlivu doby) – AK Slovenská L'upča I

Další experiment testoval vliv hodnoty pH během bazické hydrolyzy na biologickou rozložitelnost. Na obr. 23 jsou znázorněny procenta degradace podle produkce CO_2 . Podle výsledků tohoto testu s AK Slovenská L'upča II lze říci, že ani pH kterému je vzorek vystaven při hydrolyze v našem případě nehraje významnou roli. Hodnoty BSK/TSK (obr. 24) tyto závěry potvrzují. Podle procent produkce CO_2 a BSK/TSK podléhal nejvíce biodegradaci vzorek PVP hydrolyzovaný 24 hodin při pH 11. Podle IČ spekter (kap. 7.3) lze říci, že ke strukturálním změnám během hydrolyzy došlo. Měření biorozkladu (po odečtení slepého pokusu) viz obr.21 a 23 i korekce vlivu nitrifikace (obr.22 a 24) tuto skutečnost potvrdilo. Změny nejsou sice výrazné (cca 7-10 % dle hodnot BSK/TSK) ale ve srovnání s neupraveným polymerem naprosto průkazné. Roli zde samozřejmě hraje i krátká doba pokusu, který ale pokračuje.

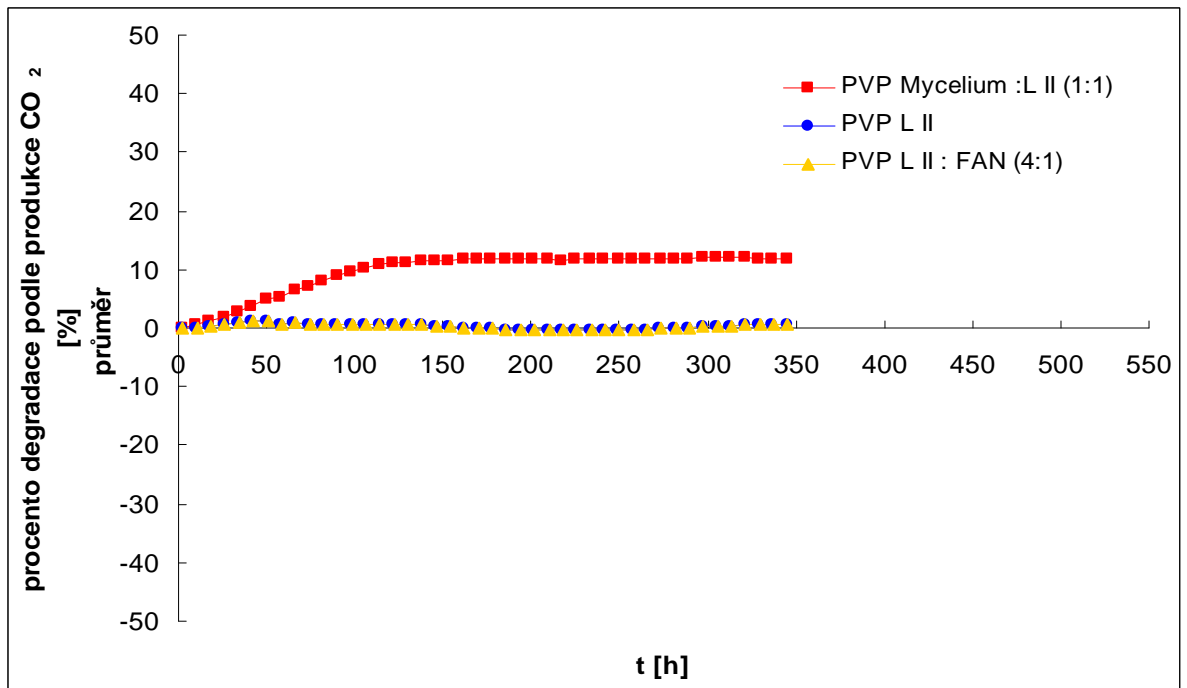


Obr. 23: Procenta degradace podle produkce CO_2 u hydrolyzátů a vzorku 1-methyl-2-pyrrolidonu (vliv pH) - AK Slovenská L'upča II



Obr. 24: Hodnoty BSK/TSK pro testované vzorky PVP upravené bazickou hydrolyzou a 1-methyl-2-pyrrolidon (vliv pH) – AK Slovenská L'upča II

Dále byly testovány typy aktivovaných kalů a mycelia v různých kombinacích (obr. 25). Podle procent produkce CO₂ nejvyšších hodnot v tomto experimentu dosahuje pokus, kde byl AK Slovenská L'upča II zaočkován myceliem. Byl proveden test dle Zahn-Wellens metody, kdy bylo použito samotné mycelium; jako kontrolní látka byl použit NMP. Podle stanovení TOC byl NMP téměř ze sta procent rozložen; ale hodnoty pro PVP po celou dobu měření kolísaly kolem počáteční hodnoty (110 mg. l⁻¹). Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že samotné mycelium PVP nerozkládá.



Obr. 25: Hodnoty BSK/TSK PVP s AK Slovenská L'upča II, myceliem a fakultativně anaerobním AK

ZÁVĚR

Polyvinylpyrrolidon (PVP) je díky svým vlastnostem hojně používán ve farmaceutickém a potravinářském průmyslu. Jeho „osud“ v životním prostředí nebyl zatím příliš zkoumán, ale z dostupných informací (čistírnami odpadních vod prochází beze změny s minimální sorpcí); je tedy možné, že dochází k jeho ukládání do environmentu, což může být v budoucnosti problémem. Vzhledem k jeho biologické rezistenci je nutno hledat jiné možné cesty jeho odstranění pomocí nákladné předúpravy polymeru, případně využít (teoreticky) vhodných enzymů (nákladné) či adaptovaných heterogenních technických kultur tyto enzymy obsahujících.

Při provedených experimentech byl používán komerční vzorek PVP K15, na němž byly testovány čtyři typy aktivovaných kalů pro potenciální biodegradaci ve vodném aerobním prostředí. Aerobní heterokultura z čistírny městských odpadních vod Zlín – Malenovice i čistíren společnosti Zentiva a. s. (výroba léčiv) Hlohovec a Slovenská L'upča. Posledně jmenovaná zpracovává odpadní vody pro společnost Biotika a.s. (výroba farmak vč. antibiotik) V tomto případě bylo zjištěno, že výraznou úlohu hraje doba odběru aktivovaného kalu; při „nárazové“ výrobě penicilinu (AK Slovenská L'upča II) vykazoval náznaky biologického rozkladu PVP.

Vedle klasických aktivovaných kalů bylo použito i odpadní mycelium z výroby penicilinu a „fakultativně“ aerobní kal. Výrazně kladných výsledků (proti ostatním testovaným) dosáhl vzorek, kde bylo inokulem mycelium v kombinaci s aktivovaným kalem reagujícím na probíhající výrobu penicilinu. Naměřená data potvrdila, že PVP je sice odolný vůči biologické degradaci, ale jistý posun je v tomto ohledu podle výsledků zřetelný. S jistou rezervou lze všeobecně konstatovat, že zdánlivá rezistence organických látek vůči biorozkladu nemusí být striktně platná.

Vzhledem k předchozím výsledkům bylo přistoupeno k adaptaci aerobních aktivovaných kalů na 1-methyl-N-pyrrolidon který má laktamový kruh a je tedy podobný monomeru PVP – nestálému a těkavému vinylpyrrolidonu. Aktivovaný kal z čistírny Slovenská L'upča (odebraný v době výroby penicilinu) byl podle očekávání adaptabilnější než kal odebraný v době odstávky výroby.

Vedle experimentů s adaptací aktivovaných kalů byla provedena předúprava PVP bazickou hydrolýzou. Byly provedeny testy sledující vliv hodnoty pH a doby hydrolýzy. Z

IČ spekter lze vidět změny u vzorků PVP upravených hydrolyzou v závislosti na pH (narušení laktamového kruhu dle úbytku signálu –CO skupin), v menší míře na době po kterou byl vzorek vystaven hydrolyze. U hydrolyzátů byla opět testována biologická rozložitelnost v aerobních podmínkách. Přes strukturální změny hydrolyzátů doložené IČ spektry byla rozložitelnost nepříliš výrazná (cca 7-10% dle hodnot BSK/TSK); tato okolnost může souviset s malou kvantitou těchto rozkladných produktů.

Z předložených výsledků je možno uzavřít, že popsaná cesta k možnému biologickému rozkladu PVP je reálná a bude předmětem dalších experimentů.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Kotyza, J., Saudek, P., Kafka, Z., Vaněk, T., Léčiva – „nový“ enviromentální polutant, *Chemické listy* 103, 540 -547, (2009)
- [2] Trimpin, S., a kol. Recalcitrance of poly(vinylpyrrolidone): evidence through matrix-assisted laser desorption – ionization time – of – light mass spektrometry, *Journal of chromatography A*, 938, 67 – 77, (2001)
- [3] <http://pslc.ws/macrogcss/nvp.html> - staženo 28.10. 2009
- [4] Robinson, B. V., Sullivan, F. M., Borzelleca, J. F., Schwarz, S. L., *A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinyl pyrrolidone*, Lewis Publisher, (1990), ISBN 0 – 87371 – 288 – 9
- [5] Mathias, S. P., Tavares, M. I. B., Solution NMR Evaluation of Polyvinylpyrrolidone and Collagen Interaction, *Ann. Magn. Reson.* 2, 441 – 448, (1996)
- [6] Bühler, V., *Polyvinylpyrrolidone Excipients for Pharmaceuticals Povidone, Crospovidone and Copovidone*, Springer Berlin Heidelberg New York (2005), ISBN 3 – 540 – 23412 - 8
- [7] Åkesson, B., *N-METHYL-2-PYRROLIDONE*, *Concise International Chemical Assessment Document 35 (CICAD)*, World Health Organization, Geneva, (2001), ISBN 92 4 153035 9
- [8] http://www.arb.ca.gov/db/solvents/solvent_pages/Nitrogen-HTML/N-methylpyrrolidone.htm - staženo 30.3. 2010
- [9] BASF Intermediates, *N-Methylpyrrolidone Biodegradability*, BASF Corporation, (1998)
- [10] Singh, B., Sharma, N., Mechanistic implications of plastic degradation, *Polymer Degradation and Stability* 93, 561 – 584, (2008)
- [11] Horikoshi, S., Hidaka, H., Serpone, N., Photokatalyzed degradation of polymers in aqueous semiconductor suspensions V. Photomineralization of lactam ring – pendant polyvinylpyrrolidone at titania/water interfaces, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 138, 69 – 77, (2001)

- [12] Loraine, G. A., Oxidation of polyvinylpyrrolidone and an ethoxylate surfactant in phase-inversion wastewater, *Water Environment Research* 80, 373 – 379, (2008)
- [13] Jablonski, E. A., Lang, J. A., Vyazovkin, S., Isoconversional kinetics of degradation of polyvinylpyrrolidone used as a matrix for ammonium nitrate stabilization, *Thermochemica Acta* 474, 78 – 80, (2008)
- [14] Frank, H. P., The Lactam-Amino Acid Equilibria for Ethylpyrrolidone and Polyvinylpyrrolidone, *Journal of Polymer Science* 12, 565 – 576, (1954)
- [15] Conix, A., Smets, G., Ring opening in lactam polymers, *Journal of Polymer Science* 15, 221 – 229, (1955)
- [16] Marušincová, H., *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2009)
- [17] Pitter, J., Chudoba, J., *Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment*, CRC Press, Boca Raton, 242 - 248, (1990)
- [18] Hong, Y., Chirila, T. V., Vijayasekaran, S., Shen, W. Y., Lou, X., Dalton, P. D., Biodegradation in vitro and retention in the rabbit crosslinked poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone) hydrogel as a vitreous substitute, *Journal of Biomedical Materials Research* 39, 650 – 659, (1998)
- [19] Brabban, A. D., Littlechild, J., Wisdom, R., Stereospecific γ lactamase activity in a *Pseudomonas fluorescens* species, *Journal of Industrial Microbiology* 16, 8-14, (1996)
- [20] Wang, J. J., Guo, X. Y., Zheng, G. J., Wen, C., Purification and characterization of novel (-) γ -lactamase from *Microbacterium hydrocarbonoxydans*, *Annals of Microbiology* 59, 345 – 348, (2009)
- [21] Hickey, A. M., Ngamsom, B., Wiles, C., Greenway, G. M., Watts, P., Littlechild, J., A microreactor for the study of biotransformations by a cross-linked γ -lactamase enzyme, *Biotechnol J.* 4, 510 – 516, (2009)
- [22] Toogood, S. H., Brown, C. R., Line, K., Keene A. P., Taylor, J. C. S., McCague, R., Littlechild J., The use of thermostable signature amidase in the resolution of the bicyclic synthon (rac)- γ -lactam, *Tetrahedron* 60, 711 – 716, (2004)

- [23] Line, K., Isupov, N. M., Littlechild J., The Crystal Structure of a (-) γ Lactamase from an Aureobacterium Species Reveals a Tetrahedral Intermediate in the Active Site, *Journal of Molecular Biology* 338, 519 – 532, (2004)
- [24] Šebela, M., *Nepublikované sdělení*
- [25] Dřímál, P., Hoffmann, J., Automatizovaný systém kontinuálního sledování aerobního biologického rozkladu látek ve vodním i půdním prostředí, *Chem. Listy* 102, 139–147, (2008)
- [26] <http://www.skalar.com/page/formacs-series-toc-tn-analyzers> - staženo 18.4. 2010
- [27] <http://www.hydrotox.de/english/zahnwellens.html> - staženo 3. 5. 2010
- [28] <http://uiozp.ft.utb.cz/uiozp> - staženo 5. 5. 2010
- [29] Klívar, S., *Diplomová práce*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, (2010)
- [30] Kesner, F., Vaněk, L., *Nepublikované sdělení*

Seznam použitých symbolů a zkratek

A	Absorbance	[-]
BSK	Biologická spotřeba kyslíku	[mg. l ⁻¹]
c	Koncentrace	[g. l ⁻¹ nebo mg. l ⁻¹]
c _{NO₃-}	Koncentrace dusičnanů dle potenciometrického stanovení	[mg. l ⁻¹]
c _{PVP}	Koncentrace PVP dle jodometrického stanovení	[g. l ⁻¹ nebo mg. l ⁻¹]
ČOV	Čistírna odpadních vod	
Da	Atomová hmotnostní konstanta	
DDT	dichlordifenyltrichlormethylenmethan	
EMS	Potenciál článku	[mV]
IC	Koncentrace anorganického uhlíku	[mg. l ⁻¹]
IČ	Infračervená spektroskopie	
k	Přepočtový koeficient	[-]
log _c NO ₃ -	Logaritmus koncentrace dusičnanů	[-]
m ₀	Hmotnost filtračního papíru	[g]
m _n	Hmotnost po vysušení kalu	[g]
N	Počet dílků v čase t	[-]
N ₀	Počet dílků na počátku času	[-]
NMP	N-methyl-2-pyrrolidon	
PVP	polyvinylpyrrolidon	
t	Čas	[h]
TC	Koncentrace celkového uhlíku	[mg. l ⁻¹]
TN	Koncentrace celkového dusíku	[mg. l ⁻¹]
TOC	Koncentrace celkového organického uhlíku	[mg. l ⁻¹]
TSK	Teoretická spotřeba kyslíku	[mg. l ⁻¹]

UV	Ultrafialové záření	
V_{pip}	Pipetovaný objem	[ml]
VIS	Viditelné záření	
WHO	Světová zdravotnická organizace	
X	Sušina	[g. l ⁻¹]

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1: Struktura PVP</i>	12
<i>Obr. 2: Vznik PVP</i>	12
<i>Obr. 3: Polymerace PVP³</i>	13
<i>Obr. 4: Chemická struktura NMP</i>	15
<i>Obr. 5: Struktura (+) a (-) γ laktamu²²</i>	22
<i>Obr. 6: Mechanismus ataku (-) γ laktamasy</i>	22
<i>Obr. 7: Předpokládaná cesta rozkladu PVP, vznik meziproductů (fragmentů) a konečných substrátů potenciálně schopných biorozkladu</i>	23
<i>Obr. 8: Kalibrační závislost absorbance na koncentraci PVP K15</i>	32
<i>Obr. 9: Kalibrační křivka závislosti potenciálu na logaritmu koncentrace NO_3^-</i>	34
<i>Obr. 10: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci 103,16 mg. l^{-1} AK Zlín-Malenovice o sušině 100 mg. l^{-1}</i>	37
<i>Obr. 11: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci 100,37 mg. l^{-1} AK Hlohovec o sušině 100 mg. l^{-1}</i>	38
<i>Obr. 12: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci 109,54 mg. l^{-1} AK I Slovenská L'upča o sušině 100 mg. l^{-1}</i>	38
<i>Obr. 13: Celková BSK vzorku PVP o koncentraci 100 mg. l^{-1} AK II Slovenská L'upča o sušině 100 mg. l^{-1}</i>	39
<i>Obr. 14: Průběh adaptace aktivovaných kalů na 1-methyl-2-pyrrolidon – substrátové BSK</i>	41
<i>Obr. 15: Hodnoty BSK/TSK pro 1-methyl-2-pyrrolidon</i>	41
<i>Obr. 16: Substrátová BSK pro PVP</i>	42
<i>Obr. 17: Hodnoty BSK/TSK pro PVP</i>	42
<i>Obr. 18: IČ spektra hydrolyzátů – vliv pH</i>	45
<i>Obr. 19: IČ spektra hydrolyzátů – přiřazení známých pásů v oblasti funkčních skupin</i>	46
<i>Obr. 20: IČ spektra hydrolyzátů – přiřazení známých pásů v oblasti „finger print“</i>	46
<i>Obr. 21: Procenta degradace podle produkce CO_2 hydrolyzátů a vzorku 1-methyl-2-pyrrolidonu (sledování vlivu doby) – AK Slovenská L'upča I</i>	48
<i>Obr. 22: Hodnoty BSK/TSK pro testované vzorky PVP upravené bazickou hydrolyzou a 1-methyl-2-pyrrolidon (sledování vlivu doby) – AK Slovenská L'upča I</i>	48

<i>Obr. 23: Procenta degradace podle produkce CO₂ u hydrolyzátů a vzorku 1-methyl-2-pyrrolidonu (vliv pH) - AK Slovenská L'upča II</i>	49
<i>Obr. 24: Hodnoty BSK/TSK pro testované vzorky PVP upravené bazickou hydrolyzou a 1-methyl-2-pyrrolidon (vliv pH) – AK Slovenská L'upča II</i>	50
<i>Obr. 25: Hodnoty BSK/TSK PVP s AK Slovenská L'upča II, myceliem a fakultativně anaerobním AK</i>	51

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1: Kalibrace roztoku PVP K15</i>	32
<i>Tab. 2: Koncentrace, logaritmus koncentrace NO_3^- a EMS kalibračních standardů</i>	34
<i>Tab. 3: ředění vzorků pro měření BSK na přístroji BIAL</i>	35
<i>Tab. 4: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu</i>	39
<i>Tab. 5: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu</i>	40
<i>Tab. 6: Hodnoty TOC a TN u vzorku PVP a hydrolyzátů</i>	43
<i>Tab. 7: Koncentrace PVP u hydrolyzátů stanovené pomocí jodometrické metody</i>	43
<i>Tab. 8: Koncentrace, logaritmus koncentrace NO_3^- a EMS hydrolyzátů</i>	44
<i>Tab. 9: Koncentrace, logaritmus koncentrace NO_3^- a EMS hydrolyzátů podrobených biorozkladu</i>	44
<i>Tab. 10: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu a výstupu (sledování vlivu doby)</i>	47
<i>Tab. 11: Hodnoty pH a TOC vzorků na vstupu (vliv pH)</i>	47

EVIDENČNÍ LIST DIPLOMOVÉ PRÁCE

Sigla (místo uložení diplomové práce)	Ústřední knihovna UTB ve Zlíně
Název diplomové práce	Předúprava polyvinylpyrrolidonu před biologickým rozkladem Pre-treatment of polyvinylpyrrolidone before biodegradation
Autor diplomové práce	Bc. Lenka Červenáková
Vedoucí diplomové práce	Prof. Ing. Jan Kupec, CSc.
Vysoká škola	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Adresa vysoké školy	Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, nám. T. G. Masaryka 5555, 760 01 Zlín
Fakulta	Fakulta technologická, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín
Katedra	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí
Rok obhájení DP	2010
Počet stran	61
Počet svazků	3
Vybavení (obrázky, tabulky...)	25 obrázků, 11 tabulek
Klíčová slova	polyvinylpyrrolidon, degradace, předúprava, biodegradace, enzymy polyvinylpyrrolidone, degradation, pre-treatment, biodegradation, enzymes