

## LABORATORNÍ PŘÍSTROJE A POSTUPY

### AUTOMATIZOVANÝ SYSTÉM KONTINUÁLNÍHO SLEDOVÁNÍ AEROBNÍHO BIOLOGICKÉHO ROZKLADU LÁTEK VE VODNÍM I PŮDNÍM PROSTŘEDÍ

PAVEL DŘÍMAL a JAROMÍR HOFFMANN

*Ústav inženýrství ochrany životního prostředí, Fakulta technologická, Univerzita Tomáše Bati, nám. T. G. Masaryka 275, 762 72 Zlín  
drimal@ft.utb.cz*

Došlo 27.2.07, přepracováno 3.8.07, přijato 10.9.07.

**Klíčová slova:** Micro-Oxymax, IČ spektroskopie, paramagnetická rezonance, biologický rozklad

#### Úvod

Průběh aerobního biologického rozkladu látek je zřejmě nejčastěji sledován na základě změn složení plyné fáze (obsah  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$ ), probíhající v důsledku mikrobiálních pochodů v uzavřeném testovacím systému. Standardní postupy stanovení těchto základních ukazatelů biorozkladu jsou v závislosti na typu prostředí předepsány českými i mezinárodními normami (ČSN ISO, ISO, ASTM aj.). Standardní postup stanovení produkovaného  $\text{CO}_2$  dle normy<sup>1,2</sup> spočívá v kontinuálním stripování testovacího systému vzduchem zbařeným vzdušného  $\text{CO}_2$ , při kterém je produkovaný  $\text{CO}_2$  unášen v proudu nosného vzduchu, je pohlcen v roztoku NaOH a následně acidimetricky stanoven (vodní, půdní i kompostovací testy, např. v práci<sup>3,4</sup>). Standardní postup stanovení  $\text{O}_2$  dle norem<sup>2,5</sup> spočívá ve sledování změn tlaku plyné fáze v průběhu testu ve vhodném typu respirometru; postup použitý např. v práci<sup>3,6</sup>. Vzhledem ke značné pracnosti a omezené testovací kapacitě standardních postupů je snaha využívat alternativních instrumentálních metod stanovení aktuálního obsahu  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  s možností jejich automatizace. Mezi automatické metody sledování průběhu biorozkladu patří zejména přímá analýza plynu v headspace plynovou chromatografií (GC) nebo infračervenou spektroskopií (IČ), použitelné pro vodní<sup>7,8</sup> i půdní testy<sup>9,10</sup>. Výhodou plynové chromatografické analýzy je možnost souběžného stanovení obsahu  $\text{O}_2$  vedle stanovení  $\text{CO}_2$ . U obou metod je nutno výsledky celkové bilance  $\text{CO}_2$  korigovat o vliv acidobazické rovnováhy  $\text{CO}_2$  v systému plyn-kapalina.

Automatizované sledování průběhu biorozkladu bylo také prováděno konduktometrickým stanovením produkovaného  $\text{CO}_2$  v kombinaci s paralelním měřením biologické spotřeby  $\text{O}_2$  v uzavřeném respirometru využitelné pro obě prostředí (vodní, půdní)<sup>11,12</sup>.

Cílem je používání takové testovací metody, která je plně automatizovaná a umožňuje kontinuální záznam sledovaných parametrů během testu bez větších zásahů obsluhy. Experimentální podmínky testů musí být navrženy tak, aby bylo zajištěno aerobní prostředí během celé doby experimentu.

V laboratorních podmínkách může být průběh rozkladu ve vodním i půdním prostředí sledován také na automatickém analyzátoru Micro-Oxymax s IČ analýzou  $\text{CO}_2$  a analýzou  $\text{O}_2$  elektrochemickým či paramagnetickým analyzátozem<sup>13,14</sup>. V odborné literatuře bylo nalezeno několik prací využívající daný respirometr, které se převážně týkaly hodnocení biorozložitelnosti testovaných vzorků a detailněji nepopisovaly jeho princip a experimentální podmínky testů. Další častou aplikací respirometru je u testů popisujících aktivitu sledovaných mikrobiálních kultur<sup>15</sup>.

Respirometr Micro-Oxymax představuje relativně unikátní zařízení, nepříliš známé i v odborné veřejnosti. Cílem práce tedy bylo: 1) orientační popis činnosti respirometru Micro-Oxymax včetně možností obsluhujícího softwaru přístroje a 2) popis využití analyzátoru při testech biologické rozložitelnosti makromolekulárních látek ve vodním i půdním prostředí, experimentálních výstupů a jejich zpracování.

Respirometr Micro-Oxymax představuje relativně unikátní zařízení, nepříliš známé i v odborné veřejnosti. Cílem práce tedy bylo: 1) orientační popis činnosti respirometru Micro-Oxymax včetně možností obsluhujícího softwaru přístroje a 2) popis využití analyzátoru při testech biologické rozložitelnosti makromolekulárních látek ve vodním i půdním prostředí, experimentálních výstupů a jejich zpracování.

#### Respirometr Micro-Oxymax

Analyzátor Micro-Oxymax je uzavřený, plně automatizovaný systém kontinuálního měření koncentrace  $\text{O}_2$ ,  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$  v plyné fázi uzavřených testovacích baněk („closed-circuit“). Je použitelný pro sledování biologického rozkladu látek jak za aerobních (detektory  $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$ ), tak i anaerobních podmínek (detektory  $\text{CO}_2$  a  $\text{CH}_4$ ). Detektory  $\text{CH}_4$  a  $\text{CO}_2$  pracují na principu infračervené spektroskopie (jednopaprskové), detektor  $\text{O}_2$  na principu paramagnetické rezonance. Jsou použitelné i další detektory:  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{S}$  a  $\text{SO}_2$ .

Respirometr pracuje v uzavřené smyčce, tzn., že vzduch z testovacích lahví je čerpán do detektorů a odtud vrácen zpět do testovacích lahví. Přítomný  $\text{O}_2$  a  $\text{CO}_2$  v plyné fázi je periodicky měřen a koncentrační změny jsou přepočítávány jako spotřeba  $\text{O}_2$  a produkce  $\text{CO}_2$ . Hodnoty jsou ihned přepočítávány na standardní podmínky. Výsledky mohou být rovněž vyjadřovány v mg nebo  $\mu\text{g}$  za zvolenou časovou jednotku. Tento postup zahrnuje i případnou periodickou recalibraci detektorů měřením referentního plynu (čistý vzduch nebo jiná plyná směs známého složení). Nastavení a udržování provozních podmínek je zajištěno externím počítačem, který současně slouží pro ukládání, zpracování a prezentaci experimentálních dat. Použitý software firmy Columbus Instruments,

USA umožňuje širokou variabilitu konfigurace, kalibraci detektorů, měření objemů a těsností testovacích pozic (chambers), měření těsností systému apod.

Uspořádání přístroje je velmi variabilní co do typu připojených detektorů, tak do počtu testovacích pozic. Simultánně mohou pracovat pouze tři detektory (z nabídky O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, CO, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>); jejich volba je samozřejmě dána typem testu. Připojované testovací baňky mohou být různého objemu v rozmezí 20 ml až desítek litrů, které jsou obvykle temperovány při teplotě dané typem prostředí. Ve víku každé baňky jsou umístěny 3 rychloupínací spojky, pomocí kterých je zajištěno plynotěsné připojení k přepínací ventilové jednotce (obr. 1, pozice 8) respirometru polyamidovými hadičkami. Kapacita jedné ventilové řídicí jednotky je 10 testovacích pozic, systém je schopen řídit až 80 testovacích míst (tj. celkem 8 ventilových jednotek). V našem případě byl přístroj vybaven 30 pozicemi. Všechna zařízení jsou propojena (elektricky i pneumaticky) s řídicí „čerpací“ jednotkou (obr. 1, pozice 7) a počítačem. Schéma přístroje je uvedeno na obr. 1; výrazně je vyznačen proud plynu během analýzy testovací pozice. Na obr. 2 je uvedeno ilustrační foto stavebnicového uspořádání respirometru.

Pracovní rozsahy připojených detektorů: analyzátor O<sub>2</sub> 19,3–21,5 obj.%, analyzátor CO<sub>2</sub> 0–0,9 obj.%, analyzátor CH<sub>4</sub> 0–5 obj.% (pouze anaerobní testy).

#### Nastavení a kalibrace respirometru

Spuštění nového testu předchází několik kroků. V první fázi je nutná kalibrace připojených detektorů. Jsou

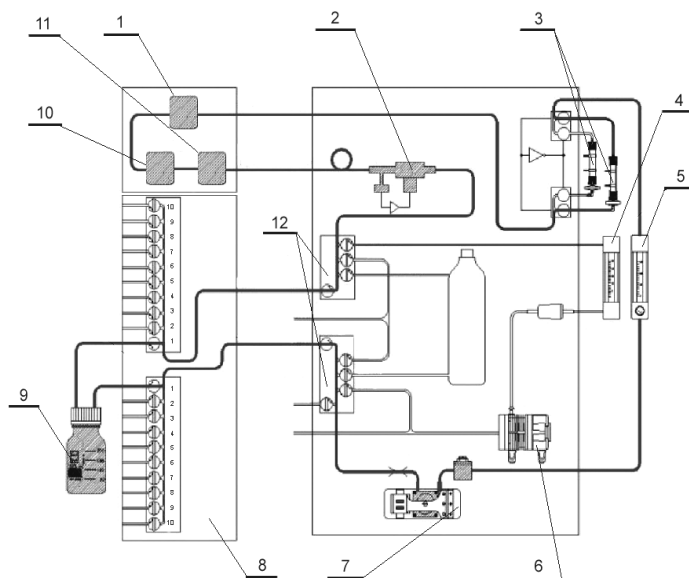
dva možné způsoby kalibrace:

- „*Injection method*“ – provádí se přímým nástřikem plynu známého složení do testovací cely známého objemu, připojené k řídicí čerpací jednotce. Tato metoda se používá pouze v případech, kdy není možné použít druhý způsob kalibrace (např. není dostupný požadovaný směsný plyn v tlakové láhvi s atestem).
- „*Bottle method*“ – ke kalibraci detektorů jsou používány plyny o potřebném složení (čisté či směsné plyny s atestem v tlakových lahvích) v závislosti na typu a rozsahu připojených detektorů. Tlakové láhve jsou připojeny k řídicí čerpací jednotce systému. Kalibrace se provádí postupně v několika krocích (viz níže).

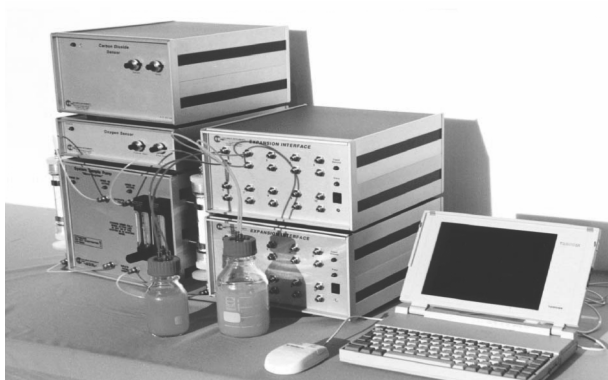
V našem případě byly použity následující kalibrační plyny: vzduch, čistý N<sub>2</sub>, směs N<sub>2</sub> (80 obj.%) + O<sub>2</sub> (20 obj.%), směs CO<sub>2</sub> (0,818 obj.%), CH<sub>4</sub> (4,05 obj.%) a N<sub>2</sub> (95,132 obj.%); dodavatel plynů firma Linde Technoplyn, směsi s atestem.

Dále je prováděna diagnostika přístroje kontrolující funkčnost jednotlivých částí respirometru. V programu je k dispozici několik typů diagnostických testů:

- „*Basic diagnostic test*“ – při kterém jsou testovány základní čidla přístroje (kontrola teplot, tlaků, průtoků a těsností).
- „*Valves and Sensors*“ – jsou ověřovány připojené detektory, čerpací jednotka a sušičky analyzovaného plynu (obr. 1, pozice 3) – těsnosti, objemy.
- „*Expansion Unit*“ – je prověřována ventilová jednotka a připojení testovacích baněk (těsnosti, objemy).



Obr. 1. Schéma automatického analyzátoru Micro-Oxymax měření koncentrace CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>; 1 – paramagnetický analyzátor O<sub>2</sub>, 2 – tlakový regulátor, 3 – sušič analyzovaného plynu, 4 – průtokoměr pro „REFRESH“, 5 – průtokoměr analyzovaného plynu, 6 – čerpadlo „REFRESH“, 7 – čerpací (řídicí) jednotka, 8 – ventilová jednotka s 10 měřícími pozicemi, 9 – jedna testovací pozice, 10 – IČ analyzátor CO<sub>2</sub>, 11 – IČ analyzátor CH<sub>4</sub>, 12 – ventilová skříň



Obr. 2. Ilustrační foto stavebnicového uspořádání respirometru Micro-Oxymax; sestava zahrnuje (vlevo shora) detektor  $O_2$ , detektor  $CO_2$ , čerpací řídicí jednotka (vpravo) dvě ventilové řídicí jednotky připojení 20 měřících pozic

Závěrečným krokem je softwarové nastavení experimentálních podmínek testů. Je nastavován počet aktivních připojených pozic (*Channels*), frekvence analýz plynné fáze a doba trvání experimentu (*Timing*), frekvence a doba trvání případného proplachu baněk „čerstvým“ vzduchem (*Refresh*), způsob vyjádření naměřených dat (*Data Units*) apod. Podmínky experimentu musí být nastaveny s ohledem na měřicí rozsahy detektorů.

Spuštění testů a jejich sledování probíhá postupně v několika následných krocích:

- 1) proplach všech testovacích baněk včetně detektorů a spojovacích cest vzduchem zbaveným vzdušného  $CO_2$  a vlhkosti (*Refresh Air*),
- 2) změření objemů všech testovacích baněk (*Auto Volume Measurement*),
- 3) analýza složení plynné fáze postupně pro všechny pozice,
- 4) při překročení nastavené mezní koncentrace  $CO_2$  (*Refresh Threshold*) v plynné fázi následuje proplach baňky „čerstvým“ vzduchem (*Refresh Air*) a opět analýza plynné fáze,
- 5) proplach detektorů a spojovacích cest vzduchem, tímto vzduchem je částečně ředěn plyn v následující měřicí baňce; na ředění je softwarově prováděna korekce,
- 6) kroky ad 3) až ad 5) se opakují při vlastním testování,
- 7) naměřená data jsou průběžně odesílána do počítače, přepočtena na standardní podmínky ( $0\text{ }^\circ\text{C}$ , tlak  $101\,325\text{ Pa}$ ) a vyjadřována jako rychlost produkce/spotřeby sledovaného plynu ( $CO_2$ ,  $O_2$ ), kumulativní produkce/spotřeba, objemová koncentrace (%) sledovaných plynů v plynné fázi každé testovací baňky.

### Testy biologické rozložitelnosti

Biologická rozložitelnost testovaných látek byla posuzována na základě skutečné produkce  $CO_2$  resp. skutečné spotřeby  $O_2$  v plynné fázi uzavřených testovacích baněk připojených k respirometru (v „headspace“). Biodegradace probíhala ve vodním nebo v půdním prostředí, ve kterém

byl testovaný vzorek jediným „externím“ zdrojem uhlíku a energie. Testy probíhaly v temnu při  $25\text{ }^\circ\text{C}$  v souladu s normami<sup>1,2,5</sup>. Podmínky testů na respirometru Micro-Oxymax byly převzaty z dřívějších prací<sup>16,17</sup>.

### Biologický materiál

Zdrojem mikroorganismů bylo půdní mikrobiální konsorcium ve formě vodného výluhu půdních mikroorganismů (testy ve vodním prostředí) nebo přímo v půdě (půdní testy). V obou případech byla použita směs dvou komerčních půdních substrátů a jedné přírodní půdy v poměru zahradní substrát : hrobový substrát : přírodní půda = 2 : 1 : 1. Před použitím byla půdní směs zbavena zbytků rostlin a jiných organických či inertních hrubých materiálů, poté přesita. Do testů byla použita frakce částic do velikosti 5 mm.

U směsi půd byl stanoven obsah celkového organického uhlíku  $TC = 32,9\%$ , celkový obsah dusíku (stanoveného podle Kjeldahla)  $N_{\text{TNK}} = 0,50\%$  a celkový obsah fosforečnanů na  $P = 0,2\%$ . Hodnota pH vodného výluhu bylo cca 6,6.

### Příprava půdního výluhu

20 g půdy s vlhkostí cca 50 % bylo smícháno se 100 ml roztoku minerálního média, 2 hodiny třepáno na třepače a zfiltrováno přes předem promytý filtrační papír. Před použitím v testu bylo inokulum min. 24 hodin pro-  
vzdušňováno. Dávkování inokula do testů odpovídalo výsledné koncentraci  $10^6$  buněk / 1ml reakční suspenze<sup>18,19</sup> (počítáno na celkové množství buněk z mikrobiologického rozboru).

### Testy ve vodním prostředí

Biologický rozklad probíhal v kapalném kultivačním prostředí tvořeném směsí testovaného vzorku a mikrobiálního inokula v roztoku minerálního média. K inokulaci byl použit vodný výluh půdních mikroorganismů. Počáteční koncentrace testovaných vzorků byla  $\rho = 300\text{ mg l}^{-1}$ . Objem kapalně fáze v testovacích baňkách<sup>16</sup> činil  $V_1 = 100\text{ ml}$ , objem plynné fáze  $V_g = 1040\text{ ml}$  (tj. poměr  $V_1 / V_g \approx 0,10$ ).

Na začátku a konci testu bylo vždy měřeno pH kapalně fáze. Počáteční pH bylo nastaveno na  $\text{pH} \approx 7,1$  a udržováno přidávkem fosforečnanového tlumivého roztoku (součástí minerálního média). U všech experimentů bylo také sledováno chování samotného mikrobiálního inokula (slepý pokus). Testy probíhaly v temnu při teplotě  $25\text{ }^\circ\text{C}$  a kontinuálním míchání kapalně fáze. Analýza složení plynné fáze byla prováděna v desetihodinových intervalech.

### Testy v půdním prostředí

Požadované množství půdy (o sušině přibližně 50 %) bylo nadávkováno do testovací lahve. Do této navážky byl postupně v malých dávkách přimíchán testovaný vzorek v pevné formě (prášku). Současně se vzorkem byla půda obohacena o dusík v podobě  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a fosfor v podobě  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  tak, aby byl zhruba respektován poměr C : N : P = 100 : 10 : 1. Směs byla homogenizována protřepáním

a případně upravena sušina. Testovací láhve byly plynotěsně uzavřeny a připojeny k respirometru. Testy probíhaly v temnu při 25 °C.

Vedle vlastního testu se vzorkem bylo sledováno chování samotného půdního materiálu (slepý pokus). Na začátku a konci testu bylo stanoveno pH (v půdním výluhu) a sušina půdy. Počáteční sušina byla cca 50 %, počáteční pH bylo přibližně 6,5.

Experimentální uspořádání bylo zvoleno dle práce<sup>17</sup>: testovací lahve o celkovém objemu 1140 ml, 120 g půdy o vlhkosti cca 50 % (60 g sušiny) a přibližně 180 mg vzorku v práškové formě (přesně váženo). Množství CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> v plynné fázi testovacích lahví bylo sledováno v šestihodinových měřicích intervalech, poté automaticky proveden proplach („refresh“) testovacích baněk (aby nebyl překročen měřicí rozsah detektoru CO<sub>2</sub> – max. 0,9 obj.%).

#### Testované vzorky

Přehled testovaných vzorků včetně jejich základní charakteristiky je uveden v tab. I. Byly vybrány modelové vzorky s rozdílným průběhem biorozkladu (dobře i špatně rozložitelné), na kterých byla demonstrována citlivost stanovení CO<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> na respirometru Micro-Oxymax. Hlavní složkou směsí označených D 97/235 a D 97/236 (tab. I) byl polyvinyl alkohol PVA (Sloviol nebo Poval) s dalšími přísadami (glycerol, hydrolyzát kolagenu Hykol E, různé typy škrobů).

Vzorky byly připraveny ve spolupráci se Slovenskou technickou univerzitou v Bratislavě, způsob přípravy je blíže popsán v práci<sup>20</sup>.

#### Zpracování výsledků

U testů ve vodním prostředí bylo naměřené množství vyprodukovaného CO<sub>2</sub> korigováno s ohledem na podmín-

ky acidobazické rovnováhy CO<sub>2</sub> podle rovnice (1) (cit.<sup>16</sup>). Bilanční rovnice (1) umožňuje výpočet celkového množství CO<sub>2</sub> s ohledem na acidobazickou a fázovou rovnováhu v systému plyn-kapalina:

$$n_{\text{CO}_2\text{g+1}} = \left( V_g + V_l \cdot K_{\text{lg}} \cdot (1 + 10^{-\text{pK}_1} \cdot 10^{\text{pH}}) \right) \cdot c_{\text{CO}_2\text{g}} \quad (1)$$

kde  $n_{\text{CO}_2\text{(g+l)}}$  je látkové množství vyprodukovaného CO<sub>2</sub> v kapalně i plynné fázi,  $V_g$  a  $V_l$  objem plynné a kapalně fáze systému,  $K_{\text{lg}}$  limitní formální rozdělovací koeficient CO<sub>2</sub> platný při pH < 4,  $\text{pK}_1$  disociační konstanta H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> do prvního stupně v závislosti na aktuální iontové síle kapalně fáze, pH aktuální pH kapalně fáze v okamžiku GC analýzy a  $c_{\text{CO}_2\text{g}}$  koncentrace CO<sub>2</sub> v plynné fázi uzavřeného systému zjištěná GC analýzou.

Nalezené množství CO<sub>2</sub> resp. O<sub>2</sub> bylo přepočteno vzhledem k vzniklému/spotřebovanému teoretickému množství CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> za předpokladu úplné oxidace testovaného vzorku a vyjádřeno parametry  $D_{\text{CO}_2}$  nebo  $D_{\text{O}_2}$ . Časová závislost byla regresně zpracována podle rovnice (2) v zásadě dobře popisující průběh biologického rozkladu:

$$D_{\text{CO}_2} = D_{\text{CO}_2\text{max}} \times \left( 1 - e^{-k \cdot (t - t_{\text{lag}})} \right) \quad (2)$$

kde  $D_{\text{CO}_2\text{max}}$  je regresní koeficient vyjadřující limitní hodnotu v čase nekonečno,  $k$  hodnota rychlostní konstanty a  $t_{\text{lag}}$  posun na časové ose vyjadřující lagovou fázi. Zpracované křivky jsou průměrem z 5 paralelních stanovení s odpovídajícím 95% intervalem spolehlivosti.

#### Výsledky a diskuse

Práce navázala na předchozí výzkum provedený na pracovišti, který se týkal ověření různých alternativ testo-

Tabulka I

Přehled vzorků testovaných na respirometru Micro-Oxymax ve vodním a půdním prostředí

Vzorek	Charakteristika	TC <sup>b</sup> [mg g <sup>-1</sup> ]	CHSK <sub>Cr</sub> [mg g <sup>-1</sup> ]
Sloviol 88-08	viskozita 4% vodného roztoku při 20 °C 8 mPa s, obsah acetátových skupin 12 %, stupeň hydrolyzy 88 mol.%, prášková forma, výrobce Novácké chemické závody a.s., SR	474,8	1 479
Škrob GS/14/30	složení: škrob Meritena <sup>a</sup> : glycerol = 2 : 1, vývojový produkt katedry plastů a kaučuku STU v Bratislavě, SR	368,4	937
D 97/235	složení: Poval 205 69,8 %, škrob GS/14/30 15,1 %, glycerol 10,1 %, lignin 5,0 %	464,4	1 526
D 97/236	složení: Poval 205 69,8 %, škrob Meritena <sup>a</sup> 10,1 %, glycerol 15,1 %, Hykol E 5,0 %	443,5	1 513

<sup>a</sup> Škrob Meritena = přírodní neupravený kukuřičný škrob, Amylum a.s., SR, <sup>b</sup> obsah IC prakticky zanedbatelný

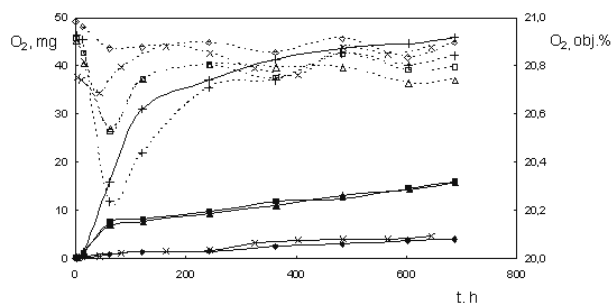
vání biologické rozložitelnosti plastů ve vodním a půdním prostředí. Doposud publikované práce<sup>16,17</sup> se zabývaly především návrhem vhodných experimentálních podmínek testů biologické rozložitelnosti (pro GC a IČ analýzu produkovaného CO<sub>2</sub>) a relací naměřených výsledků s výsledky standardních postupů<sup>1,2,5</sup> testování biorozkladu ve vodách či půdách.

#### Experimentální „výstupy“ při testech biologické rozložitelnosti z respirometru Micro-Oxy max

##### Spotřeba O<sub>2</sub>

Stanovené koncentrace O<sub>2</sub> v plynné fázi pro jednotlivé vzorky včetně příslušného slepého pokusu jsou uvedeny na obr. 3 (pro testy ve vodním prostředí) resp. obr. 4 (pro půdní testy). Současně je na obrázcích vyjádřena kumulativní spotřeba kyslíku pro dané měřicí pozice (spotřeba O<sub>2</sub> vyjádřena v absolutní hodnotě). Jak je patrné z obr. 3, změna koncentrace O<sub>2</sub> v plynné fázi testovacích lahví u vodních testů byla velmi malá. Obsah O<sub>2</sub> se během testu pohyboval v rozmezí 20,95–20,20 obj.%. Malé koncentrační změny O<sub>2</sub> během testu byly očekávané, neboť souvisely se zvolenými experimentálními podmínkami testů (poměrem objemů plynné a kapalné fáze a výchozí koncentrací substrátu) volenými s ohledem na uplatnění acidobazické rovnováhy CO<sub>2</sub> dle rovnice (1). Podmínky testů biologického rozkladu vyplývající z modelu acidobazické rovnováhy kladou vysoké požadavky na přesnost a citlivost stanovení analyzovaných složek (CO<sub>2</sub> i O<sub>2</sub>)<sup>16</sup>. Z důvodu malých koncentračních změn O<sub>2</sub> tak nebyl prováděn „refresh“ baněk v průběhu testu.

Citlivost detektoru O<sub>2</sub> může být popsána naměřenými hodnotami spotřeby O<sub>2</sub> pro slepý pokus, u kterého aktivita mikrobiálního inokula bez přítomného uhlíkatého substrátu znamenala minimální spotřebu O<sub>2</sub>. Kumulativní spotřeba O<sub>2</sub> (obr. 3) byla na konci testu (tj. cca 700 hodin) zaznamenána na úrovni cca 4 mg O<sub>2</sub>, což představovalo pokles koncentrace z původních 20,95 obj.% O<sub>2</sub> na hodnotu



Obr. 3. Koncentrace O<sub>2</sub> (čárkovaně, prázdné značky) a kumulativní spotřeba O<sub>2</sub> (plné křivky, plné značky) testovaných vzorků ve vodním prostředí; + GS/14/30, ■ D97/235, ▲ D97/236, ◆ slepý pokus, × PVA

cca 20,80 obj.%. Velmi malé koncentrační změny byly také zaznamenány v případě vzorku PVA, který byl půdními mikroorganismy za podmínek testu obtížně rozložitelný. Pro tento vzorek byla celková kumulativní spotřeba O<sub>2</sub> na úrovni cca 4,5 mg.

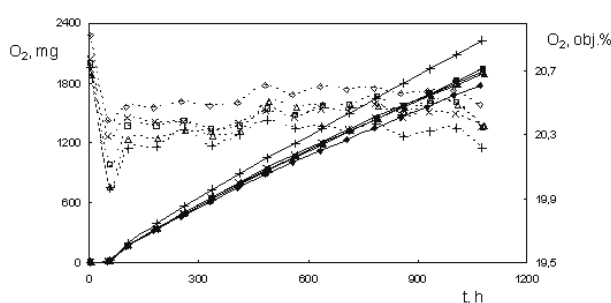
Výsledky svědčily o vysoké citlivosti paramagnetického detektoru i při malých koncentračních změnách O<sub>2</sub> v plynné fázi. Dle údajů výrobce umožňuje paramagnetický detektor zaznamenávat změny koncentrace O<sub>2</sub> v maximálním rozpětí 0–21 obj.% O<sub>2</sub>. Aktuální měřicí rozsah detektoru je libovolně nastavitelný v maximálním pracovním rozpětí (v daném případě byl zvolen interval 19,3–21,5 obj.%). Ve zvoleném rozsahu výrobce zaručuje přesnost detektoru 0,001 obj.% O<sub>2</sub> po dobu až 6 hodin při rozlišení 0,002 obj.%.

V případě půdních testů byla podle očekávání zaznamenána velmi vysoká respirace samotného půdního inokula. Proto byla zvolena šestihodinová frekvence analýz a pravidelné obměňování plynné fáze čerstvým vzduchem („refresh“). Změna koncentrace O<sub>2</sub> v zadaném intervalu byla v rozmezí 20,95–20,00 obj.% (obr. 4, čárkované křivky), tedy v měřicím rozsahu detektoru O<sub>2</sub>. Kumulativní spotřeba O<sub>2</sub> v případě slepého pokusu byla na úrovni 1780 mg O<sub>2</sub> na konci testu, v případě vzorků 1900 mg a vyšší.

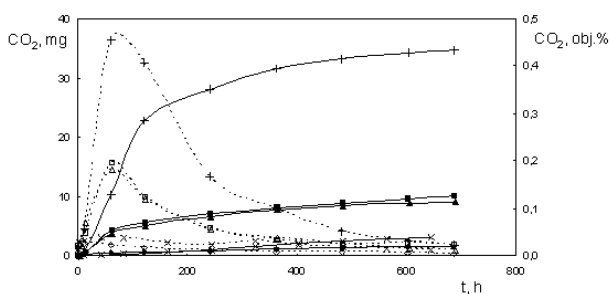
Klíčovou roli při měření O<sub>2</sub> hraje, vedle ostatních podmínek testu, délka měřicího intervalu; s prodlužující se délkou intervalu je změna koncentrace O<sub>2</sub> vyšší a vyšší je i přesnost analýzy. Nastavení frekvence analýz však musí být kompromisem mezi měřitelnou spotřebou O<sub>2</sub> a produkcí CO<sub>2</sub> s ohledem na rozsahy detektorů.

##### Produkce CO<sub>2</sub>

Na obr. 5 (vodní testy) a 6 (půdní testy) jsou uvedeny naměřené bilance produkovaného CO<sub>2</sub> vyjádřené jako koncentrace CO<sub>2</sub> v plynné fázi (obj.%) a zároveň kumulativní množství produkovaného CO<sub>2</sub> v mg. V obou případech se jedná o původní data naměřená analyzátozem (nekorigovaná o vliv acidobazické rovnováhy CO<sub>2</sub> dle (1))



Obr. 4. Koncentrace O<sub>2</sub> (čárkovaně, prázdné značky) a kumulativní spotřeba O<sub>2</sub> (plné křivky, plné značky) vzorků u půdních testů; + GS/14/30, ■ D97/235, ▲ D97/236, ◆ slepý pokus, × PVA

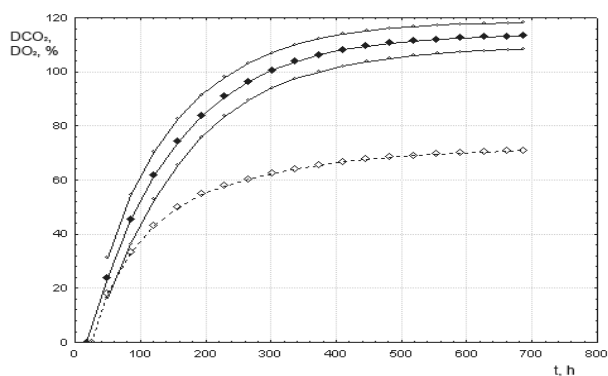


Obr. 5. Koncentrace  $\text{CO}_2$  (čárkovaně, prázdné značky) a kumulativní produkce  $\text{CO}_2$  (plné křivky, plné značky) vzorků u vodních testů. Data nejsou přepočtena dle rovnice (1) podle podmínek acidobazické rovnováhy; + GS/14/30, ■ D97/235, ▲ D97/236, ◆ slepý pokus, × PVA

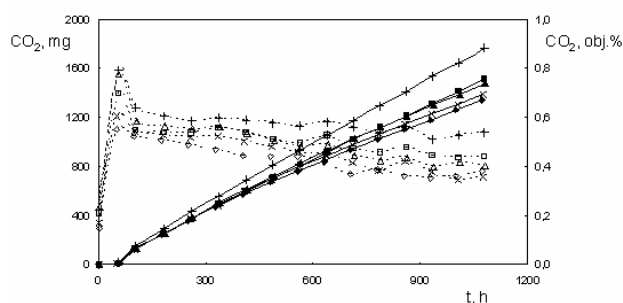
v případě vodních testů).

Za zvolených experimentálních podmínek byl detektor  $\text{CO}_2$  schopen zaznamenávat velmi nízké koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynu, což bylo zřejmé především u testů ve vodním prostředí. V případě slepého pokusu bylo na konci testu vyprodukováno cca 1,5 mg  $\text{CO}_2$ , které odpovídaly koncentraci přibližně 0,01 obj.%  $\text{CO}_2$ . Podobné hodnoty byly také naměřeny u obtížně rozložitelného vzorku PVA (půdními mikroorganismy). Naopak v případě dobře rozložitelného škrobu GS/14/30 byla zaznamenána maximální koncentrace  $\text{CO}_2$  na hodnotě 0,50 obj.%  $\text{CO}_2$ . U žádného testu nedošlo k překročení měřicího rozsahu detektoru (max. 0,9 obj.%).

Jak již bylo zmíněno dříve, i při vypnutém proplachu baněk („refresh“) nezůstával vyprodukovaný  $\text{CO}_2$  kumulován v plynné fázi baňky, nýbrž byl postupně ředěn vzduchem (*Refresh Air*) při analýzách předcházející baňky (pozice). To dokládá postupný pokles křivek (čárkované křivky) na obr. 5 z maxima až téměř k nulové koncentraci  $\text{CO}_2$ .



Obr. 7. Průběh biologického rozkladu škrobu GS/14/30 ve vodním prostředí podle produkce  $\text{CO}_2$  (plné křivky) a spotřeby  $\text{O}_2$  (čárkovaně); průběh  $D_{\text{CO}_2}$  vyznačen včetně 95% intervalu spolehlivosti; ◆ analýza  $\text{CO}_2$ , ◇ analýza  $\text{O}_2$

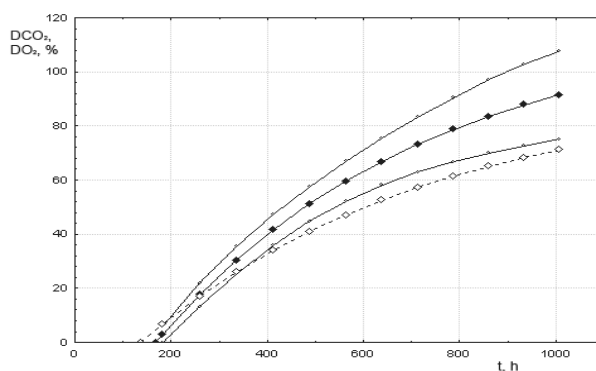


Obr. 6. Koncentrace  $\text{CO}_2$  (čárkovaně, prázdné značky) a kumulativní produkce  $\text{CO}_2$  (plné křivky, plné značky) vzorků u půdních testů; + GS/14/30, ■ D97/235, ▲ D97/236, ◆ slepý pokus, × PVA

U půdních testů byly koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynu řádově vyšší, pohybovaly se v rozmezí 0,4 až 0,80 obj.% v závislosti na rozložitelnosti vzorku. Vysoké koncentrace  $\text{CO}_2$  odpovídaly vysoké produkci  $\text{CO}_2$  samotným půdním materiálem; ty se pohybovaly v intervalu 0,3–0,5 obj.%  $\text{CO}_2$  (hodnoty pro slepý pokus). Také požadavek alespoň 10% rozdílu celkové produkce  $\text{CO}_2$  mezi slepým pokusem a testovaným vzorkem doporučený dle normy<sup>2</sup> byl s výjimkou vzorku PVA dodržen.

#### Hodnocení biologické rozložitelnosti vzorků

Naměřené kumulativní produkce  $\text{CO}_2$  (obr. 5 a 6, plné křivky) byly vztaženy na teoretické množství  $\text{CO}_2$  vzniklé za předpokladu úplné oxidace substrátu (vypočítáno z hodnoty TC – obsah celkového organického uhlíku) a vyjádřeny parametrem  $D_{\text{CO}_2}$ . U vodních testů (obr. 5) bylo provedeno až po přepočtu kumulativních hodnot  $\text{CO}_2$  dle rovnice (1). Kumulativní spotřeba  $\text{O}_2$  byla analogicky vy-



Obr. 8. Průběh biologického rozkladu škrobu GS/14/30 v půdě podle produkce  $\text{CO}_2$  (plné křivky) a spotřeby  $\text{O}_2$  (čárkovaně); průběh  $D_{\text{CO}_2}$  vyznačen včetně 95% intervalu spolehlivosti; ◆ analýza  $\text{CO}_2$ , ◇ analýza  $\text{O}_2$

jádrěna parametrem  $D_{O_2}$  – procento spotřeby  $O_2$  versus oxidovatelnost  $CHSK_{Cr}$ .

Na obr. 7 je graficky znázorněn průběh biologického rozkladu škrobu GS/14/30 ve vodním prostředí, na obr. 8 pak průběh biorozkladu téhož vzorku v půdním prostředí. Výsledky vypočtené podle rovnice (2) jsou pro všechny vzorky uvedeny v tab. II.

Hodnoty parametru  $D_{CO_2}$  jsou znázorněny s 95%

intervalem spolehlivosti (obr. 7 a 8, tab. II). Podle očekávání byla statistická odchylka výrazně vyšší u půdních testů, u kterých nebyla prováděna pravidelná homogenizace protřepáním v průběhu testu. V takových případech bylo nutné provádět více paralelních testů (minimálně 5× vedle sebe).

Podle očekávání byl biologický rozklad vzorků výrazně pomalejší v půdním prostředí s delší lagovou fází

Tabulka II

Hodnoty  $D_{CO_2}$ ,  $D_{O_2}$ , rychlostních konstant a délky lagové fáze ( $t_{lag}$ ) u vzorků testovaných ve vodním a půdním prostředí

Č.	Vzorek	$D_{CO_2 \max}$ [%]	$D_{O_2 \max}$ [%]	$10^3 k$ [ $h^{-1}$ ]	$t_{lag}$ [h]	Poznámka
1	Škrob GS/14/30	109,1 ± 4,9	---	8,2	18,2	vodní prostředí – $CO_2$
2	Škrob GS/14/30	91,4 ± 16,3	---	3,8	168,9	půdní prostředí – $CO_2$
3	Škrob GS/14/30	---	70,9	8,0	25,3	vodní prostředí – $O_2$
4	Škrob GS/14/30	---	71,2	3,6	137,3	půdní prostředí – $O_2$
5	PVA 88-08	7,2 ± 1,1	---	5,1	185,2	vodní prostředí – $CO_2$
6	PVA 88-08	10,9 ± 5,8	---	4,1	235,2	půdní prostředí – $CO_2$
7	PVA 88-08	---	---	---	---	vodní prostředí – $O_2$
8	PVA 88-08	---	10,5	3,7	221,6	půdní prostředí – $O_2$
9	D 97/235	25,7 ± 3,3	---	7,4	36,6	vodní prostředí – $CO_2$
10	D 97/235	27,7 ± 9,9	---	3,9	245,2	půdní prostředí – $CO_2$
11	D 97/235	---	19,6	6,2	42,3	vodní prostředí – $O_2$
12	D 97/235	---	21,4	3,8	230,4	půdní prostředí – $O_2$
13	D 97/236	29,6 ± 3,1	---	7,6	42,3	vodní prostředí – $CO_2$
14	D 97/236	23,7 ± 7,0	---	3,9	233,1	půdní prostředí – $CO_2$
15	D 97/236	---	24,0	6,2	42,3	vodní prostředí – $O_2$
16	D 97/236	---	16,4	3,8	222,5	půdní prostředí – $O_2$

Tabulka III

Doplňkové analýzy vodních a půdních testů

Č.	Vzorek	pH <sub>0</sub>	pH <sub>1</sub>	sušina <sub>0</sub> [%]	sušina <sub>1</sub> [%]
<i>Testy ve vodním prostředí</i>					
1	Slepý pokus	7,19	7,19	---	---
2	Škrob GS/14/30	7,19	7,20	---	---
3	Sloviol 88-08	7,18	7,18	---	---
4	D 97/235	7,19	7,17	---	---
5	D 97/236	7,19	7,17	---	---
<i>Testy v půdním prostředí</i>					
6	Slepý pokus	6,45	6,39	48,9	46,2
7	Škrob GS/14/30	6,45	6,51	48,9	42,1
8	Sloviol 88-08	6,45	6,36	48,9	46,0
9	D 97/235	6,45	6,33	48,9	42,8
10	D 97/236	6,45	6,32	48,9	42,6

Pozn.: Index „0“ odpovídá hodnotám na začátku testu, index „1“ hodnotám na konci testu

(tab. II). Výjimkou byl vzorek PVA, u něhož byla zaznamenána přibližně stejná délka lagové fáze bez ohledu na typ prostředí a hodnotící kritérium ( $\text{CO}_2$  i  $\text{O}_2$ ). U tohoto vzorku však nebylo možné popsat průběh biorozkladu ve vodním prostředí parametrem  $D_{\text{O}_2}$ . Za podmínek testu byly změny koncentrace  $\text{O}_2$  v plynné fázi velmi malé (pohybovaly se přibližně na úrovni slepého pokusu), zatížené velkou experimentální chybou. Jak dále vyplývá z tab. II, byly zjištěny srovnatelné hodnoty rychlostních konstant ( $k$ ) a délky lagové fáze ( $t_{\text{lag}}$ ).

Tab. III uvádí výsledky doplňkových měření prováděných vždy na začátku a konci testu (pH a v případě půd stanovení obsahu vlhkosti). V případě vodních testů byly změny pH (tab. III, č. 1–5) reakční suspenze v průběhu testu malé ( $\text{max.} \pm 0,02$ ) a jimi způsobený posun v acidobazické rovnováze mohl vést k maximálně 2,5% změně koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynné fázi (počítáno dle (1)). V případě půdních testů (č. 6–10) došlo k poklesu pH půdního materiálu i mírnému poklesu obsahu vody v půdě. Uvedené změny zřejmě podstatněji neovlivnily průběh rozkladu vzorků.

## Závěr

Účelem práce bylo informování o možnostech automatického respirometru Micro-Oxymax při testech biologické rozložitelnosti makromolekulárních látek v různých typech prostředí (vodní a půdní testy). Nalezení a ověření vhodných experimentálních podmínek testů bylo provedeno v předcházejících studiích<sup>16,17</sup>. Z experimentů provedených v předložené práci vyplynulo následující:

- a) Detektor  $\text{O}_2$  je schopen monitorovat změny koncentrace  $\text{O}_2$  v max. rozpětí 0–21 obj.%  $\text{O}_2$ . Pracovní rozsah detektoru je volitelný (v dané studii 19,3–21,5 obj.%). Ve zvoleném rozsahu výrobce zaručuje přesnost analýzy 0,001 obj.%  $\text{O}_2$ .
  - Vhodné pracovní rozmezí detektoru  $\text{O}_2$  je při změně koncentrace  $\text{O}_2$  na úrovni 0,10 obj.% a více.
  - Problémy s citlivostí mohou nastat u vodních testů biologického rozkladu (především u obtížně rozložitelných látek), u kterých je změna koncentrace  $\text{O}_2$  v plynné fázi velmi malá (na úrovni 0,1 obj.%  $\text{O}_2$  nebo nižší). V těchto případech jsou výsledky zatíženy velkou experimentální chybou a tedy prakticky nepoužitelné (zde případ obtížně rozložitelného vzorku PVA).
- b) Detektor  $\text{CO}_2$  (měřicí rozsah do 0,9 obj.%  $\text{CO}_2$ ) deteguje minimální koncentraci cca 0,001 obj.%  $\text{CO}_2$  v plynné fázi.
  - Nevýhodou je poměrně omezený pracovní rozsah detektoru (max. 0,9 obj.%). Při použité frekvenci analýz (vodní testy 10 hodin, půdní testy 6 hodin) jsou hodnoty produkce  $\text{CO}_2$  v měřicím rozsahu detektoru.
  - V případě testů ve vodním prostředí je nutno celkové naměřené množství  $\text{CO}_2$  přepočítat s ohledem na acidobazickou rovnováhu  $\text{CO}_2$  dle rovnice (1). Změna pH kapalné fáze v průběhu testu je za použitých pod-

mínek velmi malá (cca 0,02 jednotky pH), posun acidobazické rovnováhy  $\text{CO}_2$  vyvolaný touto změnou může vést k maximálně 2,5% změně koncentrace  $\text{CO}_2$  v plynu.

- c) Testy biorozložitelnosti je nutné provádět v dostatečném počtu paralelních opakování. Na základě dosavadních zkušeností lze doporučit provedení vždy 3 paralelních testů ve vodním prostředí (nepřetržitě míchaných) a minimálně 5 paralelních půdních testů (bez průběžné homogenizace).

Respirometr Micro-Oxymax lze plně doporučit pro testování biologické rozložitelnosti vzorků ve vodním i půdním prostředí. Výhodou jeho použití je plně automatizovaný provoz a současné analýzy obsahu  $\text{CO}_2$  a  $\text{O}_2$  v rámci jednoho testu. Nevýhodou je omezený počet testovacích pozic (podle konfigurace přístroje 10 až 80) a samozřejmě cena zařízení.

*Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky, MSM 7088352101.*

## LITERATURA

1. *International Standard ISO 14852 – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium – Method by analysis of evolved carbon dioxide*, 1999.
2. *International Standard ISO 17556 – Plastics – Determination of the ultimate aerobic biodegradability in soil by measuring the oxygen demand in a respirometer or the amount of carbon dioxide evolved*, 2003.
3. Pagga U., Schäfer A., Müller R. J., Pantke M.: *Chemosphere* 42, 319 (2001).
4. Jayasekara R., Lonergan G., Harding I., Bowater I., Halley P., Christie G. B.: *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 411 (2001).
5. *International Standard ISO 14851 – Determination of the ultimate aerobic biodegradability of plastic materials in an aqueous medium – Method by measuring the oxygen demand in a closed respirometer*, 1999.
6. Strotman U., Schwarz H., Pagga U.: *Chemosphere* 30, 525 (1995).
7. Calmon A., Dusserre-Bresson L., Bellon-Maurel V., Feuilloley P., Silvestre F.: *Chemosphere* 41, 645 (2000).
8. Battersby N. S.: *Chemosphere* 34, 1813 (1997).
9. Degli-Innocenti F., Tosin M., Bastioli C.: *J. Polym. Environ.* 6, 197 (1998).
10. Miles R. A., Doucette W.: *Chemosphere* 45, 1085 (2001).
11. Strotmann U., Reuschenbach P., Schwarz H., Pagga U.: *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4621 (2004).
12. Száraz L., Beczner J., Kayser G.: *Polym. Degrad. Stab.* 81, 477 (2003).
13. Plaza G., Ulfing K., Worsztynowicz A., Malina G., Krzeminska B., Brigmon R. L.: *Environ. Technol.* 26, 161 (2005).



14. Hollender J., Althoff K., Mundt M., Dott W.: *Chemosphere* 53, 269 (2003).
15. Lizama H. M., Zielinski P. A., Kerby L. D., Abraham C. C.: *Biotechnol. Bioeng.* 77, 111 (2002).
16. Dřimal P., Hrnčířík J., Hoffmann J.: *J. Polym. Environ.* 14, 309 (2006).
17. Dřimal P., Hoffmann J.: *Polym. Test.*, v tisku.
18. Itävaara M., Karjomaa S., Selin J. F.: *Chemosphere* 46, 879 (2002).
19. Grima S., Bellon-Maurel V., Silvestre F., Feuilloley P. A.: *J. Polym. Environ.* 9, 39 (2001).
20. Hoffmann J., Řezníčková I., Rozsypalová L., Julinová M., Alexy P., Bakoš D.: *Plasty Kauc.* 40, 295 (2003).

**P. Dřimal and J. Hoffmann** (*Department of Environmental Protection Engineering, Faculty of Technology, Tomas Bata University, Zlín*): **Fully Automated System of Continual Testing of Aerobic Biodegradability in Aqueous or Soil Environment**

The aim of this work was to introduce a unique device – fully automated respirometer Micro-Oxymax (Columbus Instruments Corp., Ohio, USA) which can be used for testing aerobic biodegradability of plastics in aerobic aqueous or soil environment. The O<sub>2</sub> consumption and CO<sub>2</sub> production in gas phase of the test chambers are measured periodically in 30 parallel tests in our respirometer arrangement. The selected experimental conditions of the biodegradability tests were based on the prior research focused on reproducibility and repeatability of the measurements. The results of this study indicate that the respirometer application in aerobic biodegradability is very effective. It provides comparable results with other methods (acidimetric or GC determination of CO<sub>2</sub> production), is incomparably less laborious and shows a high testing capacity (up to 80 measuring chambers at a time).

## VŠCHT Praha přijme na Ústav biochemie a mikrobiologie odborného pracovníka.

### Požadavky:

- VŠ vzdělání přírodovědného zaměření,
- znalost technik molekulární biologie.

### Nabízíme:

- místo ve výzkumném centru **REMOROST**: Regulace morfogeneze rostlinných buněk a orgánů,
- zajímavou práci na moderně vybaveném pracovišti,
- příležitost k osobnímu rozvoji,
- pracoviště v blízkosti metra,
- zaměstnanecké výhody (šest týdnů dovolené, pružnou pracovní dobu, příspěvek na stravování, rekreaci, penzijní připojištění, návštěvu kulturních zařízení).

**Nástup:** 1.3. 2008, na dobu určitou (3 roky)

**Kontakt:** Ústav biochemie a mikrobiologie, prof. RNDr. Olga Valentová, CSc.,  
e-mail: olga.valentova@vscht.cz, tel. 220 445 102