

MINISTERUL EDUCATIEI SI INVATAMINTULUI
Institutul Politehnic "Traian Vuia" Timisoara
Facultatea de Tehnologie Chimică

Ing. Carmen Boeriu

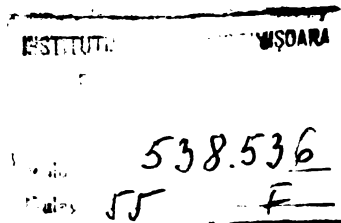
"PROCEDEE DE EPURARE A APILOR REZIDUALE
INDUSTRIALE CU CONTINUT DE POLUANTA
ORGANICI NEBIODEGRABILI"

- Teză de doctorat -

BIBLIOTECA CENTRALĂ
UNIVERSITATEA "POLITEHNICA"
TIMIȘOARA

Conducător științific :
Prof.dr.ing. Vasile Cocheci

- 1989 -



Elaborarea prezentei lucrări s-a desfășurat sub conducerea și îndrumarea nemijlocită a tovarășului profesor dr.ing. Vasile Cocheci. Pentru grije și înțelegerea deosebită pe care am simțit-o în acești ani, îi aduc cele mai sincere mulțumiri și profunda mea recunoștință.

Mulțumesc, de asemenea, colectivelor de Cataliză enzimatică, de Chimie organică și de Bazele tehnologiei chimice și cercetătorilor de la Institutul de Cercetări și Proiectări pentru Epurarea Apelor Reziduale, filiala Timișoara, pentru ajutorul colegial acordat la realizarea acestei teze.

C U P R I N S

	Pg.
Partea I	
1. Introducere	5
2. Metode de epurare a apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice	9
2.1. Epurare biologică	9
2.1.1. Biodegradabilitatea și mecanismele degradării biologice a fenolilor și aminelor aromatice	9
2.1.2. Tehnologii de epurare biologică a apelor reziduale	30
2.1.3. Analiza critică a proceselor de epurare biologică a fenolilor și aminelor aromatice	32
2.2. Epurarea apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice prin procedee de oxidare chimică	34
2.2.1. Oxidarea fenolilor și aminelor aromatice cu ozon	34
2.2.2. Oxidarea fenolilor și aminelor aromatice cu hipoclorit de sodiu și bioxid de clor	44
2.3. Oxidarea enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază a fenolilor și aminelor aromatice	46
2.3.1. Obținerea și caracterizarea peroxidazei	46
2.3.2. Cinetica și mecanismul reacției de oxidare a fenolilor și aminelor aromatice cu apă oxigenată și peroxidază	57
2.3.3. Epurarea apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice prin procedeul cu apă oxigenată și peroxidază	64
Partea a II-a - Contribuții la epurarea unor ape reziduale cu apă oxigenată și peroxidază	
1. Studii și cercetări cu privire la eliminarea enzimatică a fenolilor din apele reziduale	65
1.1. Obținerea, purificarea și caracterizarea peroxidazei din hrean	65
1.2. Stabilirea parametrilor optimi de eliminare a fenolilor din ape prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază : pH, concentrația apei oxigenate, concentrația peroxidazei, concentrația fenolului	69

1.3. Relații între structura fenolilor și eliminarea lor din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază	75
1.4. Eliminarea fenolilor din apă prin oxidare enzimatică urmată de coagulare	78
1.5. Cinetica reacției de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată și peroxidază	80
1.6. Concluzii asupra eliminării enzimatice a fenolilor din apă prin oxidare enzimatică	110
2. Eliminarea enzimatică a aminelor aromatice din ape reziduale prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază	112
2.1. Stabilirea parametrilor optimi de eliminare a aminelor aromatice din ape prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază : pH, concentrația apei oxigenate, concentrația peroxidazei, concentrația aminei aromatice	112
2.2. Relații între structura aminelor aromatice și eliminarea lor din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază	118
2.3. Eliminarea aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și coagulare	119
2.4. Concluzii asupra eliminării enzimatice a aminelor aromatice	120
3. Studii și cercetări comparative ale eliminării fenolilor și aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică, epurare biologică, și oxidare cu hipoclorit de sodiu, dioxid de clor și ozon	122
3.1. Eliminarea comparativă a fenolilor și aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și epurare biologică	122
3.2. Epurarea comparativă a apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu hipoclorit de sodiu	125
3.3. Cercetări comparative cu privire la eliminarea fenolilor și aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu dioxid de clor	126
3.4. Studii comparative între procedeele de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din ape reziduale prin oxidare enzimatică și oxidare cu ozon	131

3.5. Concluzii comparative asupra procedurilor de epurare a apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice	134
4. Aplicații tehnologice ale procedurii cu apă oxigenată și peroxidază în epurarea unor ape reziduale fenolice	136
4.1. Epurarea apelor reziduale fenolice de la fabricarea fenolului prin procedeul cumen	136
4.2. Epurarea apelor reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului	148
4.3. Concluzii asupra posibilităților de aplicare industriale a procedurii de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază în epurarea apelor reziduale cu conținut de fenoli	151
5. Concluzii finale	152
6. Bibliografie	157

PARTEA A I-a

I. INTRODUCERE

Alături de materia primă și de energie, apa constituie un element esențial al vieții social-economice a unei țări, influențând dezvoltarea industriei, agriculturii, a centrelor populate.

Dezvoltarea intensivă a industriei și agriculturii, creșterea continuă a nivelului de trai al populației, necesită debite de apă mereu crescînde și de o calitate corespunzătoare. Concomitent, această dezvoltare constituie un pericol din ce în ce mai mare pentru calitatea apelor de suprafață și subterane, prin creșterea volumelor de ape reziduale evacuate și a complexității substanțelor poluante prezente în ele.

Apele reziduale industriale au o compoziție foarte variată și exercită o acțiune vătămătoare asupra omului, a florei și faunei bazinului receptor, asupra captărilor de apă potabilă și industrială în aval, a instalațiilor de canalizare, a utilizării în agricultură etc.

Apele uzate industriale se caracterizează prin variații mari ale concentrațiilor și compoziției, ele conținînd atât materii prime, cît și produși intermediari, produși finali și produși ai reacțiilor secundare. Astfel, în efluenții rezultați de la fabricarea celulozei au fost identificate o serie de substanțe ca : acizii formic, acetic, oxalic, vanilic, ferulic, abietinic, rezinici, glucoză, galactoză, fructoză, arabinoză, ramanoză, celobioză, acid galacturonic, gusiacol, vanilină, dimetilsulfură, metilmercaptani, metanol, aldehidă formică, furfurool, camfor, α - terpineol, alcool fenilic, limonen, terpinolen /3-8/. Apele uzate evacuate din cocserii conțin : piridină, metilpiridină, metiletilpiridină, dietilpiridine, trimetilpiridine, anilină, metilanilină, dimetilanilină, chinolină, izochinolină, 3,4-benzpiren, fenol, o-crezol, m-crezol, xilenoli, etil-fenol, pirocatechină, metil și etil-pirocatechină, rezorcină, β - naftol /3,9-13/.

Aceste substanțe chimice, precum și cele prezente în apele uzate evacuate din alte unități industriale cu producție diversificată, de exemplu din unități care sintetizează coloranți, medicamente etc., se caracterizează printr-o acțiune nocivă pronunțată.

Nu se cunosc încă efectele toxice ale tuturor impurităților prezente în apă ; se știe însă că, în apa potabilă obținută din apele de suprafață ce servesc drept emisari, se găsesc concentrații variabile de poluanți. Deși concentrațiile acestor substanțe în apa de baut sînt de obicei scăzute, de multe ori imperceptibile organoleptic, efectele lor fiziologice posibile nu pot fi neglijate. Există opinia că expunerea repetată la concentrații scăzute de astfel de substanțe reprezintă un pericol potențial pentru sănătatea publică și că ingerarea continuă a apelor ce le conțin, ar putea avea efecte cumulative dezastruoase /2/.

Dăunele economice mari provocate de deversarea în emisari a apelor reziduale netratate, precum și efectele nocive asupra sănătății comunităților umane impun epurarea ca o măsură absolut necesară în vederea protejării resurselor naturale de apă. Epurarea apelor uzate poate fi mai mult sau mai puțin complexă în funcție de caracteristicile fizico-chimice și microbiologice ale apelor și de cerințele de calitate pentru evacuarea în râurile receptoare. Apele uzate cu poluanți anorganici pot fi tratate prin procedee fizico-chimice, în care eliminarea substanțelor impurificatoare se face prin procese fizice sau chimice, ca de ex.: sedimentare, neutralizare, precipitare, coagulare, adsorbție pe cărbune activ, schimb ionic etc. Apele uzate cu caracter predominant organic pot fi tratate prin procedee fizico-chimice și biologice; în acest din urmă caz, eliminarea substanțelor organice impurificatoare se face prin procese biochimice, și anume procesele metabolice ale microorganismelor.

În ultimele decenii, tehnologia tratării apelor a cunoscut o dezvoltare impetuoasă. Apariția în apele reziduale a unor compuși organici sintetici, caracterizați printr-o complexitate și stabilitate mare, care nu pot fi eliminați din ape prin metodele convenționale de tratare (epurarea mecanică și biologică) a impus necesitatea introducerii treptei de epurare avansată. Metodele de epurare avansată cuprind procedee fizice și chimice cu eficiență mare, ca de ex.: filtrarea prin microsite, coagularea, adsorbția, extracția, dializa, osmoza inversă, antrenarea, distilarea, schimbul ionic, oxidarea chimică și electrolytică, înghețarea, procedee termice și termocatalitice, separarea cu membrane lichide etc. Acestea pot modifica, completa sau înlocui una sau mai multe faze ale tehnologiei obișnuite de epurare. Metodele de epurare avansată, deși superioare celor aplicate în epurarea primară și secundară,

prezintă și unele dezavantaje, ca : purificarea incompletă a apelor reziduale, formarea necontrolată de produse secundare, costuri ridicate.

Cercetările întreprinse în ultimii ani au deschis noi perspective în tehnologia epurării apelor reziduale, prin abordarea de noi domenii. S-au făcut astfel primii pași în aplicarea biotehnologiilor în epurare, prin studierea unor metode enzimatică de eliminare a unor compuși organici din ape. S-au utilizat preparate enzimatică în epurarea apelor, ca mijloace ajutătoare, în diferite procese, ca de ex.:

- pentru îndepărtarea turbidității și creșterea vitezei de sedimentare a suspensiilor din apa uzată cu conținut de amidon ; s-au utilizat amilaze, care scindează hidrolitic amidonul, și distruge astfel sistemul coloidal care împiedică sedimentarea suspensiilor din apa uzată a unei fabrici de hârtie /18/ ;

- în preepurarea apelor uzate cu conținut de rășini polivinilice se utilizează un preparat enzimatic obținut prin cultivarea uneia sau mai multor specii de *Pseudomonas* și *Xantomonas* în soluție de alcool polivinilic. Extrasul enzimatic adăugat apei uzate (cu COOCr de 4150 mg/l) depolimerizează impuritățile, astfel că epurarea ulterioară cu nămol activ conduce la un efluent cu COOCr de 200 mg/l ; în instalația martor, ce funcționează fără preparat enzimatic, nu se realizează micșorarea COO-ului ;

- în recuperarea din apele reziduale a unor substanțe utilizabile, ca de ex. concentrate de maltoză din ape uzate cu conținut ridicat de amidon, concentrate de glucoză și galactoză din efluenții evacuați de la fabricarea derivatelor de lapte, prin utilizarea de enzime immobilizate pe suporturi insolubile.

Progresele înregistrate în enzimologie în ultimii ani, au condus la înțelegerea fenomenelor care stau la baza epurării biologice, și anume : metabolismele celulare, adaptarea celulelor la inhibiție, și posibilitatea dirijării unor mecanisme celulare în sensul folosirii lor.

Pentru domeniul epurării biologice a apelor uzate, enzimele sînt importante nu numai datorită catalizării reacțiilor necesare îndepărtării diferitelor substanțe din apele uzate, dar însuși procesul cu nămol activ este privit din punct de vedere al cineticii enzimatică /19/. În acest sens, au fost stabilite valori ale lui K_m pentru unele ape uzate sau pentru unele substanțe organice degradate prin procedeul cu nămol ac-

tiv /20,21/. S-a demonstrat că respirația nămolului activ în prezența apei uzate (respirația de substrat) funcționează de concentrația acestuia (exprimată în CO₂) urmează cinetica Michaelis-Menten /22/, deși sînt evidențiate abateri de la relația respectivă în cazul respirației nămolului activ alimentat discontinuu, aparent din cauza rezervelor de hrană pe care le face celula organismelor în aceste condiții /23/.

Cinetica enzimatică este folosită pentru stabilirea acțiunii unor substanțe toxice asupra procesului de epurare (modele de inhibiție), pentru descrierea procesului de adaptare etc. De asemenea, prin determinări de enzime se poate aprecia viabilitatea nămolului activ.

Din nămolul activ au fost izolate, sau caracterizate din punctul de vedere al activității, unele enzime ca : proteaze /24/, urează /25/, catalază /26/, peroxidază și coenzima Q /27/, dehidrogenaze /28-32/.

În acest domeniu al utilizării enzimelor în epurarea apelor reziduale, se încadrează și cercetările ce constituie obiectul prezentei lucrări. Studiile efectuate se referă la eliminarea fenolilor și aminelor aromatice din apele reziduale prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază, metodă menționată pentru prima dată în literatură în anul 1980 /15,16/.

În cercetările originale au fost abordate mai multe direcții, și anume : studiul aplicabilității metodei de oxidare enzimatică în eliminarea din ape a unei serii de 30 de fenoli și 20 de amine aromatice ; studiul cinetic al reacției de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată în prezența peroxidazei ; compararea eficienței metodei enzimatică de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din ape, cu a unor procese aplicate în prezent în epurarea apelor reziduale ; perfecționarea metodei descrise în literatură prin cuplarea reacției de oxidare enzimatică cu coagularea cu sulfat ferros și aplicarea metodei complexe elaborate pe ape reziduale reale provenite de la obținerea fenolului prin procedeul curenț și de la distilarea uscată a lemnului.

2. METODELE DE EPURARE A APELOR UZATE CU FENOLI SI AMINE AROMATICE

Compușii organici din clasa fenolilor și aminelor aromatice prezenți în apele de suprafață și în apele reziduale de la diferite procese industriale, ca industria detergenților, a rășinilor și a maselor plastice, industria textilă, chinizarea cărbunilor, industria coloranților și a medicamentelor, industria organică de sinteză etc., sînt substanțe cu toxicitate ridicată. Astfel, fenolul este toxic pentru pești în concentrații de minimum 2 mg/l, și poate fi determinat în carnea peștilor chiar și la concentrații mult mai mici decît doza toxică /14/. Totodată, fenolii au un consum biochimic de oxigen (CBO) destul de ridicat, și în concentrații mai mari, pot să ducă la scăderea bruscă a oxigenului în emisar /15/. Fenolii dau un gust neplăcut apei chiar la concentrații foarte reduse, mai ales dacă apa este tratată, pentru potabilizare, prin clorare. Mulți compuși din aceste clase, ca de ex.: benziidina, 1- și 2-naftilamina, o-toluidina, aminoazobenzenu, anilina și derivații ei, fenilendiaminele, benzpirenul, 2,4,6-triolorfenolul, 4-amino-2-nitrofenolul, prezintă o pronunțată acțiune cancerigenă.

În prezent, eliminarea fenolilor din apele reziduale se realizează în instalațiile industriale prin utilizarea procedurilor de epurare biologică. Metoda nu se aplică însă decît în cazuri particulare pentru aminele aromatice. Dificultățile întâmpinate în exploatarea instalațiilor industriale, precum și unele dezavantaje ale metodei, au determinat studierea unor alte procedee de tratare, ca : oxidarea chimică cu clor sau compuși cu clor, sau cu ozon, separarea cu membrane lichide, oxidarea enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază.

2.1. Epurarea biologică

2.1.1. Biodegradabilitatea și mecanismele degradării biologice a fenolilor și aminelor aromatice

Epurarea biologică, considerată în prezent cea mai eficientă și cea mai economică metodă de îndepărtare a substanțelor organice din apele uzate, se bazează pe reacțiile metabolice ale unei populații mixte de bacterii, ciuperci și alte microorganisme

(în special protozoare și unele metazoare inferioare), numită biocenoză sau biomasă. Compoziția biocenozelor și randamentul de îndepărtare a substanțelor organice depind de condițiile de mediu: compoziția apei uzate și concentrația în impurități, temperatura, tensiunea în oxigen, condițiile de amestec, modul de exploatare a instalației de epurare.

- Procesele biochimice prin care microorganismele îndepărtează impuritățile organice prezente în apele reziduale sînt posibile numai dacă poluanții organici sînt biodegradabili. Deși în domeniul epurării apelor se iau în considerare mai multe grade de degradare biologică : primară, parțială, acceptabilă și totală //0/, din punct de vedere al protecției mediului se vorbește numai de o biodegradabilitate acceptabilă și biodegradabilitate totală. Mulți cercetători susțin necesitatea biodegradării totale a poluanților organici, principalul argument adus în favoarea ei fiind acela că degradarea parțială a unei substanțe are ca rezultat acumularea continuă în mediul apos de reziduri ale moleculelor inițiale, ale căror efecte în timp sînt de multe ori necunoscute. Studii aprofundate relatează efecte toxice sau cancerigene ale unor substanțe parțial degradate, printre care amintim : 2-naftilaminobenzidina, 1,4-benzpiren, 1-naftilamină, o-tolidină, diclorbenzidină, dianisidină, 4-dimetilaminoazobenzen și alți coloranți azoici //1/.

Studiul biodegradabilității unei substanțe cuprinde cunoașterea căilor metabolice de degradare, a reacțiilor și produșilor succesivi prin care substanța este transformată în oxizii elementelor care o compun. Reacțiile metabolice ale microorganismelor se desfășoară simultan prin cele două laturi contradictorii și inseparabile : prin catabolism sau dezassimilație, în care are loc degradarea oxidativă a substanțelor, mai ales în scopul obținerii energiei, și prin anabolism sau asimilație, în care are loc sinteza materialului celular, folosind energia eliberată în reacțiile de degradare.

Cercetări extinse de biochimie și microbiologie au condus la o cunoaștere detaliată a metabolismului claselor de substanțe care reprezintă substraturi ale activității microorganismelor și care formează componenți majori ai celulelor (glucide, lipide, proteine) ; în acest fel a fost posibilă estimarea unui tablou metabolic general pentru bacteriile comune, care intervin în epurarea apelor (fig.1). În același timp, sînt cunoscute și mecanismele de degradare a unor substanțe organice cu acțiune ecologică deosebită

(pesticide, hidrocarburi aromatici, fenoli și amine aromatice, detergenți), datorită cercetărilor efectuate în principal pe sisteme substrat unic - organism unic.

În fig.1 este prezentată degradarea polimerilor biologici care în cazul epurării biologice pot fi furnizați ca nutrienți celulelor de microorganisme de către apele uzate. În aceste procese intervin o serie de enzime, printre care hidrolaze (lipaze, amilaze, proteaze), oxigentranferaze, decarboxilaze, dehidrogenaze, oxidoreductaze etc.

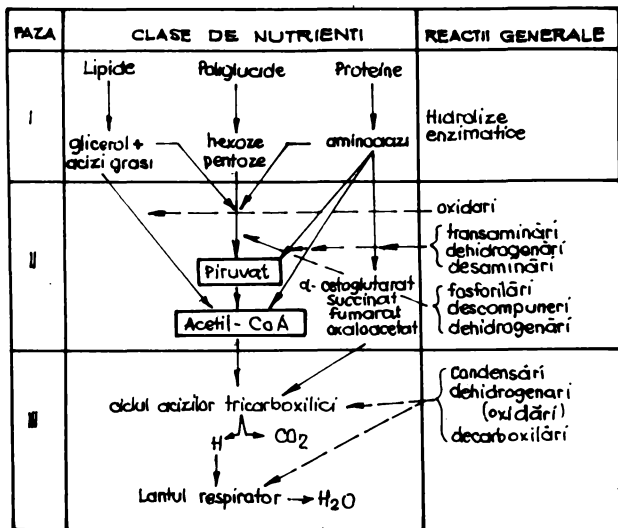


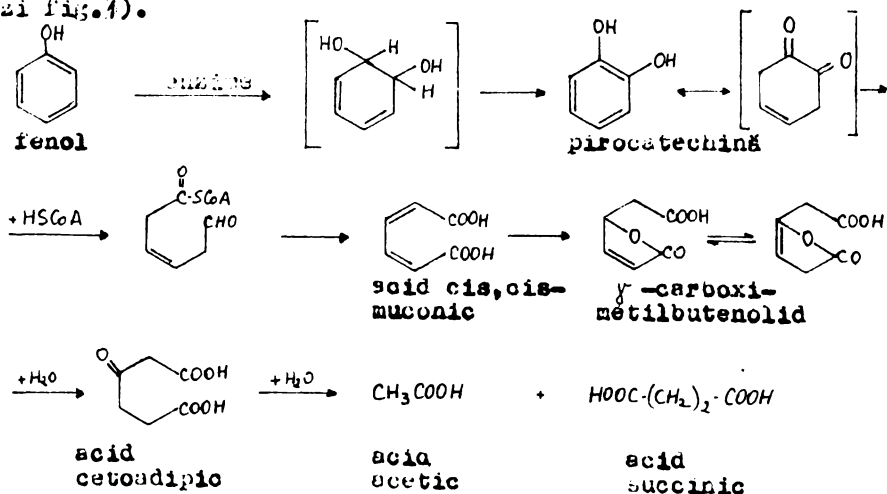
Fig.1 - reacțiile generale de degradare aerobă a principalelor clase de nutrienți

În timpul catabolismului, energia potențială mare conținută în moleculele organice ale substratului, cu un grad înalt de organizare structurală, este eliberată sub formă de energie liberă ΔG, de a cărei producere și utilizare depinde creșterea și supraviețuirea microorganismelor [35]. Procesul oxidării biologice a substanțelor organice este exoterm. Producția de căldură a diferitelor microorganisme aeriene, obținută la degradarea unui gram de carbon conținut în solidele organice

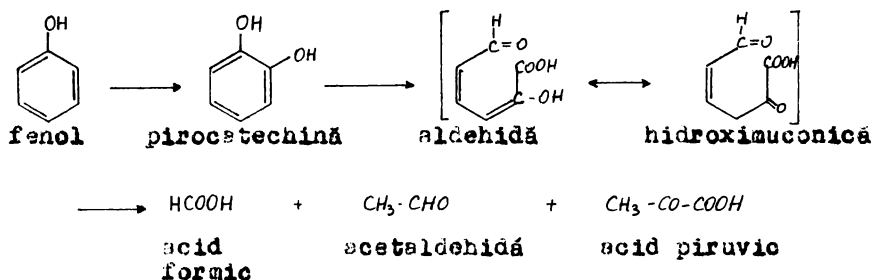
din diferite substraturi este cuprinsă între 8 și 12 kcal /36/.

Simultan cu reacțiile exergonice de degradare a substanțelor organice au loc reacțiile endergonice de sinteză a materialului celular nou, prin care se obțin componenții biochimici majori - lipide, glucide și mai ales proteine. Pentru obținerea materialului celular sînt necesare următoarele elemente esențiale : C, H, O, N, S, P în cantități relativ mari, și K, Mg, Mn, Ca, Fe, Co, Cu, Zn, Mo în cantități mici, ultimele patru chiar în urme.

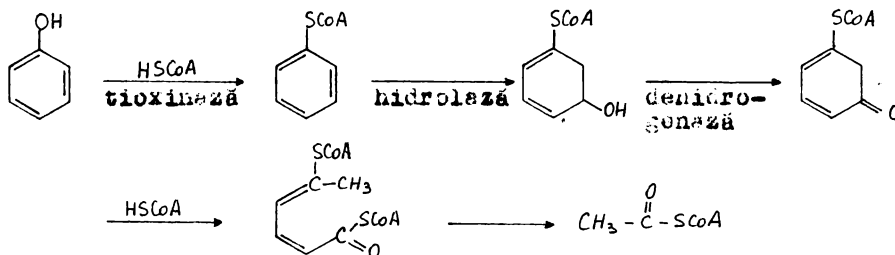
Fenolul este ușor oxidat de multe specii de microorganisme, îndeosebi de *Mycardia*. Calea metabolică de degradare cuprinde o succesiune de reacții [72] în care prima treaptă a reacției de biodegradare este o hidroxilare catalizată de monooxigenaze, cînd se obține un diol reactiv și pirocatechina, urmată de deschiderea nucleului benzenic. Într-o variantă de deschidere a inelului aromatic, deschiderea "orto", se obține un acid dicarboxilic, acidul β - cetoacidpic, care este degradat în continuare prin β - oxidare, la acid acetic și acid succinic. Acidul acetic, sub formă de acetat activ, devine metabolit cheie pentru oxidare și sinteză, iar succinatul este oxidat probabil în ciclul acizilor tricarboxilici (vezi fig.4).



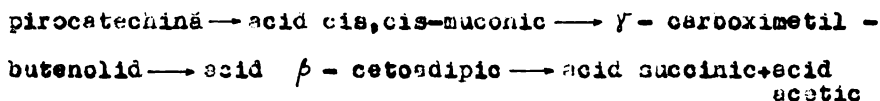
În al doilea caz, deschiderea "meta" a nucleului aromatic, urmată de o succesiune de reacții enzimatiche de oxidare, decarboxilare, duce la acid formic, acetaldehidă și acid piruvic, toate aceste substanțe fiind metaboliți celulari.



O altă cale metabolică de degradare a fenolului, propusă de Mc Kinney /72/, admite atacul coenzimei A la nucleu, cu eliminarea apei, urmată de o succesiune de reacții de hidroxilare și oxidare, al căror rezultat final este ruperea nucleului aromatic și formarea acetil-coenzimei A.



Prezența unor substituenți în moleculele fenolului duce la modificarea biodegradabilității. Astfel, fenolii polihidroxicici, ca de ex. pirocatechina și rezorcina sînt degradați ușor de microorganisme, prin căile metabolice ale fenolului :



Introducerea în moleculă a atomilor de halogen modifică viteza de degradare bacteriană în funcție de numărul, poziția și tipul halogenului substituent. Astfel, substituarea în orto cu clor conduce la mono, di - și triclorfenoli rezistenți la oxidare ; substituarea în meta conduce la clorfenoli cu rezistență moderată, respectiv cu viteză mică de degradare, iar substituarea în para duce la clorfenoli ușor biodegradabili /71/.

Compușii policlorurați sînt foarte persistente în mediu și reîntorc la atacul microorganismelor comune în apă și sol. Astfel, pentaclorfenolul este foarte rezistent la biodegradare, se cunoaște o singură referință bibliografică despre existența unei bacterii capabile să se dezvolte pe acest substrat, *eriberina* 1^m,

dar nu se cunoaște încă mecanismul de degradare /74/.

Nitrofenolii sînt degradați greu, prin două căi metabolice, prin care microorganismele înlătură gruparea nitro din moleculă /75/ ; astfel, *Scherichia coli* reduce gruparea nitro - la amino, în timp ce *Nocardia* îndepărtează gruparea nitro din moleculă, N fiind transformat probabil în continuare în NH_3 . Prezența mai multor grupări nitro în moleculă îngreunează mult degradarea acestora, trinitrofenolul fiind toxic pentru microorganisme /53,54/.

Aminele aromatice, ca de exemplu anilina, sînt relativ ușor biodegradabile, cu condiția ca pozițiile orto sau para față de NH_2 să fie libere. Substituirea N,N face molecula inertă pentru biodegradare /76/.

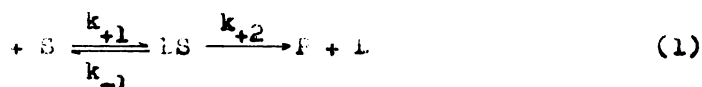
Unele amine aromatice ca benzidina și derivații ei, o-toluidina, anisidina, naftilaminele și derivații lor, au efecte cancerigene. Potodată, ele prezintă toxicitate pentru nămolul activ /76, 77/. Analizele gaz-cromatografice au arătat însă că aminele respective, cu excepția celor N,N - disubstituite sînt transformate biologic, cu randamente mari, chiar în cazul concentrațiilor mari de substanțe (100 - 500 mg/l); calea metabolică nu este încă cunoscută și se presupune că metabolizii sînt toxici pentru nămolul activ /76/. Aminele bifenilului, deci și benzidina, formează în contact cu nămolul activ compuși polimerizați, colorați în roșu, prin oxidare enzimatică catalizată probabil de peroxidază, similari ca structură colorantului diaminic descris pentru 3,3-diaminobenzidină /76/.

Deoarece toate reacțiile biocimice sînt catalizate de enzime, aplicarea cineticii enzimatică în studiul proceselor ce intervin în epurarea biologică a permis elucidarea multor aspecte legate de mecanismul și cinetica degradării biologice.

Cinetica reacțiilor enzimatică /37,38/

La baza cineticii enzimatică stă postulatul existenței unui complex deosebit de reactiv - ES - între enzima și substratul ei. Marea diferență dintre masa moleculară a enzimei și cea a substratului ei indică faptul că din întreaga suprafață a macromoleculei proteice cu proprietăți catalitice numai o mică regiune (centrul activ) este responsabilă pentru recunoașterea stereochimiei substratului, de legarea lui și de actul catalitic propriu-zis, restul proteinei avînd roluri secundare de facilitare a acestor interacții. Această structură tranzitorie, foarte activă, a fost denumită complex enzimă-substrat sau complex Michaelis.

Cinetica reacțiilor enzimatice se bazează pe teoria stării staționare conform căreia în orice moment al reacției enzimatice, vitezele de formare și de scindare a complexului ES sînt aproximativ egale, așa încît pentru o scurtă perioadă de timp concentrația ES poate fi considerată constantă. Această stare este descrisă printr-un set de ecuații algebrice obținute prin egualarea cu zero a tuturor derivateilor în funcție de timp a concentrațiilor din sistem. Reactiv care reprezintă schema fundamentală a unui mecanism enzimatic este următoarea :



Reacția inversă ultimei etape $E + P \xrightarrow{k_{-2}} ES$ decurge cu o viteză foarte mică, și poate fi neglijată.

Viteza formării complexului ES poate fi redată de relațiile :

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_{+1}[E][S] - k_{-1}[ES] - k_{+2}[ES] = k_{+1}[E][S] - (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (2)$$

În fază staționară, în procesul enzimatic, cantitatea de substrat fiind în mare exces, nu constituie un factor limită pentru viteză și concentrația complexului ES poate fi considerată constantă.

$$k_{+1}[E][S] = (k_{-1} + k_{+2})[ES] \quad (3)$$

Concentrația totală a enzimei la începutul reacției enzimatice, e_t este egală cu suma concentrației enzimei libere și a concentrației enzimei legate în complexul ES la un moment al reacției :

$$[E]_t = [E] + [ES] \quad (4)$$

Introducînd în relația (3) valoarea concentrației enzimei libere din (4) se obține :

$$k_{+1}[S](E_t - E_S) = (k_{-1} + k_{+2})[ES]$$

Explicitînd în funcție de ES :

$$[ES] = \frac{k_{+1}[E]_t[S]}{k_{+1}[S] + k_{-1} + k_{+2}} = \frac{[E]_t[S]}{[S] + \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}}} \quad (5)$$

se obține valoarea concentrației enzimei legate în complexul ES. Raportul constantelor parțiale de viteză poate fi înglobat într-un singur termen :

$$\frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_M \quad (6)$$

numit constantă Michaelis.

Dacă se ține seama că viteza reacției enzimatice depinde în special de concentrația ES și că viteza maximă se înregistrează când toată cantitatea de enzimă se află legată în complexul ES,

$$v = k_{+2} [ES]$$

$$v_{\max} = k_{+2} [E]_t$$

ecuația (5) devine :

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (7)$$

și poartă numele de relația Michaelis-Menten. Ea furnizează expresia vitezei de reacție în funcție de concentrația substratului ținând seama de două constante cinetice : viteza maximă de reacție v_{\max} și constanta Michaelis K_M .

Reprezentarea grafică a ecuației Michaelis-Menten (fig.2)

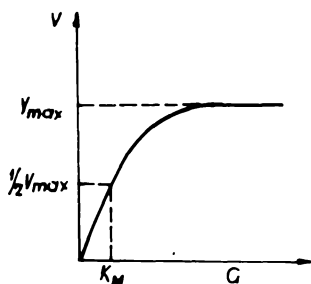


Fig.2 - reprezentarea grafică a ecuației Michaelis-Menten

în care pe abscisă se notează concentrația substratului S , iar pe ordonată viteza de reacție v , conduce la obținerea unei părți dintr-o hiperbolă rectangulară care tinde asimptotic către valoarea maximă a vitezei v_{\max} . Această constantă cinetică variază de la o enzimă la alta fiind funcție de natura substratului, de pH, de concentrația enzimei și de temperatură. Se exprimă în $\mu\text{moli}/\text{min. ml}$. Constanta Michaelis este independentă de concentra-

ția enzimei, fiind egală cu :

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_{+2}}{k_{+1}} = K_S + \frac{k_{+2}}{k_{+1}} \quad (7')$$

În majoritatea cazurilor K_M are o valoare foarte apropiată

de a lui K_M , însă totdeauna mai mare. Pentru reacțiile în care ES se descompune spontan, cu viteze neglijabile, în produși de reacție, $k_{+2} = 0$ și K_M devine egal cu constanta de disociere K_S . De aceea K_M poate fi numită constantă aparentă de disociere sau constantă de disociere dinamică.

Considerind cazul special cînd $v = 1/2 V_{max}$, obținem :

$$K_M = S,$$

de unde se desprinde concluzia că, K_M este egală cu concentrația substratului pentru care viteza de reacție este egală cu $1/2 V_{max}$.

K_M are dimensiunile unei concentrații, se exprimă în mol/l și poate lua valori de la $10^{-1}M$ la $10^{-8}M$. Enzimele care au valori cuprinse între 10^{-1} și $10^{-2}M$ prezintă o mică afinitate pentru substratele a căror transformare o catalizează, enzimele cu K_M cuprinse între $10^{-5}M$ și $10^{-8}M$ au o afinitate mare, valoarea K_M reprezentînd inversul afinității enzimei pentru substratul ei. Valoarea K_M variază cu structura substratului, cu pH și cu temperatura.

Determinarea constantelor cinetice prin reprezentarea grafică a ecuației Michaelis-Menten este unevoasă, atît datorită numărului mare de determinări experimentale, care sînt necesare pentru trasarea graficului cît și a posibilităților de erori pentru calcularea lor. De aceea se utilizează unele prelucrări matematice ale ecuației Michaelis-Menten, ca : linearizarea Lineweaver-Burk /39/ bazată pe ecuația :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (8)$$

care reprezentată grafic conduce la o dreaptă a cărei pantă este egală cu K_M/V_{max} și care interceptează abscisa într-un punct egal cu $-1/K_M$. Prelucrarea Lineweaver-Burk are avantajul că dă unele informații asupra tipului de inhibiție enzimatică.

- modelul luiadie și Hofstee /40/ .

$$v = V_{max} - \frac{K_M \cdot v}{[S]} \quad 538.5 \frac{36}{55} F \quad (9)$$

care poate fi reprezentat grafic printr-o dreaptă cînd variabilele sînt $x = v/S$ și $y = v$. Panta acestei drepte este egală cu $-K_M$.

Hanes /41/ realizează reprezentarea liniară a ecuației Michaelis-Menten sub forma $[S]/v$ în funcție de $[S]$, în timp ce Kuhn /42/ utilizează reprezentarea lui v în funcție de $\log [S]$.

cind se obține o sigmoidă al cărei punct de inflexiune corespunde lui K_M .

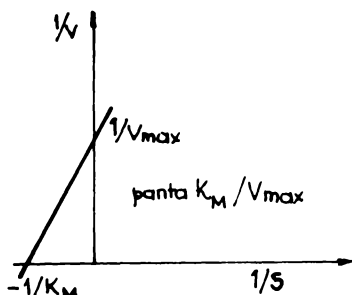


Fig.3 - Prelucrarea grafică Lineweaver-Burk a ecuației Michaelis-Menten

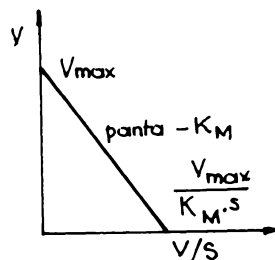


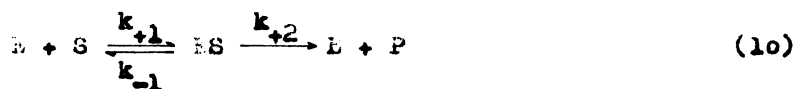
Fig.4 - Prelucrarea grafică Eadie-Hofstee a ecuației Michaelis-Menten

Pentru toate reacțiile catalizate de enzime, o importanță deosebită prezintă posibilitatea influențării vitezelor de reacție de factorii de mediu - pH, temperatură, tărzie ionică, și de către anumite substanțe chimice. Mărirea vitezei de reacție se realizează cu ajutorul unor substanțe de obicei anorganice, activatori, cum sînt : Cl^- , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+} etc., care funcționează probabil prin participarea la legarea substratului de enzimă, sau prin stabilizarea unuia sau mai multor complexe implicite în succesiunea reacțiilor /43/. Micșorarea vitezei de reacție, mergînd pînă la anularea ei, este determinată de către substanțe anorganice și organice, numite inhibitori. Inhibiția enzimatică are o importanță hotărîtoare în epurarea biologică a apelor uzate, acestea conținînd pe lîngă substanțele necesare activității metabolice și substanțe care, în funcție de structură și de concentrația lor, pot deveni inhibitori ai activității enzimatică, conducînd la randamente slabe ale epurării.

Inhibiția enzimelor este clasificată în general în două tipuri : ireversibilă și reversibilă. În inhibiția ireversibilă, reîncetarea activității enzimatică, în condițiile lipsite de inhibitori nu se mai produce în timpul obișnuit experimentarilor de cinetică enzimatică. Cei mai mulți inhibitori ireversibili reacționează chimic cu enzima, și dacă există o cantitate suficientă de substanță, pentru a reacționa cu toate grupările enzimei implicate în reacție, inhibiția este practic totală, distrugînd enzima. Dintre inhibitorii ireversibili fac parte derivații ai dinitrofenolului, iodosacetat, complecși cu iosior și iluor.

Există mai multe tipuri de inhibiție reversibilă - competitivă, necompetitivă și incompetitivă, cele mai importante fiind primele două.

În inhibiția competitivă, inhibitorul reacționează reversibil cu un situs al enzimei și deci concură cu substratul în vederea fixării la nivelul centrului activ; acest fenomen presupune în general existența unei oarecare similitudini structurale între inhibitor și substrat [38]. Deoarece inhibitorul și substratul concură pentru același situs, în mediul de reacție se formează concomitent complexe enzimă - substrat (ES), și enzimă inhibitor (EI), conform următoarelor reacții:



pentru care viteza de reacție are expresia:

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [ES]}{[E] + [ES] + \frac{K_M}{K_1} \cdot \frac{[ES][I]}{[S]}} = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right)} \quad (12)$$

Comparând ecuația de viteză a reacției enzimatice în prezența unui inhibitor competitiv cu ecuația Michaelis-Menten (7), se constată prezența termenului $\left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right)$ care multiplică valoarea K_M a enzimei.

Formal, ecuația inhibiției competitive este asemănătoare ecuației Michaelis-Menten, ceea ce permite prelucrarea ei matematică după metoda Lineweaver-Burk, în vederea reprezentării ei grafice. Ecuația (12) se poate scrie sub forma:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (13)$$

Reprezentînd grafic această ecuație, alegînd variabilele $1/v$ în funcție de $1/S$ se obține o dreaptă, care intersectează axa abscisei în punctul

$$-\frac{1}{K_M} \left(1 + \frac{[I]}{K_1}\right)$$

și axa ordonatei în punctul $1/v_{\max}$ (fig.5).

Inhibiția competitivă se traduce grahic prin schimbarea punctului de intersecție al dreptei cu abscisa și prin mărirea pantei dreptei. Viteza maximă de reacție este aceeași, dar constanta Michaelis crește; în urma inhibiției competitive se înregistrează o scădere a afinității enzimei pentru substrat.

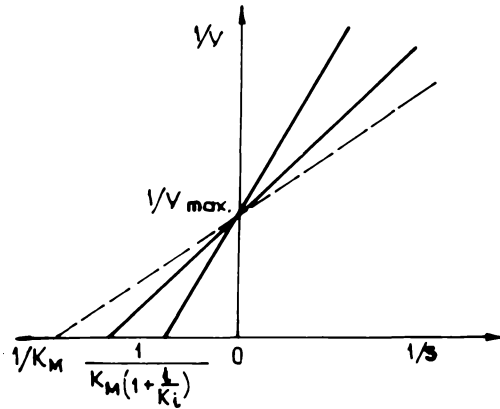
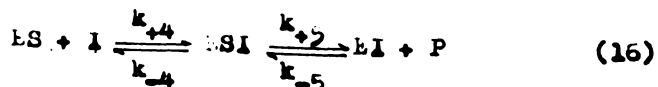
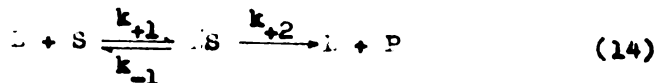


Fig.5 - Reprezentarea Lineweaver-Burk a inhibiției competitive. Linia punctată indică cazul unei reacții enzimice neinhibate.

În cazul în care inhibitorul se leagă de centrul catalitic activ, provocând o deformare a enzimei, care poate afecta viteza de reacție sau valoarea K_M .

Cazul de inhibiție necompetitivă pură, când efectorul reduce valoarea lui V_{max} și nu afectează K_M , nu apare decât în puține situații concrete, majoritatea situațiilor de inhibiție necompetitivă fiind de tip mixt. Inhibitorii cu structuri mici, de tipul protonilor sau ionilor metalici, sînt potențiali inhibitori necompetitivi.

reacțiile care au loc sînt :



Se cunosc multe cazuri de inhibiție competitivă în cinetica enzimatică. Astfel, succinat dehidrogenaza, al cărui substrat este succinatul ($K_M = 1,3 \times 10^{-3} M$) este inhibată competitiv de malonat ($K_I = 4,1 \times 10^{-5} M$), iar malonin dehidrogenaza care acționează asupra L-alaninei ($K_M = 1,7 \times 10^{-3} M$) este inhibată competitiv de izomerul D ($K_I = 2 \times 10^{-2} M$).

În cazul inhibiției necompetitive nu există nici o competiție între liganzi, substrat și efecteur, însă ri-

iar expresia vitezei de reacție în prezența unui inhibitor necompetitiv este :

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{(K_M + [S]) \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)} \quad (17)$$

Comparând această ecuație de viteză cu relația Michaelis-Menten, se constată că valoarea K_M nu este modificată, ci numai viteza maximă, $v_{\max} = v_{\max} / (1 + [I]/K_I)$.

Prelucrând ecuația (17) după procedeul Lineweaver-Burk se obține relația :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \frac{1}{[S]} + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \cdot \frac{1}{v_{\max}} \quad (18)$$

care poate fi reprezentată într-un sistem de axe rectangulare, în funcție de variabilele $1/v$ și $1/[S]$, obținându-se o dreaptă care intersectează abscisa în punctul $-1/K_M$ și axa ordonată în punctul

$$\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) \frac{1}{v_{\max}}$$

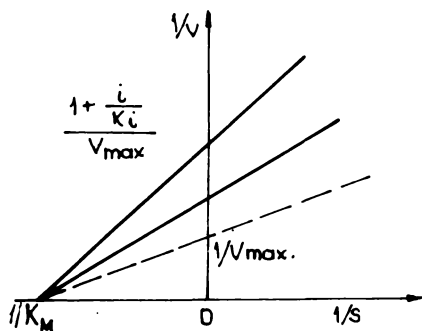


Fig.6 - Reprezentarea Lineweaver-Burk a inhibiției necompetitive
linia punctată reprezintă cazul unei reacții enzimice neinhibate

centrul catalitic activ.

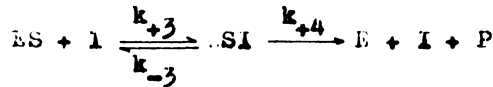
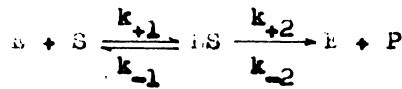
Un alt caz de inhibiție necompetitivă este cel în care inhibitorul diminuează afinitatea enzimei pentru substrat, situație greu de diferențiat de cazul inhibiției competitive /37/.

Grafic, inhibiția necompetitivă se poate traduce prin schimbarea punctului de intersecție cu axa Oy, schimbându-se și panta de înclinare a dreptei (fig.6). Viteza maximă de reacție scade, iar valoarea K_M rămâne neschimbată și deci afinitatea enzimei pentru substrat nu se modifică în urma reacției cu inhibitorul, care nu concurează cu substratul pentru legarea la centrul catalitic activ.

În cele mai multe cazuri, inhibiția necompetitivă este de tip mixt, deformarea indusă de inhibitor afectând atât V_{max} cât și K_M .

Exemple de inhibiție necompetitivă : reactivi care se pot combina reversibil cu grupările -SH ale aminoacizilor, cianuri (în cazul enzimelor care au ioni Fe în centrul activ), substanțe complementare gen BDTA etc.

Al treilea tip de inhibiție - inhibiția incompetitivă, este înregistrat în cazul în care inhibitorul nu se leagă la enzima liberă ci numai la complexul Michaelis, avînd efecte egale asupra V_{max} și K_M , dar nesfectînd raportul V_{max}/K_M :



cînd ecuația de viteză este dată de relația :

$$v = \frac{[S] \cdot V_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_I}} \quad (19)$$

$$[S] + K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

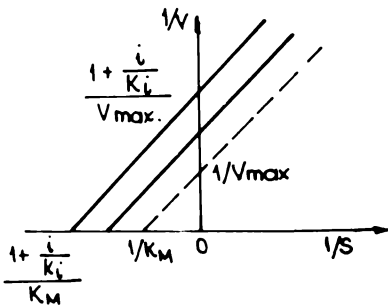


Fig.7 - Reprezentarea Lineweaver-Burk a inhibiției incompetitive
Linia punctată reprezintă cazul unei reacții enzimatică neinhibate

Comparînd ecuația (19) cu ecuația Michaelis-menten se constată că valoarea V_{max} este scuzată, iar valoarea K_M este crescută. Prelucrarea Lineweaver-Burk duce la relația :

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{max} \cdot [S]} + \frac{1}{V_{max}} \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right)$$

care reprezentată grafic conduce la o dreaptă paralelă cu cea a funcției obținute în absența inhibitorului (fig.7).

Majoritatea enzimelor se conformează cineticii Michaelis-Menten, pînă la o anumită valoare a concentrației substratului; depășirea acesteia conduce la scăderea progresivă a vitezei de reacție, ce poate ajunge la zero în cazul concentrațiilor foarte mari de substrat. Fenomenul se numește inhibiție de substrat, și se datorează probabil mai multor mecanisme, printre care amintim: fixarea pe molecula enzimei, la centrul activ, a mai multor molecule de substrat, ceea ce are drept consecință împiedicarea reacției, reducerea concentrației de apă sau creșterea concentrației ionice /43/.

În mod asemănător poate să apară inhibiția de produs, în care producția de reacție, fiind în concentrații prea ridicate, pot încetini viteza reacțiilor enzimatiche. Fenomenul se explică prin mecanismul reversibilității reacțiilor enzimatiche, producția reprezentînd în acest caz substratul reacției inverse.

În marea majoritate a cazurilor, substanțele toxice prezente în apele uzate acționează ca inhibitori ai enzimelor celulare, și pot reacționa de asemenea cu alierite proteine de structură din celulă. Răspunsul microorganismelor nămolului activ la substanțele toxice este influențat de mai multe variabile ca: natura și concentrația toxicului, timpul de contact, caracteristicile mediului format de apă uzată, condiția fiziologică a organismelor expuse /49/. Fenomenul intoxicației nămolului activ nu este elucidat; cercetările în acest domeniu s-au fost orientate mai ales în sensul determinării capacității biomasei de a suporta prezența substanțelor toxice. S-a studiat influența ionilor metalici toxici asupra nămolului activ (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , Fe^{2+}), și s-a demonstrat că acești ioni produc o scădere a eficienței de epurare; s-a observat însă o adaptare în timp a biomasei la acțiunea toxicului, și o îndepărtare a ionilor de Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Hg^{2+} din apă cu ajutorul nămolului activ variînd între 12 și 50% /50-52/.

Dintre anioni, iese în evidență toxicitatea halogenilor (mai ales a clorului) și a sulfurilor. Clorul liber are o toxicitate pronunțată asupra biocoenozei nămolului activ, în special asupra protozoarelor și metazoarelor inferioare. Bacteriile din floconul de nămol sînt mai rezistente la acțiunea clorului, dar doza letală, foarte scăzută, de 0,5 mg/l indică acest element răspunzător de distrugerea nămolului activ, în cazurile în care este prezent în reactorul instalației.

Substanțele toxice de natură organică sînt în cea mai mare măsură inhibitori enzimatici. Deosebit de important este pragul de

toxicitate, respectiv încărcarea limită (mg substanță toxică/g suspensie uscată) e cărei depășire conduce la scăderea activității nămolului activ. Un exemplu este dat de influența trinitrofenolului asupra nămolului activ : încărcarea de 110 mg/g suspensie uscată, zi, la o concentrație de TmF în influentul instalației de 50 mg/l soluție nutritivă, permite adaptarea microorganismelor la această substanță în cca. 10 zile de alimentare continuă ; încărcarea de 450 mg/g s.u.zi (concentrația TmF în influentul instalației de 200 mg/l soluție nutritivă) nu permite adaptarea microorganismelor nici după 80 zile de alimentare /53,54/.

Factori care influențează reacțiile metabolice ale nămolului activ

Procesele complexe care au loc în cursul epurării biologice a apelor uzate depind de o serie de factori care țin de :

- populație, de exemplu tipurile de bacterii heterotrofe adaptate la substanțele organice specifice din apele uzate, relațiile dintre ele, faza de dezvoltare în care se află ;
- sursa de hrană (calitatea și concentrația substratului);
- factori de mediu, dintre care acțiune importantă au substanțele toxice sau inhibante ale activității enzimatică, raportul optim între elementele majore C, N, P, temperatura, pH-ul mediului, oxigenul dizolvat, agitarea, presiunea, concentrația ionilor etc.

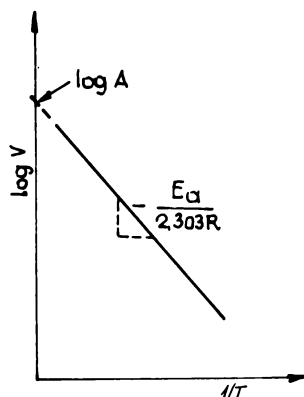
Temperatura . Efectul variațiilor de temperatură asupra activității celulelor microorganismelor și asupra răspunsului celulei la condițiile de mediu este complex ; ele pot modifica permeabilitatea membranei plasmatică, permițând pătrunderea rapidă a toxicului în celulă, și pot altera procesele de control, necesare supraviețuirii, precum și eficacitatea lor.

Astfel, temperatura are un efect remarcabil asupra vitezei reacțiilor biologice. În general, în intervalul de temperatură în care nu se realizează denaturarea proteinelor enzimatică și plastice, creșterea cu 10°C a temperaturii poate dubla viteza reacțiilor biologice, respectiv Q_{10} este în medie 2./43/.

În mod obișnuit variația vitezelor reacțiilor biologice cu temperatura este exprimată prin energia de activare a reacției, E_a , conform relației lui Arrhenius :

$$v = A \cdot e^{-E_a/RT} \quad (21)$$

unde A reprezintă o constantă cu aceleași dimensiuni ca viteza de reacție, T este temperatura absolută iar R constanta generală a gazelor.



Valoarea lui E_a (kcal/mol) poate fi obținută fie din înregistrarea vitezelor de reacție la două temperaturi diferite, fie grafic. Logaritmiind ecuația (21) se obține relația :

$$\log v = \log A - \frac{E_a}{2,303 RT} \quad (22)$$

Fig. 8 - Determinarea grafică a energiei de activare

unde $\log v$ este viteza de reacție, $1/T$ este inversul temperaturii absolute, A este constanta de preexponențială, iar E_a este energia de activare.

Pentru reacții biochimice la temperaturi de cca. 20°C , E_a are valoarea aprox. de 12000 cal/mol /3/.

În ultimii ani, s-a observat că temperaturi mai mici în bazinele de aerare influențează puternic eficiența procesului, în special în cazul epurării biologice a apelor uzate complexe, rezultate din industria chimică și petrochimică /55/, /56/. În procesele de epurare, temperatura intervine în principal asupra vitezelor de creștere a microorganismelor și asupra vitezei de consum a substratului. În general, se consideră că la temperaturi de $30-40^{\circ}\text{C}$ substratul este oxidat și biomasa este sintetizată mai repede decât la 20°C , această temperatură fiind considerată ca etalon /56-57/.

Viteza consumului biochimic de oxigen este de asemenea influențată de temperatură. S-a demonstrat astfel că, în intervalul $2-32^{\circ}\text{C}$ constanta vitezei de reacție, considerată cu cinetică de ordinul 1, nu se integrează în relația lui Arrhenius, dar că datele experimentale concordă dacă se consideră două domenii distincte, între 2 și 15°C și între $15-32^{\circ}\text{C}$, cu pante diferite /60/.

Variațiile în răspunsul-cinetic al sistemului cu nămol activ față de modificările temperaturii pot fi determinate de modul de aclimatizare al microorganismelor. Adaptarea nămolului activ la temperaturi crescute se face mai greu decât la temperaturi scăzute. Experimentele efectuate cu nămoluri active, dezvoltate la $15-20^{\circ}\text{C}$, au arătat că aceste sisteme se adaptează la 4°C în două săptămâni,

dar la temperaturi mai mari de 30°C , după câteva luni /97,50/. Temperaturile scăzute în general scad activitatea metabolică, ceea ce întârzie dezvoltarea biomasei, dar nu au altă influență negativă semnificativă, asupra dezvoltării bacteriilor din biocenoză; sensibilitate mai mare prezintă ciliatele libere și fixe care pot scădea numeric pînă la dispariție /61/.

Creșterea activității metabolice cu temperatura a determinat experimentarea epurării aerobe termofile, cu microorganismele al căror echipament genetic permite activitatea optimă la temperaturi ridicate pe ape uzate cu fenol /3/. Astfel, folosind nămol activ mezofil, adaptat la fenol, temperatura s-a fost ridicată cu cîte 2°C pînă la 55° , în 8-12 zile; la temperaturi mai mari de 55° s-a fost necesară creșterea timpului de retenție în bazinul de aerare în scopul obținerii de randamente de epurare similare. În intervalul de temperatură $38-58^{\circ}\text{C}$ au fost obținute viteze ale consumului de substrat, similare celor din domeniul temperaturilor mezofile, fenolul fiind îndepărtat în proporție de peste 95 %, la timpuri de retenție în bazinul de aerare de 6 ore.

Totuși, folosirea procedeelor cu bacterii termofile ridică numeroase probleme privind natura apelor uzate care pot fi epurate, introducerea aerului în bazinul de reacție, costul energiei, separarea biomasei, admisia efluentului în râul receptor etc.

pH-ul mediului influențează puternic activitatea nămolului activ, acționînd în primul rînd asupra activității enzimatică. Efectul pH-ului asupra vitezei reacțiilor enzimatică se poate să fie reversibil, cînd influențează gradul de ionizare al substratului, enzimei, complexului S etc., sau ireversibil - la valori extreme ale concentrației ionilor de hidrogen - cînd este denaturată proteina.

Pentru o bună activitate a nămolului activ, pH-ul apei uzate trebuie să fie cuprins în domeniul 6,5 - 8,5.

Acizii și bazele anorganice, care produc variații mari de pH, sînt foarte toxici pentru nămolul activ; acizii organici naturali, în general, și cei volatili în special, chiar dacă scad pH-ul apei uzate la valori mici, (≈ 4) nu influențează negativ activitatea microorganismelor din nămolul activ fiind ei înșiși degradați în procesul epurării, așa cum este cazul apelor uzate provenite la prelucrarea unor produse vegetale sau animale. pH-ul scăzut favorizează însă dezvoltarea ciupercilor, ceea ce contribuie la înrăutățirea structurii nămolului și a capacității lui de sedimentare.

Oxigenul - ca acceptor final al hidrogenului, rezultat din reacțiile de oxido-reducere din procesele aerobe reprezintă unul din reacțiile esențiale, concentrația lui în mediu influențând puternic reacțiile metabolice. Pentru oxidarea substanțelor organice, este necesară asigurarea introducerii satisfăcătoare de oxigen atmosferic în bazinul de aerare și un contact cât mai intim al acestuia cu biomasa.

Viteza transferului de oxigen din aer în apa din bazin este proporțională cu deficitul de O_2 în faza lichidă conform relației :

$$\frac{dc}{dt} = K(C_s - c) \quad (23)$$

unde C_s reprezintă concentrația de saturație a oxigenului dizolvat în apă la temperatura de lucru, în mg/l ; c - concentrația oxigenului dizolvat, în mg/l, la timpul t , iar K - constanta vitezei de transfer (constantă de aerare).

Integrând ecuația (23), se obține :

$$K = \frac{2,303 \log \frac{C_s - C_1}{C_s - C_2}}{t_2 - t_1} \quad (24)$$

în care C_1 și C_2 reprezintă concentrația oxigenului la timpul t_1 , respectiv t_2 , reprezentînd grafic valorile determinate experimental, în condiții standard (concentrația în oxigen a apei din bazin ≈ 0 mg/l , $p = 760$ mm Hg , $t = 10^\circ C$), în $(C_s - c)$ în funcție de t , se obține o dreaptă a cărei pantă este egală cu K . Aducerea valorii lui K , determinată în alte condiții de temperatură, la valoarea standard se face ținînd seama de dependența de temperatură a vitezei de difuzie a oxigenului în apă, și anume : /5/

$$K_{10} = K_t \cdot \sqrt{\frac{D_{10}}{D_t}} \quad (25)$$

unde K_{10} reprezintă constanta de aerare standard ; K_t - constanta de aerare la temperatura experimentului ; D_{10} coeficientul de difuzie la $10^\circ C$; D_t - coeficientul de difuzie la temperatura experimentului.

Suspensiile existente în apa reziduală și nămolul activ existent în instalațiile de epurare influențează transferul de oxigen prin caracteristicile generale conferite amestecului apă-

suspensii - aer, respectiv prin densitate, vîscozitate și condițiile interfeței aer-apă, adică prin mărirea timpului de contact aer-apă /62/. De aceea, pentru determinarea corectă a necesarului de oxigen din bazinul de aerare trebuie să se țină seama de factorul de corecție α , care reprezintă raportul dintre coeficientul de transfer al oxigenului în apa uzată K_u , și coeficientul de transfer al oxigenului în apa curată, K_c :

$$\alpha = \frac{K_u}{K_c} \quad (26)$$

Aerarea apelor reziduale în bazinele de aerare trebuie să asigure omogenizarea amestecului apă uzată - nămol activ și să favorizeze difuzia oxigenului dizolvat în toată masa, fără să se creeze zone în bazinul de aerare în care viteza transferului reactanților (substrat și oxigen) la nivelul celulei să devină factorul limitativ al dezvoltării biomasii.

S-a demonstrat că astorită geometriei și structurii flocoanelor de nămol activ, fenomenul de difuzie ca și procesele metabolice fac ca în interiorul floconului concentrația în oxigen dizolvat să fie mult mai mică decît la suprafața lui. Astfel, la concentrații de aprox. 1-2 mg O_2 /l în mediu, în centrul floconului se asigură o concentrație de 0,1 mg O_2 /l. /5/. Viteza de difuzie a oxigenului în flocon este la rîndul ei influențată de mai mulți factori fizici și biochimici, dintre care agitarea sistemului, starea fiziologică a nămolului activ și vîrsta lui, precum și natura substanțelor organice din apă și raportul între elementele biogene C : N : P au o deosebită importanță în menținerea condițiilor de aerobie în interiorul floconului. Din aceste motive se consideră necesară o concentrație minimă de oxigen în lichidul din instalația de aerare de 1,5 - 3 mg/l /63/ sau 0,4 - 0,5 mg O_2 /l /64-66/.

Îndepărtarea din apele uzate industriale a unor impurități poate fi sensibil influențată de concentrația de oxigen dizolvat din bazinul de aerare, astfel, îndepărtarea fenolului, care în mod obișnuit nu pune probleme fiind asimilat cu ușurință de către nămolul activ, are eficiență scăzută în condițiile concentrațiilor scăzute de oxigen (sub 1 mg/l) ; de asemenea eliminarea lui este influențată de prezența în mediul apos a substanțelor superficial active care pot împiedica transferul de oxigen /67/.

Turbulența este un factor care influențează activitatea metabolică a nămolului prin menținerea suspensiei de nămol activ în mediu, realizarea contactului intim între substrat, oxigen și microorganisme, îndepărtarea straturii apos din imediata vecinătate

a floconului, streat sărăcit în oxigen și substanțe nutritive și încărcat cu produși de metabolism, reușind astfel continua aprovizionare a microorganismelor.

Se asemenea, turbulența crescută reduce dimensiunea flocoanelor datorită fenomenului de forfecare, mărină astfel suprafața de contact a agregatelor bacteriene, viteza de asimilare a impurităților și viteza de respirație. Turbulența crescută prezintă însă dezavantajul producerii de efluenți tulburi, care pot fi înșă eliberați de microflocoane prin reflocularea în bazine de sedimentare prevăzute cu timp de retenție mai mare.

Factorii esențiali de creștere și ionii anorganici sînt absolut necesari pentru dezvoltarea normală a biocenozei. Dintre aceștia, un rol important revine compușilor cu azot și fosfor; azotul avinđ rol plastic (constituent al enzimelor, proteinelor, acizilor nucleici) și în mică măsură de donoz și acceptoz de electroni, la bacteriile nitrifiante, respectiv denitrifiante, iar fosforul avinđ rol energetic. Raportul între concentrația substanțelor organice, determinată ca CBO_5 și necesarul de azot și fosfor, necesar asigurării unei bune funcționări a instalațiilor de epurare biologică, este cuprins între 90 și 150 CBO față de 5 N și 1 P. În tratarea apelor uzate industriale, acest raport trebuie corectat, urmărindu-se periodic calitatea efluentului și din punctul de vedere al sărurilor de azot și fosfor; în acest sens, trebuie ținut cont de faptul că ionii de Ca sau Mg din ape uzate cu pH crescut precipită sărurile de fosfor; în același timp, supradozarea elementelor biogene în bazinul de reacție și deci prezența în concentrații crescute în efluentul instalației de epurare conduce la efecte secundare neozrite în riurile sau lacurile receptoare, fenomenul eutroizării fiind cel mai frecvent.

Concentrația ridicată de săruri în apele uzate influențează nefavorabil procesul de epurare biologică, datorită presiunilor osmotice la care sînt supuse celulele microorganismelor. Totuși, concentrațiile în cloruri și sulfazi suportate de nămolul activ sînt destul de mari, de ordinul gramelor la litru; se recomandă înșă ca ele să nu depășească 10-12 g/l /68/. Unele experimentări /69/ au aratat că este posibilă epurarea biologică a anilinei și fenolului dizolvate în soluții cu conținut de săruri mai mare de 3,5 %, în condițiile utilizării unor bacterii aclimatizate și ale unui timp de retenție hidraulic de ordinul zecilor de zile.

2.1.2. Tehnologia de epurare biologică a apelor reziduale

Procedeele de epurare biologică a apelor reziduale utilizează una din cele două grupe, fiziologic diferite, de microorganisme : aerobe sau anaerobe. Microorganismele anaerobe sînt folosite pentru fermentarea nămolurilor și fermentarea unor ape reziduale industriale. Microorganismele aerobe sînt folosite în mod curent în epurarea majorității apelor uzate cu caracter predominant organic și în tratarea nămolurilor organice. Alimentația biocenozelor se face continuu sau discontinuu, cu apă reziduală sau cu solidele organice separate din aceasta. Pentru epurarea aerobă a apelor, cele mai utilizate procedee sînt : cu nămol activ, biofiltre, iazuri de oxidare.

Deși aceste procedee diferă între ele prin timpul de contact între microorganisme și apa uzată, necesarul de oxigen, modul de utilizare al nămolului biologic etc., fenomenele biochimice esențiale sînt identice. În ultimii ani, în epurarea biologică a apelor reziduale industriale s-a impus procedeul cu nămol activ. Principial, tehnologia de epurare a apelor reziduale în instalațiile cu nămol activ a rămas neschimbată de la introducerea procedurii /34,3/, și astăzi (fig.9) /5/ :

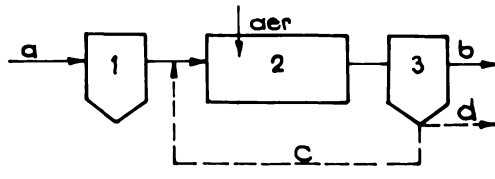


Fig.9 - Fluxul tehnologic al epurării apelor uzate cu nămol activ
1 - decantor primar; 2 - bazin de aerare; 3 - decantor secundar;
a - influent; b - efluent spre riul receptor; c - nămol recirculat; d - nămol excedentă spre tratare

- apa uzată (influența stației de epurare) este preparată mecanic, respectiv separată de o parte a suspensiilor prin sedimentarea acestora în decantorul primar (1), sau prin procese fizico-chimice, dacă este cazul, este amestecată cu nămolul recirculat și este aerată împreună cu nămolul activ în bazinul de aerare (2), în așa fel încît oxigenul dizolvat să satisfacă necesitățile de mediu

ale microorganismelor aerobe aglomerate în flocoane, iar acestea să se mențină în suspensie ;

- apa epurată (efluentul stației de epurare), lipsită în procent de peste 95 % de substanțele organice degradabile, este separată de nămol prin sedimentarea acestuia în decantorul secundar (3) și condusă spre râul receptor ;

- nămolul activ depus în decantorul secundar este recirculat în bazinul de aerare și amestecat cu apa de tratat ;

- nămolul activ excedentar, rezultat din procesele care au loc în reactor în timpul epurării este scos din circuit, pentru ca în bazinul de aerare să rămână concentrația de biomasă stabilită ca optimă.

Variantele procesului cu nămol activ diferă, în principal, prin modul de alimentare și prin raportul între substrat și microorganisme.

Deosebit de important în epurarea biologică este transferul de poluanți din apa uzată spre biomasă prin contact interfacial și prin adsorbție-absorbție. Aceste operații sînt rapide și eficiente atunci cînd interfața apă uzată-biomasă este mare, gradientul de concentrație a substanței de îndepărtat în procesul epurării biologice are pantă abruptă și cînd nu se formează la interfață pelicule lichide care să împiedice transferul de substanțe în și din celulele microorganismelor sau să acumuleze substanțe nocive.

Schematic, procesul de epurare biologică are loc în reactor astfel : substanțele organice din apele uzate sînt adsorbite și concentrate la suprafața biomasei ; aici, prin activitatea enzimelor eliberate de celulă (exoenzime), substanțele sînt descompuse în unități mici care pătrund în celula microorganismelor unde sînt metabolizate ; o parte a reacțiilor care au loc furnizează energie reacțiilor prin care se formează masa celulară nouă, iar produșii finali ai descompunerilor (produși de oxidare ca CO_2 , H_2O , azotați, sulfatați, substanțe organice stabile) sînt eliberați în mediu (fig. 10)/3/ ; moleculele mici de substanțe organice, siflate în mediul apos, pot difuza în celulă fără să fie adsorbite pe suprafața acesteia.

În epurarea biologică a apelor uzate, independent de eliminarea substanței organice impurificatoare, se obține creșterea biomasei sub forma materialului celular insolubil, sedimentabil, precum și produși reziduali (de metabolism sau din distrugerea celulelor), unii ușor de îndepărtat, ca CO_2 , alții care rămîn dis-

persați în mediul lichid, conferind o anumită valoare CO_2 -ului și CH_2O -ului apei epurate. Pentru nămolul activ se aproximează, în general, creșterea biomasei la 40-60 % din cantitatea de substanță organică asimilabilă din apă uzată.

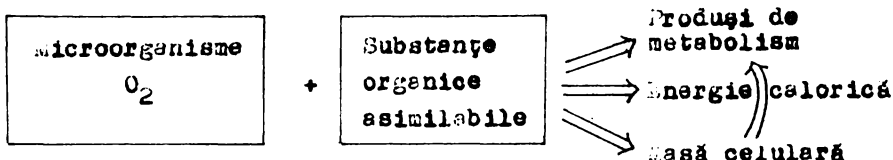


Fig.10 - Schema proceselor generale de metabolism în epurarea aerobă

În general, la îndepărtarea satisfăcătoare a substanțelor organice din apele uzate prin procese biologice iau parte :

- fenomene fizice de transfer de masă (separarea prin sedimentare a suspensiilor groasere din apă uzată brută, a suspensiilor obținute prin coagulare, ca și a materialului celular sedimentabil din apă tratată ; introducerea oxigenului din aer în apă ; difuzia oxigenului dizolvat ca și a substratului nutritiv în celulele microorganismelor ; adsorbția substanțelor dizolvate, a particulelor coloidale și a suspensiilor fine pe suprafața biomasei ; desorbția produșilor de metabolism în mediu etc.) ;
- fenomene chimice (reacții de hidratare, reacții de hidroliză, reacții de precipitare, modificări ale pH-ului ; reacții de oxido-reducere nebiologice etc.) ;
- fenomene biochimice (reacții catabolice - oxidarea substratului, respirația endogenă, reacții anabolice - creșterea biomasei ; inhibarea reacțiilor enzimactice de către substanțe toxice etc.) ;
- fenomene hidraulice (de curgere, distribuția apei uzate în reactor ; timpi de retenție ; viteze de sedimentare ; încărcări hidraulice etc.).

2.1.3. Analiza critică a proceselor de epurare biologică

Datorită reacțiilor biochimice, de oxidare și sinteză, care au loc în bazinul de aerare, aportul continuu de reactanți-substrat și oxigen - ar conduce la dezvoltarea rapidă și fără restricții a biomasei și la eliminarea totală a substanțelor organice din

efluent. Totuși, teoria și practica epurării biologice arată atât dezvoltarea restrictivă a biomasei, cât și limitarea eficienței de îndepărtare a substanțelor organice la valori ce nu depășesc 90 - 95 % (exprimate în CBO_5). Această limitare a eficienței proceselor de epurare biologică se poate explica prin teoria reactorilor biologice, corelată cu cinetica reacțiilor enzimactice și cu cinetica dezvoltării biomasei în condițiile limitării hranei /37-40; 78-80/; aceste teorii consideră că viteza proceselor crește cu creșterea concentrației substratului, pînă la atingerea unei viteze maxime, constante, în efluent rămînînd astel câteva procente din concentrația inițială a substratului, nedegradat, pe lînga alte câteva procente formate din compuși organici, metabolizi rezultați în timpul proceselor. Eficiența proceselor de epurare biologică este influențată de însuși factorii principali ai procesului, și anume: substratul, cultura, aportul de oxigen, dimensionarea și exploatarea instalației de epurare, temperatura, timpul de reacție între substrat și biomasă, realizat în reactor, tipul și viteza reacțiilor care au loc în timpul degradării substratului.

Pentru a se obține rezultate bune în epurarea biologică a apelor uzate este necesar să se respecte anumite reguli de proiectare și exploatare ;

- apa uzată sa fie tratabilă biologic ;
- printre componenți, apa uzată să conțină elemente și factori esențiali, în principal N și P, în raporturi față de substanța organică : $\text{CBO}_5:\text{N}:\text{P} = 90-150:5:1$;
- pH-ul influentului reactorului să fie cuprins între 7,0 și 8,5 existînd posibilitatea depășirii temporare a acestor limite pînă la cel mult 6 și 10 ;
- apa uzată să fie lipsită de substanțe inhibitoare ale proceselor vitale ale microorganismelor, ca ioni metalici și substanțe organice ;
- compoziția influentului instalației și debitul lui să rămînă pe cît posibil constante ;
- încărcările în substanțe organice, convenționale, să fie de 0,3 - 0,5 kg CBO_5/kg s.u.zi ;
- sistemele de aerare trebuie să asigure în mod permanent condiții de aerobie în reactor ;
- biomasa să fie sub forma suspensiilor sedimentabile, evitîndu-se sau corelînd fenomenul de umflare, nedorit.

Chiar dacă aceste reguli de exploatare a instalațiilor de epurare biologică sînt respectate, în funcționarea lor pot să

apară dereglări ce au ca rezultat eficiențe scăzute de epurare, datorate fie deversarilor accidentale de substanțe toxice în instalație, fie scăderii temperaturii sub 10°C , în perioadele reci ale anului. Aceste situații impun introducerea în proces a unor trepte suplimentare de epurare avansată.

2.2. Epurarea apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice prin procedee de oxidare chimică

Între metodele avansate de epurare, superioare din punct de vedere al eficienței, celor clasice, un loc aparte ocupă oxidarea chimică, datorită faptului că ea prezintă un potențial mare de eliminare din apele reziduale a compușilor "rezistenți" față de procesele biologice sau epurările terțiare. Larg utilizați în tratarea apelor în scopuri potabile, oxidanții chimici nu au fost folosiți în tratarea apelor reziduale datorită costului lor ridicat și faptului că, în aceste cazuri, nu erau necesare metode de tratare atât de energice. În ultimii ani însă, condițiile de calitate impuse apelor reziduale la deversarea în emisari, au determinat utilizarea tot mai largă a oxidanților chimici puternici în tratarea apelor. Între agenții de oxidare utilizați în practică amintim: permanganatul de potasiu, apa oxigenată, ozonul, clorul și bioxidul de clor.

2.2.1. Oxidarea fenolilor și aminelor aromatice cu ozon

Primele experiențe de utilizare a ozonului în tratarea apelor datează din 1887, iar în 1893 s-a realizat prima instalație pentru ozonizarea apei la Oudshorn în Olanda. În timp ozonizarea a devenit o metodă foarte importantă de dezinfecție și oxidare a apei, fiind utilizată în multiple scopuri în tratarea apelor potabile. În urma studiilor efectuate pentru a determina efectul ozonului asupra principalelor componente din apele reziduale: substanțe tensioactive anionice, biologic rezistente, hidrocarburi saturate și nesaturate, insecticide din clasa hidrocarburilor clorurate, acizi humici, fier, mangan, cianuri, fenol, ozonul este utilizat tot mai mult și în epurarea apelor reziduale industriale.

Dintre multiplele aplicații ale ozonului în tratarea apelor și epurarea apelor reziduale, ne vom referi în continuare la ozonizarea fenolilor și aminelor aromatice, în scopul eliminării lor din ape.

Primele încercări de ozonizare a fenolilor datează de la sfârșitul secolului XIX și începutul secolului XX, când Boeke (1873) și Otto (1893) au studiat reacția dintre ozon și pirogalol, respectiv fenol, catecol, rezorcină și hidrochinonă, iar Gibbs (1910) a ozonizat fenolul și a identificat, ca produși ai reacției de oxidare, hidrochinonă, chinonă, esteocol, acid glioxalic și bioxid de carbon. Cercetările ulterioare au fost orientate în elucidarea structurii moleculei de ozon și a mecanismelor reacțiilor de oxidare cu ozon a diferiților compuși.

Din spectrul de microunde al moleculei de ozon s-a demonstrat că molecule de ozon este diamagnetică, legăturile oxigen-oxigen sînt egale între ele, au o lungime de $1,278 \text{ \AA}$ și formează între ele un unghi de $116^{\circ} 49'$, și are un moment dipol scăzut, de $0,49 - 0,58 \text{ D}$. Pe această bază, molecula de ozon poate fi reprezentată prin următoarele formale de rezonanță (I), (fig. 11) :

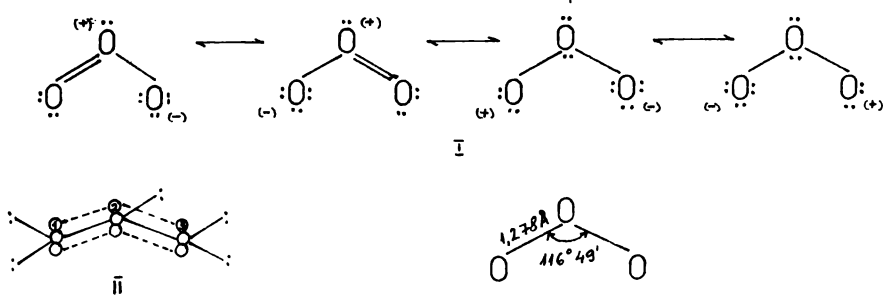


Fig.11 - Molecula de ozon

O reprezentare simplă a orbitalilor moleculari ai moleculei de ozon este descrisă în fig.11 (II). Fiecare atom de oxigen prezintă o hidridizare sp^2 ; orbitalii hibridi sp^2 sînt ocupați atât cu electronii care participă la legătură, cât și cu electronii neparticipanți, iar prin suprapunerea orbitalilor p se formează un orbital molecular π extins, ocupat cu 4 electroni.

Această structură a moleculei de ozon îi conferă acestuia o mare reactivitate. Se poate presupune că ozonul se va comporta în reacții cu un dipol 1,3, un electrophil sau un nucleofil. Probabilitatea ca, în reacțiile de ozonizare în soluții apoase sau în suspensii, care au loc, în general, la temperatura camerei, ozonul să se comporte ca un radical, sau să aibe loc descompunerea ozonului cu formare de oxigen molecular și atomic, este mică. Un mecanism radicalic implică folosirea temperaturilor ridicate, a catalizatorilor sau a fotolizei. Ozonul este un oxidant foarte puternic

(al patrulea ca tărâie după F_2, F_2O și O^*) și oxidează mulți compuși organici și anorganici.

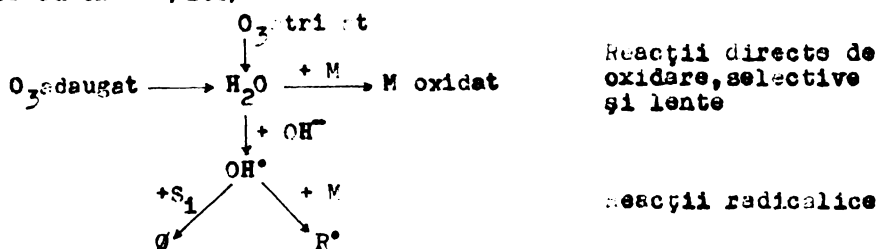
În soluții apoase, o parte din ozon reacționează direct cu substanțele dizolvate în apă (M), reacția fiind selectivă și lentă, iar o altă parte se transformă rapid în radicali liberi OH^* . Transformarea în radicali OH^* este inițiată de ioni OH^- și decurge cu atât mai rapid cu cât pH-ul este mai ridicat.

Radicalii OH^* sînt oxidanți puternici, neselectivi, care pot acționa în două moduri :

a) Formează cu substanțele dizolvate în apă (M) radicali R^* secundari (R^*), care funcționează ca promotori ai reacțiilor în lanț.

b) Pot fi captoși de unii compuși întrerupători de lanț (scavengers Si) ca de exemplu ioni bicarbonat și carbonat, rezultînd specii inactive ϕ , inhibitori ai reacțiilor în lanț.

Procesul de oxidare cu ozon reprezintă o suprapunere a celor două tipuri de reacții : "oxidare directă" și "reacții radicalice cu OH^* " /196/



unde : M = substanță dizolvată ; Si = inhibitori ai reacției radicalice (scavengers) ; R^* - radicali, promotori ai reacțiilor în lanț ; ϕ = specii inactive.

Cele două procese pot fi influențate prin diverși factori, rezultînd produși de reacție diferiți. În multe cazuri practice, ambele procese sînt de importanță comparabilă.

Date asupra reacțiilor directe de oxidare se obțin prin studierea procesului de ozonizare la pH-uri scăzute, cînd descompunerea ozonului este lentă, și cînd se adaugă inhibitori ai reacției radicalice. Informații asupra reacției radicalice se pot obține prin urmărirea reacției de oxidare cu ozon în domeniul de pH alcalin.

Reacțiile directe de oxidare cu ozon sînt reacții de ordinul 1 atât față de concentrația ozonului, cît și față de concentrația substratului M. Expresia vitezei de eliminare a substanței

M este : /106/ :

$$-\frac{d[M]}{dt} = -\eta \cdot \frac{d[O_3]}{dt} = \eta \cdot k_{O_3} \cdot [O_3] \cdot [M] \quad (27)$$

unde : M = concentrația substanței M ;

$[O_3]$ = concentrația ozonului ;

t = timpul de reacție ;

k_{O_3} = constanta vitezei reacției de oxidare cu ozon ;

η = randamentul reacției.

Pe baza determinărilor experimentale, s-au calculat constantele vitezelor reacțiilor directe pentru diferiți compuși organici, care sînt prezentate, în funcție de timpul de reacție, în fig.12/109/.

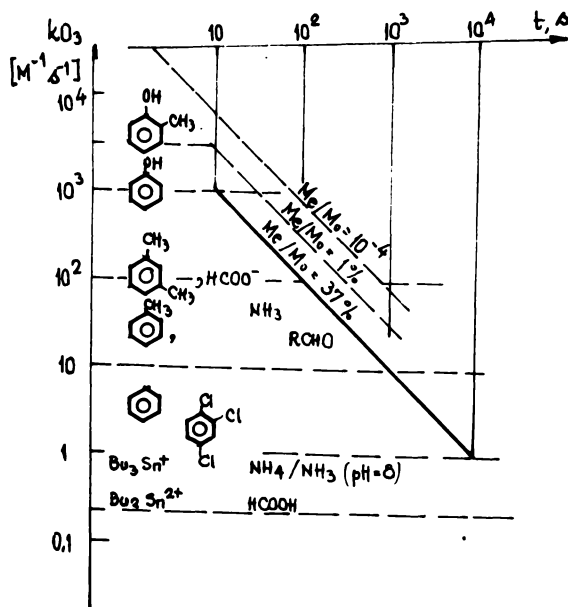


Fig.12 - Vitezele reacțiilor de oxidare directă cu ozon a unor compuși organici

Practic, se pot elimina din apă numai acei compuși pentru care valorile timpului de reacție sînt mai mici de 1000 s. Substituția la nucleul benzenic poate mări viteza de reacție; astfel, fenolii și clorfenolii pot fi oxidați ușor, în timpi de ordinul minutelor /110/.

În cazul reacțiilor de oxidare cu ozon prin intermediul radicalilor OH^\cdot /106/, expresia vitezei de eliminare a substanței

M este :

$$-\frac{dM}{dt} = \frac{dO_{3,\Delta}}{dt} = \eta' \cdot \eta'' \cdot \frac{k'_M [M]}{\sum (k_i' S_i)} \quad (28)$$

unde :

- $O_{3,\Delta}$ = cantitatea de ozon descompusă ;
- η' = randamentul de formare a radicalilor OH din ozonul descompus ;
- η'' = randamentul de oxidare a compusului M de către radicalii OH ;
- k'_M, k_i' = constantele vitezelor reacțiilor în care radicalii OH reacționează cu substratul M sau inhibitorii S_i .

Primum studiu detaliat al oxidării fenolului cu ozon în soluții apoase a fost făcut de Eisenhauer /54, 55/, care a identificat, ca produs inițial al reacției de oxidare, catecolul. (Figura 13). Concentrația catecolului atinge un maxim în primele minute ale reacției, după care scade, pe măsură ce atât catecolul cât și fenolul reacționează în continuare cu ozon. Eisenhauer

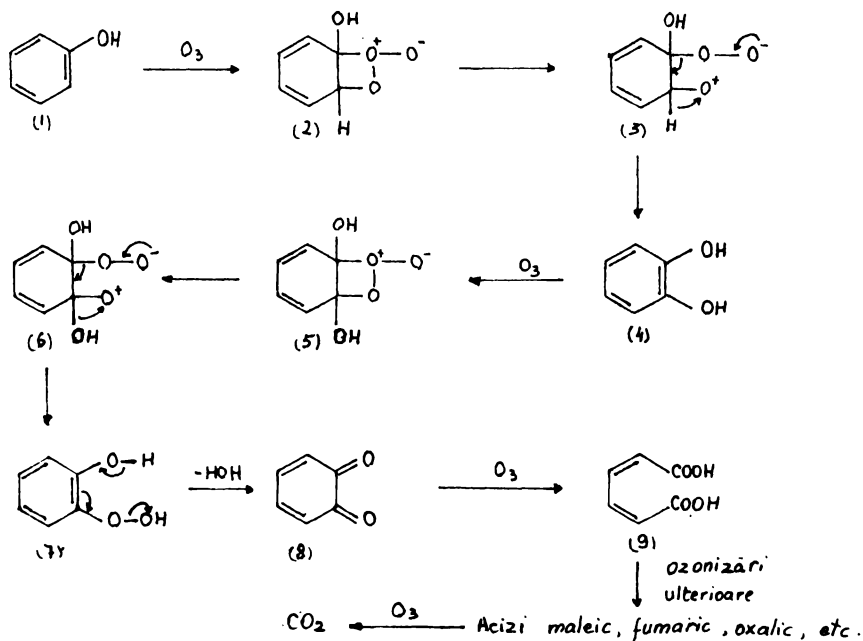


Fig.13 - Mecanismul propus de Eisenhauer pentru ozonizarea fenolului

presupune că pirocatechina este oxidată în continuare la o-chinonă, care a fost identificată ca un constituent minor în amestecul de reacție. De asemenea, s-a fost identificată, ca și produși intermediari, hidrochinona și p-chinona. Se admite că o-benzochinona este oxidată în continuare de ozon la acid cis,cis-muconic, iar acesta, la rândul lui este oxidat la acid maleic, acid fumaric și acid oxalic, și în final, la bioxid de carbon. Gould și Weber /83/ demonstrează că reacția majoră a procesului este para-substituția cu formare de hidrochinonă; ei identifică în amestecul final glioxal, acid glioxalic și acid oxalic.

Cercetări recente confirmă intermediarii de reacție propuși de Eisenhauer, dar infirmă mecanismele propuse pentru formarea lor, demonstrând că obținerea catecolului și hidrochinonei are loc printr-un atac electrofil al ozonului la nucleul aromatic (figura 14), și nu prin adiție. Faptul că reacția de oxidare cu ozon a fenolului este catalizată de baze este un argument în plus pentru un astfel de mecanism, deoarece anionul fenoxid este mult mai reactiv în reacțiile de substituție electrofilă decât fenolul. De asemenea, oxidarea catecolului la o-chinonă presupune un atac electrofil al ozonului (4 → 10 → 8), iar trecerea de la o-chinonă la acid muconic are loc prin ozonoliza sistemului de duble legături din chinonă (8), și nu prin atacul nucleofil al ozonului într-o reacție tip Bayer-Villiger (8 → 19 → 20 → 9) care, deși posibilă, este mult mai lentă.

Cele mai complete studii referitoare la ozonizarea fenolului aparțin lui Niki și colaboratorii /165/, care au ozonizat fenolul în apă la 30°C. Produșii finali ai reacției au fost acidul formic și bioxidul de carbon, iar ca intermediarii de reacție s-au identificat: catecol (4), hidrochinonă (12), acid cis,cis-muconic (9), aldehidă muconică (17), aldehida acidului maleic (23), acid glioxalic (27), glioxal, acid oxalic și apă oxigenată (figura 14). Ei consideră că atacul inițial al ozonului la fenol are loc, atât printr-o hidroxilare (1 → 10 → 4), cât și prin ruperea legăturilor (1 → 11 → 14 → 9 sau 17). De asemenea, ei au elucidat mecanismele oxidării ulterioare cu ozon a acidului muconic (figura 15).

Cercetările referitoare la oxidarea cu ozon a difenolilor și a fenolilor substituiți /166, 165, 157-159, 162/ au demonstrat că grupările alchil și hidroxi în moleculă măresc viteza atacului ozonului la nucleu. S-a demonstrat de asemenea că, în soluții apoase, sînt necesari 4-6 moli ozon pe mol de fenol pentru distrugerea nucleului aromatic /83-85, 161, 162/, iar pentru distrugerea tuturor compușilor organici în CO₂, sînt necesari minim 150 moli de ozon/83/.

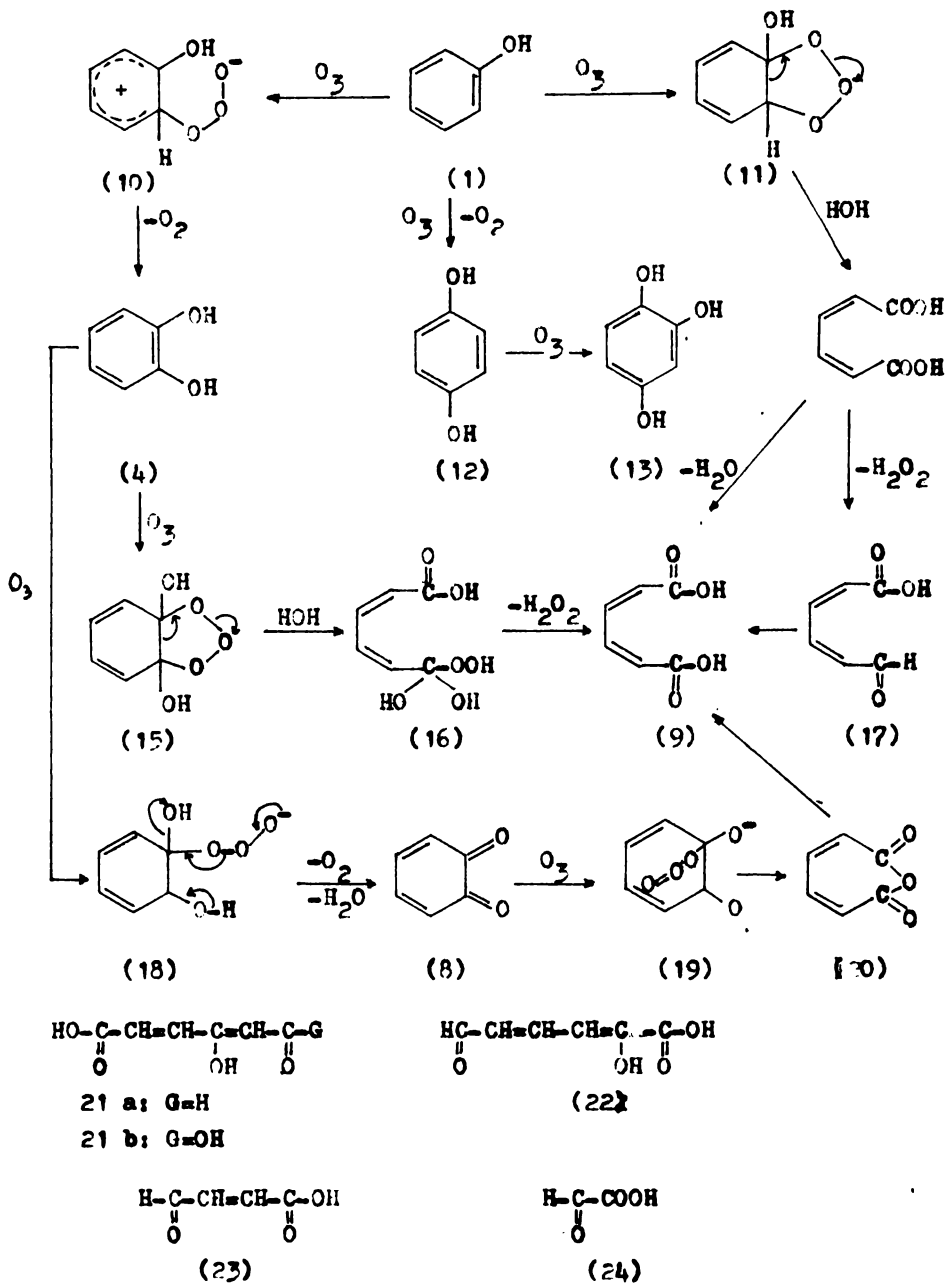


Fig.14 - Ozonizarea fenolului in apa

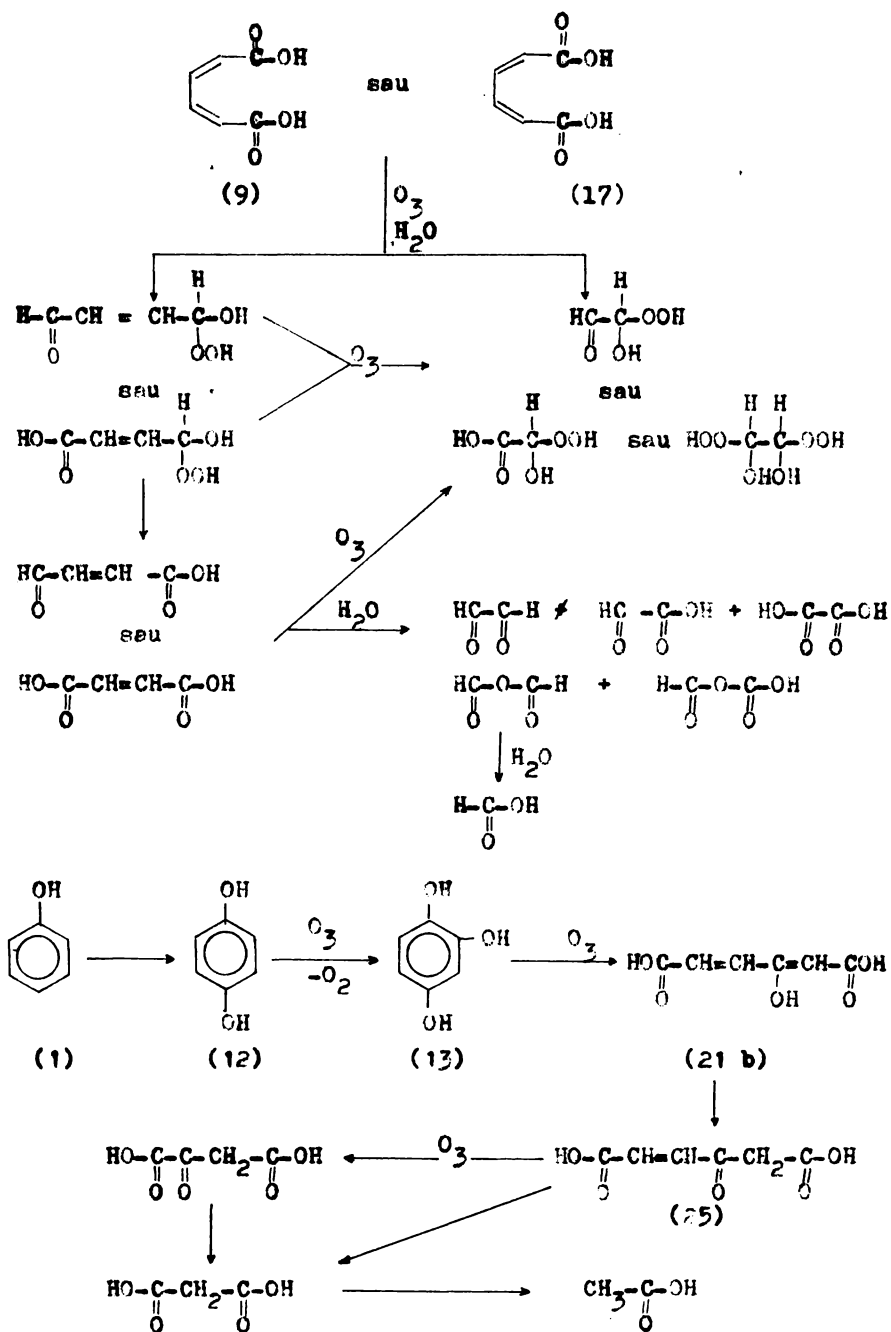


Fig.15 - Degradari totale in ozonizarea fenolului

Aminele aromatice sînt deosebit de reactive față de ozon /168-181/. Studiindu-se reacția de oxidare cu ozon a anilinei, p-toluidinei, p-nitroanilinei, p-fenilendiaminei, p-aminorezolului, acidului sulfonic, s-au identificat, ca produși de reacție, nitroderivați, azobenzeni, chinonimine și polimeri. În figura 16 este prezentat mecanismul oxidării cu ozon a anilinei și a derivaților ei substituiți la nucleu /177/. Se observă că are loc un atac al ozonului la atomul de azot, urmat de disocierea aductului amin-ozon, prin două reacții competitive: eliminarea de oxigen cu formare de amin-oxizi, și în final de nitroderivați și scindarea cu formarea unui cation-radical aromatic.

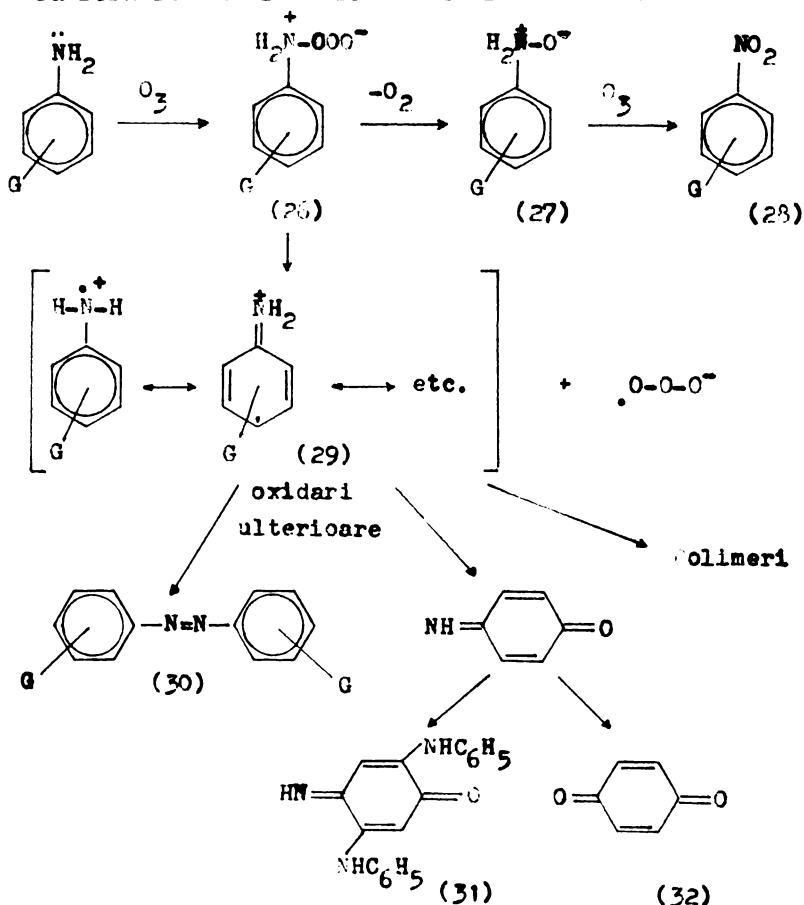


Fig.16 - Ozonizarea aminelor aromatice primare

...area ușurință cu care ozonul reacționează cu fenolii și aminele aromatice în soluții apoase, și formarea de produși de reacție nepoluantți, ca bioxidul de carbon sau polimeri in-

solubili, fac posibilă utilizarea ozonului în epurarea apelor reziduale cu conținut de fenoli și amine aromatice.

Schema generală a unei instalații de epurare cu ozon a apelor reziduale este prezentată în figura 17 /82/.

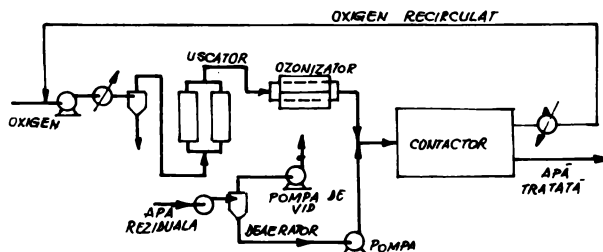


Fig.17 - Ozonizarea în sistem închis cu recirculare

Procesul cuprinde următoarele faze principale : uscarea aerului, obținerea aerului ozonizat și amestecarea aerului ozonizat cu apa de tratat.

Ca materii prime pentru obținerea ozonului pot servi aerul atmosferic, aerul îmbogățit în oxigen sau oxigenul pur. Aerul cu care se alimentează ozonizatorul este în prealabil uscat, deoarece în prezența umidității crește consumul de energie și se formează compuși cu azot (NO , NO_2 , HNO_3), care exercită o acțiune distructivă asupra electrozilor. Uscarea aerului se poate realiza practic prin două metode :

a.- adsorbție pe alumina activă, silicagel sau site moleculare ; metoda se aplică în instalațiile mici ;

b.- în instalațiile mari se procedează, în general, înainte de a trece aerul peste materialul adsorbent, la o condensare parțială a vaporilor de apă, prin scăderea temperaturii la $2-5^{\circ}\text{C}$.

Aerul uscat este trimis în generatorul de ozon unde, sub acțiunea descărcărilor electrice, se obține un amestec de ozon-aer, cu un conținut de până la 5 % ozon (în greutate), sau ozon-oxigen, conținând până la 10 % ozon (în greutate). Depășirea acestor limite maxime nu este posibilă datorită reacției inverse de descompunere a ozonului.

Amestecul aer-ozon rezultat este amestecat cu apa reziduală într-un contactor, timpul de contact variind în funcție de natura apei reziduale și de tipurile de instalații. Apa reziduală, înainte de a fi tratată, este deaerată, pentru eliminarea azotului. După

ozonizare, apa tratată și gazele părăsesc separat contactorul. Gazul recirculat, care conține oxigen, ozon rezidual, apă și impurități, se introduce în instalație înainte de faza de condiționare a gazului care alimentează generatorul de ozon.

Intr-o instalație complexă de epurare a apelor reziduale, locul treptei de ozonizare depinde de scopul urmărit.

Astfel, pentru epurarea unui efluent de la rafinării, pentru care se admite, la deversare, un conținut de fenol mai mic de 0,015 ppm, se utilizează o tehnologie complexă de epurare ce constă în tratare biologică cu nămol activ, filtrare și ozonizare finală /149/. Prin ozonizare se realizează o reducere de 96 % a fenolului din apă, concentrația fenolului în efluent scăzând de la 0,38 ppm la 0,012 ppm, pentru doze de ozon de 20-40 ppm.

La uzinele Boeing din Kansas, /149, 151/, ozonul este folosit curent pentru tratarea unei ape reziduale care conține cianuri, fenoli, ulei, detergenți, sulfuri, sulfat și cromat. Tratarea cu ozon este precedată de un tratament primar, care constă în eliminarea uleiurilor, tratarea cramaților cu dioxid de sulf, controlul pH-ului, coagulare și limpezire. Doza de ozon este de aprox. 20 ppm, și se aplică în două turnuri de contact cu difuzoare, prin care apa curge în serie. După ozonizare, efluentul final este trecut într-un lac, unde absența compușilor toxici și a poluanților este pusă în evidență prin prezența peștilor vii.

2.2.2. Oxidarea fenolilor și aminelor aromatice cu hipoclorit de sodiu și bioxid de clor

Utilizați în tratarea apelor în scop potabil, pentru dezinfecție, sterilizare, eliminarea gustului și mirosului, decolorare etc., hipocloritul de sodiu și bioxidul de clor, compuși cu caracter oxidant puternic, sînt aplicați în prezent și în epurarea apelor reziduale pentru distrugerea oxidativă a fenolilor și a altor compuși organici.

Hipocloritul de sodiu, care conține și 2-15 % clor, se utilizează în epurarea apelor reziduale sub formă de soluție. Proprietățile sale oxido-reductoare depind de pH-ul mediului de reacție (figura 16).

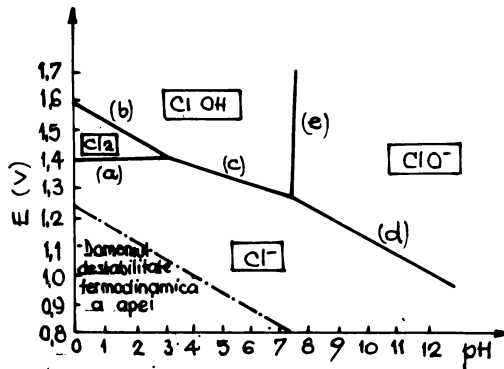
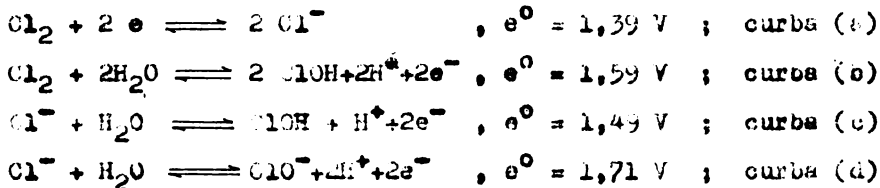


Figura 16 - Diagrama potențial redox-pH pentru sistemele : $ClOH/Cl_2$, Cl_2/Cl^- , $ClOH/Cl^-$ și ClO^-/Cl^-

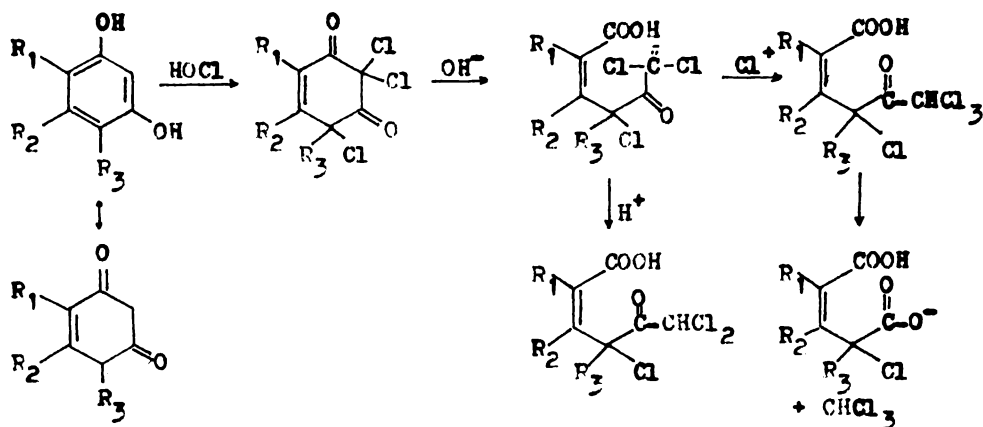
Această diagramă corespunde pentru diverse echilibre :



Se observă că dreptele (a), (b) și (c) se întretaie la $pH = 3,4$, de unde se desprinde concluzia că acidul hipocloros se reduce la clorură numai la valori de $pH > 3,4$. Dreptele (c) și (d) se intersectează la $pH = 7,5$, care este de fapt pKa al acidului hipocloros (curba e).

În soluție, în funcție de pH -ul mediului de reacție, vor exista diferite specii active (ClO^- , $ClOH$, Cl_2), care vor oxida compușii organici din apă.

Mecanismul reacțiilor de oxidare a fenolilor și aminelor aromatice cu hipoclorit de sodiu nu este încă elucidat. S-a observat însă că, în urma reacțiilor de oxidare a fenolilor cu hipoclorit se obțin și mici cantități de trihalometani și alți compuși organici clorurați, toxici pentru organismul uman /194-200/. Pentru formarea trihalometanilor din polifenoli, incomplet cunoscută, s-a propus următorul mecanism /194/ :

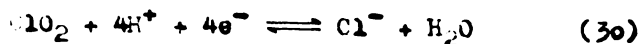
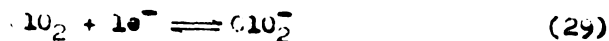


Procesul implică, în primă etapă, formarea structurii chinonice urmată de o substituție la carbonul din α față de cele două grupări carbonil, cu formarea unui carbanion clorurat. Carbanionul format se poate stabiliza fie prin protonare, formând o cetonă dichlorurată, fie prin clorurare energetică, când se obține o cetonă trichlorometilată, care se poate descompune formând cloroform.

Practic, oxidările cu hipoclorit de sodiu se realizează cu excese mari de hipoclorit, raportul molar minim hipoclorit de sodiu: compus aromatic pentru care se realizează o reducere a încărcării organice a apei reziduale exprimată ca TOC cu aprox. 30 %, fiind 6:1 /193/. Folosirea acestor doze mari de agent de oxidare duce la existența în apa epurată a unor cantități mari de clor și hipoclorit, care trebuie eliminate ulterior din apă.

Posibilitatea formării de trihalometani în timpul procesului de oxidare, purificarea incompletă a apelor, consumul mare de reactiv de oxidare și necesitatea eliminării excesului de clor, și de ioni de clorură și hipoclorit din apă, fac ca procesul de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apă cu hipoclorit de sodiu să fie neeconomic.

Bioxidul de clor este un oxidant mai puternic decât clorul și hipocloritul de sodiu, și poate fi utilizat în epurarea apelor reziduale cu conținut de fenoli și amine aromatice. Dioxidul de clor poate participa în diferite reacții de oxidare, schimbând unul sau mai mulți electroni :



Deși ambele reacții au loc la pH mai mic de 2, numai prima reacție este posibilă la pH = 7,0. În soluție apoasă, ionii clorit pot să disproporționeze, formând ionii clorat, și hipoclorit (ClO^-). În figura 17 este prezentată diagrama potențialelor normale a cuplurilor corespunzătoare diferitelor stări de oxidare ale clorului/183/:

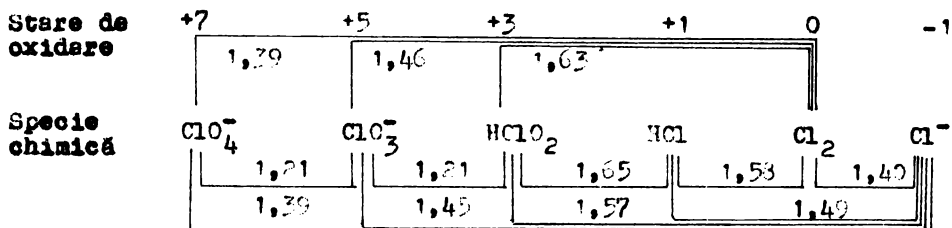


Diagrama lui Latimer, a potențialelor redox pentru diversele stări de oxidare ale clorului, la pH = 0

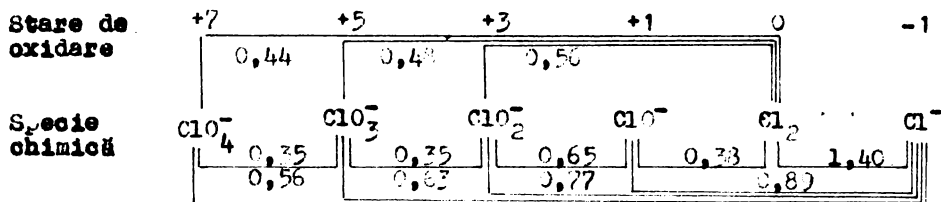
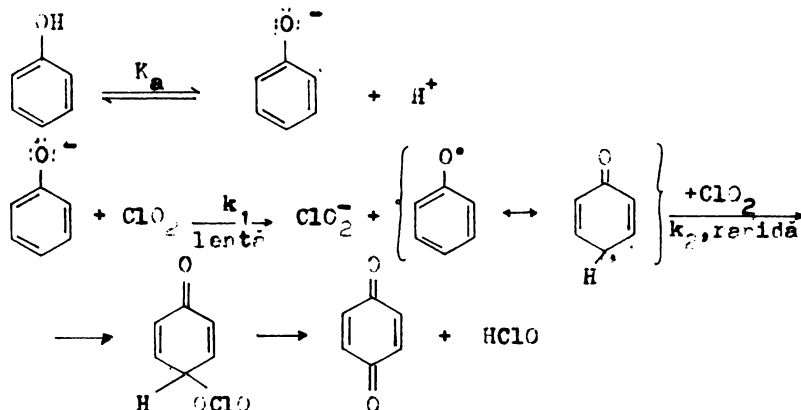


Fig.17 - Diagrama lui Latimer, a potențialelor redox pentru diversele stări de oxidare ale clorului, la pH = 14

Se observă că, atât în mediu bazic, cât și în mediu acid, ClO_2^- se dismută în ClO_3^- și ClO^- ; în mediu bazic, Cl_2 și ClO_2^- nu pot coexista, formându-se ClO^- .

Studiul reacției de oxidare a fenolului cu bioxid de clor indică, ca produși ai reacției, benzochinona, ionul clorit ClO_2^- și acidul hipocloros. Mecanismul propus este : /184/



Bioxidul de clor smulge un electron de la ionul de fenoxid, formînd un radical-fenoxid și ClO_2^- . În continuare, o nouă moleculă de ClO_2 reacționează cu radicalul format, ducînd la p-benzoquinonă și HOCl . Dacă fenolul este în exces, el poate reacționa cu acidul hipocloros, formînd fenoli clorurați. Dacă însă se lucrează cu exces de bioxid de clor, în amestecul de reacție vor predomină produșii de oxidare /190-192/.

Utilizarea bioxidului de clor pentru oxidarea compușilor aromatici din apă prezintă însă unele dezavantaje cum sînt : a) costuri mari ; b) lipsa unor informații concrete asupra capacității de oxidare și asupra produșilor organici secundari care rezultă ; c) efecte toxice ale bioxidului de clor și ale produșilor anorganici de reacție, ionii de clorat (ClO_3^-) și clorit (ClO_2^-), care produc anemie hemolitică /183,94/. Din aceste motive, se impune ca în efluenții rezultați după oxidarea cu bioxid de clor, să nu existe bioxid de clor și clorit rezidual.

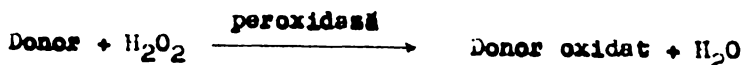
2.3. Oxidarea enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază a fenolilor și aminelor aromatice

2.3.1. Obținerea și caracterizarea peroxidazei

Enzimele sînt biocatalizatori de natură proteică, a căror acțiune respectă legile generale ale catalizei :

- enzima nu se consumă în timpul reacției și teoretic poate provoca transformarea unui număr nelimitat de molecule de substrat . Eventuala denaturare a enzimei este independentă de actul catalitic ;
- enzima nu modifică natura reacției, echilibrul sau bilanțul ei termodinamic, reacția fiind posibilă și în absența ei ;
- enzima mărește viteza de reacție, pentru acest parametru cinetic înregistrîndu-se valori de aprox. 10^{11} ori mai mari decît cele obținute în absența catalizatorului.

Enzimele de tipul peroxidazelor fac parte din classa oxidoreductazelor : (donor : H_2O_2 - oxidoreductaze, E.C.1.1.1.7) și catalizează reacțiile de oxidare a diferiților compuși organici și anorganici, drept agenți de oxidare acționînd apa oxigenată sau peroxisii:



Ca donori pot fi compuși organici ca : fenoli, amine aromatice primare, secundare și terțiare, leucoderivați și coloranților organici, heterociclii (acid ascorbic, indol), sau ioni anorganici (în particular ionul

iodură).

Peroxidazele sînt foarte răspîndite în plante (hrean, gulii, soia, roșii, cartofi, alge etc.), în țesuturile animale și în fluidele din corpul vertebratelor (adrenalină, sînge, salivă, intestine, ficat, rinichi, pancreas etc.), în microorganisme și în diferite specii de fungi (*Neurospora crassa*, *Sclerotinia*, *Veticillium*, *Aspergillus*), și bacterii (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*)/242/.

Sursa cea mai importantă de obținere a peroxidazei e reprezentată hreanul. Peroxidaza din hrean se obține prin macerarea rădăcinilor de hrean, urmată de extracția cu apă sub agitare, timp de câteva minute și filtrare pe material textil /242/. Filtratul obținut conține enzima care se separă și se purifică prin diferite metode : precipitare cu sulfat de amoniu și redizolvarea precipitatului în apă, dializă, adsorbție pe alumina urmată de eluare cu cantități mici de sulfat de amoniu, cromatografie pe o rășină schimbătoare de ioni cu grupe HSO_4^- sau pe carboximetilceluloză, electroforeză, cromatografie de afinitate pe conconavalin A - sepharose și/ sau gelfiltrare pe sephadex /205, 206, 208, 210, 244, 250/.

Prima peroxidază cristalină pură a fost obținută de Theorell (1941) printr-un procedeu laborios cu cuprinde cinci faze de purificare /224/ : precipitare cu sulfat de amoniu, dializă, precipitare fracționată cu alcool, electroforeză, și precipitarea iracționată finală cu sulfat de amoniu.

Metodele moderne realizează purificarea peroxidazei prin combinarea cromatografiei de afinitate cu filtrarea pe gel.

S-au obținut în stare cristalină următoarele enzime : a) peroxidaza din hrean cu isoenzimele ei : peroxidaza neutră C și șase isoenzime bazice /224, 246/; b) verdoperoxidaza (mieloperoxidaza) din leucocite ; c) lactoperoxidaza din lapte și d) citocrom-c-peroxidaza din drojdie.

Preparatele enzimatiche obținute, fie sub formă de extracte brute sau purificate, fie sub formă de pulbere cristalină, se caracterizează prin determinarea purității, a activității catalitice și a conținutului de proteine.

Puritatea preparatelor se determină prin calculul cifrei de puritate $RZ = E_{403}/E_{280}$, care reprezintă raportul dintre concentrația nemului (exprimată prin valoarea extincției la $\lambda = 403$ nm, banda roșie caracteristică feroporfirinelor) și conținutul în proteine (exprimat prin extincția la $\lambda = 280$ nm, maximum de absorbție al proteinelor). Un preparat enzimatic pur se caracterizează prin valori ale lui RZ de aprox. 3,5.

Activitatea catalitică a peroxidazelor se determină prin estimarea cantitativă a produsului de reacție format în urma acțiunii enzimelor asupra unui compus organic, în prezența apei oxigenate, în condiții bine definite de pH, temperatură, timp de reacție și concentrația reactanților. Ca substraturi ale reacției se pot utiliza diferiți fenoli și amine aromatice ca : pirogalol, guaiacol, indofenol, mesidină, benzidină, o- și p-fenilendiamină, acid ascorbic, o-toluidină, verde de leucomalachit etc., care reacționează cu sistemul apă oxigenată - peroxidază formând compuși ce absorb în domeniul ultraviolet sau vizibil /208,242/.

Fiind printre primele enzime izolate și caracterizate peroxidaza din hrean a fost mult studiată în scopul elucidării structurii, proprietăților și mecanismului de acțiune al enzimei, precum și pentru caracterizarea produsilor de reacție.

Au fost izolate și caracterizate prin metode cromatografice și electroforetice, proprietățile spectrale, secvența de aminoacizi și compoziția în carbohidrați, a șapte izoenzime ale peroxidazei, izoenzima neutră C și șase izoenzime bazice E₁ - E₆ /214,215,222,224,227,244,258/. În tabelul 1 sînt prezentate proprietățile fizice ale izoenzimelor peroxidazei, iar în tabelul 2, compoziția lor chimică /227,246/.

Tabelul 1 - Proprietățile fizico-chimice ale izoenzimelor peroxidazei

Izoenzima	RZ	Coeficient molar de extincție, E (mM)		p.I	Greutate moleculară (D)		
		403 nm	280 nm		Enzimă	Rest proteic	Rest carbohidrat
E ₁	2,97	29,7	32,7	10,60	36800	32843	5002
E ₂	2,89	104,2	36,1	10,63	39000	32630	5487
E ₃	3,02	111,3	36,9	> 12	33900	32314	323
E ₄	3,16	111,2	35,2	> 12	33700	34804	323
E ₅	3,00	115,9	38,6	> 12	37300	34804	1613
E ₆	3,15	91,2	29,0	> 12	33900	32701	645
C	3,41	102,8	30,1	8,6	41600	33890	8016

Izoenzima neutră C a peroxidazei, care se găsește în concentrație cea mai mare în rădăcinile de hrean, este o pulbere cristalină brună, cu următoarea compoziție : 47,0 % C, 7,35 % H, 13,2 % N, 0,43 % S, 0,127 % Fe. Este constituită dintr-o proteină incoloră (apoenzime), formată din 308 aminoacizi și opt lanțuri laterale

de carbohidrați ce sînt legate de proteină prin intermediul asparaginei), combinată cu o feroporfirină (/1,3,5,8 - tetrametil-2,4-divinil-6,7-dipropionat-porfirinato/Fe III), ce constituie gruparea prostetică hemică /214,242/.

Tabelul 2 - Compoziția chimică a izoenzimelor peroxidazei (numar de resturi/mol)

	Peroxidază						
	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	E ₆	C
Lisină	6,7	7,3	5,6	5,2	7,3	7,2	6
Histidină	2,9	2,9	4,1	4,0	3,1	3,0	3
Arginină	21,3	21,2	24,0	24,5	25,7	22,7	21
Acid aspartic	44,7	43,8	36,0	37,5	44,4	41,5	48
Acid Glutamic	21,6	21,7	20,9	20,9	16,2	16,9	20
Glicină	16,8	17,4	30,6	30,4	20,4	23,0	17
Alanină	23,8	23,4	23,0	22,7	25,6	32,1	23
Valină	19,1	19,1	28,1	28,2	20,0	19,0	17
Leucină	30,1	29,3	24,4	24,3	34,0	21,5	35
Isoleucină	13,1	12,6	15,4	16,0	14,2	15,7	13
Prolină	17,5	17,5	14,8	14,4	19,2	11,4	17
Serină	23,2	20,2	22,8	22,8	25,4	29,2	25
Treonină	23,1	23,4	23,2	23,9	23,6	27,9	25
Cistină	8,4	8,4	8,1	7,9	7,8	8,1	8
Metionină	2,5	3,1	4,1	3,8	3,7	4,7	4
Fenilalanină	16,8	16,6	12,9	13,2	20,9	14,3	20
Tirosină	5,4	5,9	2,1	2,1	5,3	4,1	5
Triptofan	0,8	1,9	1,1	1,2	1,1	1,8	1
Total	297,8	295,7	303,2	303,0	317,9	304,1	308
Glucosamină	5,4	7,1	0,8	0,7	1,8	1,0	7
Hexoză și pentoză	25,7	26,9	0,8	0,8	7,3	2,7	43

Adiția unui ion feric la protoporfirine IX dislocuie $2H^+$ de la atomii de azot din ciclul pirolitic și astfel sarcina ionului feric este efectiv redusă de la +3 la +1. Ionul feric din gruparea prostetică are șase coordinațe, dintre care patru sînt ocupate de cei patru atomi de azot pirolitici din porfirină. Poziția 5 de coordinare (latura proximală) este ocupată de o grupă imidazol, dintr-un rest de histidină, iar poziția 6 de coordinare (latura distală) poa-

te fi ocupată de apă (ca în mioglobină), sau poate fi liberă (ca în cazul peroxidazelor). În ambele cazuri, sarcina totală în vecinătatea ionului $Fe(III)$ este +1 /240,223,224/

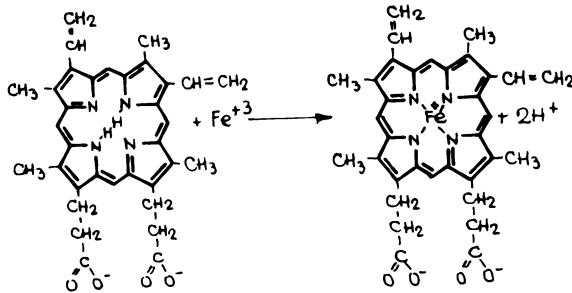
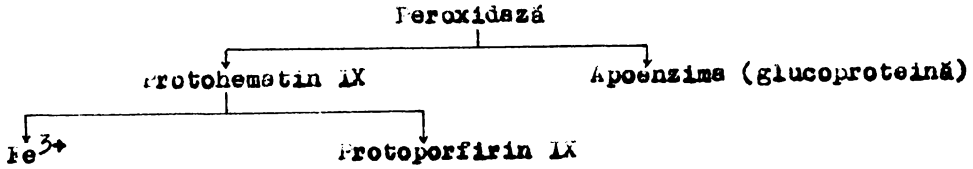


Fig.18 - Protoporfirina IX + $Fe^{3+} \longrightarrow$ Ferriprotoporfirina IX + $2H^+$

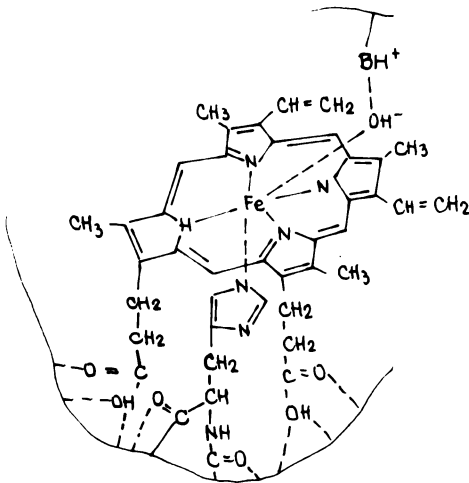
Decarece numai patru liganzi sînt identici, și poziția 6 de coordonare este vacantă, ionul feric nu are o înconjurare octaedrică, ci una piramidală pătrată.

Ciclul porfirinic este aromatic și puternic hidrofob. Substituenții din pozițiile 2 și 4 ale ciclului porfirinic nu afectează activitatea catalitică a peroxidazei, în schimb grupările carboxil libere din pozițiile 6 și 7 sînt esențiale. Resturile propionace ale hemului în peroxidază sînt distribuite la o distanță de 900 Å de atomul de fier și prin ele hemul se fixează la apoenzimă (fig.19). În cazul esterificării uneia din aceste legături, activitatea catalitică a peroxidazei scade de 5 ori; esterificarea ambelor grupări propionace scade sensibil puterea de legare a hemului și reduce aproape complet activitatea catalitică a enzimei.

Protohematina IX poate fi ușor și reversibil detașată de proteină sub acțiunea acidului clorhidric și acetonei, la 0°C și la un pH < 2,5. Acești constituenți pot fi recombinați pentru a

reconstitui enzima, fără a avea loc pierderi de activitate. În acest mod se pot obține peroxidaze sintetice cu o activitate similară enzimei native.

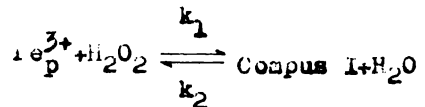
Peroxidaza este cunoscută în cinci stări de oxidare : ferrosa, ferică, compusul I, compusul II și compusul III. Enzima nativă în starea Fe^{3+} este redusă la Fe^{2+} cu ditionit de sodiu, borhidrură de potasiu sau prin reducere catalitică cu paladiu sau platină. Compusul I este produsul de reacție al apei oxigenate cu enzima nativă, compusul II se obține prin reducerea compusului I,



printr-o reacție în care se schimbă un electron, iar compusul III se obține din compusul II cu exces de apă oxigenată, sau din ferroperoxidază cu oxigen molecular /215, 219-222, 229, 230, 236, 240, 242, 249, 253, 258, 272-275/.

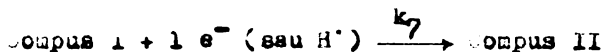
Peroxidaza, în stare normală, reacționează în raport echimolar cu apă oxigenată, într-o reacție cu o cinetică de ordinul 2, formând compusul I :
($\lambda_{max} = 678 \text{ nm}, 407 \text{ m}\mu$)

Fig.19 - Fixarea hemului de apoenzimă, în peroxidază



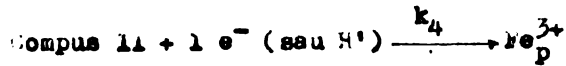
unde k_1 are o valoare de aprox. $9 \times 10^6 - 2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, la 20°C și k_2 este mai mică de $3 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$. Valorile constantei k_1 depind de natura agentului de oxidare utilizat. Astfel, pentru H_2O_2 , $k_1 = (9 \pm 0,2) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, pentru H_2O_2 , $k_1 = 1,5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, iar pentru H_2O_2 , $k_1 = 3,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ /238/.

Compusul I poate fi redus în prezența unui donor de hidrogen la compusul II, ($\lambda_{max} = 561, 530$ și $414 \text{ m}\mu$), conform reacției :



care, în prezența unui donor de hidrogen, poate fi redus, regenerând

feriperoxidaza inițială :



În general, valorile constantei k_4 sînt cuprinse între 10 și $10^8 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$, iar k_7 este aprox. $10^2 k_4$. Se observă că reacția lentă, determinată de viteză, este reducerea compusului II, și prin urmare compusul II are rol de complex Michaelis-Menten /215, 242/.

Compusul II formează, cu exces de apă oxigenată, compusul III (absorbția maximă la $\lambda = 583 \text{ nm}, 545 \text{ nm}$ și 417 nm).

Pe baza acestor date se poate propune următorul ciclu de acțiune enzimatică a peroxidazei :

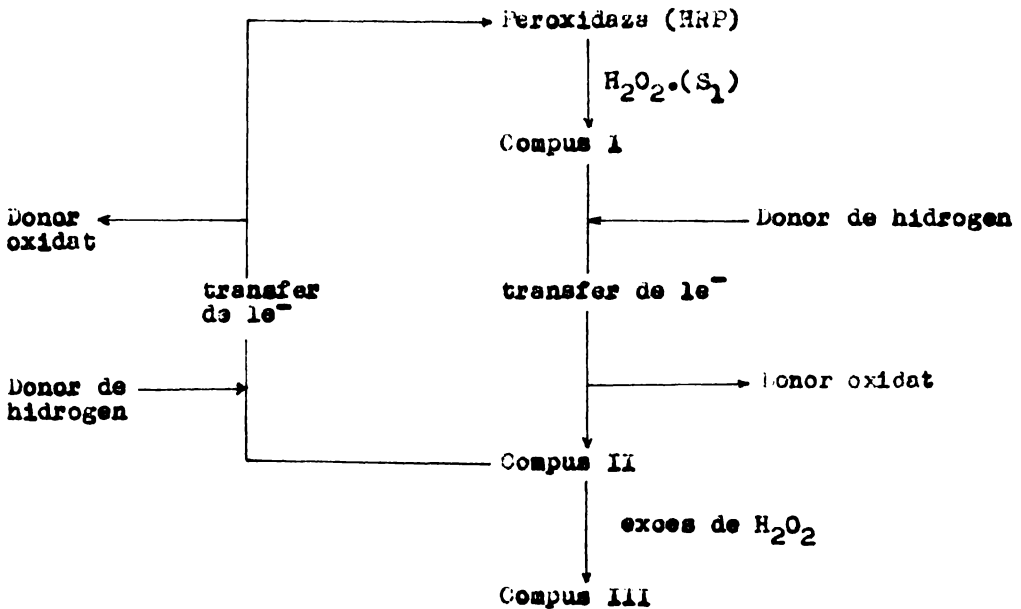
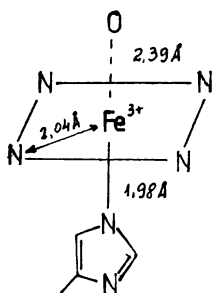
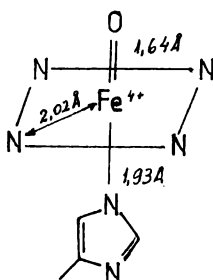


Fig.20 - Ciclul de acțiune enzimatică al peroxidazei

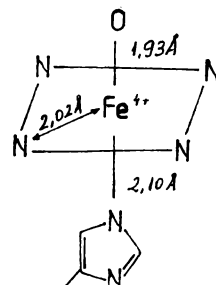
În figura 21 sînt prezentate structurile peroxidazei și ale compuşilor ei determinate din spectrele de raze X și datele de susceptibilitate magnetică /215/ :



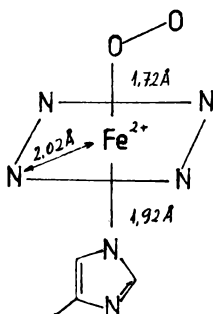
Peroxidază nativă
spin înalt



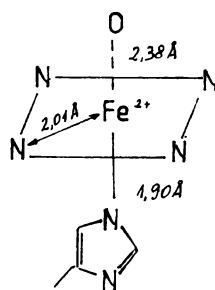
Compus I
spin intermediar



Compus II
spin scăzut



Compus III
spin intermediar



Peroxidază redusă
spin intermediar

Fig.21 - Structura peroxidazei și a compuşilor ei intermediari

Se observă că în toți compuşii intermediari ai peroxidazei, cu excepția compusului II, caracterizat printr-o valoare mică a spinului, distanța Fe-N_o (histidina proximală) = 1,92 ± 0,02 Å, fapt care, corelat cu formarea unui ion feril, joacă un rol important în elucidarea mecanismului acțiunii peroxidazei. Informațiile structurale prezentate în fig.21 permit o analiză detaliată a stadiilor formării intermediarului feril și a mecanismului de reacție. Astfel, în peroxidaza nativă hidratată, distanța între ionul de Fe(III) și atomii de azot ai părilor porfirinici Fe-N_p este mare, indicând astfel o delocalizare a densității de electroni π ai hemului de la atomul de Fe. În compusul I, densitatea de electroni în jurul atomului de fier este scăzută; distanța Fe-N_o (azotul imidazolului din histidină) este neschimbată, cea Fe-N_p este puțin micșorată, în schimb distanța Fe-O este mult mai scăzută, indicând astfel o reorganizare a sarcinii sistemului de electroni π ai hemului și un orbital axial. Această distanță mică Fe-O = 1,64 Å este caracteristică pentru modele având o dublă le-

gătură, care se formează prin cedarea unui electron de la fier, însoțită de o rearanjare a sistemului de electroni π ai hemului.

Reducerea compusului I la compusul II, prin acceptarea unui electron, nu modifică sarcina la atomul de fier, în schimb determină scurtarea legăturii Fe-N_D. Ca o consecință, în compusul II, distanțele între atomul de fier și liganzi, inclusiv distanța Fe-N_O, sînt mai mari, densitatea de electroni π ai hemului este mai localizată în jurul fierului, iar densitatea de electroni din orbitelul axial este delocalizată de la fier. Distanța Fe-O este comparabilă cu cea din structurile în care legătura este simplă, iar sarcina suplimentară este localizată la oxigen.

Prin reducerea compusului II cu un electron, sarcina atomului de fier și densitatea de electroni π a hemului revin la starea normală, și se formează enzima nativă hidratată Fe³⁺(H₂O).

Pornind de la structura de ion feril, propusă de George /219/ pentru compusul II, structura de radical - π - cation pentru compusul I /225, 252/ și cunoscînd prezența unor grupări ionizabile ale hemului în peroxidaza nativă, compusul I și compusul II, Nagasaki și Yamszaki /248/ propun următoarele relații între diferitele stări de oxidare ale peroxidazei și demonstrează ionizarea unor resturi acide și bazeice aflate în vecinătatea hemului (fig.22).

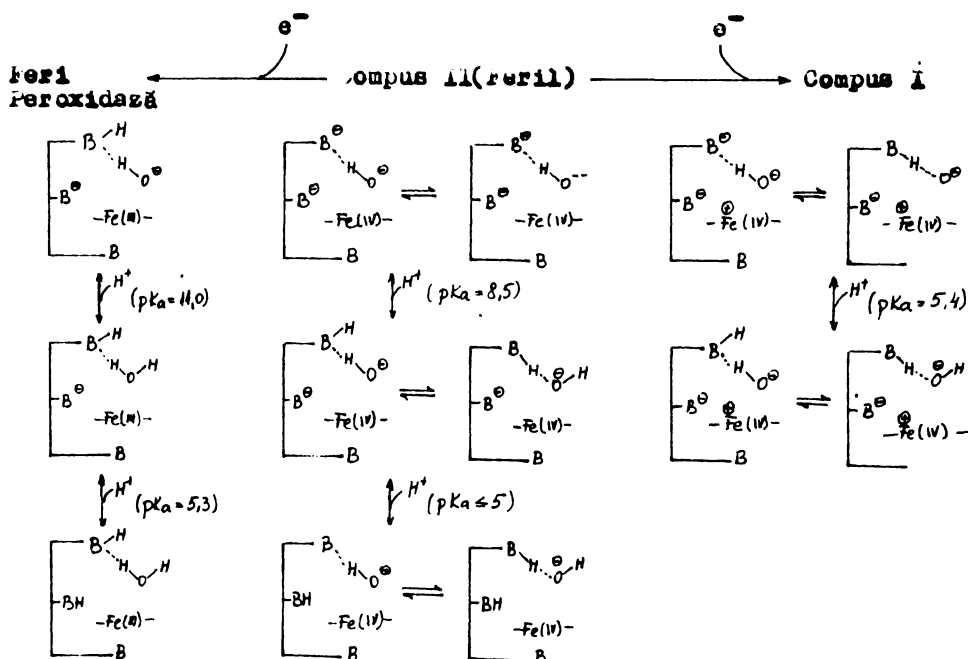
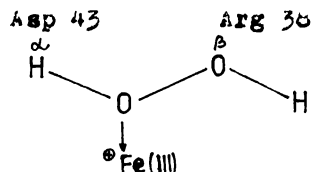


Fig.22 - Schema ionizării hemului în ferriperoxidază, compus I și compus II

Se observă că, pentru fiecare formă a compusului I și compusului II există două specii în echilibru. A treia grupare bazică care stabilizează cationul-radical porfirinic /252/ poate fi o grupare carboxil a unui rest de aminoacid, sau chiar carboxilul propion acid din porfirină.

Prezența acestor grupări bazice și acide în vecinătatea fierului din hem este esențială pentru manifestarea activității catalitice a peroxidazei /230,252,275/.

Formarea compusului I prin reacția dintre peroxidază și apă oxigenată în cantități echimolare, presupune existența în centrul activ al enzimei a unei grupe cu $pK_a \leq 3$ care a fost identificată ca fiind Asp 43, și a unei grupe capabilă să ionizeze la $pH = 11$ și să coordoneze poziția α -6-a a ionului feric, care se presupune a fi Arg 38. S-a demonstrat că la valori de pH cuprinse între 3 și 11, compusul I se formează cu o viteză constantă, de $2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ /240/. Mecanismul propus pentru formarea compusului I din peroxidază este următorul :



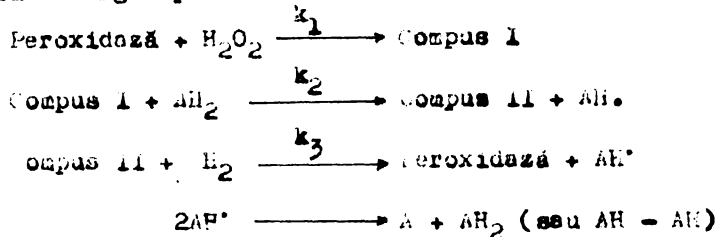
și presupune următoarele etape : a) atacul nucleofil al apei oxigenate la Fe(III) însoțit de transferul protonului α la Asp 43 ; b) transferul protonului α prin rotația grupării carboxil din Asp 43, la oxigenul β ; c) eliminarea apei din β și d) transferul unui electron de la inelul porfirinic la Fe(V). Se presupune că restul Arg 38 stabilizează sarcina la oxigenul β în timpul formării și eliminării apei, și că are loc și un transfer al αH^+ la Asp 43, și al Arg 38 H^+ la βO /240/.

2.3.2. Cinetica și mecanismul reacției de oxidare a fenolilor și aminelor aromatice cu apă oxigenată și peroxidază

Posibilitatea oxidării fenolilor și aminelor aromatice cu apă oxigenată și peroxidază este cunoscută încă din anul 1900, când aceste reacții erau utilizate pentru depistarea peroxidazelor în diferite sisteme. Determinarea și caracterizarea produșilor de reacție, precum și cinetica și mecanismul reacțiilor au constituit o-

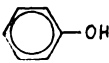
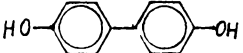
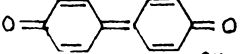
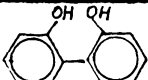
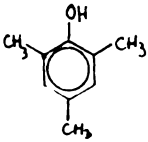
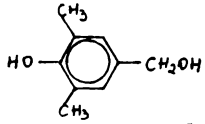
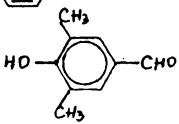
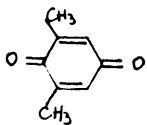
biectul cercetărilor efectuate după anul 1940.

Reacțiile de oxidare a compuşilor aromatici cu apă oxigenată și peroxidază decurg după următoarea schemă generală /220/ :



unde compusul I și II sînt intermediarii enzimatici, iar AH₂ este compusul organic cu rol de donor de hidrogen. Se presupune că, în timpul reacției cu intermediarii peroxidazei (compusul I și compusul II), compuşii aromatici se leagă la partea hidrofobă a enzimei, în vecinătatea poziției distale a grupării prostetice /232/. Din structura hiperfină a spectrelor ESR, s-a stabilit că radicalii organici obținuți prin oxidarea enzimatică a diferiților compuşii aromatici se află liberi în soluție /262,263/. Acești radicali sînt foarte reactivi, și în urma reacțiilor care au loc se poate obține o mare varietate de produși de reacție. În tabelul 3 sînt prezentați produșii de reacție pentru o serie de compuşii aromatici oxidați de sistemul apă oxigenată - peroxidază /241,244,251/ :

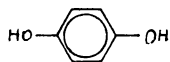
Tabelul 3 - Produșii reacției de oxidare enzimatică a unor fenoli și amine aromatice

Substrat	Produși
<p>fenol,</p> 	 <p>p,p'-bifenol</p>  <p>p-difenoquinonă</p>  <p>o,o'-bifenol</p>
<p>mesitol</p> 	 <p>4-hidroxi-3,5-dimetilbenzil-alcool</p>  <p>4-hidroxi-3,5-dimetilbenzaldehydă</p>  <p>2,6-dimetilbenzoquinonă</p>

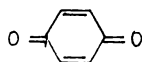
Substrat

Produși

Hidrochinonă



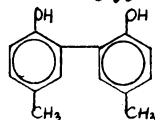
p-benzoquinonă



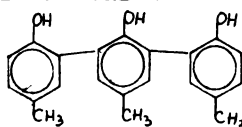
p-cresol



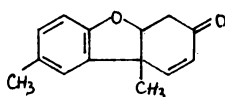
2,2'-dihidroxi-5,5'-dimetildifenil



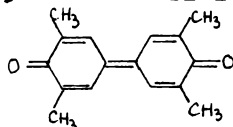
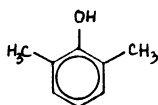
trihidroxitrimetil terfenil



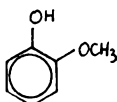
cetona lui Pummerer



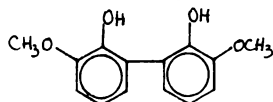
2,6-dimetilfenol 3,5,3',5'-tetrametildifeno-4,4'-chinonă



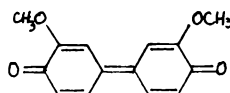
Guaicol



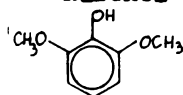
2,2'-dihidroxi-3,3'-dimetoxidifenil



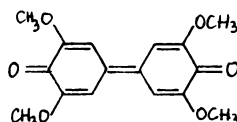
3,3'-dimetoxidifeno-4,4'-chinonă



2,6-dimetoxifenol



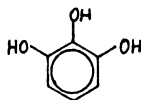
3,5,3',5'-tetrametoxidifeno-4,4'-chinonă



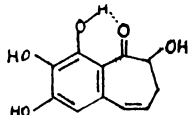
Substrat

Produce

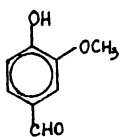
Pirogalol



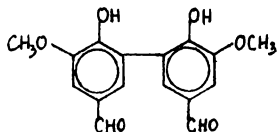
Purpurogalin



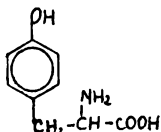
Vanilină



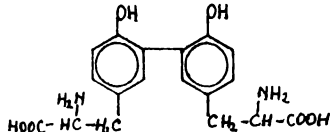
Dehidrodivanilină



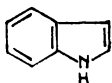
Tirosină



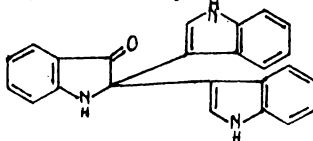
Ditirosină



Indol



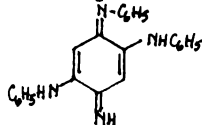
2,2'-bis(3-indolil)-indoxil



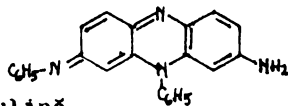
Anilină



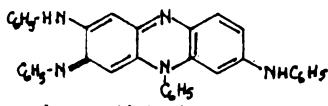
2,5-dianilino-p-benzoquinon-1,4-dianil



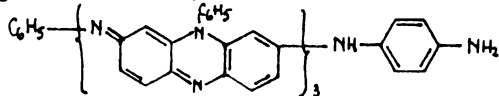
pseudomauveină



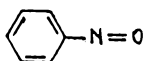
indulină



negru de anilină



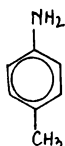
nitrozobenzen



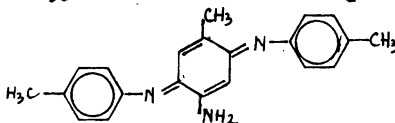
Substrat

Produce

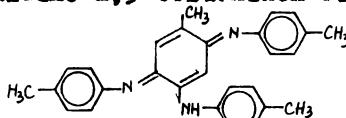
p-toluidină



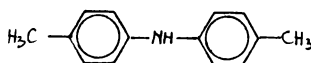
4-amino-2,5-toluenchinon bis-p-tolilimină



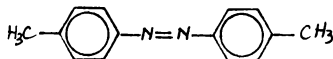
4-p-toluidino-2,5-toluchinon-bis-p-tolilimine



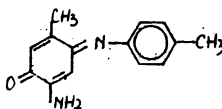
4,4'-dimetildifenilamină



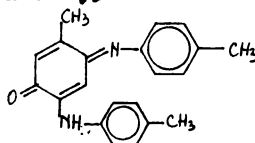
4,4'-dimetilazobenzen



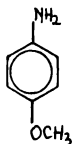
4-amino-2,5-toluchinon-2-p-tolilimină



4-p-toluidino-2,5-toluchinon-2-p-tolilimină

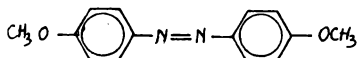


p-anisidină

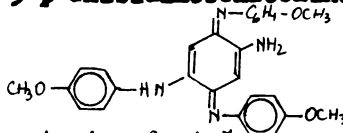


Metanol, CH₃OH

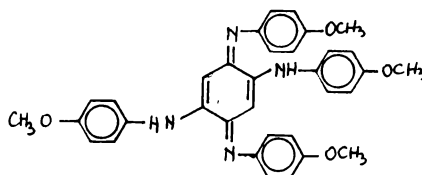
4,4'-dimetoxiazobenzen



2-amino-5-p-anisidinobenzochinon-di-p-metoxianil



tetra-p-metoxiazofenină



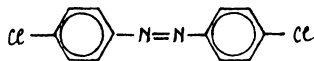
Substrat **Produși**

p-cloroenilină

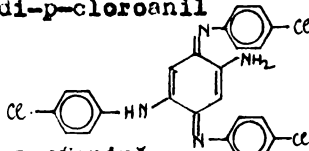


ion de clorură, Cl^-

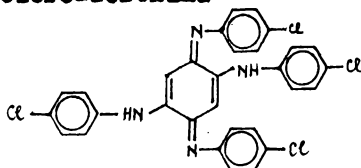
4,4'-diclorazobenzen



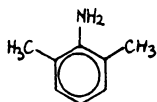
2-amino-5-p-cloroenilinobenzochinon-di-p-cloroanil



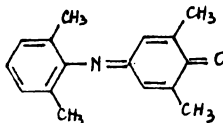
tetra-p-cloroazoenină



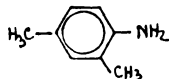
2,6-dimetilanilină



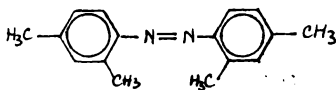
2,6-dimetilbenzochinon-4-(2',6'-dimetil)-anil



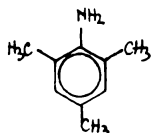
2,4-dimetilanilină



2,2',4,4'-tetrametil azobenzen

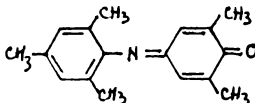


Mesidină

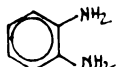


formaldehidă CH_2O , amoniac NH_3

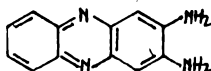
2,6-dimetilbenzochinon-4-(2',4',6'-trimetil)-anil



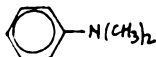
o-enilen-disaină



2,3-diaminofensazină

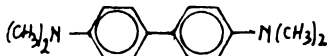


N,N-dimetilanilină



Formaldehidă, CH_2O

N,N,N',N'-tetrametilbenzidină



Pe baza mecanismului general de acțiune al peroxidazei, și a faptului că viteza de reacție este limitată de reducerea compusului II în prezența donatorului de hidrogen aromatic, se obține pentru viteza de reacție o expresie de forma /237/ :

$$\frac{v}{v} = \frac{1}{2k_1 H_2O_2} + \frac{k_2 + k_3}{2k_2k_3 AH_2}$$

unde I, H_2O_2 și AH_2 reprezintă concentrațiile enzimei, a apei oxigenate și a substratului organic în mediul de reacție, iar v este viteza inițială de reacție.

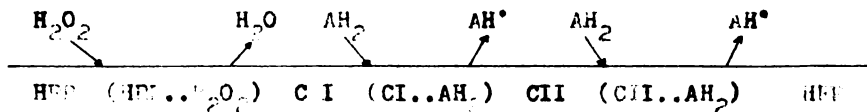
Constanta de viteză k_1 are o valoare de aprox. $2 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$, în timp ce valorile constantelor k_2 și k_3 depind de natura compusului aromatic utilizat ca donator de hidrogen. Astfel, în cazul în care se utilizează ca donator de hidrogen acidul p-aminobenzoic, $k_2 = 5 \times 10^4 M^{-1} sec^{-1}$, iar $k_3 = 2 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ /242/, pentru acidul benzhidroxamic se obține $k_3 = 7,0 \times 10^5 M^{-1} sec^{-1}$ /237/.

Studiind comparativ cinetica staționară de oxidare enzimatică a unei serii de amine aromatice și fenol, la concentrații constante de apă oxigenată și peroxidază, s-au obținut valorile parametrilor cinetici : viteza maximă de reacție V_{max} , constanta Michaelis K_M și constanta catalitică k_{cat} (tabelul 4) /216-218, 243/ precum și unele indicații referitoare la similitudinea enzimei pentru substratele enzimatic oxidate. Din valorile constantelor Michaelis, se observă că enzima are afinitate maximă pentru tetrametilbenzidină, o-dianiridină și benzidină.

Tabelul 4 - Valorile parametrilor cinetici pentru unii compuși aromatici

Substrat	$V_{max} \cdot 10^7$ $M \cdot s^{-1}$	$k_{cat} \cdot 10^{-3}$ s^{-1}	$K_M \cdot 10^4$ M
Benzidină	40,5	5,33	2,38
o-Dianisidină	1,49	1,24	0,43
Tetrametilbenzidină	5,00	8,30	1,09
Acid amino salicilic	14,3	1,19	15,40
Acid m-aminobenzoic	50,0	0,0041	33,30
o-Fenilendiamină	47,6	3,97	5,26
m-Fenilendiamină	25,0	0,208	22,20
p-Fenilendiamină	14,3	11,9	5,78
Fenol	-	-	1,00

Pe baza schemei generale a procesului de oxidare enzimatică a compușilor aromatici și a studiilor cinetice efectuate, se propune pentru ciclul de acțiune al peroxidazei un mecanism și o cinetică de tip ping-pong, în care participă o moleculă agent oxidant și două molecule de agent reductor /240/ :



2.3.3. Epurarea apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice cu apă oxigenată și peroxidază

Studiind reacțiile de oxidare a fenolilor și aminelor aromatice cu apă oxigenată și peroxidază, A. Alibanov și colaboratorii /284-286, 295/, au observat că pentru o serie de compuși se obțin produși de reacție insolubili în apă, ușor separabili. Această comparație se explică prin faptul că, în cursul reacției aminelor aromatice și fenolilor cu sistemul apă-oxigenată-peroxidază, sînt generați radicali liberi care difuzează de la centrul activ al enzimei în soluție, unde polimerizează, formînd compuși poliaromatici care, spre deosebire de compușii inițiali, sînt practic insolubili în apă, și pot fi îndepărtați prin sedimentare sau centrifugare.

Aceste observații experimentale au fost aplicate pentru epurarea unor ape reziduale cu conținut de fenoli și amine aromatice provenite din diferite ramuri industriale : petrochimică, cocsochimică, metalurgică etc. Astfel, prin tratarea unei ape reziduale provenite de la gazeificarea carbonilor, ce conține fenol, amoniac, cloruri, cianuri și tiocianat, cu peroxidază și apă oxigenată, se obține un randament de eliminare al fenolului din apă de 97 - 98 % /295/.

PERTEA A 11-A

CONTRIBUȚII LA PURIFICAREA UNOR APE REZIDUALE
CU APA OXIGENATA SI PEROXIDAZA

1. Studii și cercetări cu privire la eliminarea
enzimatică a fenolilor din apele reziduale

1.1. Obținerea, purificarea și caracterizarea peroxidazei

Peroxidaza este o enzimă cu largă răspândire în regnul vegetal, fiind izolată din majoritatea plantelor și fructelor /242/. Sursele cele mai bogate în peroxidază sînt hreanul, guliile și tomatele. În cercetările efectuate în laborator s-au utilizat ca surse de peroxidaze hreanul, plantă cu răspîndire mare, a cărui cultivare nu este pretențioasă, și este accesibilă în orice sezon, și guliile. Peroxidaza s-a obținut din hrean sau gulii prin extracție cu apă. Pentru aceasta, rădăcinile de hrean, respectiv guliile, în mărunțite, se agită la rece cu apă. Extractul se separă de fibre lemnoasă prin filtrare și centrifugare, după care se analizează pentru a determina concentrația proteinelor în soluție, și activitatea enzimatică. Pentru a caracteriza cantitativ procesul de extracție și pentru a compara rezultatele obținute în diferite experimente, s-a introdus noțiunea de "eficiența extracției", definită ca și cantitatea de enzimă, exprimată ca activitate totală, obținută dintr-un gram de materie primă /296/. În experimentele efectuate, s-a urmărit influența timpului de contact asupra eficienței extracției. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 1.

Din datele prezentate, se observă că durata extracției influențează mult eficiența acesteia. Astfel, la un timp de contact de 1,5 ore, din hrean se extrag 0,75 U/g materie primă, iar după 24 ore de extracție, eficiența procesului crește la 8,1 U/g.

Totodată, rezultă că o singură extracție nu este suficientă pentru izolarea întregii cantități de peroxidază din rădăcină. Astfel, în experimentul 2, după prima extracție de 24 de ore, se separă 3956 U, iar după a doua extracție, cu o durată de 144 de ore, se mai obțin 2700 U, obținîndu-se în total 6656 U de peroxidază.

eficiența extracției crește, prin reunirea extractelor, de la 8,1 U/g la 13,5 U/g. Se observă de asemenea că hreanul este o sursă mai bogată în peroxidază decât guliile. Dintr-un gram de materie primă obținându-se, în condiții identice, pentru hrean 13,85 U de peroxidază, iar pentru guliile, numai 5,93 U.

Tabelul 1 - Obținerea peroxidazei prin extracție cu apă din hrean și guliile

Nr. exp	Materie primă Cantitate g	Vol. apă extracție ml	Timp h	Conc. prote- ine mg/ml	Activit ^{x)} specifi- că U/mg	Activit. totală U	eficien- ța ex- tracției U/g	
1.	Hrean	175	300	1,5	1,528	0,220	133,4	0,75
2.	Hrean	480	a)960	24,0	2,649	1,296	3956,0	8,32
			b)1000	144,0	1,362	1,982	2700,0	5,53
			Total extracție a + b :				6656,0	13,85
3.	Hrean	470	940	144,0	2,476	1,920	4466,7	9,50
4.	Guliile	250	500	1,5	1,776	0,158	140,0	0,695
5.	Guliile	250	c)500	24,0	2,148	1,09	936,4	3,72
			d)500	144,0	1,125	1,216	547,2	2,18
			Total extracție c + d :				1483,6	5,93

x) o unitate enzimatică este definită ca și cantitatea de purpurogalină exprimată în mg., formată într-o secundă, prin acțiunea unui miligram de peroxidază asupra pirogalolului, în prezența apei oxigenate.

Extractele enzimatic brută cu conținut de peroxidază au fost purificate prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu și gel-cromatografie.

Purificarea soluțiilor brută de peroxidază prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu se realizează prin adăugarea, sub agitare și la rece, de porțiuni mici de sulfat de amoniu, atingându-se diferite grade de saturație ale soluției. În timpul precipitării, pH-ul soluției se menține în jurul valorii inițiale, cu o soluție diluată de hidroxid de sodiu, ca urmare a creșterii concentrației sărurilor în soluție, proteinele se separe prin precipitare. Suspensiile obținute se centrifughează, iar precipitatele și supernatantele izolate se caracterizează prin determinarea concentrației în proteine și a activității enzimatică. Rezultatele precipitării fracționate cu sulfat de amoniu sînt prezentate în tabelul 2.

Tabelul 2 - Precipitarea cu sulfat de amoniu

Proba	Concentrație proteine mg/ml	Proteine totale mg	Activitate specifică U/mg	Activitate totală U
Extract inițial	2,649	688,74	1,296	889,0
<u>Precipitare 30 % saturație (NH₄)₂SO₄</u>				
Precipitat	0,165	13,80	0	0
Supernatant	0,805	505,10	1,274	844,0
<u>Precipitare 50 % saturație (NH₄)₂SO₄</u>				
Precipitat	2,288	114,40	1,456	166,6
Supernatant	0,914	228,50	3,430	634,8
<u>Precipitare 70 % saturație (NH₄)₂SO₄</u>				
Precipitat	1,292	73,64	1,904	123,0
Supernatant	-	-	2,760 ^{x)}	634,8
<u>Precipitare 90 % saturație (NH₄)₂SO₄</u>				
Precipitat	1,035	51,56	3,220	178,0
Supernatant	-	-	0,240 ^{x)}	72,0
<u>Precipitare 30-90 % saturație (NH₄)₂SO₄</u>				
Precipitat	2,802	141,6	4,200	584,0
Supernatant	-	-	0,228 ^{x)}	68,4

x) activitatea specifică a enzimei este exprimată în U/ml soluție, deoarece concentrațiile mari de ioni de amoniu din soluție deranjează determinarea proteinelor prin metoda Lowry

Se observă că precipitatul separat la 30 % saturație sulfat de amoniu nu prezintă activitate peroxidică, toată enzima regăsiindu-se în supernatant. Enzima este distribuită în precipitatele și supernatantele separate la precipitățile cu 50 %, respectiv 70 % saturație sulfat de amoniu, și în precipitatul obținut cu 90 % saturație sulfat de amoniu. Supernatantul separat cu 90 % saturație sulfat de amoniu conține o cantitate mică de enzimă (72 U), cu o activitate specifică scăzută, de numai 0,24 U/ml. Prin precipitarea soluțiilor brute de peroxidază cu sulfat de amoniu cu 90 % saturație se realizează o purificare a enzimei de 2,5 ori, obținându-se un preparat enzimatic solid cu o activitate de 3,22 U/mg proteină. Reunind preparatele solide obținute la precipitarea cu 50 %, 70 % și 90 % saturație sulfat de amoniu, se recuperează aproximativ jumătate din cantitatea de peroxidază din extractul brut. Se recoman-

dă de aceea, pentru purificarea extractelor enzimatiche brute, realizarea unei precipitări cu sulfat de amoniu cu 30 % saturare, separarea supernatantului și precipitarea lui cu 90 % saturare sulfat de amoniu. S-a obținut astfel un preparat enzimatic cu o activitate specifică de 4,2 U/mg, ce indică o purificare a enzimei de 3,2 ori, și o activitate totală de 584 U, ce corespunde unui randament de recuperare a enzimei de 65 %.

Desalefierea și purificarea avansată a enzimei s-a realizat prin gel-cromatografie pe sephadex G-75 astfel : 50 ml soluție enzimatică obținută prin dizolvarea solidului separat la precipitarea extractului brut cu sulfat de amoniu cu 90 % saturare, cu o activitate de 1,86 U/mg, s-au introdus într-o coloană umplută cu Sephadex G-75, tamponat la pH 7,0, cu tampon fosfat 0,05 M, pH 7,0.

Coloana s-a eluat cu același tampon, s-au cules probe cu volum de 5 ml, care s-au analizat pentru determinarea concentrației proteinelor și a activității enzimatice. În figura 1 sînt prezentate variația concentrației proteinelor și a activității peroxidazei la eluarea coloanei de Sephadex G-75.

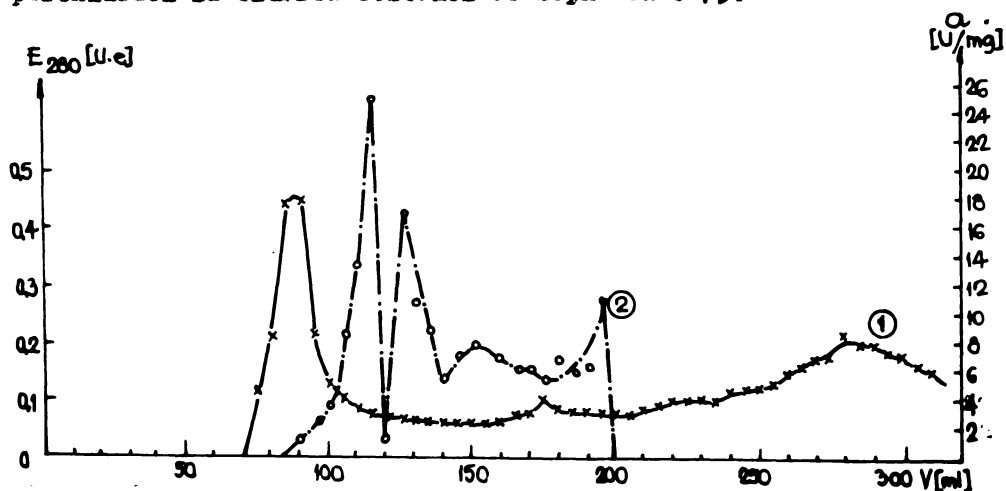


Fig.1 - Purificarea extractului enzimatic pe Sephadex G-75.
Curba 1 - proteine, curba 2 - activitate enzimatică

La trecerea extractului enzimatic pe coloana cu gel de Sephadex G-75 se realizează atât o desalefiere totală, pusă în evidență prin lipsa ionilor de NH_4^+ și SO_4^{2-} în eluate, cât și o fracționare a proteinelor, obținându-se soluții cu o activitate peroxidazică specifică de până la 28 U/mg. Se realizează o purificare avansată a enzimei, ilustrată de o creștere a activității

specifico a fracției celei mai active de aproximativ 15 ori. Se observă totodată existența a cel puțin două izoenzime bine separate, și încă cel puțin una probabilă.

Extractele enzimatiche brute și purificate au fost utilizate ca și catalizatori în reacția de oxidare enzimatică a fenolului și l-naftilaminei cu apă oxigenată.

1.2. Stabilirea parametrilor optimi de eliminare a fenolilor din ape prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază : pH, concentrația apei oxigenate, concentrația peroxidazei, concentrația fenolului

Peroxidaze catalizează reacția de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată, ducând la produși de reacție poli-aromatici, insolubili în apă /242, 264-266/. Această proprietate a produșilor reacției de oxidare enzimatică a fenolilor ne-a determinat să încercăm aplicarea oxidării enzimatiche în epurarea apelor reziduale impurificate cu fenoli. Cercetările au fost efectuate pentru o serie de 30 de fenoli, printre care : fenol, crezoli, xilenoli, polifenoli, clorfenoli, aminofenoli, naftoli etc., și au avut ca scop determinarea randamentelor de eliminare a fenolilor din apă și stabilirea parametrilor optimi ai procesului /298/.

Pentru a descrie cantitativ procesul de tratare enzimatică a apelor fenolice, s-a introdus noțiunea de "grad de eliminare γ ", care este definit ca procentul de poluant organic îndepărtat sub formă de precipitat din soluție, în condițiile date /298/.

Tratarea soluțiilor apoase de fenoli cu apă oxigenată și peroxidază s-a realizat prin adăugarea apei oxigenate (1 ml) într-o soluție apoasă de fenol de concentrație 0,1 g/l (100 ppm). Reacția a fost inițiată prin adăugarea peroxidazei (1 U/ml). În toate cazurile, după adăugarea reactivilor, (apa oxigenată și peroxidază), se observă colorarea soluției și formarea treptată a unui precipitat ce poate fi separat prin filtrare sau centrifugare. Amestecul de reacție se agită trei ore la temperatura camerei, și se filtrează pentru separarea precipitatului format. Soluțiile limpezi rezultate se analizează pentru determinarea conținutului de fenol rezidual prin metoda spectrofotometrică cu 4-aminoantipirină /298/.

Pentru toți fenolii studiați, tratarea soluțiilor numai cu peroxidază, în concentrație de 1000 U/l, sau numai cu apă oxigenată, în concentrație de 5 ml, timp de 24 de ore, nu duce la formare de precipitate și nici la o scădere apreciable a concentrației fenol-

lilor din ape. Se poate trage de aici concluzia că precipitatul format în timpul reacției enzimatică și scăderea concentrației fenolilor dizolvați în apă este rezultatul acțiunii combinate a apei oxigenate și peroxidazei.

Pentru fiecare substanță în parte, s-a studiat influența condițiilor de reacție - pH, concentrația enzimă, a apei oxigenate și a substratului - asupra gradului de eliminare al fenolilor din apă, în scopul determinării valorilor optime.

Studiul dependenței gradului de eliminare enzimatică a fenolilor din apă de pH s-a efectuat variind pH-ul în domeniul 3-9, prin utilizarea de tampon acetat 10 mM pentru domeniul de pH 3-5,5, respectiv tampon de fosfat 10 mM pentru domeniul de pH 5,5-8. În tabelul 3 sînt prezentate rezultatele experimentale obținute.

În figura 2 este prezentată grafic dependența gradului de eliminare a unor fenoli în funcție de pH.

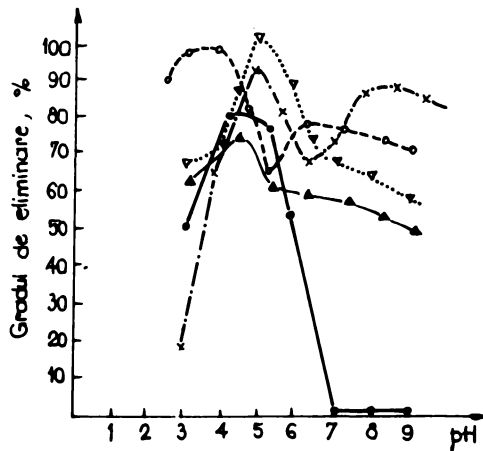


Fig.2 - Influența pH asupra gradului de eliminare a unor fenoli

- ▲ - p-nitrofenol
- ▼ - 2-naftol
- - o-clorfenol
- - pentaclorfenol
- x - 8-hidroxichinolină

Tabelul 3 - Influența pH-ului asupra gradului de eliminare al fenolului. Condiții : 1000 U/l peroxidază, 1 mm H₂O₂, 100 mg/l fenol, τ = 3 h, T = 25°C

pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,5	9,0
Compus	Grad de eliminare, %										
Fenol	65,3	69,6	91,2	82,5	78,6	69,2	66,5	60,0	54,2	48,5	56,0
o-crezol	93,6	93,2	93,1	86,7	82,8	80,1	78,2	77,6	72,5	69,6	65,0
m-crezol	96,9	90,0	95,5	86,4	78,6	75,2	78,9	74,5	78,2	83,6	80,0
p-crezol	79,6	70,5	77,0	76,2	73,9	73,5	73,4	70,2	68,4	71,9	65,8
o-metoxi-fenol	65,9	67,2	69,8	72,5	77,8	34,2	-	-	-	-	-
m-metoxi-fenol	71,2	64,5	99,0	88,4	81,2	72,6	61,4	54,2	50,8	41,6	39,2
p-metoxi-fenol	69,6	70,4	74,7	69,8	65,0	65,2	65,6	64,0	64,6	61,5	60,0
o-amino-fenol	76,4	81,2	88,0	78,6	75,3	64,6	66,8	54,2	48,4	31,6	31,2
m-amino-fenol	53,9	54,2	56,8	75,6	96,9	78,4	66,8	55,0	54,5	36,6	14,7
p-amino-fenol	79,5	79,8	82,0	79,2	71,5	69,7	78,0	76,2	74,6	69,2	68,0
o-clor-fenol	96,2	98,0	95,0	75,8	62,2	66,6	77,2	76,0	75,5	71,1	69,0
m-clor-fenol	63,4	65,7	69,6	67,1	62,5	58,5	55,0	52,4	50,8	53,2	29,8
p-clor-fenol	91,4	85,6	81,9	87,2	92,6	42,8	16,7	-	-	-	-
pirocatechină	58,0	63,2	48,2	21,6	1,8	-	-	-	-	-	-
rezorcină	60,2	65,2	71,8	62,8	59,5	59,0	60,0	60,8	61,5	58,0	54,2
hidrochinonă	76,8	77,0	77,3	68,5	63,3	57,6	51,7	48,3	46,9	36,8	35,0
pirogalol ^{a)}	52,2	52,4	53,0	61,0	68,5	68,0	-	-	-	-	-
o-nitro-fenol	8,95	9,4	10,0	6,4	5,9	5,2	4,9	4,9	4,9	5,9	4,0
m-nitro-fenol	-	-	-	-	-	1,8	3,0	1,2	-	-	-
p-nitro-fenol	10,2	15,8	18,2	11,6	4,2	12,6	18,2	15,8	14,2	10,6	9,2
2,6-dimetilfenol	85,2	78,3	65,4	74,6	63,9	61,2	58,9	58,0	57,5	53,6	50,0
3,5-dimetilfenol	97,2	97,3	97,6	97,4	84,0	81,8	79,0	69,5	60,0	77,0	75,2
2,6-ditert-butilfenol	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	20,0	14,6
1-naftol	71,0	74,3	79,2	85,1	83,4	81,2	75,9	68,2	66,4	58,7	55,2
2-naftol	71,5	72,0	72,3	85,2	98,1	88,4	71,3	71,0	70,0	65,4	62,8
8-hidroxi-chinolină	19,8	45,2	70,2	76,5	94,5	86,6	70,0	73,2	67,5	67,5	85,0
pentaclor-fenol	51,0	65,2	80,0	76,5	74,0	35,5	1,6	0	0	0	0

a) Pirogalolul, în mediu alcalin, se oxidează în prezența oxigenului dizolvat în apă.

Din datele prezentate se observă că enzima este activă într-un domeniu larg de pH (3-9). Taxinele de eficiență variază în funcție de structura fenolului supus oxidării cu apă oxigenată și peroxidază. În cazurile în care se obțin grade de eliminare mici, nu s-au observat în timpul reacției formarea de precipitate. Soluțiile s-au colorat parcurgând întreaga gamă de la galben la brun, fapt ce arată că reacția enzimatică a avut loc, dar produșii de reacție nu reușesc să se dizolveți în apă. Conversiilor maxime obținute le-a corespuns formarea masivă de precipitat, iar filtratele obținute după îndepărtarea precipitatului au fost limpezi și incolore. Studiile efectuate în continuare s-au realizat la valorile optime de pH determinate experimental pentru fiecare compus în parte.

eficiența peroxidazei în eliminarea fenolilor din apă a fost urmărită și în funcție de concentrația apei oxigenate. Intrucât rezultatele experimentale sînt foarte asemănătoare pentru toți compușii studiați, ele sînt exemplificate pentru un singur compus, o-clorfenol. Din datele prezentate în tabelul 4 și fig. 3 se observă că gradul de eliminare al o-clorfenolului crește, cu concentrația apei oxigenate pînă la 1 mM, cînd atinge valoarea de 98 %, și rămîne constant în limita erorilor experimentale, la concentrații mai mari de apă oxigenată (pînă la 5 mM).

Tabelul 4 - Influența concentrației apei oxigenate asupra gradului de eliminare al o-clorfenolului
 Condiții : 50 mg/l o-clorfenol, 1000 U/l peroxidază,
 pH = 4,0, τ = 3 h, T = 25°C

Nr. ord	C _{H₂O₂} mM	C _f o-clorfenol mg/l	Grad de eliminare %
1.	0,2	78,12	13,2
2.	0,5	54,0	40,0
3.	0,8	17,19	80,9
4.	1,0	1,75	98,0
5.	2,0	1,74	98,1
6.	3,0	1,75	98,0
7.	4,0	1,78	97,8
8.	5,0	1,75	98,0

Se observă că, pentru a se realiza o eliminare practic totală a fenolilor din apă, în procedeul enzimatic este necesar

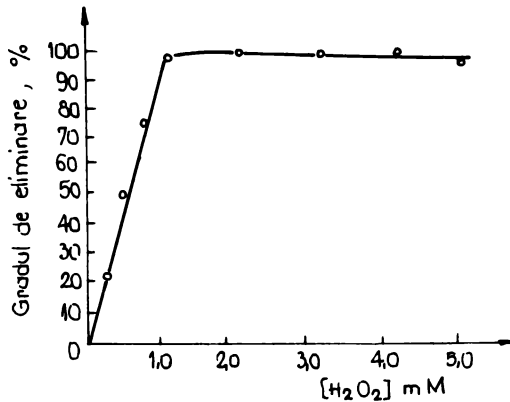


Fig.3 - Dependența gradului de eliminare al o-clorfenolului de concentrația apei oxigenate. Condiții : 90 mg/l (0,7 ml) o-clorfenol, 1000 U/l peroxidază, pH = 4,0
 $\tau = 3$ h , T = 25°C

un raport molar apă oxigenată, fenol de (1 - 1,5):1, spre deosebire de procesul convențional de tratare cu apă oxigenată și catalizatori de fier când, pentru fenol de exemplu, raportul molar apă oxigenată : fenol este de 14:1 /286/.

Influența concentrației peroxidazei asupra reacției de oxidare enzimatică a fenolilor a fost studiată pentru concentrații ale enzimei cuprinse în domeniul 0-1000 U/l. S-a demonstrat, pentru toți fenolii testați, că la un timp de reacție de 3 ore gradul de eliminare crește proporțional cu creșterea concentrației enzimei, până la o anumită valoare, și rămâne constant, în limite experimentale, la concentrații mai mari de enzimă.

Rezultatele experimentale obținute sînt exemplificate pentru p-clorfenol (tabelul 5 și fig.4).

Tabelul 5 - Influența concentrației peroxidazei asupra gradului de eliminare al o-clorfenolului din apă. Condiții : 90 mg/l o-clorfenol , 1 mM H₂O₂, pH = 4, T = 25°C

Nr. crt	C _p peroxidază U/l	C _f p-C ₆ H ₄ (Cl)OH mg/l	Grad de eliminare %	
			a)	b)
1.	0	90,0	0	0
2.	10	60,65	31,45	64,5
3.	25	33,75	62,5	90,2
4.	50	20,45	44,5	98,6
5.	100	15,75	82,5	98,4
6.	150	3,82	94,75	98,5
7.	200	1,26	98,6	98,0
8.	300	2,25	97,5	98,2

9.	400	1,57	98,25	97,95
10.	500	1,94	97,85	98,0
11.	600	1,56	98,2	98,1
12.	700	2,84	96,65	98,4
13.	800	1,35	97,95	98,2
14.	900	1,44	98,4	98,3
15.	1000	1,56	98,2	98,6

a) timp de reacție 3 h
b) timp de reacție 24 h

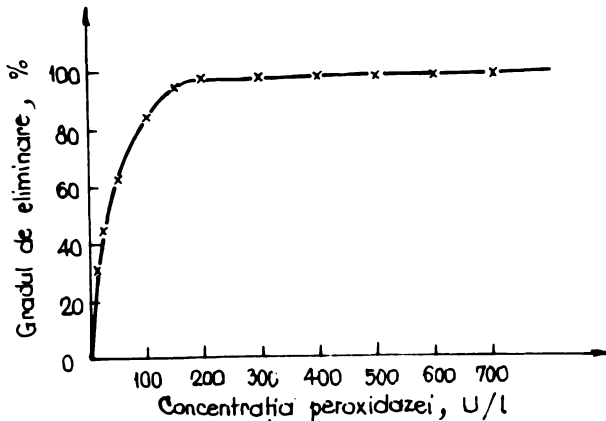


Fig.4 - Dependența gradului de eliminare al o-clorfenolului de concentrația peroxidazei în soluție. Condiții : 90 mg/l o-clorfenol, 1 mM H_2O_2 , pH = 4,0, $t = 3$ h, $T = 25^\circ C$

Mărind timpul de reacție la 24 h, și păstrind neschimbate celelalte condiții, eliminarea o-clorfenolului este maximă la o concentrație de enzimă de numai 50 U/l (tabelul 5). Această observație este deosebit de importantă, deoarece permite reducerea consumului de peroxidază și implicit scăderea costului procesului.

Intrucât concentrația poluanților în apele reziduale variază în limite largi, s-a studiat variația gradului de eliminare pentru diferite concentrații de fenol cuprinse în domeniul 0-150 mg/l. Rezultatele sînt exemplificate pentru o-clorfenol.

Din datele prezentate în tabelul 6 se observă că eliminarea acestui compus din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază este practic totală în domeniul studiat, fiind maximă la concentrații mici de fenol. La concentrații mici, concentrația reziduală de fenol în apă este de asemenea foarte mică. Astfel, la o

Tabelul 6 - Dependența gradului de eliminare de concentrația o-clorfenolului. Condiții: 1000 U/l peroxidază, 1 mM H₂O₂, pH = 4, z = 3 h, T = 25°C

Nr. crt	Concentrație inițială, C _i mg/l	Concentrație finală, C _f mg/l	η %
1.	0	0	0
2.	10	0,08	99,2
3.	25	0,25	99,0
4.	50	0,50	99,0
5.	75	0,90	98,8
6.	100	1,40	98,6
7.	125	2,25	98,2
8.	150	3,75	97,5

concentrație inițială de o-clorfenol de 10 mg/l gradul de eliminare este de 99,2 % iar concentrația fenolului rezidual dizolvat în apă este de numai 0,08 mg/l. La concentrații inițiale de fenol mai mari de 100 mg/l, deși gradele de eliminare ale acestor compuși din apă se mențin ridicate (98,8 % pentru C_i = 100 mg/l, respectiv 97,5 % pentru C_i = 150 mg/l) concentrația fenolului ne eliminat din apă crește, astfel pentru C_i = 100 mg/l, C_f = 1,4 mg/l, respectiv C_f = 3,75 mg/l la concentrație inițială de fenol C_i = 150 mg/l. Rezultă de aici că eficiența metodei propusă de noi este maximă pentru concentrații inițiale mai mici de 100 mg/l.

1.3. Relații între structura fenolilor și eliminarea lor din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază

În vederea aplicării metodei în scopuri practice, este utilă găsirea unor relații între structura fenolilor supuși reacției de oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază și eliminarea lor din apă. În tabelul 7 sînt prezentate gradele de eliminare ale diferiților fenoli studiați și unele din proprietățile lor structurale.

Se observă că, în unele cazuri, gradul de eliminare este foarte ridicat (m-crezol, o-clorfenol, fenol, 3,5-dimetilfenol, 2-naftol, 8-hidroxichinolină), în timp ce în altele este destul de mic (nitrofenoli, 2,6-diterțbutilfenol). Din datele prezentate, se pot trage unele concluzii referitoare la relația dintre

Tabelul 7 - Eliminarea fenolilor din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază^{x)}

Compus	Solub. g/100 ml.	pK _a	pH _{optim}	C _i mg/l	C _f mg/l	% ^{xx)} %
Fenol	3,49 ^{20a)}	9,96	4,0	100,0	8,8	91,2
o-crezol	2,68 ²⁵	10,29	4,0	102,0	6,5	93,2
m-crezol	2,32 ²⁵	10,09	3,5	110,0	3,35	96,9
p-crezol	2,39 ⁴⁰	10,27	3,5	98,0	20,0	79,6
o-metoxifenol	1,9 ¹⁵	9,98	5,0	133,0	29,0	78,0
m-metoxifenol	b	9,65	4,0	83,8	2,7	93,0
p-metoxifenol	b	10,21	4,0	98,8	25,0	74,7
o-aminofenol	1,7 ⁰		4,0	100,0	12,0	88,0
m-aminofenol	2,6 ²⁰		5,0	80,6	2,7	97,0
p-aminofenol	1,1 ⁰		4,0	102,4	18,5	82,0
o-clorfenol	2,8 ²⁰	8,51	4,0	90,0	1,75	98,0
m-clorfenol	2,6 ²⁰	9,11	4,0	100,8	32,5	69,6
p-clorfenol	2,7 ²⁰	9,41	5,0	110,4	8,2	92,6
Pirocatechină	b		3,5	95,2	35,04	63,2
Rezorcină	147,3 ¹²		3,5	100,0	14,8	85,2
Hidrochinonă	5,7 ¹⁵		4,0	103,6	23,0	77,8
Pirogalol	44,0 ¹³		5,0	119,2	37,5	68,0
o-nitrofenol	0,21 ²⁰		4,0	101,0	92,0	10,0
m-nitrofenol	1,35 ²⁰	8,37	6,0	103,6	100,0	3,0
p-nitrofenol	1,18 ²⁰	7,16	4,0	100,2	82,0	18,2
			6,0			
2,6-dimetil- fenol	c	10,62	3,0	101,2	14,5	85,2
3,5-dimetil- fenol	d	10,20	4,0	100,8	2,4	97,6
2,6-ditertbu- tilfenol	e		6,0	100,8	80,0	20,0
Pentaclorfenol	e		4,0	100,0	18,0	80,0
1 - Naftol	c		5,0	101,2	15,2	85,0
2 - Naftol	0,057 ²⁰		5,0	106,0	2,16	98,2
8-Hidroxi- chinolină	e		5,0	101,6	6,28	94,0

x) Condiții : 1 ml H₂O₂, 1000 U/l peroxidază , t = 3 h , T = 25°C

xx) la pH optim

a) temperatura la care s-a efectuat determinarea

b) ușor solubil

c) solubil la cald ; d) greu solubil ; e) greu solubil la cald

structura compusului organic și eficiența precipitării enzimatică. Eficiența enzimei este mult influențată de poziția substituenților în nucleu și de distribuția electronilor în moleculă. Reacția este favorizată în cazul în care grupa hidroxil are densitate maximă de electroni. Astfel, substituenții cu efect inductiv donor de electroni (metil, metoxi) în poziția m-favorizează într-o măsură mai mare reacția de oxidare enzimatică, decât cei din poziția o- sau p-, în timp ce substituenții cu efect inductiv atrăgător de electroni și efect mezomer donor de electroni prezintă o acțiune inversă. Gruparea nitro, cu efect mezomer atrăgător de electroni pronunțat, prezintă în moleculă inhibă oxidarea enzimatică; prin urmare nitrofenolii sînt transformați într-o măsură foarte mică de enzimă și nu pot fi eliminați din apă prin această metodă.

Un rol important în desfășurarea reacției de oxidare enzimatică a fenolilor, îl are configurația moleculei de fenol, prin efectele sterice prezentate de substituenții prezenți în moleculă. Astfel, prezența unor substituenți voluminoși în poziție o- duce la scăderea reactivității compusului, datorită faptului că molecule substratului nu mai poate pătrunde în centrul activ al enzimei. În exemplu concludent îl constituie 2,6-diterț butilfenolul, care este eliminat numai în proporție de 20 %, în timp ce gradul de eliminare pentru 2,6-dimetilfenol este 85,2 %, iar pentru 3,5-dimetilfenol gradul de eliminare η este 97,6 %.

Corelînd gradele de eliminare η obținute cu valorile pK_a ale fenolilor studiați, se obține o dreaptă (fig.5) cu ecuația :

$$\eta = 21,90 pK_a - 134,49 \quad (r = 0,93)$$

Se observă că, cu cît aciditatea fenolilor este mai mică (pK_a mai mare), deci densitatea de electroni la atomul de oxigen este mai mare, cu atît fenolii sînt mai ușori oxidați de sistemul apă oxigenată-peroxidază, și implicit sînt mai ușor eliminați din apă.

Se observă de asemenea existența unei relații între hidrofobicitatea compusului aromatic și gradul de eliminare. Astfel, gradul de eliminare al naftolilor, clorfenolilor, 6-hidroxicinolinei, compuși greu solubili în apă, este mult mai mare decât în cazul fenolilor hidrofilii ca di- și polihidroxifenolii, aminofenolii (pirocatechina, hidrochinona și pirogelolul practic nu precipită din soluție). Aceaste se poate explica și prin faptul că, în cazul fenolilor hidrofobi, produșii de reacție sînt de asemenea hidrofobi și deci mai puțin solubili sau chiar insolubili în apă, în

timp ce polifenolii hidrofili se transformă în produși cu grupări OH reziduale, solubili în apă, și deci mai greu separabili.

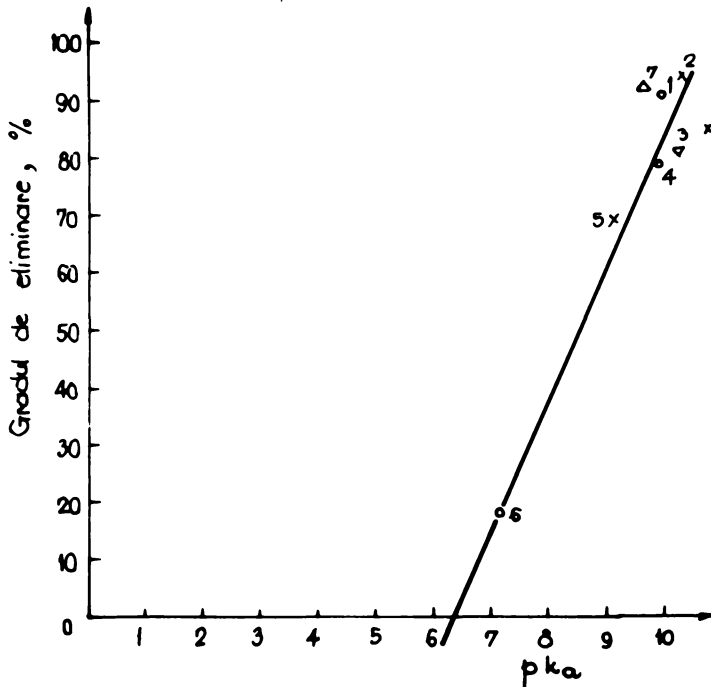


Fig.5 - Dependența gradului de eliminare de valorile pK_a ale fenolilor
1 - Fenol ; 2-o-crezol ; 3-p-crezol ; 4-o-metoxifenol ;
5 - m-clorfenol ; 6-p-nitrofenol ; 7-8-2,6-dimetilfenol

1.4. Eliminarea fenolilor din apă prin oxidare enzimatică și coagulare

Faptul, că fenolii hidrofili sînt eliminați din apă cu randamente mai mici, cuprinse între 60-80 %, ne-a determinat să orientăm cercetările în vederea găsirii unei metode, care să permită îndepărtarea totală a acestor compuși din apă. Pentru aceasta, s-a încercat cuplarea reacției de oxidare enzimatică cu coagularea cu sulfat feros.

Suspensiile obținute după oxidarea soluției apoase fenolice cu apă oxigenată și peroxidază, au fost tratate cu sulfat feros la pH optim 8,5, doză determinată prin jar-test, a fost de 20 mg Fe^{2+}/l . Precipitatul format se separă ușor prin decantare sau filtrare, obținându-se soluții limpezi incolore. S-au obținut pentru o-crezol și o-aminofenol grade de eliminare de pînă la 99 %

(tabelul 8), datorită eliminării fenolilor dizolvați prin absorbție și complexare. Prin coagularea soluțiilor rezultate la oxidarea pirogalolului și hidrochinonei se obțin grade de eliminare a acestor compuși din apă de 95, respectiv 90 % și se realizează totodată o precipitare totală a produșilor de reacție colorați din apă, obținându-se soluții finale limpeză și incolore. Trebuie subliniat faptul că, așa cum s-a demonstrat experimental în cazul fenolului (tabelul 8), prin coagulare cu sulfat feros nu se poate realiza îndepărtarea fenolilor din apă.

Tabelul 8 - Eficiența eliminării fenolilor prin oxidare enzimatică și coagulare

Compus	C_1 mg/l	$C_2^a)$ mg/l	$\eta^a)$ %	$C_2^b)$ mg/l	$\eta^b)$ %
Fenol	100,0	8,8	91,2	0,2	99,8
Fenol	100,0	-	-	96,4	5,6
o-crezol	102,0	6,7	93,1	3,4	98,6
o-aminofenol	100,0	12,0	88,0	2,5	98,5
Pirogalol	119,2	37,5	68,0	0,25	94,8
Hidrochinonă	103,6	23,0	77,8	10,0	90,2

a) după oxidare enzimatică

b) după coagulare finală

Generalizând rezultatele și pentru alți fenoli, se poate admite că, prin tratarea fenolilor cu apă oxigenată și peroxidază, urmată de coagulare cu sulfat feros, se poate elimina din apă o gamă variată de poluanți fenolici.

Un interes deosebit s-a acordat studiului eliminării fenolilor din apă, prin oxidare enzimatică și coagulare, utilizând ca și catalizator preparatele enzimatiche brute și purificate, obținute în laborator. Lucrând în condițiile optime de reacție determinate anterior, s-au obținut, pentru fenol, următoarele rezultate (tabelul 9).

Se observă că la tratarea soluției apoase de fenol cu extract de hrean purificat prin precipitare cu sulfat de amoniu și gel cromatografie, se obțin rezultate apropiate de cele obținute în cazul în care s-a utilizat, ca și catalizator al reacției de oxidare, peroxidaza Merck. În experimentele în care s-au utilizat extracte enzimatiche brute din hrean, după 3 ore de reacție, gradul de eliminare al fenolului din apă a fost de numai 75,8 %. Mărind

timpul de reacție la 24 ore, gradul de eliminare a crescut la 90,5 %, iar după coagularea cu sulfat feros, a atins valoarea de 93,6 %. Rezultate similare s-au obținut la utilizarea extractului enzimatic brut din gullii. Totodată, se observă că peroxidaza din hrean este mult mai activă în eliminarea fenolului din apă decât peroxidaza din gullii.

Tabelul 3 - Tratarile apelor cu conținut de fenol cu extracte enzimactice brute și purificate. Condiții : 1 ml H₂O₂, pH = 4,0

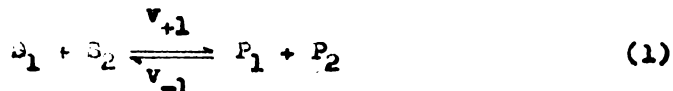
Preparat enzimatic	Activit. A _t U/l	C ₁ mg/l	Timp h	C _f ^{a)} mg/l	% ^{a)} %	C _f ^{b)} mg/l	% ^{b)} %
Peroxidază Merck	231,8	100,0	3	8,0	92,0	1,2	98,8
Extract hrean brut	264,7	99,9	3	24,2	75,8	-	-
			6	12,0	85,0	-	-
			24	9,5	90,5	6,4	93,6
Extract hrean purificat	264,7	99,9	3	6,2	91,8	3,5	96,5
Extract gullii brut	264,3	110,8	3	36,5	67,0	-	-
			8	24,0	78,3	-	-
			24	17,5	84,2	10,4	90,6

a) concentrația fenolului și gradul de eliminare după oxidarea enzimatică

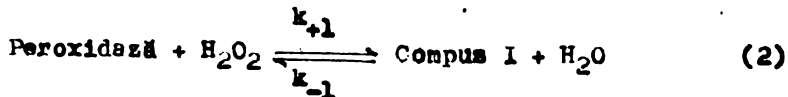
b) concentrația fenolului și gradul de eliminare după coagulare

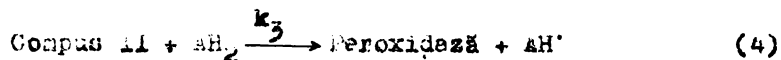
1.5. Cinetica reacției de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată și peroxidază

Reacția de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată, catalizată de peroxidază, este o reacție enzimatică complexă, cu două substraturi, care are loc conform următoarei scheme generale :



Studiind comportamentul cinetic al unui preparat de peroxidază izolat din hrean, s-a constatat că enzima acționează asupra apei oxigenate și a substratului aromatic în modul următor [215, 238/ :





Peroxidaze reacționează cu apa oxigenată formînd compusul I, care în prezența substratului aromatic cu rol de donor de hidrogen formează compusul II - complexul enzimă-substrat. Atît compusul I cît și compusul II sînt activi din punct de vedere catalitic. În continuare, compusul II reacționează cu o nouă moleculă de substrat, regenerînd enzima. Radicalii aromatici formați în reacțiile (3) și (4) reacționează între ei, formînd produsul de reacție P. Etapa determinantă de viteză a reacției enzimatice este reacția complexului II cu substratul aromatic, astfel că acest compus II poate fi considerat adevăratul complex Michaelis.

Ecuația cinetică care caracterizează reacțiile de oxidare a fenolilor cu peroxidază și apă oxigenată are forma /37-39/ :

$$v_1 = \frac{v_{\max} \cdot S_1 \cdot S_2}{K_{M_1} \cdot S_2 + K_{M_2} \cdot S_1 + S_1 \cdot S_2} \quad (6)$$

în care v_{\max} este viteza maximă de reacție, S_1 - concentrația apei oxigenate, S_2 - concentrația inițială a fenolului, iar K_{M_1} și K_{M_2} sînt constantele Michaelis pentru cele două substraturi.

Valorile parametrilor cinetici v_{\max} , K_{M_1} și K_{M_2} se pot obține prin liniarizarea Lineweaver-Burk a ecuației (6) :

$$\frac{1}{v_1} = \frac{1}{v_{\max}} + \frac{K_{M_1}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S_1} + \frac{K_{M_2}}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S_2} \quad (7)$$

Artificialul experimental și teoretic, care facilitează determinarea constantelor cinetice constă în determinarea variației vitezei inițiale de reacție ca o funcție de variația concentrației unuia din cele două substraturi, în condițiile menținerii constante a concentrației celui de al doilea substrat. Astfel, se poate realiza un set de experiențe prin studiul vitezei inițiale ca funcție de concentrația S_1 , în condițiile menținerii constante a lui $S_2 \gg e_0$, în timp ce un al doilea set de determinări se rea-

lăsează ținând constantă $S_1 \gg e_t$, și variind concentrația S_2 .

Se poate aplica astfel, pentru studiul cineticii reacțiilor, ecuația Michaelis-menten :

$$v = \frac{v'_{\max} \cdot S_2}{K_{M_2} + S_2} \quad , \text{ pentru } S_1 = \text{const.} \quad (8)$$

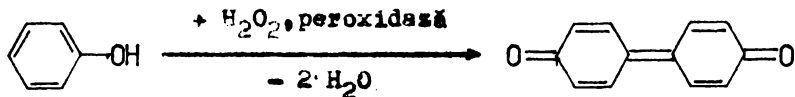
în care v = viteză inițială de reacție, iar

$$v'_{\max} = \frac{1}{v_{\max}} \left(1 + \frac{K_{M_1}}{S_1} \right)$$

este viteză maximă de reacție aparentă.

În acest mod s-a studiat cinetica reacției de oxidare a fenolului cu apă oxigenată, în prezența peroxidazei, determinându-se parametrii cinetici și urmărind influența temperaturii și a pH-ului asupra constantei de viteză.

În prezența peroxidazei, fenolul este oxidat de apa oxigenată, în prima etapă, la p-difenochinonă :



produs ce prezintă un maxim de absorbție la $\lambda = 399 \text{ nm}$ ($\epsilon = 34,7 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Viteza inițială de reacție s-a determinat spectrofotometric, urmărind în timp formarea produsului de reacție, la diferite concentrații de fenol și la concentrații constante de apă oxigenată și peroxidază. Concentrația soluțiilor de enzimă s-a determinat utilizând $\epsilon = 1,02 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ la $\lambda = 403 \text{ nm}$. Reacțiile s-au efectuat în cuva spectrofotometrului, în care s-au introdus 3 ml tampon totalat 10^{-2} M , pH = 6,0 ; în cuva de reacție s-au introdus, cu o microsiringă, soluțiile de fenol și de peroxidază; reacție s-a inițiat prin introducerea în amestecul de reacție a soluției de apă oxigenată, cu ajutorul unei seringi microlitrice, și agitarea cu un plunger. Formarea produsului de reacție s-a urmărit la lungimea de undă constantă ($\lambda = 399 \text{ nm}$). Viteza inițială de reacție s-a calculat din tangenta curbei $c = f(t)$, pentru $t \rightarrow 0$.

Parametrii cinetici v'_{\max} și K_{M_2} s-au determinat prin liniarizarea ecuației Michaelis-menten (8) sub forma următoarelor patru ecuații :

- liniarizarea Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_1} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{S_2} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (9)$$

- liniarizarea Eadie - Hofstee :

$$v_1 = v_{\max}' - K_M \cdot \frac{v_1}{S} \quad (10)$$

- liniarizarea Hanes :

$$\frac{S}{v_1} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{S}{v_{\max}} \quad (11)$$

- liniarizarea Woolf :

$$\frac{v_1}{S} = \frac{v_{\max}'}{K_M} - \frac{v_1}{K_M} \quad (12)$$

În tabelul 10 sînt prezentate rezultatele experimentale obținute într-un set de determinări ale vitezei inițiale a reacției de oxidare enzimatică a fenolului, precum și parametrii calculați. Un exemplu de liniarizare prin metoda Lineweaver-Burk a ecuației Michaelis-menten este ilustrat în figura 6.

Tabelul 10 - Determinarea parametrilor cinetici v_{\max}' și K_M și reacției de oxidare enzimatică a fenolului. Condiții : concentrație peroxidază : $3 \cdot 10^{-9}$ M ; concentrația apei oxigenate : $0,827 \cdot 10^{-3}$ M ; pH = 6,0 ; T = 25°C

Nr. det	$C_{\text{fenol}} \cdot 10^3$ M	$1/c \cdot 10^{-3}$ M ⁻¹	$v_1 \cdot 10^8$	$1/v_1 \cdot 10^{-8}$ M ⁻¹ ·s	$v_1/c \cdot 10^5$ s ⁻¹	$c/v_1 \cdot 10^{-5}$ s
1.	0,1213	8,2440	1,399	0,715	11,533	8,672
2.	0,1808	5,5310	2,041	0,489	11,288	8,841
3.	0,2411	4,1476	2,617	0,382	10,854	9,210
4.	0,3014	3,3190	3,367	0,297	11,175	8,952
5.	0,3615	2,7657	3,602	0,277	9,952	10,013
6.	0,4219	2,3700	4,082	0,245	9,674	10,336
7.	0,5536	1,8067	4,902	0,204	8,853	11,293
8.	0,7850	1,2750	6,061	0,165	7,728	12,952
9.	1,0020	0,9980	7,042	0,142	7,028	14,228

Liniarizarea Lineweaver-Burk :

$$\frac{1}{v_1} = 6,088 \cdot 10^6 + 7,856 \cdot 10^3 \cdot \frac{1}{c}, r = 0,999$$

$$v_{\max}^0 = 1,64 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$$

$$K_{M_2}^0 = 1,29 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Linearizarea Eadie - Hofstee :

$$v_1 = 1,54 \cdot 10^{-7} - 1,192 \cdot 10^{-3} \cdot \frac{v_1}{C} , r = 0,998$$

$$V_{\max}^0 = 1,542 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$$

$$K_{M_2}^0 = 1,192 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Linearizarea Hanes :

$$\frac{C}{v_1} = 7,698 \cdot 10^3 + 6,534 \cdot 10^6 \cdot C , r = 0,998$$

$$V_{\max}^0 = 1,532 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$$

$$K_{M_2}^0 = 1,18 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

Linearizarea Woolf :

$$\frac{v_1}{C} = 1,289 \cdot 10^{-4} - 829,38 \cdot v_1 , r = 0,997$$

$$V_{\max}^0 = 1,56 \cdot 10^{-7} \text{ M}\cdot\text{s}^{-1}$$

$$K_{M_2}^0 = 1,205 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

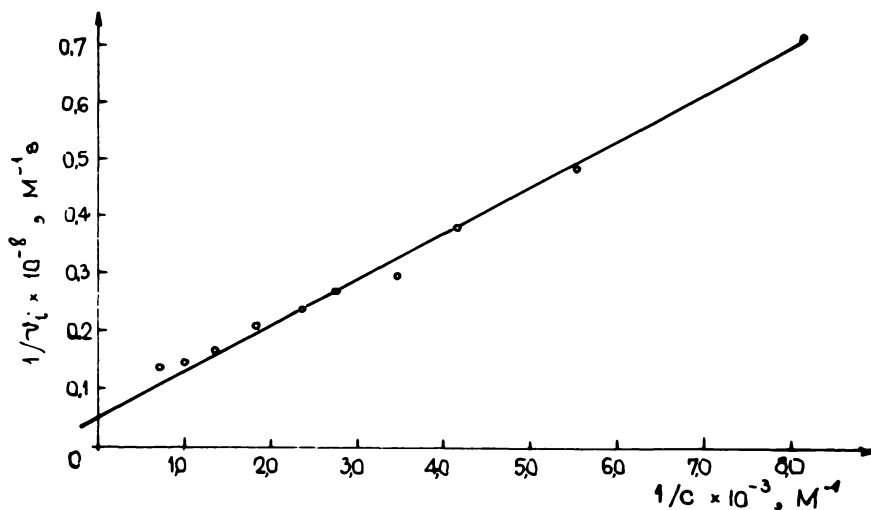


Fig.6 - Linearizarea Lineweaver-Burk

Parametrii cinetici V_{\max}^0 și K_M^0 , determinați prin oricare din cele patru metode sînt aproximativ egali, dar nu identici cu parametrii ecuației Michaelis-Menten, datorită erorilor care apar în cadrul operațiilor de liniarizare.

Pentru determinarea parametrilor reali ai ecuației Michaelis-Menten s-a utilizat un procedeu iterativ de corectare a estimărilor valorilor experimentale, utilizînd metoda de dezvoltare în serie Taylor a unei funcții de mai multe variabile, al cărui procedeu matematic este prezentat în continuare /300/.

Fie V_{\max}^0 și K_M^0 estimările inițiale ale parametrilor cinetici obținute prin liniarizarea ecuației Michaelis-Menten, pe baza a N determinări experimentale a vitezei inițiale de reacție o funcție de concentrația substratului S , și fie V_{\max} și K_M valorile reale ale parametrilor cinetici.

Se definește funcția F ca fiind egală cu diferența dintre valoarea experimentală a vitezei inițiale v_i și valoarea calculată a vitezei inițiale, utilizînd estimările V_{\max}^0 și K_M^0 pentru valoarea parametrilor cinetici :

$$F_i = v_i - \frac{V_{\max}^0 \cdot S_i}{K_M^0 + S_i}, \quad i = \overline{1, N} \quad (14)$$

Valorile reale ale parametrilor cinetici se exprimă în funcție de estimările inițiale ale parametrilor cinetici, prin următoarea dezvoltare în serie Taylor :

$$F_i(V_{\max}, K_M) = F_i^0(V_{\max}^0, K_M^0) = F_{\max}^0 \cdot \Delta V_{\max} + F_{K_M}^0 \cdot \Delta K_M, \quad i = \overline{1, N} \quad (15)$$

unde :

$$F_{V_{\max}^0}^0 = \left(\frac{\partial F_i}{\partial V_{\max}^0} \right)_{S_i, v_i, K_M^0} = - \frac{S_i}{K_M^0 + S_i} \quad (16)$$

$$F_{K_M^0}^0 = \left(\frac{\partial F_i}{\partial K_M^0} \right)_{S_i, v_i, V_{\max}^0} = \frac{V_{\max}^0 \cdot S_i}{(K_M^0 + S_i)^2} \quad (17)$$

Corecțiile ΔV_{\max} și ΔK_M se determină prin metoda celor mai mici pătrate, rezolvînd sistemul de două ecuații cu două necunoscute :

$$V_{\max} \cdot \sum F_{V_{\max i}} \cdot F_{V_{\max i}} + K_M \sum F_{V_{\max i}} \cdot F_{K_{Mi}} = \sum F_{V_{\max i}} \cdot F_i^0 \quad (18)$$

$$V_{\max} \cdot \sum F_{K_{Mi}} \cdot F_{V_{\max i}} + K_M \sum F_{K_{Mi}} \cdot F_{K_{Mi}} = \sum F_{K_{Mi}} \cdot F_i^0$$

Valorile corectate ale parametrilor cinetici sînt :

$$\begin{cases} V_{\max} = V_{\max}^0 - \Delta V_{\max} \\ K_M = K_M^0 - \Delta K_M \end{cases} \quad (19)$$

Aceste valori sînt utilizate ca estimari inițiale în noua iterație. Procesul iterativ atinge convergența atunci cînd sînt satisfăcute simultan inegalitățile :

$$\begin{cases} \left| \frac{\Delta V_{\max}}{V_{\max}^0} \right| < 10^{-6} \\ \left| \frac{\Delta K_M}{K_M^0} \right| < 10^{-6} \end{cases} \quad (20)$$

Această metodă a servit la baza unui program de calculator EN20PT-2 pentru determinarea parametrilor cinetici V'_{\max} și K_M reali. S-au utilizat ca estimari inițiale valorile V_{\max}^0 și K_M^0 obținute prin cele patru liniarizări ale ecuației Michaelis-Menten, obținându-se aceeași valoare reală a parametrilor cinetici $V'_{\max} = 1,642 \cdot 10^{-7}$ m/s și $K_M = 1,294 \cdot 10^{-3}$ m, fapt ce probează pentru convergența către un singur optim al metodei.

Valoarea constantei Michaelis indică o afinitate medie a enzimei pentru substratul aromatic.

Din valoarea vitezei maxime de reacție, s-a calculat constanta catalitică a reacției :

$$k_{\text{cat}} = \frac{V'_{\max}}{E_0} = 54,6 \text{ s}^{-1}$$

Din reprezentarea grafică a variației extincției maxime a produsului de reacție în funcție de raportul molar fenol : apă oxigenată (fig.7), se desprinde concluzia că procesul are loc conform unei stoichiometriei 2 : 1.

Temperatura este un parametru care influențează viteza

reacțiilor enzimetice modificând stabilitatea enzimei, efinitatea enzimei pentru substrat, viteza de scindare a complexului enzimă-substrat etc./37-39/. Dacă în teoria simplă Michaelis-Menten se aplică teoria stării de tranziție, schema de reacție va fi reprezentată prin :



în care apar stările de tranziție (ES^*) și (EP^*) , pe lângă complexul Michaelis (ES) .

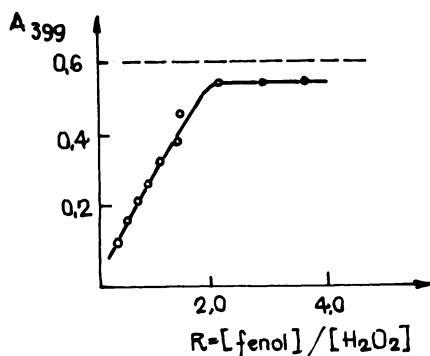


Fig.7 - Dependența absorbției de raportul molar fenol : apă oxigenată

Studiind dependența constantei de viteză cu temperatura, din ecuația lui Arrhenius $k = A \cdot e^{-E_a/RT}$, s-au determinat valorile parametrilor de activare ai procesului.

În experimentele efectuate, s-au determinat vitezele maxime de reacție și constantele catalitice pentru oxidarea fenolului cu apă oxigenată și peroxidază, la diferite temperaturi cuprinse în domeniul 20°-60°C. Din datele obținute (tabelul 11), se observă creșterea cu temperatura a parametrilor cinetici.

Faptul că pînă la temperatura de 60° nu se observă nici o scădere a vitezei de reacție, sau a constantei catalitice de viteză demonstrează stabilitatea termică ridicată a peroxidazei. Se desprinde de aici concluzia că reacțiile de oxidare, catalizate de peroxidază, pot avea loc într-un domeniu larg de temperatură.

Logaritmînd ecuația lui Arrhenius în $\ln k = \ln A - E_a/RT$ și reprezentînd grafic $\ln k = f(1/T)$ (fig.9) se determină valorile energiei de activare E_a , entalpiei și entropiei de activare.

Tabelul 11 - Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de oxidare enzimatică a fenolului de diferite temperaturi. Condiții: concentrația peroxidazei, $6 \cdot 10^{-9} M$; concentrația apei oxigenate: $1,38 \cdot 10^{-3} M$; $pH = 6,0$

Nr. det	C fenol $\cdot 10^4$ M	1/C $\cdot 10^{-4}$ M ⁻¹	$v_1 \cdot 10^7$ 1/s	1/ $v_1 \cdot 10^{-7}$	Parametrii
20°C					
1.	1,5943	0,6272	0,23330	4,0916	$y = 3,28 \cdot 10^6 + 6,634 \cdot 10^3 x$ $r = 0,998$ $v_{max}^i = 3,048 \cdot 10^{-7}$ 1/s $K_M = 2,022 \cdot 10^{-3}$ M $k_{cat} = 50,8$ s ⁻¹
2.	2,3915	0,4311	0,33210	3,0111	
3.	3,1887	0,3136	0,47124	2,122	
4.	4,7830	0,2090	0,60351	1,657	
5.	5,5802	0,1792	0,72510	1,379	
30°C					
1.	1,5943	0,6272	0,3325	3,0075	$y = 2,338 \cdot 10^6 + 4,424 \cdot 10^3 x$ $r = 0,995$ $v_{max}^i = 4,170 \cdot 10^{-7}$ 1/s $K_M = 1,845 \cdot 10^{-3}$ M $k_{cat} = 69,5$ s ⁻¹
2.	2,3915	0,4311	0,4744	2,1081	
3.	3,1887	0,3136	0,5246	1,7100	
4.	4,7830	0,2090	0,6122	1,6312	
5.	5,5802	0,1792	1,0758	0,9295	
40°C					
1.	1,5943	0,6272	0,4648	2,0618	$y = 1,160 \cdot 10^6 + 3,171 \cdot 10^3 x$ $r = 0,997$ $v_{max}^i = 8,020 \cdot 10^{-7}$ 1/s $K_M = 2,734 \cdot 10^{-3}$ M $k_{cat} = 143,6$ s ⁻¹
2.	2,3915	0,4311	0,6437	1,5534	
3.	3,1887	0,3136	0,9011	1,1097	
4.	4,7830	0,2090	1,2250	0,8163	
5.	5,5802	0,1792	1,5348	0,6516	
6.	6,3774	0,1568	1,7170	0,5824	
50°C					
1.	1,5943	0,6272	0,3475	1,4263	$y = 7,446 \cdot 10^6 + 2,162 \cdot 10^3 x$ $r = 0,995$ $v_{max}^i = 1,343 \cdot 10^{-6}$ 1/s $K_M = 2,303 \cdot 10^{-3}$ M $k_{cat} = 223,8$ s ⁻¹
2.	2,3915	0,4311	0,9786	1,0218	
3.	3,1887	0,3136	1,3706	0,7296	
4.	4,7830	0,2090	1,7959	0,5568	
5.	5,5802	0,1792	2,1971	0,4551	
60°C					
1.	1,5943	0,6272	0,9011	1,1097	$y = 6,654 \cdot 10^5 + 1,486 \cdot 10^3 x$ $r = 0,996$ $v_{max}^i = 1,502 \cdot 10^{-6}$ 1/s $K_M = 2,234 \cdot 10^{-3}$ M $k_{cat} = 250,3$ s ⁻¹
2.	2,3915	0,4311	1,4304	0,6991	
3.	3,1887	0,3136	1,8156	0,5508	
4.	4,7830	0,2090	2,8651	0,3678	

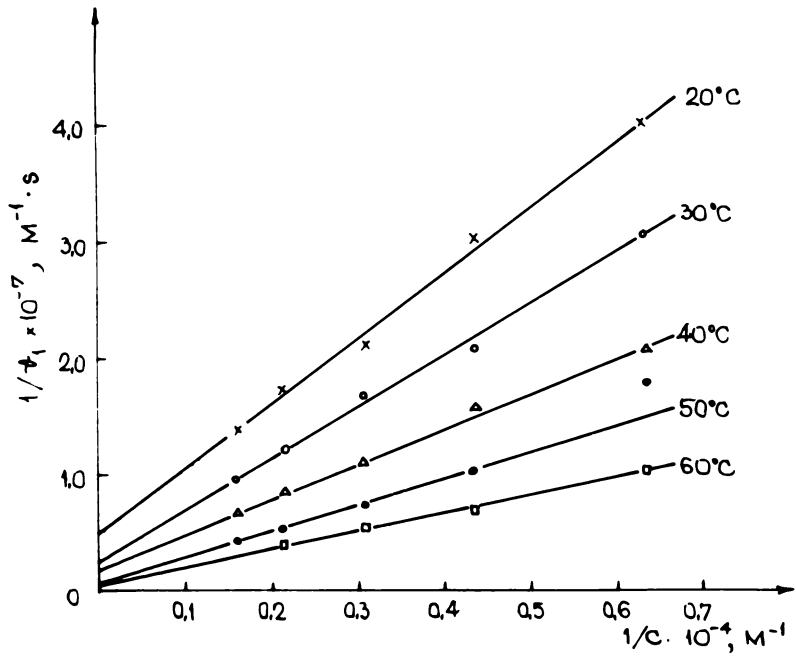


Fig.8 - reprezentative lineweaver-burk la diferite temperaturi

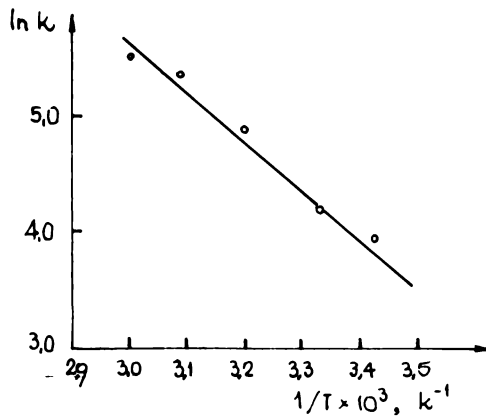


Fig.9 - dependența $\ln k = f(1/T)$

Dreapta din figură este caracterizată de o ecuație :

$$\ln k = 18,46 - 4,26 \cdot 1/T, \quad r = 0,98 \quad (21)$$

Cu valorile determinate pentru $\ln A$ și $\operatorname{tg} \alpha$, se calculează :

$$E_a = 32,9 \text{ k y/mol}$$

$$\Delta H^* = 35,4 \text{ k y/mol}$$

$$\Delta S^* = -72,6 \text{ y/mol} \cdot ^\circ\text{K}$$

Valoarea negativă a entropiei de activare ΔS^* și valoarea entalpiei de activare ΔH^* sînt un indiciu, că reacția limitativă de viteză este ruperea complexului enzimă-substrat. Totodată, valoarea negativă mare a ΔS^* arată că formarea stării de tranziție necesită ca reactanții să adopte conformații precise. Laidler /304/ explică valoarea negativă a entropiei de activare prin creșterea polarității speciilor din sistem, în timpul formării complexului activat (SP), cu o creștere concomitentă a gradului de solvatare.

Valorile determinate experimental pentru energia de activare sînt apropiate de cele prezentate în literatură pentru energia de activare a reacțiilor enzimatice /37/.

Un alt parametru care influențează activitatea enzimelor este pH-ul. Enzimele sînt extrem de sensibile la variațiile de pH, care le pot afecta activitatea fie ireversibil - la valori extreme ale concentrației ionilor de hidrogen - cînd este denaturată proteina, fie reversibil, influențînd gradul de ionizare al substratului, enzimei sau complexului enzimă-substrat. Studiul acțiunii pH-ului asupra reacțiilor enzimatice, permite găsirea unui pH optim, sau interval optim de pH, pentru care viteza reacției este maximă.

Pentru sistemul fenol-apă oxigenată-peroxidază, s-a urmărit dependența de pH a vitezei maxime de reacție, a constantei Michaelis și a constantei catalitice, în domeniul de pH cuprins între 3 - 8. Rezultatele experimentale obținute sînt prezentate în tabelul 12.

Urmărind variația vitezei maxime de reacție în funcție de pH (fig. 10), se observă că enzima prezintă un maxim de activitate în domeniul de pH 6,0 - 6,5.

Prezența unor grupări ionizabile în peroxidază și compoziția ei a fost sugerată și demonstrată de mulți cercetători. Valorile constantelor de ionizare și de aici, natura grupărilor implicate în proces, pot fi evidențiate din date cinetice.

Tabelul 12 - Determinarea parametrilor cinetici ai reacției de oxidare enzimatică a fenolului la diferite pH-uri.
 Condiții : concentrația peroxidazei = $3,72 \cdot 10^{-9} M$
 concentrația apei oxigenate : $1,102 \cdot 10^{-2} M$, $T = 25^{\circ}C$

pH	3,6	4,0	4,6	5,0	5,6	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0
fenol. $10^4 M$										
	$v_1 \cdot 10^8, M \cdot s^{-1}$									
0,678	1,277	1,505	1,641		1,914	1,910	2,107	1,860	1,481	1,375
1,356	2,371	2,660	2,673	2,759	3,722	2,351	4,351	3,532	2,764	1,762
2,034	2,358	3,548	3,903	3,900	5,183	4,905	5,213	4,711	3,903	3,326
2,712	3,903	4,387	4,961	4,933	6,384	6,012	6,649	6,156	4,711	2,652
3,390	4,684	5,212	5,987	6,010	7,231	7,918	7,875	7,319	5,135	3,562
4,068	5,012	5,720	6,756	6,820	8,207	8,608	8,715	8,310	5,856	4,133
v_{max}° 10^7 ($M \cdot s^{-1}$)	1,05	1,25	1,54	1,64	1,89	2,02	2,0	1,67	1,25	0,83
$K_m \cdot 10^4$ (M)	4,65	4,95	5,18	5,18	5,20	5,18	5,15	5,20	4,95	5,16
k_{cat}° s^{-1}	28,2	33,6	41,4	44,1	50,8	53,8	53,8	44,9	33,6	22,3



Fig.10 - Dependența vitezei maxime de reacție de pH

Reprezentând valorile determinate experimental ale constantei catalitice de viteză în funcție de pH (într-o diagramă semilogaritmică - fig.11) s-au obținut valorile pK_{es1} și pK_{es2} ionizare pentru complexii enzimă - substrat /38/. S-au determinat două valori : $pK_{es1} = 5,3$ și $pK_{es2} = 6,9$, care corespund cu cele prezentate în literatură pentru ionizarea compusului I în reacția de reducere la compusul II ($pK_2 = 5,1 - 5,29$ /209/), și pentru ionizarea compusului II în reacția de reducere la peroxidază, cu aport de un electron și doi protoni ($pK_5 = 7,0 - 7,1$ /209,252,284/).

Ionizarea care are loc cu un $pK_a = 5,3$ poate fi atribuită unei grupări carboxilat distale sau histidinei proximale, sau unor grupări bazice sau acide (carboxilat sau imidazol) din vecinătatea inelului porfirinic, și are rolul de a stabiliza radical-cationul porfirinic în compusul I /209/. Deoarece transformarea peroxidazei (forma ferică) în compusul I, în prezența apei oxigenate nu are loc cu schimb de protoni, se poate admite că și peroxidaza (Fe III) are o grupare ionizabilă legată de hem cu aceeași comportare la ionizare ca cea din compusul I. Astfel, o grupare, cu $pK_a = 5$, a fost pusă în evidență, în peroxidază, de Theorell și Paul /209/.

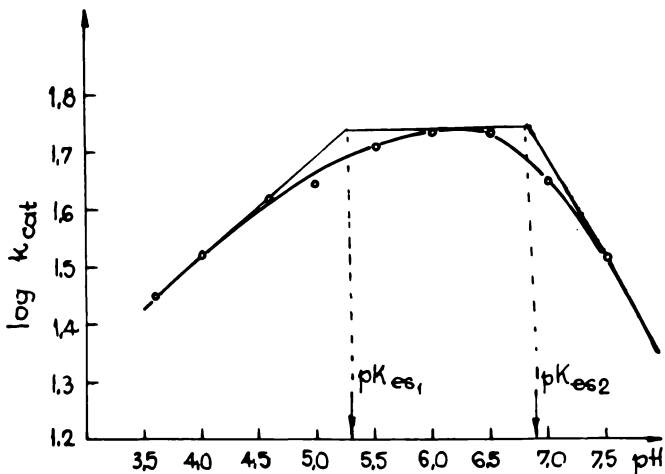
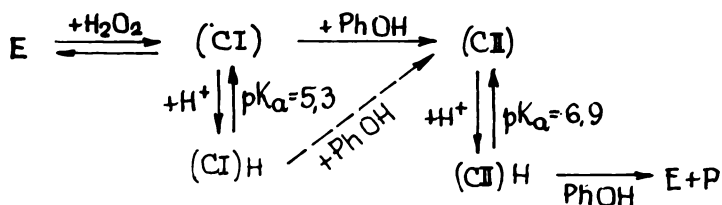


Fig.11 - Dependența de pH a constantei catalitice, la 25°C. conc. peroxidază : $3,72 \cdot 10^{-9}$ M; conc. H_2O_2 : $1,102 \cdot 10^{-3}$ M; conc. fenol : $(0,6 - 4,06) \cdot 10^{-4}$ M

Natura grupării care ionizează cu $pK_a = 6,9 - 7,0$ nu este încă cunoscută. Se poate presupune că este vorba de histidina distală, care este legată printr-o legătură de hidrogen cu ligantul al 6-lea al Fe(IV) - apa /252/. Deoarece prin deprotonare compusul II se inactivează reversibil, se poate admite că forma activă în procesul catalitic este forma protonată.

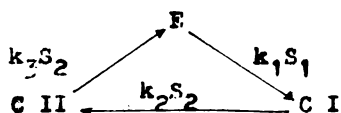
Pe baza rezultatelor experimentale obținute se poate propune următoarea schemă de reacție, ținând cont și de ionizarea enzimii și a complexilor enzimatici :



Ioni de hidrogen prezenți în mediul de reacție pot să manifeste și o acțiune inhibitoare asupra enzimei. Reprezentînd grafic $1/v_1 = f(1/s)$ la diferite pH-uri, (fig.12) se obține o familie de drepte cu pantă variabilă, care se intersectează într-un punct comun pe abscisă, ce reprezintă $-1/K_M$.

Se observă că ionii de hidrogen manifestă o inhibiție necompetitivă asupra enzimei ; valoarea K_M rămîne neschimbată ($K_M = 5 \pm 0,15 \cdot 10^{-4} M$), și deci afinitatea enzimei pentru substrat nu se modifică în urma reacției cu inhibitorul, care nu concurează cu substratul pentru legarea la centrul catalitic activ.

Așa cum s-a arătat anterior, reacțiile de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată catalizate de peroxidază sînt reacții enzimatice cu două substraturi, pentru a căror caracterizare este necesară determinarea constantelor de viteză k_1 și k_3 . Dacă se admite următoarea schemă simplificată a procesului :



și se exprimă concentrațiile speciilor enzimatice în funcție de concentrațiile reactenților :

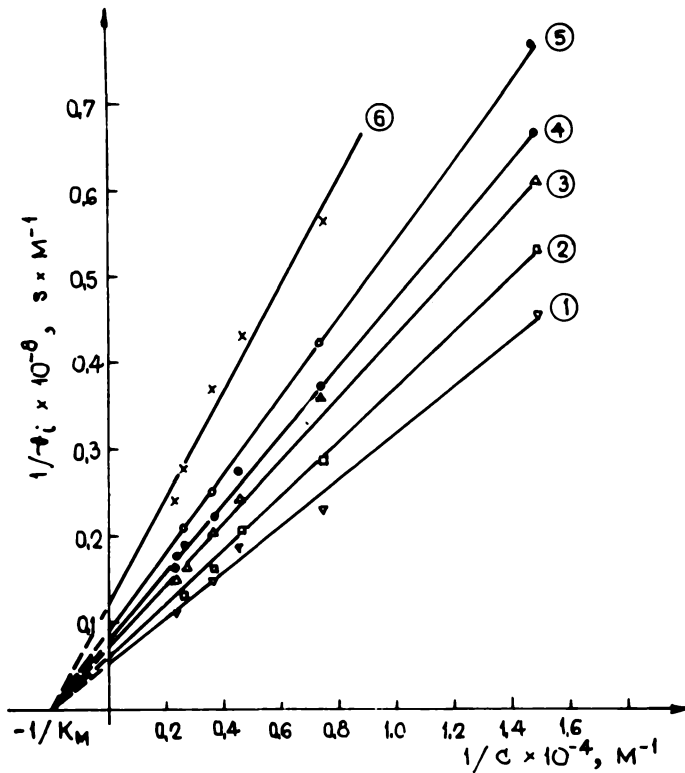


Fig.12 - Reprezentarea Lineweaver-Burk pentru inhibiția H^+ ,
 $T = 25^\circ C$; $E_0 = 3,72 \cdot 10^{-9} M$; $[H_2O_2] = 1,102 \cdot 10^{-3} M$;
 1. pH = 6,0 și 6,5 ; 2. pH = 5,5 și 7,0 ; 3. pH =
 = 4,5 și 5,0 ; 4. pH = 4,0 și 7,5 ; 5. pH = 3,6 ;
 6. pH = 8,0

$$\begin{aligned}
 E &= k_2 k_3 S_2^2 \\
 C_I &= k_1 k_3 S_2 S_1 \\
 C_{II} &= k_1 k_2 S_1 S_2
 \end{aligned} \tag{23}$$

se obține :

$$\frac{C_{II}}{E_0} = \frac{k_1 k_2 S_1 S_2}{k_2 k_3 S_2^2 + k_1 (k_2 + k_3) S_1 S_2} \tag{24}$$

unde E_0 = concentrația inițială a enzimei, $L_0 = E + C_I + C_{II}$. Deoarece reacția lentă, limitativă de viteză a procesului este descompunerea complexului Michaelis C_{II} , viteza de reacție poate fi scrisă :

$$v = k_3 C_{II} \tag{25}$$

Înlocuind pe C_{II} în ecuația de viteză (25), se obține pentru viteza de reacție expresia :

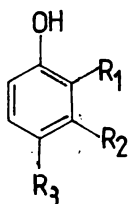
$$v = \frac{k_1 k_2 k_3 S_1 S_2 E_0}{k_2 k_3 S_2^2 + k_1 (k_2 + k_3) S_1 S_2} \quad (26)$$

care prin liniarizare devine :

$$\frac{S_0}{v_1} = \frac{1}{k_1 \cdot S_1} + \frac{k_2 + k_3}{k_2 \cdot k_3} \cdot \frac{1}{S_2} \quad (27)$$

Deoarece constanta de viteză k_1 , a reacției de formare a complexului C_I din enzimă și apă oxigenată nu depinde de natura substratului aromatic utilizat, se poate admite pentru k_1 valoarea din literatură $k_1 = 1,8 \cdot 10^7 M^{-1} s^{-1} / 215, 221, 242, 248, 273 /$. În aceste condiții, admitând că $k_2 \gg k_3$, se poate calcula k_3 , constanta de viteză pentru reducerea compusului II la peroxidază, determinantă de viteză, care depinde de natura compusului aromatic utilizat cu substrat donor de protoni.

În modul descris, s-a studiat cinetica oxidării enzimatică pentru o serie de fenoli, și anume :



- | | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. $R_1 = R_2 = R_3 = H$ | , fenol |
| 2. $R_1 = R_2 = H, R_3 = OH$ | , hidrochinonă |
| 3. $R_1 = OH, R_2 = R_3 = H$ | , pirocatechină |
| 4. $R_1 = CH_3, R_2 = R_3 = H$ | , o-crezol |
| 5. $R_1 = R_2 = H, R_3 = OCH_3$ | , p-metoxifenol |
| 6. $R_1 = NH_2, R_2 = R_3 = H$ | , o-aminofenol |
| 7. $R_1 = R_3 = H, R_2 = NH_2$ | , m-aminofenol |
| 8. $R_1 = R_2 = H, R_3 = Cl$ | , p-clorfenol |
| 9. $R_1 = Cl, R_2 = R_3 = H$ | , o-clorfenol |
| 10. $R_1 = R_2 = OH, R_3 = H$ | , pirogalol |
| 11. $R_1 = OCH_3, R_2 = R_3 = H$ | , o-metoxifenol |

Au fost determinate constantele de viteză k_3 , precum și valorile constantelor Michaelis și a vitezelor maxime de reacție, pentru fiecare compus efectuându-se minim patru seturi de determinări experimentale. S-au utilizat două tehnici experimentale diferite pentru urmărirea reacției, și anume metoda spectrofotometrică și metoda termică.

Studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică a fenolilor prin metoda spectrofotometrică s-a realizat prin urmărirea în timp a dispariției maximumului de absorbție al reactantului aromatic, sau a apariției benzii de absorbție corespunzătoare produsului de reacție. S-a ales domeniul de lungimi de undă în care benzile corespunzătoare reactantului, respectiv produsului de reacție, sînt net separate. Coeficienții molari de extincție ai produșilor de reacție s-au determinat experimental, pe baza ipotezei că, la transformarea totală a substratului aromatic, din doi moli de reactant se formează un mol de produs. În tabelul 13 sînt prezentate maximele de absorbție și coeficienții molari de extincție ai reactanților și produșilor de reacție, utilizați pentru studiul cinetic al reacției.

Tabelul 13 - Caracteristicile spectrale ale fenolilor și produșilor reacției de oxidare enzimatică

Substrat	Fenol		Produs de reacție	
	λ_{\max}	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)	λ_{\max}	$\epsilon \cdot 10^{-4}$ ($M^{-1}cm^{-1}$)
Fenol			399	3,470
Hidrochinonă	293	0,270		
Pirocatechină	278	0,263		
o-Crezol			373	1,960
p-Metoxifenol			380,2	0,440
o-Aminofenol			427,4	1,280
m-Aminofenol			434,8	0,360
o-Clorfenol			409,8	0,560
p-Clorfenol			296,0	0,728

Viteza inițială de reacție s-a determinat experimental prin urmărirea scăderii concentrației reactantului în timp, în cazul hidrochinonei și pirocatechinei. Pentru ceilalți compuși aromatici, vitezele de reacție s-au determinat prin urmărirea formării produsului de reacție, nefiind posibilă măsurarea scăderii concentrației reactantului, deoarece unii fenoli (p-metoxifenol, m-aminofenol, p-clorfenol), prezintă maximumul de absorbție la marginea domeniului spectral ultraviolet, iar pe de altă parte, în cazul o-crezolului, m-aminofenolului, o-clorfenolului, banda de absorbție a reactantului este acoperită de benzile de absorbție ale produsului de reacție.

Deoarece nu pentru toți fenolii reacția de oxidare enzima-

tică poate fi urmărită spectrofotometric, s-a încercat găsirea unei alte metode de investigare. Astfel, s-a studiat cinetica reacției enzimatice a hidrochinonei, pirogalolului, pirocatechinei prin măsurarea efectului termic al procesului, înregistrând curba de variație în timp a temperaturii amestecului de reacție, utilizând un aparat de tip Ditermanol. Experimentele au fost realizate în felul următor: în celulele termostatale ale aparatului s-au introdus câte 200 ml tempon fosfat 0,05 M, pH = 6,0, preîncălzit la 25°C (temperatura de reacție). În celula de reacție s-au introdus soluțiile de fenol și de enzimă; reacția s-a inițiat prin introducerea în amestecul de reacție a apei oxigenate, cu ajutorul unei pipete submersibile, și s-a înregistrat variația temperaturii amestecului de reacție în timp. Viteza inițială de reacție s-a determinat din înregistrarea $t = f(\tau)$, ca tangentă la curbă pentru $\tau \rightarrow 0$.

În continuare, se prezintă un exemplu de studiu cinetic al reacției de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază a hidrochinonei, realizat prin ambele tehnici experimentale.

Primul set de experiențe a constatat în determinarea vitezei inițiale de reacție, a oxidării enzimatice a hidrochinonei, la concentrații variabile de substrat aromatic, menținând constantă concentrația apei oxigenate și a peroxidazei. Experimentele s-au efectuat pentru mai multe concentrații constante de apă oxigenată, la concentrație constantă de peroxidază. Rezultatele experimentale sînt prezentate în tabelul 14 pentru metoda spectrofotometrică, și în tabelul 15 pentru metoda termică.

Tabelul 14 -- Vitezele inițiale de reacție pentru oxidarea hidrochinonei, determinate prin metoda spectrofotometrică.

T = 25°C, pH = 6,0. Concentrația enzimei $1,86 \cdot 10^{-9}$ M

$C_{H_2O_2} \cdot 10^4$	$C_{Ha} \cdot 10^4$	$1/C_{Ha} \cdot 10^{-4}$	$v_1 \cdot 10^6$	$1/v_1 \cdot 10^{-6}$	$1/v_1 \cdot 10^3$
	M	M ⁻¹	M.s ⁻¹	M ⁻¹ .s	s
1	2	3	4	5	6
5,710	3,100	0,323	1,161	0,861	1,602
	2,790	0,358	1,098	0,910	1,692
	2,480	0,403	1,005	0,995	1,851
	2,170	0,461	0,895	1,112	2,068
	1,860	0,538	0,792	1,262	2,347
	1,550	0,645	0,662	1,509	2,806

$$1/v_1 = 2,303 \cdot 10^6 + 203,466 \cdot 1/8_2, r = 0,998 \quad V_{\max} = 4,342 \cdot 10^{-6} \text{ M.s}^{-1}$$

$$K_{M_2} = 6,83 \cdot 10^{-4} \text{ M}$$

$$1/v_1 = 5 \cdot 10^{-4} + 3,75 \cdot 10^{-7} \quad 1/8_2, r = 0,998 \quad k_3 = 2,6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

	2	3	4	5	6	
2	6,357	3,132	0,319	1,238	0,803	1,503
		2,820	0,355	1,143	0,875	1,628
		2,506	0,398	1,014	0,906	1,834
		2,193	0,456	0,905	1,105	2,055
		1,880	0,532	0,806	1,241	2,308
		1,566	0,638	0,693	1,443	2,684
	$1/v_1 = 1,914 \cdot 10^5 + 197,323 \cdot 1/S_2, r=0,996 \quad V_{\max}^1 = 5,224 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ $K_{M2}^1 = 1,030 \cdot 10^{-3} \text{ M}$					
	$E/v_1 = 3,34 \cdot 10^{-4} + 3,708 \cdot 10^{-7} \cdot 1/S_2, r=0,998 \quad k_3 = 2,696 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$					
3	3,082	3,132	0,319	0,971	1,029	1,914
		2,820	0,355	0,909	1,099	2,044
		2,506	0,398	0,895	1,118	2,079
		2,193	0,456	0,754	1,325	2,465
		1,880	0,532	0,694	1,441	2,680
		1,566	0,638	0,612	1,634	3,039
	$1/v_1 = 3,978 \cdot 10^5 + 194,910 \cdot 1/S_2, r=0,987 \quad V_{\max}^1 = 2,514 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$ $K_{M2}^1 = 4,9 \cdot 10^{-4} \text{ M}$					
	$E/v_1 = 7,385 \cdot 10^{-4} + 3,678 \cdot 10^{-7} \cdot 1/S_2, r=0,991 \quad k_3 = 2,76 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$					

Reprezentind grafic dependențele $1/v_1 = f(1/C_{H_2O_2})$ (figura 13) respectiv $1/v_1 = f(1/C_{H_2O})$ (figura 14), se obține o familie de drepte paralele, cu aceeași pantă. Acest fapt este un argument în favoarea unui mecanism ping-pong, pentru reacția de oxidare a fenolilor cu apă oxigenată și peroxidază.

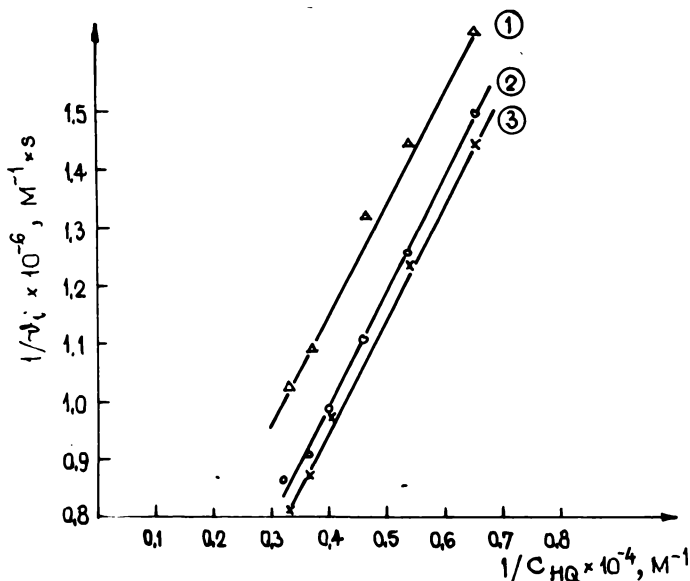


Fig.13 - Reprezentările lineweaver-Burk pentru hidrochinonă.
 conc.peroxidază: $1,88 \cdot 10^{-4}$ M; pH = 6,0, T = 25°C
 (1). $C_{H_2O_2} = 3,082 \cdot 10^{-4}$ M; (2). $C_{H_2O_2} = 5,710 \cdot 10^{-4}$ M;
 (3). $C_{H_2O_2} = 6,357 \cdot 10^{-4}$ M

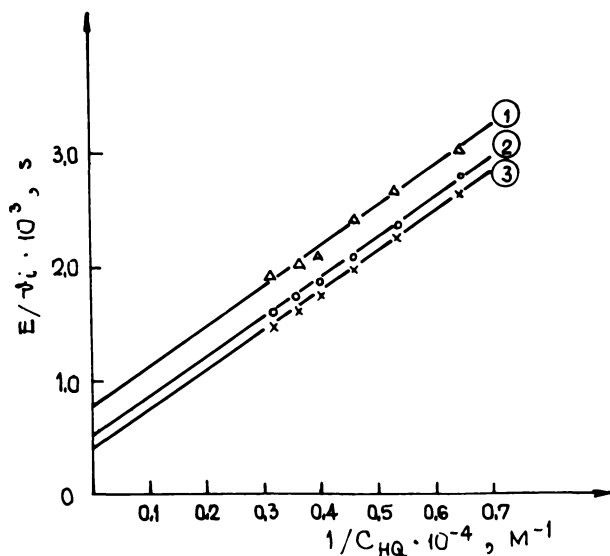


Fig.14 - Reprezentările $e/v_1 = f(1/C_{HQ})$ pentru hidrochinonă.
 Condiții : concentrația peroxidază = $1,88 \cdot 10^{-9}$ M, pH = 6,0,
 T = 25°C, (1). $C_{H_2O_2} = 3,082 \cdot 10^{-4}$ M; (2). $C_{H_2O_2} = 5,710 \cdot 10^{-4}$ M;
 (3). $C_{H_2O_2} = 6,357 \cdot 10^{-4}$ M

Tabelul 15 - Vitezele inițiale de reacție pentru oxidarea hidrochinonei, determinate prin metoda termică. Concentrație peroxidază: $2,95 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $\text{pH} = 6,0$, $T = 25^{\circ}\text{C}$, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 6,1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$

$C_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 10^3$ M	$1/C_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 10^{-3}$ M^{-1}	$v_1 \cdot 10^5$ $\text{M} \cdot \text{s}^{-1}$	$1/v_1 \cdot 10^{-4}$ $\text{M}^{-1} \cdot \text{s}$	$E/v_1 \cdot 10^4$ s
1,0004	0,9996	5,892	1,6971	5,006
1,5006	0,6664	8,1136	1,2325	3,6358
2,008	0,4980	9,6592	1,0353	3,054
2,501	0,3984	11,8647	0,8428	2,486
3,001	0,3332	13,6325	0,7335	2,1638
3,501	0,2856	15,2322	0,6565	1,9367
4,001	0,2499	16,8527	0,5934	1,7505
4,502	0,2221	18,9387	0,5280	1,7416
5,002	0,1999	17,7157	0,5645	1,6653

$1/v_1 = 2,206 \cdot 10^4 + 16,807 \cdot 1/S_2, r = 0,998$ $V_{\text{max}} = 4,533 \cdot 10^{-5} \text{ M/S}$
 $K_M = 7,618 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
 $E/v_1 = 6,68 \cdot 10^{-5} + 4,332 \cdot 10^{-5} \cdot 1/S_2, r = 0,998$ $k_3 = 2,30 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$

In figura 15 este prezentată dependența $E/v_1 = f(1/C_{\text{H}_2\text{O}_2})$, determinată prin metoda termică.

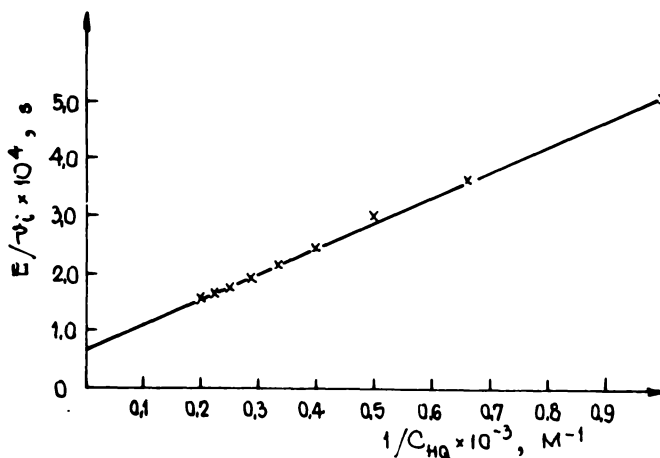


Figura 15 - Dependența $E/v_1 = f(1/C_{\text{H}_2\text{O}_2})$ pentru hidrochinonă, determinată prin metoda termică $E_0 = 2,95 \cdot 10^{-8} \text{ M}$, $C_{\text{H}_2\text{O}_2} = 6,10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, $\text{pH} = 6,0$, $T = 25^{\circ}\text{C}$

Comparând valorile parametrilor cinetici K_{M2} și k_3 , obținute prin cele două metode, se observă existența unei bune concordanțe. Se desprinde de aici concluzia că metoda termică de analiză propusă de noi poate fi utilizată pentru studiul cineticii reacțiilor enzimatice.

În tabelul 16 sînt prezentate rezultatele experimentale obținute la studiul reacțiilor de oxidare enzimatică a unei serii de fenoli, prin metodele descrise.

Tabelul 16 - Studiul cinetic al reacțiilor de oxidare enzimatică al unei serii de fenoli ; pH = 6,0 ; T = 25°C

$C_{H_2O_2} \cdot 10^4$ M	$C_{enzimă}$ M	$C_{fenol} \cdot 10^4$ M	$1/C_{fenol} \cdot 10^{-4}$ M ⁻¹	$v_1 \cdot 10^7$ M.s ⁻¹	$1/v_1 \cdot 10^{-7}$ M ⁻¹ .s	$1/v_1 \cdot 10^2$ s
1	2	3	4	5	6	7
Metoda spectrofotometrică						
Fenol						
6,89	2,7 · 10 ⁻⁹	1,213	0,824	0,140	7,148	19,300
		1,808	0,553	0,204	4,902	13,235
		2,411	0,415	0,262	3,816	10,303
		3,014	0,332	0,336	2,976	8,035
		3,616	0,276	0,360	2,778	7,506
		4,219	0,237	0,408	2,451	6,62
$1/v_1 = 5,521 \cdot 10^6 + 7,792 \cdot 10^3 \cdot 1/s_2, r=0,99$				$V_{max}^0 = 1,811 \cdot 10^{-7}$ M/s		
$1/v_1 = 1,26 \cdot 10^{-2} + 2,18 \cdot 10^{-5} \cdot 1/s_2, r=0,996$				$K_{M2} = 1,411 \cdot 10^{-3}$ M		
				$k_3 = 4,58 \cdot 10^4$ M ⁻¹ s ⁻¹		
o-Crezol						
5,0	4,5 · 10 ⁻⁸	1,0	1,0	1,052	0,950	42,75
		1,5	0,66	1,352	0,739	33,25
		2,0	0,50	1,653	0,605	27,22
		2,5	0,40	1,954	0,512	23,04
		3,0	0,33	2,405	0,416	18,72
		$1/v_1 = 1,942 \cdot 10^6 + 776,4 \cdot 1/s_2, r=0,991$				$V_{max}^0 = 5,15 \cdot 10^{-6}$ M.s ⁻¹
				$K_{M2} = 3,998 \cdot 10^{-3}$ M		
$1/v_1 = 8,82 \cdot 10^{-2} + 3,48 \cdot 10^{-5} \cdot 1/s_2, r=0,992$				$k_3 = 2,27 \cdot 10^5$ M ⁻¹ s ⁻¹		
o-Clorfenol						
6,28	2,7 · 10 ⁻⁹	0,835	1,197	1,205	0,829	2,240
		1,670	0,598	2,321	0,431	1,163
		2,506	0,399	3,723	0,268	0,725

1	2	3	4	5	6	7
		3,341	0,299	3,928	0,255	0,687
		4,176	0,239	4,566	0,205	0,555
		5,012	0,199	5,800	0,172	0,465
$1/v_1 = 3,962 \cdot 10^5 + 655,851 \cdot 1/S_2, r=0,997$		$V'_{max} = 2,52 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$				
		$K_{M2} = 1,05 \cdot 10^{-3} \text{ M}$				
$1/v_1 = 1,08 \cdot 10^{-3} + 1,77 \cdot 10^{-6} \cdot 1/S_2, r=0,998$		$k_3 = 5,65 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$				

o-Clorfenol

0,28	$1,8 \cdot 10^{-9}$	0,031	1,200	0,575	1,738	3,128
		1,662	0,601	1,150	0,869	1,564
		2,078	0,482	1,502	0,666	1,198
		2,494	0,401	1,534	0,652	1,174
		3,325	0,301	1,904	0,526	0,946
		4,156	0,241	2,172	0,460	0,828
		4,978	0,201	2,172	0,460	0,828
$1/v_1 = 2,172 \cdot 10^6 + 1,045 \cdot 10^3 \cdot 1/S_2, r=0,986$		$V'_{max} = 4,004 \cdot 10^{-7} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$				
		$K_{M2} = 4,81 \cdot 10^{-4} \text{ M}$				
$1/v_1 = 2,28 \cdot 10^{-3} + 2,35 \cdot 10^{-6} \cdot 1/S_2, r=0,988$		$k_3 = 4,25 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$				

o-Aminofenol

5,02	$1,5 \cdot 10^{-9}$	1,0	1,00	1,691	0,591	0,866
		1,5	0,66	2,367	0,422	0,633
		2,0	0,50	2,931	0,341	0,512
		2,5	0,40	3,494	0,286	0,429
		3,0	0,33	3,852	0,261	0,392
$1/v_1 = 9,023 \cdot 10^5 + 500,2 \cdot 1/S_2, r = 0,999$		$V'_{max} = 1,108 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$				
		$K_{M2} = 5,542 \cdot 10^{-4} \text{ M}$				
$1/v_1 = 1,38 \cdot 10^{-3} + 7,472 \cdot 10^{-7} \cdot 1/S_2, r=0,993$		$k_3 = 1,34 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$				

m-Aminofenol

5,00	$7,5 \cdot 10^{-8}$	1,0	1,00	9,018	0,1108	8,310
		1,5	0,66	11,220	0,0891	6,682
		2,0	0,50	13,220	0,0756	5,670
		2,5	0,40	15,230	0,0656	4,920
		3,0	0,33	17,630	0,0567	4,252
$1/v_1 = 3,374 \cdot 10^5 + 79,02 \cdot 1/S_2, r=0,992$		$V'_{max} = 2,964 \cdot 10^{-6} \text{ M} \cdot \text{s}^{-1}$				
		$K_{M2} = 2,342 \cdot 10^{-4} \text{ M}$				
$1/v_1 = 2,5 \cdot 10^{-2} + 5,82 \cdot 10^{-6} \cdot 1/S_2, r=0,992$		$k_3 = 1,70 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$				

$C_{H_2O_2} \cdot 10^3$ M	$C_{enzimã}$ M	$C_{fenol} \cdot 10^3$ M	$1/C_{fenol} \cdot 10^{-3}$ M ⁻¹	$v_1 \cdot 10^5$ M.s ⁻¹	$1/v_1 \cdot 10^{-5}$ M ⁻¹ .s	$E/v_1 \cdot 10^4$ s
------------------------------	-------------------	-----------------------------	--	---------------------------------------	---	-------------------------

Metodă termică

Pirogalol

6,494	$2,96 \cdot 10^{-8}$	5,49	0,182	9,886	0,1014	2,980
		5,00	0,205	9,668	0,1034	3,060
		4,00	0,250	8,518	0,1174	3,435
		3,25	0,307	7,625	0,1312	3,883
		2,00	0,500	4,933	0,2008	5,944
		1,50	0,667	3,965	0,2522	7,455

$$1/v_1 = 3,898 \cdot 10^3 + 31,92 \cdot 1/S_2, \quad r = 0,998$$

$$v_{\max}^1 = 2,565 \cdot 10^{-4} \text{ M.s}^{-1}$$

$$K_{M_2} = 8,10 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$E/v_1 = 1,10 \cdot 10^{-4} + 9,4 \cdot 10^{-7} \cdot 1/S_2, \quad r = 0,998$$

$$k_3 = 1,06 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$

o-Metoxifenol

6,10	$2,96 \cdot 10^{-8}$	1,0	1,000	1,968	0,508	15,036
		2,5	0,400	3,593	0,278	8,235
		3,0	0,334	4,022	0,248	7,341
		3,5	0,286	4,617	0,216	6,394
		4,5	0,222	4,951	0,202	5,980
		5,0	0,200	5,141	0,195	5,772

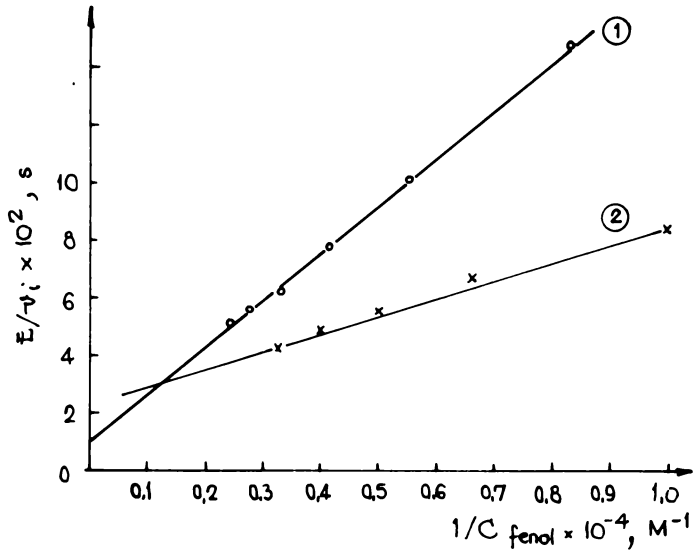
$$1/v_1 = 1,276 \cdot 10^4 + 38,642 \cdot 1/S_2, \quad r = 0,986$$

$$v_{\max}^1 = 7,838 \cdot 10^{-5} \text{ M.s}^{-1}$$

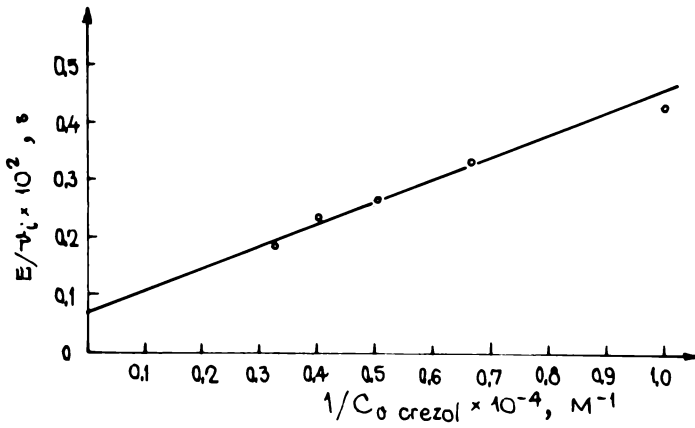
$$K_{M_2} = 3,028 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$E/v_1 = 3,3 \cdot 10^{-4} + 1,16 \cdot 10^{-6} \cdot 1/S_2, \quad r = 0,988$$

$$k_3 = 8,62 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$$



ig.16 - Dependenta $E/v_i = f(1/C_{\text{fenol}})$, pentru : 1.fenol, 2.o-aminofenol



ig.17 - Dependenta $E/v_i = f(1/S_2)$, pentru o-crezol

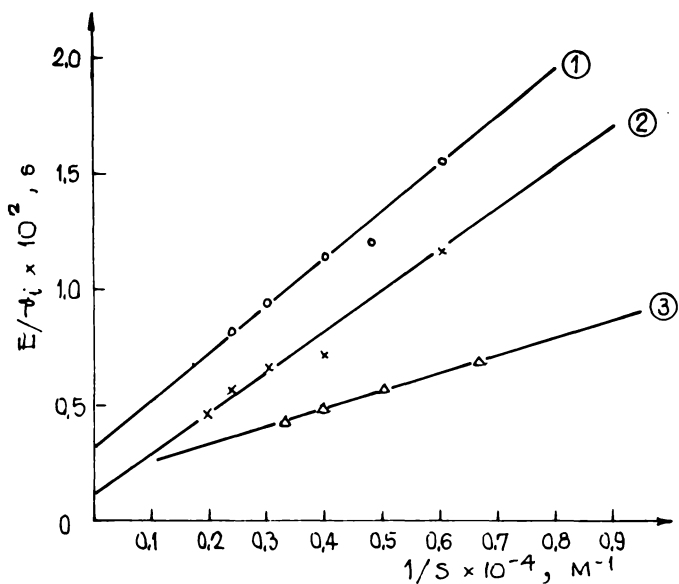


Fig.18 - dependența $E/v_i = f(1/S)$ pentru : (1) p-clorfenol ; (2) - o-clorfenol ; (3) m-aminofenol

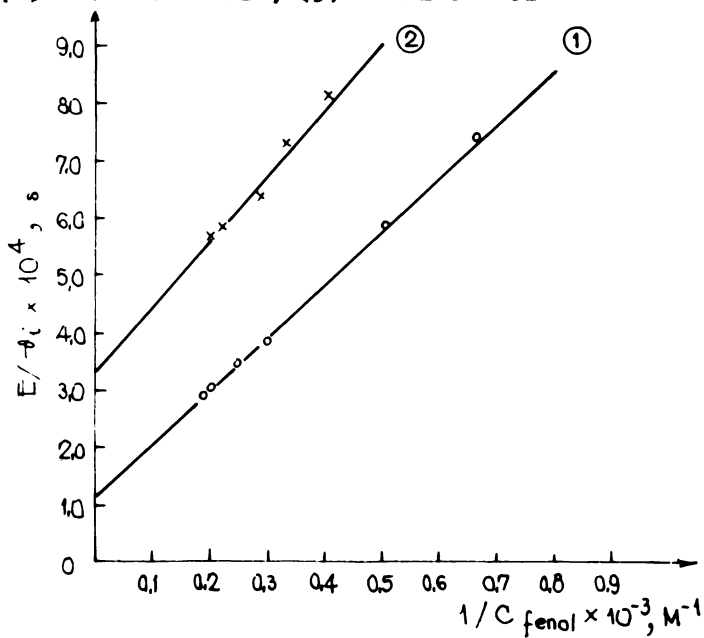


Fig.19 - Dependența $E/v_i = f(1/S)$ pentru : (1) pirogalol ; (2) o-metoxizetol

Studiind dependența vitezei inițiale de reacție pentru p-metoxifenol și pirocatechină (tab.17), și reprezentind grafic $v_1 = f(1/S)$, (fig.20), se observă reacțiile de oxidare enzimatică ale acestor compuși se abat de la cinetica Michaelis-Menten. În alura dependenței $v_1 = f(1/S)$, se observă aceste reacții pot fi considerate ca reacții autocatalitice, cînd produsul final exercită o acțiune de activare a procesului [37].

Tabelul 17 - Vitezele inițiale de reacție pentru p-metoxifenol și pirocatechină $T = 25^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,0$, $\text{H}_0 = 1,5 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
 $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}_2} = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}$

Nr. det	$\text{C}_{\text{fenol}} \cdot 10^4$ M	$v_1 \cdot 10^7$ M.s ⁻¹	Nr. det	$\text{C}_{\text{fenol}} \cdot 10^4$ M	$v_1 \cdot 10^7$ M.s ⁻¹
<u>pirocatechină</u>			<u>p-Metoxifenol</u>		
1.	1,0	2,079	1.	1,0	5,247
2.	1,5	3,534	2.	1,5	7,215
3.	2,0	3,742	3.	2,0	10,490
4.	2,5	5,196	4.	2,5	13,770
5.	3,0	6,054	5.	3,0	17,050
6.	3,5	7,901			

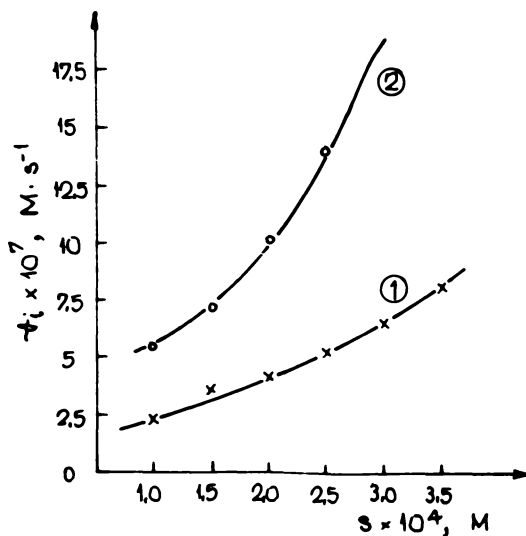


Fig.20 - Dependența $v_1 = f(S)$ pentru : (1) pirocatechină ;
 (2) p-metoxifenol

În tabelul 18 sînt prezentate valorile constantelor de viteză k_3 , determinate experimental pentru fenolii studiați. Se observă că reactivitatea cea mai mare față de sistemul apă oxigenată - peroxidază o prezintă hidrochinona, urmată de o-aminofenol și de pirogalol. O-Crezolul este cel mai puțin reactiv ($k_3 = 2,8 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) în reacția de oxidare enzimatică.

Tabelul 18 - Valorile experimentale ale constantei de viteză k_3

Compus	$k_3, (\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1})$
Fenol	$4,58 \cdot 10^4$
Hidrochinonă	$2,80 \cdot 10^6$
o-Crezol	$2,87 \cdot 10^4$
o-Clorfenol	$5,64 \cdot 10^5$
p-Clorfenol	$4,25 \cdot 10^5$
o-Aminofenol	$1,31 \cdot 10^6$
m-Aminofenol	$1,70 \cdot 10^5$
Pirogalol	$1,05 \cdot 10^6$
o-Metoxifenol	$8,54 \cdot 10^5$

Se observă că reactivitatea fenolilor față de sistemul apă oxigenată - peroxidază depinde de natura substituenților din moleculă. Astfel, introducerea unor grupări ușor oxidabile ($-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$) în moleculă duce la o creștere pronunțată a vitezei reacției de oxidare.

Studiind dependența vitezei inițiale a reacției enzimatică de oxidare a fenolilor în funcție de concentrația apei oxigenate, la diferite concentrații constante de fenol, se obține o familie de drepte paralele. Acest fapt este încă un indiciu pentru un mecanism ping-pong ale reacției. În tabelul 19 și fig. 21 sînt prezentate rezultatele obținute la determinarea vitezei inițiale a reacției de oxidare a pirogalolului la diferite concentrații de apă oxigenată.

Pentru toate experimentele efectuate, se observă existența unei zone în care viteza inițială crește odată cu creșterea concentrației apei oxigenate. Pentru valoarea de $16,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ a concentrației de apă oxigenată, viteza inițială prezintă un maxim, după care se evidențiază o scădere bruscă a vitezei inițiale cu creșterea concentrației apei oxigenate peste $16,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Deci sistemul enzimatic respectă o cinetică de tip Michaelis-Menten la concentrații mai mici de $16,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de apă oxigenată, iar la concentrații mai

Tabelul 19 - Determinarea vitezelor inițiale de oxidare a pirogalolului în funcție de concentrația apei oxigenate, la diferite concentrații constante de pirogalol.

$h_0 = 2,96 \cdot 10^{-5} \text{ M} ; \text{pH} = 6,0 ; T = 25^\circ\text{C}$

$C_{\text{pirogalol}} \cdot 10^3$ M	$C_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 10^3$ M	$1/C_{\text{H}_2\text{O}_2} \cdot 10^{-3}$	$v_1 \cdot 10^5$ M.s ⁻¹	$1/v_1 \cdot 10^{-5}$ M ^{-1}.s}
4,00	9,741	0,103	7,392	0,125
	12,988	0,077	8,518	0,117
	16,470	0,0607	8,500	0,116
	21,960	0,0455	9,383	0,106
	27,450	0,0364	9,321	0,107
	32,940	0,0304	9,750	0,102
$1/v_1 = 1,52 \cdot 10^4 + 21,27 \cdot 1/C_{\text{H}_2\text{O}_2} ; r = 0,984$				
$V_{\text{max}}^0 = 0,570 \cdot 10^{-5} \text{ M.s}^{-1}$				
$K_M^0 = 1,39 \cdot 10^{-3} \text{ M}$				
3,25	6,474	0,154	6,980	0,1519
	9,741	0,103	7,082	0,1412
	12,988	0,077	7,625	0,1311
	16,470	0,0607	7,960	0,1256
	21,960	0,0455	7,277	0,1374
	27,450	0,0364	6,882	0,1453
32,940	0,0304	6,675	0,149	
$1/v_1 = 1,072 \cdot 10^4 + 31,40 \cdot 1/C_{\text{H}_2\text{O}_2} ; r = 0,983$				
$V_{\text{max}}^0 = 9,325 \cdot 10^{-5} \text{ M.s}^{-1}$				
$K_M^0 = 2,928 \cdot 10^{-3} \text{ M}$				
2,0	6,474	0,154	4,866	0,2055
	9,741	0,103	4,902	0,204
	12,988	0,077	4,993	0,2002
	16,470	0,0607	4,992	0,2003
	21,960	0,0455	4,402	0,227
	27,450	0,0364	4,125	0,242
32,940	0,0304	3,930	0,254	
$1/v_1 = 1,965 \cdot 10^4 + 6,05 \cdot 1/S_2 ; r = 0,983$				
$V_{\text{max}}^0 = 5,087 \cdot 10^{-5} \text{ M.s}^{-1}$				
$K_{1,2}^0 = 3,08 \cdot 10^{-4} \text{ M}$				

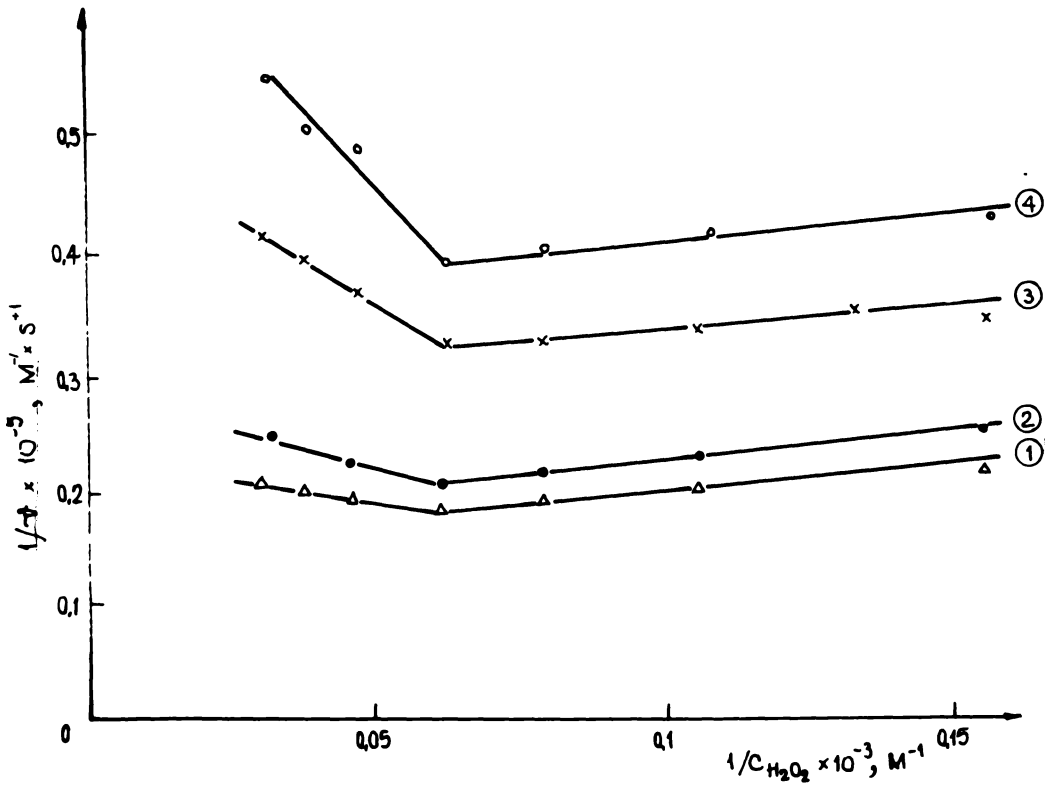


Fig.21 - Liniarizările Lineweaver-Burk $1/v_1 = f(1/C_{H_2O_2})$, pentru pirogalol. (1) $C_{\text{pirog}} = 4,0 \text{ mM}$; (2) $C_{\text{pirog}} = 3,25 \text{ mM}$; (3) $C_{\text{pirog}} = 2,0 \text{ mM}$; (4) $C_{\text{pirog}} = 1,5 \text{ mM}$

marilor se evidențiază fenomenul de inhibiție a enzimei, produs de apă oxigenată. Cunoscând concentrația de apă oxigenată limită, și constanta Michaelis, se poate determina constanta de inhibiție K_i pe baza relației

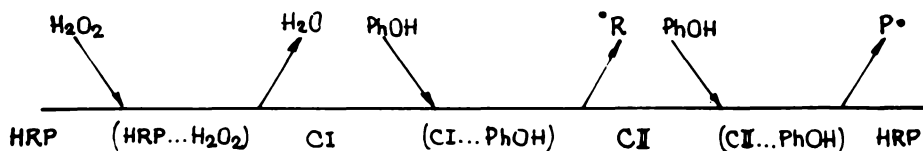
$$[b] = \sqrt{K_m \cdot K_i}$$

se obține pentru K_i o valoare :

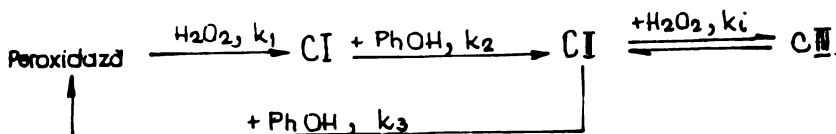
$$K_i = 90,75 \cdot 10^{-5} \text{ M}$$

Porțiunile din grafic corespunzătoare unei concentrații de apă oxigenată mai mici decît $16,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ sînt paralele, pentru diferitele concentrații constante de pirogalol, fapt ce constituie un argument în favoarea unui mecanism de oxidare enzimatică

de tip ping-pong, se poate fi reprezentat sub următoarea formă grafică :



Pe baza datelor experimentale, se propune următoarea schemă de reacție pentru oxidarea enzimatică a fenolilor cu apă oxigenată și peroxidază :



1.0. Concluzii asupra eliminării enzimatică a fenolilor din apă prin oxidare enzimatică

1. S-a elaborat o metodă de obținere și de purificare a peroxidazei din hrean. Purificarea avansată a extractului enzimatic se realizează prin gel-cromatografie pe Sephadex G 75.
2. S-a studiat oxidarea unei serii de 30 de fenoli, cu apă oxigenată și peroxidază, în scopul eliminării lor din apele reziduale, și s-au determinat parametrii optimi ai reacției : pH, concentrația enzimei, concentrația apei oxigenate și concentrația fenolului.
3. S-a stabilit existența unor relații între structura fenolilor și eliminarea lor din apă prin oxidare enzimatică.
4. S-a demonstrat că, prin cuplarea reacției de oxidare enzimatică a fenolilor cu coagularea cu sulfat feros, se realizează o eliminare avansată a fenolilor din ape.
5. S-a studiat oxidarea fenolului cu apă oxigenată și extracte enzimatice brute obținute în laborator, și s-au obținut grade de eliminare 90 %.
6. S-a efectuat studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică pentru o serie de 9 fenoli, prin metoda spectrofotometrică și metoda termică. S-a demonstrat că metoda termică poate fi utilizată ca metodă de investigare în studiul cineticii reacțiilor

enzimatice :

a) Pentru sistemul fenol-apă oxigenată-peroxidază s-au determinat valorile energiei de activare E_a , și ale variațiilor entalpiei și entropiei de activare ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger .

b) Din studiul vitezelor de reacție în funcție de concentrația substratului aromatic, la diferite pH-uri, s-a demonstrat că ionii de hidrogen manifestă o inhibiție necompetitivă asupra activității enzimei. Totodată, s-au determinat valorile pK_1 es și pK_2 es pentru ionizarea compusului I și compusului II în timpul procesului.

c) S-au determinat constantele de viteză k_2 și s-a stabilit că cea mai mare reactivitate față de sistemul apă oxigenată-peroxidază o prezintă hidrochinona, alături de o-aminofenol și pirogalol ; compusul cu reactivitate minimă fiind o-crezolul.

d) Studiile efectuate asupra dependenței vitezei inițiale de reacție în funcție de concentrația apei oxigenate, au demonstrat că la concentrații mai mari de $16,5 \cdot 10^{-3} M$, apa oxigenată inhibă reacția enzimatică, reacționând cu complexul Michaelis C_{II} cu formarea compusului III inactiv, determinându-se totodată valoarea constantei de inhibiție K_1 .

e) S-a stabilit că reacția de oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază a fenolilor are loc conform unui mecanism ping-pong pentru reacții cu trei substraturi, și s-a propus o schemă pentru acest mecanism.

2. ELIMINAREA ENZIMATICĂ A AMINELOR AROMATICE DIN
APE REZIDUALE PRIN OXIDARE CU APA OXIGENATĂ ȘI
PEROXIDAZĂ /299/

2.1. Stabilirea parametrilor optimi de eliminare a
aminelor aromatice din apă prin oxidare cu apă
oxigenată și peroxidază

Aminele aromatice, compuși caracterizați printr-o toxicitate foarte ridicată, sînt la fel ca fenolii, substraturi pentru peroxidază. Producții de reacție sînt în general compuși colorați cu masă moleculară mare, practic insolubili în apă, fapt ce ne-a determinat să încercăm să eliminăm aminele aromatice dizolvate în apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază. Studiul s-a efectuat pe o serie de 20 de amine aromatice printre care anilina și derivații ei, naftilamine, bensidina /299/. Experimentele au fost conduse similar cu cele efectuate în cazul oxidării enzimatice a fenolilor. În toate cazurile studiate, după inițierea reacției enzimatice a amestecului de reacție, format din soluția apoasă a aminei aromatice și apa oxigenată, prin adăugarea peroxidazei, soluția rezultată se colorează, corespunzător scăderii concentrației aminei aromatice, formîndu-se treptat un precipitat, pe cînd în cazul experimentelor martor realizate prin incubarea, timp de 24 h, a soluțiilor de amine aromatice numai cu apă oxigenată, respectiv a aminelor aromatice numai cu peroxidază, nu se formează nici un precipitat. Rezultă că formarea precipitatului și scăderea concentrației aminei aromatice din soluție se datorează acțiunii concertate a apei oxigenate și peroxidazei.

Pentru descrierea cantitativă a procesului de tratare enzimatică a apelor cu conținut de amine aromatice, s-a folosit gradul de eliminare η , care reprezintă procentul de amină aromatică eliminată din apă sub formă de precipitat, prin reacția enzimatică /298,299/. Concentrația inițială și finală a aminelor aromatice în soluție s-a determinat prin metoda spectrofotometrică și prin metoda diazotării și cuplării /15/.

Pentru fiecare amină în parte s-a studiat influența para-

metrilor de reacție asupra gradului de eliminare : pH, concentrația peroxidazei, concentrația apei oxigenate, concentrația aminei aromatice, în scopul determinării valorilor optime [299/].

pH-ul este unul din parametrii, care influențează puternic activitatea enzimelor, și de aceea s-a studiat dependența gradului de eliminare al aminelor aromatice din apă de pH, în domeniul de pH cuprins între 3 - 9. Rezultatele experimentale obținute sînt prezentate în tabelul 20 și figura 22.

Tabelul 20 - Dependența gradului de eliminare al aminelor aromatice de pH. Condiții : 100 mg/l amină aromatică , 1 ml H₂O₂, 1000 U/l peroxidază , 3 h , 25°C

pH	3,0	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	8,0	9,0
Compus	Grad de eliminare , %										
Bensidină	95,2	97,0	98,3	99,1	99,4	99,8	99,6	99,2	99,0	98,8	97,0
1-naftilemină	96,6	97,2	98,5	99,0	99,1	99,4	99,2	99,0	99,0	98,5	86,5
2-naftilemină	96,8	97,4	98,2	98,6	99,0	99,1	99,0	98,5	98,2	97,6	80,4
o-ansidină	64,0	65,5	67,5	68,4	70,0	70,2	70,5	68,0	67,5	65,2	60,4
m-ansidină	68,6	68,8	69,0	61,6	52,0	43,5	39,5	39,0	38,7	38,0	36,2
p-ansidină	77,6	72,4	54,3	54,0	53,6	53,8	54,3	55,1	55,4	67,5	68,0
Anilină	65,7	62,3	59,5	51,6	46,5	40,0	32,0	32,8	33,7	28,5	22,0
o-clorani- lină	36,0	32,7	32,2	28,6	24,2	25,0	25,1	18,6	9,1	25,1	25,0
m-clorani- lină	69,5	31,6	12,0	1,4	-	-	-	-	-	-	-
o-bromanili- nă	79,4	61,3	58,5	54,6	52,3	52,0	51,8	50,1	49,5	40,4	36,2
m-bromani- lină	81,8	74,5	63,6	41,3	33,2	30,0	27,2	27,4	27,9	38,2	39,0
p-bromani- lină	74,0	74,6	75,6	75,4	75,6	68,5	62,2	51,4	46,9	46,9	43,0
o-toluidină	79,7	73,5	71,0	71,0	70,8	78,5	83,8	83,6	83,4	74,0	70,0
m-toluidină	72,4	77,5	82,8	68,5	56,2	49,4	43,9	44,0	43,8	43,0	42,0
m-nitroani- lină	14,2	10,5	8,3	9,6	10,2	10,8	12,2	12,0	12,2	12,0	10,0
p-nitroani- lină	18,5	8,5	8,7	9,2	10,6	10,5	10,6	10,8	12,6	16,5	15,0
o-hidroxi- anilină	76,4	81,2	88,0	78,6	75,3	64,6	56,8	54,2	48,4	31,8	30,0
m-hidroxi- anilină	53,9	54,2	56,8	75,6	97,0	78,4	56,8	55,0	54,5	36,6	14,7
p-hidroxi- anilină	79,5	79,8	82,0	79,2	71,5	69,7	78,0	76,2	74,6	69,2	68,0

Se observă că enzima este activă într-un domeniu larg de pH de la 3 la 9. Randamentele maxime de eliminare a aminelor aromatice din apă se înregistrează în domeniul de pH acid : astfel, pentru 1-naftilamină, $\eta = 99,2\%$ la pH 5,5, iar pentru m-toluidină, $\eta = 82,8\%$ la pH 3,5. La pH-uri din domeniul alcalin, gradele de eliminare scad, dar rămân totuși destul de ridicate, de exemplu, $\eta = 88,5\%$ pentru 1-naftilamină la pH = 9.

eficiența peroxidazei în eliminarea aminelor aromatice a fost urmărită și în funcție de concentrația apei oxigenate. În tabelul 21 și figura 23 este prezentată dependența gradului de eliminare al 1-naftilaminei din apă, de concentrația apei oxigenate. Se observă că gradul de eliminare al 1-naftilaminei crește cu creșterea concentrației apei oxigenate până la 1 mM, după care rămâne constant, până la concentrații de apă oxigenată de 5 mM.

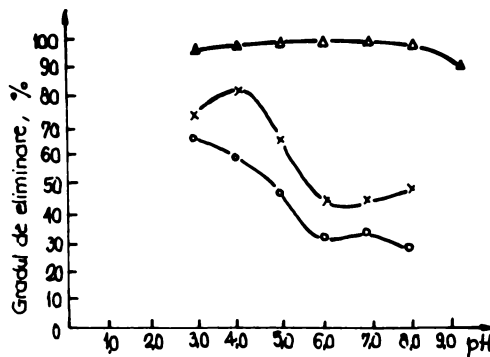


Fig.22 - Influența pH-ului asupra eliminării aminelor aromatice din apă sub acțiunea apei oxigenate și peroxidazei.
Condiții : 100 mg/l amină, 1000 U/l peroxidază,
1 mM H₂O₂ , 3 h , 25°C. (1) 1-naftilamină ;
(2) m-toluidină ; (3) anilină

Tabelul 21 - Influența concentrației apei oxigenate asupra eliminării enzimatică a l-naftilaminei din apă.
Condiții : 102,6 mg/l l-naftilamină, 1000 U/l peroxidază , pH 5,5 , 3 h , 25°C

Nr. det	$C_{H_2O_2}$ mM	$C_f C_{10H_9N}$ mg/l	Grad de eliminare %
1.	0,0	102,6	0
2.	0,1	88,0	14,2
3.	0,2	80,5	21,5
4.	0,4	60,7	40,8
5.	0,6	34,4	66,5
6.	0,8	15,7	84,7
7.	1,0	0,82	99,1
8.	2,0	0,92	99,1
9.	3,0	0,72	99,3
10.	4,0	1,02	99,0
11.	5,0	1,71	98,5

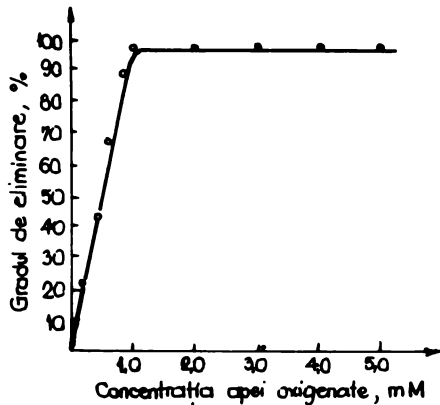


Fig.23 - Dependența eliminării l-naftilaminei de concentrația apei oxigenate. Condiții : 100 mg/l l-naftilamină, 1000 U/l peroxidază , pH 5,5 , 3 h , 25°C

Concentrația peroxidazei din mediul de reacție influențează puternic reacția de oxidare enzimatică a aminelor aromatice, viteza reacției crescând cu creșterea concentrației enzimei. Studiindu-se dependența eliminării l-naftilaminei din apă de concentrația peroxidazei, s-a demonstrat că pentru concentrații de enzimă cuprinse în domeniul 0-1000 U/l, gradul de eliminare al aminelor aromatice din apă crește proporțional cu concentrația enzimei până la 100 U/l (când pentru l-naftilamină de exemplu, $\eta = 99,2\%$), și rămâne constant, în limita erorilor experimentale, la concentrații mari de enzimă (tabelul 22 și fig.24).

Tabelul 22 - Influența concentrației peroxidazei asupra eliminării l-naftilaminei din apă. Condiții: 102,6 mg/l l-naftilamină, 1 mM H₂O₂, pH 5,5, 3 h, 25°C

Nr. det	C _p peroxidază U/l	C _f C ₁₀ H ₉ N mg/l	Grad de eliminare %
1.	0	102,60	0,00
2.	10	60,50	40,50
3.	25	40,62	60,40
4.	40	18,26	82,20
5.	75	6,87	93,70
6.	100	0,82	99,20
7.	150	0,72	99,30
8.	200	0,77	99,25
9.	300	0,92	99,10
10.	400	0,82	99,20
11.	500	0,88	99,15
12.	600	1,32	98,95
13.	700	1,02	99,00
14.	800	0,92	99,10
15.	900	0,82	99,20
16.	1000	0,72	99,30

Studiind variația gradului de eliminare la diferite concentrații de amine aromatice, s-a observat că pentru domeniul 0-150 mg/l, eliminarea l-naftilaminei din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază este practic totală, fiind maximă la concentrații mari de amine (tabelul 23).

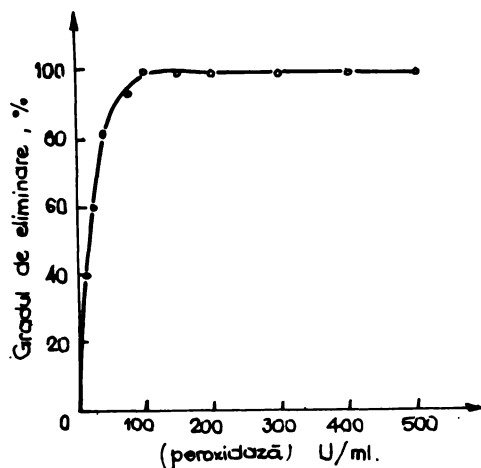


Fig.24 - Influența concentrației peroxidazei asupra gradului de eliminare a 1-naftilaminei din apă. Condiții : 102,6 mg/l 1-naftilamină, 1 mM H₂O₂, pH 5,5, 3 h, 25°C

Tabelul 23 - Dependența gradului de eliminare de concentrația aminei aromatice. Condiții : 1 mM H₂O₂, 1000 U/l peroxidază, pH=5,5, 3h, 25°C

Nr. det	C ₁ mg/l	C _r mg/l	%
1.	10	0,06	99,4
2.	25	0,20	99,2
3.	50	0,55	99,3
4.	75	0,60	99,2
5.	100	0,80	99,2
6.	125	1,25	99,0
7.	250	2,10	98,6

Concentrația reziduală a aminei în soluție deține și ea de concentrația inițială a aminei, fiind minimă la concentrații mici de amină aromatică (de exemplu, C_r = 0,06 mg/l pentru o concentrație inițială C₁ = 10 mg/l). La concentrații inițiale mari ale aminelor aromatice (125 mg/l respectiv 150 mg/l), după tratarea enzimatică, în soluții se regăsesc concentrații reziduale de compuși aromatici mai mari de 1 mg/l (1,25 mg/l respectiv 2,1 mg/l), deși gradele de eliminare se mențin ridicate : 99 % respectiv 98,6 %.

2.2. Relații între structura aminelor aromatice și eliminarea lor din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază

În vederea aplicării metodei în practică, este utilă găsirea unei relații între eliminarea aminelor aromatice din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază, și structura lor. În tabelul 24 sunt prezentate gradele de eliminare din soluții apoase a unei serii de 20 de amine aromatice, prin oxidare cu apă oxigenată în prezența peroxidazei. Unii compuși, de exemplu benzidina, 1- și 2-naftilamina, m-hidroxianilina, sunt eliminați practic total din apă, = 97-99,9 %, în timp ce pentru anilină și derivații ei substituiți gradele de eliminare sunt mai mici, variind între 14 % (nitroanilina) și 88 % (o-hidroxianilina).

Tabelul 24 - Eliminarea aminelor aromatice din apă, prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază^{x)}

Compus	pH optim	C ₁ mg/l	C _f mg/l	η %	xx)
Benzidină	5,5	101,4	0,2	99,8	
1-Naftilamină	5,5	102,6	0,6	99,4	
2-Naftilamină	5,5	100,2	0,92	99,1	
o-Anisidină	3,0	99,6	21,00	79,0	
p-Anisidină	3,0	98,4	22,00	77,6	
m-Anisidină	4,0	110,4	34,00	69,0	
Anilină	3,0	105,0	36,00	65,7	
o-Cloranilină	3,0	112,2	76,0	36,0	
m-Cloranilină	3,0	97,4	33,0	69,5	
o-Bromanilină	3,0	109,0	22,5	79,4	
m-Bromanilină	3,0	110,0	20,04	81,8	
p-Bromanilină	5,0	103,6	25,0	75,6	
o-Toluidină	6,0	96,0	15,5	83,85	
m-Toluidină	4,0	105,6	18,0	82,85	
m-Nitroanilină	3,0	101,4	87,0	14,20	
p-Nitroanilină	3,0	103,0	86,0	16,50	
o-Hidroxianilină	4,0	100,0	12,0	88,0	
m-Hidroxianilină	5,0	86,8	2,7	97,0	
p-Hidroxianilină	4,0	100,4	18,5	82,0	

x) Condiții : 1000 U/l peroxidază , 1 mM H₂O₂ , 3 h , 25°C

xx) la pH optim

Din datele prezentate în tabelul 24 se pot trage unele concluzii referitoare la relația existentă între gradele de eliminare a anilinei și derivaților săi substituiți și natura substituentului prezent în moleculă. Se observă că introducerea unor substituenți cu efect inductiv donor de electroni ($-\text{CH}_3$), sau efect electromer donor de electroni ($-\text{Cl}$, $-\text{Br}$, $-\text{OH}$, $-\text{OCH}_3$) mărește susceptibilitatea oxidării acestor compuși de către sistemul apă oxigenată-peroxidază, efectul fiind mai pronunțat în cazul în care acești substituenți se află în poziția orto, față de gruparea aminică. Introducerea în molecula anilinei a unor grupări cu efect electromer atrăgător de electroni, ca, de exemplu, gruparea nitro, inhibă reacția enzimatică. Aceste observații sînt în concordanță cu datele prezentate în literatură /280/, conform cărora reacția de oxidare enzimatică a aminelor aromatice este favorizată de o densitate de electroni mărită la gruparea aminică, ce constituie centrul de reacție.

2.3. Eliminarea aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și coagulare

Experimentele efectuate au demonstrat că un număr mare de compuși din clasa aminelor aromatice pot fi eliminați din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază. Totuși, unii compuși ca anilina, cloranilina o-anisidina, sînt oxidați numai în proporție de 60-80 %. În aceste cazuri, produșii de reacție au mase moleculare mai mici și sînt parțial solubili în apă. Pentru a realiza o epurare avansată a acestor ape, s-a încercat utilizarea unei metode combinate, ce constă în oxidarea enzimatică primară a soluțiilor apoase cu conținut de amine aromatice, urmată de coagulare cu sulfat ferros a suspensiilor rezultate. Lucrîndu-se în condițiile optime, determinate experimental, s-a obținut pentru anilină, o-hidroxianilină, o-cloranilină și o-anisidină grade de eliminare de pînă la 98 % (tabelul 25), și s-a realizat și eliminarea totală a produșilor de reacție, soluțiile finale obținute, fiind limpezi și incolore. Aceasta se explică prin adsorbția și coprecipitarea compușilor aromatici dizolvați în apă cu macromoleculele produșilor de hidroliză a coagulantului. Menționăm că aminele aromatice nu pot fi eliminate din apă numai prin coagulare cu sulfat ferros.

În experimentele următoare, s-au utilizat, ca și catalizator în reacția de oxidare enzimatică a l-naftilaminei, preparatele enzimatiche brute și purificate obținute în laborator (tabelul 26).

Tabelul 25 - Eficiența eliminării aminelor aromatice prin oxidare enzimatică și coagulare

Compus	C_i mg/l	$C_f^{a)}$ mg/l	$\eta^{a)}$ %	$C_f^{b)}$ mg/l	$\eta^{b)}$ %
Anilină	105,6	36,0	65,7	4,6	95,6
Anilină	105,0	-	-	96,4	8,2
o-Hidroxianilină	100,0	12,0	88,0	3,5	96,5
o-Cloranilină	112,2	76,0	36,0	8,4	92,5
o-Anisidină	99,6	21,0	79,0	1,8	97,8

a) Concentrație finală și gradul de eliminare după oxidare

b) Concentrația finală și gradul de eliminare după coagulare

Tabelul 26 - Tratarea soluțiilor l-naftilaminei cu extracte enzimatic brută și purificate. Condiții : 1 mM H_2O_2 , pH=5,5, 25°C, 3 h

Preparat enzimatic	Activ. totală U/l	C_i mg/l	$C_f^{a)}$ mg/l	$\eta^{a)}$ %	$C_f^{b)}$ mg/l	$\eta^{b)}$ %
Peroxidază Merck	246,7	100,0	0,75	99,25	0,30	99,70
Extract hreen	264,7	100,0	1,40	98,60	0,32	99,68
Extract hreen purificat	264,7	100,0	0,88	99,12	0,30	99,70
Extract gullii	264,3	100,0	1,5	98,50	1,50	98,50

Se observă că, indiferent de natura preparatului enzimatic utilizat drept catalizator în reacția de oxidare, după 3 h de reacție se obțin grade de eliminare ale l-naftilaminei din apă cuprinse între 98,5 - 99,2 %.

2.4. Concluzii asupra eliminării enzimatică a aminelor aromatice

Din cercetările prezentate în acest capitol, se desprind următoarele concluzii :

1. S-a elaborat o metodă generală de tratare a apelor cu conținut de amine aromatice prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază, urmată de coagulare cu sulfat ferros. Coagularea cu sulfat ferros a soluțiilor oxidate enzimatic în prealabil, duce la mărirea gradelor de eliminare a aminelor aromatice din apă cu 10 - 30 %, datorită faptului că se realizează și o eliminare a compuşilor dizolvați în apă prin adsorbție și complexare.

2. S-au stabilit parametrii optimi ai reacției de oxidare enzimatică a aminelor aromatice : pH, concentrație de substrat, concentrația apei oxigenate și concentrația peroxidazei.

3. S-a demonstrat existența unei relații între structura aminelor aromatice și eliminarea lor din apă prin oxidare enzimatică. S-a arătat că substituenții cu efect inductiv, sau electromer donor de electroni măresc reactivitatea anilinei față de sistemul apă oxigenată-peroxidază, în timp ce substituenții cu efect electromer atrăgător de electroni o micșorează.

3. STUDIUL SI CERCETARI COMPARATIVE ALE ELIMINARII FENOLILOR SI AMINELOR AROMATICE DIN APA PRIN OXIDARE ENZIMATICA, EPURARE BIOLOGICA, SI OXIDARE CU HIPOCLORIT DE SODIU, BLOXID DE CLOR SI OZON /3ol/

Posibilitatea eliminării fenolilor și aminelor aromatice din apele reziduale prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază deschide perspective noi în tehnologia apelor. Metoda poate fi aplicată, ca o treaptă de epurare avansată, în fluxul tehnologic de epurare a apelor reziduale din industria organică de sinteză.

În acest sens, s-a considerat necesară compararea metodei de eliminare enzimatică a fenolilor și aminelor aromatice din ape, cu unele metode aplicate în prezent în tehnologia epurării apelor reziduale: epurarea biologică și oxidarea chimică.

3.1. Eliminarea comparativă a fenolilor și aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și epurare biologică

Cea mai răspândită metodă de epurare a apelor reziduale impurificate cu fenoli și amine aromatice o constituie epurarea biologică. Funcționarea stațiilor de epurare biologică ridică însă unele probleme, datorate pe de o parte, faptului că un număr mare de substanțe organice, inclusiv fenoli și amine aromatice sunt greu biodegradabile și toxice pentru microorganisme, iar pe de altă parte, reducerii proceselor metabolice care au loc în timpul epurării la temperaturi scăzute.

Fenolii și aminele aromatice pot fi însă eliminați din apă, cu randamente ridicate, prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază.

Pentru a putea studia posibilitatea aplicării în practică a reacției de oxidare enzimatică a fenolilor și aminelor aromatice în epurarea apelor reziduale, s-a urmărit comparativ eliminarea unor compuși aromatici din apă, prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază și prin epurare biologică. În acest scop, soluțiile sintetice de fenoli și amine aromatice au fost oxidate enzimatic, cu apă oxigenată și peroxidază, în condițiile optime determinate exper-

rimental, în modul descris în capitolul 1.2 și s-au urmărit comparativ rezultatele cu ale epurării biologice.

Epurarea biologică a soluțiilor compușilor aromatici s-a realizat într-o instalație de epurare biologică realizată în laborator, cu alimentare și aerare continuă, prevăzută cu sistem de recirculare continuă a nămolului și cu termostatare. S-a utilizat un nămol activ provenit de la stația de epurare a orașului, care a fost adaptat pentru fiecare compus aromatic în parte. Concentrația de nămol activ în instalație, determinată experimental, a fost de aproximativ 1 g de nămol uscat pe litru. Soluțiile de alimentare a instalației de epurare biologică conțin, pe lângă compusul aromatic ce urmează a fi supus epurării biologice, și substanțe nutritive care asigură necesarul de C, N, P, și anume acetat de sodiu, uree, fosfat dipotasic. Debitul de alimentare al instalației a fost reglat în așa fel încât să se asigure un timp de staționare în vasul de aerare de aprox. 5 ore. Efluentul instalației de epurare biologică a fost analizat din oră în oră, pentru determinarea concentrației reziduale de compus aromatic neepurat și a încărcării organice totale reziduale.

Concentrația inițială și finală a fenolilor s-a determinat prin spectroscopie UV și prin metoda colorimetrică cu 4-aminoantipirină /15/, iar cea a aminelor aromatice, prin spectroscopie UV și prin metoda diazotării și cuplării /15/. Carbonul organic total (TOC) s-a determinat la un analizor de carbon organic total tip Beckman.

În studiul efectuat, s-au urmărit două aspecte: eliminarea comparativă a unor fenoli și amine aromatice din apă prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază și prin epurare biologică precum și influența temperaturii asupra eliminării fenolului din apă prin oxidare enzimatică și epurare biologică. Pentru a putea studia utilitatea reacției de oxidare enzimatică a fenolilor și aminelor aromatice, în tratarea apelor reziduale, s-a urmărit comparativ eliminarea unor compuși aromatici din apă, prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază și prin epurare biologică. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 27.

Se observă că prin oxidare enzimatică compușii studiați sînt eliminați din apă cu randamente pînă la 99,4%. Prin epurare biologică fenolul este eliminat, în condițiile experimentului, cu randament de 85%, în timp ce o-clorfenolul este eliminat cu un randament de 21%, iar pentaclorfenolul și anilina cu randamente de 10 respectiv 8% (față de randamentele de eliminare de 98%,

82 % și respectiv 66 % prin oxidare enzimatică). Totodată, la tratarea biologică a anilinei și α -naftilaminei, se observă în timp o schimbare a aspectului nămolului activ - dispariția speciilor de microorganisme active, apariția ciupercilor filamentoase, precum și o creștere foarte pronunțată a TOC (până la 4000 mg/l), ceea ce se poate explica prin secretarea de metaboliți în mediu de către microorganisme. Se observă că anilina și α -naftilamina sînt toxice pentru nămolul activ și epurarea lor în condițiile date nu se poate realiza.

Tabelul 27 - Eliminarea unor fenoli și amine aromatice din apă prin oxidare enzimatică și tratare biologică

- 1) Condiții : 1 ml H_2O_2 , 100 U/l peroxidază, pH optim, $T=20^\circ C$, $t=3$ ore
 2) Condiții : 1 g substanță uscată/l, $T=20^\circ C$; timp de contact 3-5 h

Compus	metoda de eliminare											
	Oxidare enzimatică ¹⁾						Epurare biologică ²⁾					
	C_i mg/l	C_f mg/l	η %	TOC _i mg/l	TOC _f mg/l	%TOC	C_i mg/l	C_f mg/l	η %	TOC _i mg/l	TOC _f mg/l	%TOC
Fenol	119,2	10,3	91,2	130	50	61,5	83,6	12,5	85,0	260	120	55,8
o-clor-fenol	90,0	1,75	98,0	112	38	66,1	129	101,8	21,1	260	115	55,0
Penta-clorfenol	100,0	18,0	82,0	86	32	62,8	102	91,8	10,0	245	125	19,0
Anilină	105,0	36,0	65,7	124	42	66,1	100	92,0	8,0	205		
α -naftilamină	102,6	0,6	99,4	135	28	79,2	104	104	-	260		

Se desprinde de aici concluzia că metoda de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apele reziduale prin oxidare cu apa oxigenată în prezența catalitică a peroxidazei este superioară epurării biologice, prin faptul că ea poate fi aplicată unui număr mare de compuși organici din aceste clase, prin această metodă se pot elimina și compuși organici greu biodegradabili, cum sînt clorfenolii, sau toxici pentru microorganisme, ca de ex. α -naftilamina.

Pentru a studia influența temperaturii asupra eliminării fenolului prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază, respectiv prin epurare biologică, s-au determinat randamentele de eliminare ale fenolului din apă prin cele două procedee, la temperaturi cuprinse între 8 - 25^o. S-a ales acest domeniu de temperatură întrucît acestea sînt temperaturile la care sînt exploatate practic

instalațiile industriale de epurare biologică a apelor reziduale, în condițiile climatice din țara noastră. Rezultatele experimentale obținute sînt prezentate în tabelul 28.

Tabelul 28 - Influența temperaturii asupra eliminării fenolului din apă prin oxidare enzimatică și epurare biologică

Temp °C	metoda de eliminare											
	Oxidare enzimatică			Epurare biologică								
	C _i mg/l	C _f mg/l	%	TOC _i mg/l	TOC _f mg/l	% _{TOC}	C _i mg/l	C _f mg/l	%	TOC _i mg/l	TOC _f mg/l	% _{TOC}
8	119,2	21,8	81,7	130	75	42,3	83,6	47,1	43,5	260	195	21,2
15	119,2	13,8	88,4	130	70	46,1	83,6	28,9	65,4	260	100	38,5
20	119,2	10,9	90,0	130	60	53,8	83,6	12,5	85,0	260	120	55,8
25	119,2	10,38	91,2	130	50	61,5	83,6	0,166	99,8	260	85	67,3

Se observă că reacția de oxidare enzimatică nu este influențată sensibil de temperatură. Astfel, randamentul de eliminare al fenolului din apă este de 91,2 % la 25°C, respectiv de 81,7 % la 8°C.

În schimb, epurarea biologică este puternic influențată de variația temperaturii. Astfel, dacă la 25°C fenolul este eliminat din apă de către microorganismele din nămolul activ cu un randament de 99,8 %, la 8°C randamentul este de numai 43,5 %. Eficiența procesului scade cu mai mult de 50 % la scăderea temperaturii de la 25°C la 8°C, fapt ce se datorează încetării proceselor metabolice ale microorganismelor.

Rezultă că metoda enzimatică de eliminare a fenolului din apă este superioară celei biologice, la temperaturi scăzute.

3.2. Epurarea comparativă a apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice prin oxidare enzimatică și oxidare cu hipoclorit de sodiu

Cercetări recente se referă la utilizarea hipocloritului de sodiu în epurarea apelor reziduale.

Pornind de la aceste considerații, cercetările noastre au fost orientate și în direcția eliminării fenolilor și aminelor aromatice din ape prin oxidare cu hipoclorit de sodiu, și a comparării rezultatelor obținute cu cele ale eliminării fenolilor și aminelor aromatice prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază/302/

Oxidarea compușilor aromatici cu hipoclorit de sodiu s-a realizat prin amestecarea unei soluții apoase de compus organic de concentrație 100 mg/l cu soluție apoasă de hipoclorit de sodiu, la diferite pH-uri și rapoarte molare de hipoclorit de sodiu : fenol. Clorul activ din soluția de hipoclorit s-a determinat prin titrare cu arsenit de sodiu în mediu slab bazic, iar clorul rezidual liber s-a determinat prin titrare cu o soluție de metilorenj /265/.

Prima etapă a studiului efectuat a constat în determinarea parametrilor optimi ai reacției de oxidare a fenolului cu hipoclorit de sodiu, și anume pH și raport molar hipoclorit de sodiu : fenol.

Pentru a determina valorile pH-ului optim al reacției de oxidare a fenolului cu hipoclorit de sodiu, s-a studiat dependența randamentului de eliminare al fenolului din apă de pH, în domeniul de pH 6-11. Rezultatele experimentale sînt prezentate în tabelul 29.

Tabelul 29 - Dependența randamentelor de eliminare a fenolului prin oxidare cu hipoclorit de sodiu, de pH
Condiții : concentrație fenol inițială : 102 mg/l,
TOC inițial : 120 mg/l, raport molar NaClO:fenol=5:1

Nr. det	pH	C _{fenol} finală mg/l	elim.fenol %	TOC final mg/l	reducere TOC %
1.	6,0	96,29	5,60	120	0
2.	6,5	73,75	27,70	115	4,34
3.	7,0	72,80	28,62	115	4,34
4.	7,5	65,27	36,00	115	4,34
5.	8,0	47,73	53,20	110	8,70
6.	8,5	75,24	26,23	118	
7.	9,0	68,07	33,26	123	
8.	9,5	68,07	33,26	120	
9.	10,0	50,78	41,10	120	
10.	10,8	95,68	6,20	125	

Din datele prezentate, se observă că pH-ul optim al reacției de oxidare a fenolului cu hipoclorit de sodiu este 8,0, cînd, la un raport molar NaClO:fenol = 5:1, se obține un randament de eliminare a fenolului din apă de 53,2 %. Soluțiile rezultate nu conțin clor rezidual liber. Se observă de asemenea că randamentul

de reducere al carbonului organic total (TOC) este foarte mic, variind între 0 și 8,7 %. Se desprinde de aici concluzia că, prin oxidarea fenolului cu hipoclorit de sodiu se obțin produși de reacție solubili în apă.

În continuare s-a determinat doza optimă de clor activ, variind raportul molar NaClO :fenol între 1:1 și 30:1.

Rezultatele experimentale obținute pentru o soluție de fenol cu concentrația inițială 100 mg/l, cu un TOC de 115 mg/l, la un timp de reacție de 24 ore și pH 8,0 sînt prezentate în tabelul 30.

Tabelul 30 - Determinarea dozei optime de hipoclorit de sodiu

Nr. rap. crt	rap. molar Cl_2 activ : fenol	C fenol finală mg/l	% fenol %	TOC final mg/l	% TOC %	Cl_2 rezidual mg/l
1.	1 : 1	91,72	10,07	110	4,34	-
2.	2 : 1	68,36	32,98	110	4,34	-
3.	3 : 1	66,58	34,72	110	4,34	-
4.	4 : 1	69,50	31,86	105	8,67	-
5.	5 : 1	62,65	38,58	105	8,67	-
6.	6 : 1	57,59	43,54	105	8,67	-
7.	8 : 1	22,67	77,33	105	8,67	-
8.	10 : 1	19,00	81,00	105	8,67	-
9.	15 : 1	16,40	83,60	105	8,67	0,0245
10.	20 : 1	14,20	85,80	105	8,67	0,0820
11.	30 : 1	12,00	88,00	105	8,67	0,1525

Din datele prezentate, se observă creșterea randamentului de eliminare a fenolului cu creșterea dozei de clor activ. Astfel, la un raport molar Cl_2 activ : fenol = 30:1, se înregistrează o reducere a concentrației fenolului de 88 %, care corespunde unei concentrații reziduale de fenol în apă de 12 mg/l, și o scădere a TOC de 8,7 %. În aceste condiții, concentrația clorului liber prezent în soluție este de 0,1525 mg/l.

Deoarece reducerea TOC nu variază în funcție de doza de clor introdusă și pentru a evita prezența în soluțiile epurate a unor cantități mari de hipoclorit și clor, se alege ca raport molar optim Cl_2 : fenol = 10 : 1.

În continuare s-au oxidat cu hipoclorit de sodiu diferite soluții de fenoli și amine aromatice, la valorile parametrilor optimi determinate experimental, în scopul studierii aplicabilității

metodei și ei comparării cu oxidarea enzimatică. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 31.

Tabelul 31 - Eliminarea unor compuși aromatici din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu hipoclorit de sodiu

Compus	Oxidare enzimatică ^{a)}				Oxidare cu NaClO ^{b)}				
	C ₁ mg/l	C _f mg/l	% %	% _{TOC} %	C ₁ mg/l	C _f mg/l	% %	% _{TOC} %	Cl ₂ liber mg/l
Fenol	119,2	10,3	91,2	61,5	100,0	17,5	85,0	4,3	-
o-Clorfenol	90,0	1,7	98,0	56,1	101,0	12,2	87,8	3,8	0,125
p-Clorfenol	110,4	8,2	92,6	84,2	99,8	13,2	86,8	6,2	0,465
o-Crezol	102,0	16,5	93,6	58,6	102,1	27,6	82,4	4,2	0,485
Anilină	105,0	36,0	65,7	66,1	100,6	24,5	75,6	3,7	0,520

a) Condițiile reacției de oxidare enzimatică : 1 mM H₂O₂, 1000 U/l peroxidază, pH 4,0 (fenol, o-crezol, o-clorfenol), 5,0 (p-clorfenol) 3,0 (anilină), 25°C, 3h

b) Condițiile de reacție pentru oxidarea cu hipoclorit : pH 8,0, raport molar Cl₂ activ : fenol = 10:1, 3h, 25°C

Din datele prezentate se observă că, prin oxidare cu hipoclorit de sodiu a soluțiilor sintetice de fenoli și amine aromatice, se realizează randamente de eliminare a compușilor aromatici din apă destul de ridicate, variind între 75 și 88 %, în funcție de natura compusului organic supus oxidării. Totuși, încărcarea organică a apei rămîne la valori ridicate, realizîndu-se o reducere a TOC de numai 3-8 %.

Comparînd rezultatele obținute la eliminarea din apă a compușilor studiați prin oxidare cu hipoclorit de sodiu, respectiv cu apă oxigenată și peroxidază, se observă că oxidarea enzimatică este superioară, realizînd grade de eliminare a compușilor din apă de pînă la 98 %, și randamente de scădere a TOC de 60-70 %.

3.3. Cercetări comparative cu privire la eliminarea fenolilor și aminelor aromatice din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu dioxid de clor

În cercetările noastre, s-a studiat eliminarea unor fenoli și amine aromatice din apă prin oxidare cu dioxid de clor. S-au determinat valorile optime ale pH-ului și raportului molar ClO₂:fenol

și s-au comparat rezultatele cu cele obținute la oxidarea enzimatică /302/.

Dioxidul de clor s-a obținut în laborator din clorat de potasiu și acid oxalic la 60°C /305/ ; gazul format s-a absorbit în apă rece. Concentrația dioxidului de clor în soluția obținută s-a determinat prin metoda cu iod-iodură /307/. Oxidarea soluțiilor sintetice de fenoli și amine aromatice cu dioxid de clor s-a realizat prin agitare, timp de 3 h la 25°C. Din timp în timp s-au luat probe, pentru determinarea concentrației reziduale de compus aromatic, respectiv de dioxid de clor, și a carbonului organic total.

Pentru determinarea pH-ului optim de reacție s-a lucrat în modul descris anterior, dar la pH-uri variind între 4 - 10 și la un raport molar ClO₂:fenol = 2:1. Rezultatele experimentale sînt prezentate în tabelul 32.

Tabelul 32 - Determinarea pH-ului optim al reacției de oxidare a fenolului cu dioxid de clor

Nr. crt	pH	C _{fenol} mg/l	elim.fenol %	TOC mg/l	%TOC %	ClO ₂ rezidual g/l
	sol. iniț.	113,8	-	100	-	-
1.	4,20	7,0	93,8	100	-	0,076
2.	5,26	4,83	95,7	95	5,0	0,054
3.	6,46	3,81	96,6	95	5,0	0,065
4.	7,10	4,17	96,3	95	5,0	0,065
5.	8,10	4,28	96,2	90	10,0	0,065
6.	8,90	3,69	95,7	90	10,0	0,054

Din datele obținute se observă că prin tratarea cu ClO₂ se obțin randamente ridicate de eliminare a fenolului din apă cuprinse între 93 - 97 %, randamentul maxim fiind obținut la pH = 6,5 ; valorile TOC sînt însă foarte ridicate (reducerea TOC-ului fiind cuprinsă între 5 - 10 %), fapt ce se explică prin aceea că producția de oxidare a fenolului cu clor rămîn dizolvați în soluție. Nu se realizează în aceste condiții o oxidare totală a fenolului la CO₂ și H₂O, ci o oxidare parțială, probabil la chinonă. Concentrația ClO₂ rezidual în soluție este mare (0,05 - 0,076 g/l) și întrucît concentrația limită admisă în apă este sub 1 mg/l, în continuare se va lucra cu rapoarte molare ClO₂:fenol mai mici.

Pentru determinarea dozei optime de dioxid de clor, soluțiilor s-au adăugat fenol de concentrație aprox. 100 mg/l, TOC = 100 mg/l,

pH = 6,5, li se adaugă volume variabile de soluție de dioxid de clor, corespunzătoare unor rapoarte molare ClO_2 :fenol, cuprinse între 0,1:1 și 2:1. Rezultatele obținute pentru un timp de reacție de 3 ore sînt prezentate în tabelul 33.

Tabelul 33 - Determinarea dozei optime de ClO_2

Nr. crt	raport molar ClO_2 :fenol	C _f fenol final mg/l	% fenol %	TOC mg/l	% TOC %
	inițial	113,8	-	100	-
1.	0,1 : 1	82,80	27,24	100	-
2.	0,5 : 1	48,80	57,11	98	2,0
3.	1 : 1	6,45	94,30	98	2,0
4.	1,5 : 1	4,18	96,32	95	5,0
5.	2 : 1	3,8	96,60	95	5,0

Se observă că randamentul de eliminare al fenolului din apă crește cu creșterea raportului molar ClO_2 :fenol, de la 27 %, pentru raportul molar ClO_2 :fenol = 0,1:1, la 94 % pentru un raport molar ClO_2 :fenol 1:1. La rapoarte molare ClO_2 :fenol mai mari de 1:1, randamentele de eliminare ating valori de 96 %. Valorile carbonului organic total (TOC) dizolvat în apă rămîn însă ridicate, eliminarea TOC-ului fiind numai de 2 - 5 %.

S-a ales ca raport molar optim ClO_2 :fenol raportul 1:1, la care se realizează o eliminare a fenolului din apă de 94,3 %, corespunzător unei concentrații reziduale de fenol de 4,18 mg/l.

La valorile optime de pH și raport molar ClO_2 :fenol s-au oxidat în continuare cîțiva fenoli și amine aromatice, în scopul determinării randamentelor de eliminare și al comparării lor cu cele obținute la oxidarea aceluiași compuși cu apă oxigenată și peroxidază. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 34.

Din datele prezentate se observă că, prin oxidare cu dioxid de clor se realizează o eliminare avansată a compușilor testați din apă, dar scăderea carbonului organic total din apă este neesențială. Totodată, în apele tratate s-a pus în evidență prezența unor specii anorganice toxice ClO_3^- , ClO^- și $\text{Cl}^-/291/$.

Comparînd rezultatele experimentale obținute la eliminarea fenolilor și aminelor aromatice din apă prin cele două metode, se observă superioritatea metodei enzimice, care realizează stît o eliminare avansată a compușilor organici din apă, cît și

o reducere de 60 - 70 % a carbonului organic total.

Tabelul 34 - Eliminarea unor compuși aromatici din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu dioxid de clor

Compuș	Metoda de eliminare							
	Oxidare enzimatică ^{a)}				Oxidare cu ClO ₂ ^{b)}			
	C _i mg/l	C _f mg/l	% %	%TOC %	C _i mg/l	C _f mg/l	% %	%TOC %
fenol	119,2	10,3	91,2	61,5	113,8	5,5	94,3	2,0
o-Clorfenol	90,0	1,75	98,2	56,1	102,4	7,2	92,3	12,9
p-Clorfenol	110,4	8,2	92,6	64,2	106,2	12,7	88,0	4,2
o-Crezol	102,0	5,5	93,6	58,6	101,0	3,0	97,0	8,0
Anilină	105,0	30,0	65,7	56,1	104,6	4,8	95,6	11,5
1-Naftil-amină	102,6	0,6	99,4	79,2	101,1	3,2	96,8	8,3

3.4. Studii comparative între procedeele de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apa reziduală prin oxidare enzimatică și oxidare cu ozon

Ozonul este un agent oxidant deosebit de puternic, a cărui utilizare în epurarea apelor reziduale cu încălzire organică a fost foarte mult studiată. Cercetările proceselor de laborator au urmărit determinarea condițiilor optime de ozonizare a fenolilor, și compararea eficienței reacțiilor de oxidare cu ozon, cu cea a reacțiilor de oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază, în eliminarea unor compuși organici din apă.

Oxidarea soluțiilor apoase de fenoli și amine aromatice cu ozon s-a realizat prin borbotoarea continuă a aerului ozonizat, obținut cu un generator de ozon, într-o coloană termostatăată ce conține soluția de compus aromatic de concentrație 0,1 g/l și pH=8,0. Din timp în timp, s-au luat probe, care s-au analizat, după distrugerea ozonului nereacționat dizolvat în apă, pentru determinarea concentrației reziduale de compus aromatic, și a carbonului organic total. Concentrația ozonului în gazul de elizentare se determină la ieșirea din generator, prin absorbția aerului ozonizat într-o soluție tamponată de iodură de potasiu (pH = 7,0) și titrare cu tiosulfat. În timpul reacției, fluxul de gaze care părăsește coloana de

contact, este trecut într-un alt absorber cu iodură de potasiu, pentru a se determina ozonul nereacționat.

Prima etapă a studiului efectuat a constituit-o determinarea pH-ului optim al reacției de oxidare cu ozon a fenolului. S-au utilizat soluții de fenol de concentrație 17,5 mg/l, care au fost ozonizate timp de 5 minute, în domeniul de pH 2-11 la, un raport molar O_3 :fenol = 1:1 (tabelul 35)

Tabelul 35 - Determinarea pH-ului optim al reacției de oxidare cu ozon a fenolului, concentrația inițială a fenolului = 17,5 mg/l, $t = 5$ min

pH	mg fenol/l consumat	%	mg O_3 alimentat	mg O_3 consumat	$\frac{O_3 \text{ consum.}}{O_3 \text{ alim.}}$	rap. molar O_3 :fenol
2,10	7,3	41,71	19,19	15,48	80,67	1,08
2,95	8,21	46,91	24,51	20,19	82,40	1,25
4,05	9,45	54,01	17,35	14,57	83,98	0,8
5,74	11,48	65,0	25,92	21,80	84,10	0,97
6,65	11,55	66,0	26,22	23,75	84,09	1,05
7,79	15,63	89,31	26,88	26,40	98,21	0,90
8,75	15,27	87,28	28,20	27,51	90,51	0,94
9,96	15,50	88,57	32,07	31,47	98,13	1,01
10,10	15,42	88,11	23,93	23,40	97,80	0,90
11,33	14,75	84,26	30,32	29,6	97,60	1,02

Se observă că randamentul de eliminare al fenolului prin oxidare cu ozon crește cu creșterea pH-ului, atîngînd valoarea maximă ($\eta = 89,31\%$), la pH = 7,8 la care și viteza reacției este maximă. În aceste condiții, 98% din ozonul introdus în vasul de reacție este consumat.

La valoarea optimă de pH determinată experimental, s-a studiat reacția de ozonizare a fenolului, o-clorfenolului și anilinei, în scopul eliminării lor din apă. În figura 25 este prezentată variația concentrației fenolului și a carbonului organic total, în timpul reacției de oxidare cu ozon. Se observă că fenolul este oxidat ușor de ozon, concentrația fenolului rezidual în soluție fiind, după 30 de minute de reacție de numai 0,9 mg/l, ce corespunde unui randament de îndepărtare a fenolului din apă de 99,2%. Încărcarea organică a apei, exprimată ca și carbon organic total (TOC), se menține însă la valori ridicate.

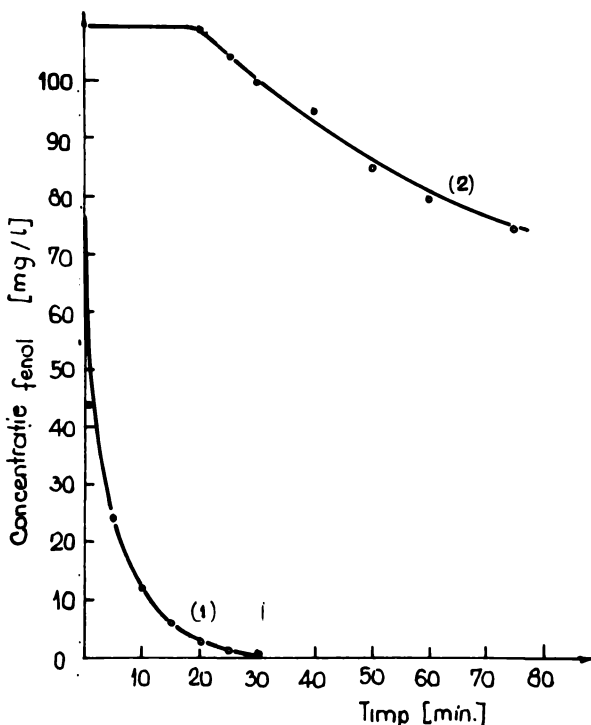


Fig.25 - Oxidarea fenolului cu ozon
Condiții : C_0 fenol = 111 mg/l; TOC_0 = 115 mg/l; $pH=8,0$
consum de ozon : 28 mg/l.min ; (1) variația fenolului ;
(2) variația TOC

Carbonul organic total începe să scadă abia după 20 de minute de reacție, cînd fenolul a fost oxidat în proporție de 99 %. O reducere a TOC de 35 % se înregistrează după 75 minute de reacție. Faptul că în prima parte a reacției, valoarea carbonului organic total nu se modifică, corelat cu punerea în evidență, din spectral de UV, a formării p-benzochinonei ($\lambda_{max} = 245 \text{ nm}$) indică faptul că, la început, fenolul este oxidat de către ozon la nucleu, formîndu-se compuși aromatici oxidați de tipul chinonelor. Ruperea nucleului aromatic, cu formare de molecule organice simple și eliminare de dioxid de carbon, însoțită de o scădere a încărcării organice a apei, are loc la timpuri de contact ridicate.

Comparînd rezultatele obținute la oxidarea unor compuși aromatici cu ozon, respectiv cu apă oxigenată și peroxidază, se observă că, la randamente comparabile de eliminare a compușilor or-

geniei din apă, prin oxidare enzimatică se realizează și o reducere pronunțată a încărcării organice a apei (TOC) (tabelul 36). Mărirea gradului de reducere a TOC prin ozonizare ar însemna timp lung de reacție, consum mare de ozon, și implicit, un consum energetic ridicat.

Tabelul 36 - Eliminarea unor fenoli și amine aromatice din apă prin oxidare enzimatică și oxidare cu ozon

Compus	Metoda de eliminare							
	Oxidare enzimatică ^{a)}				Oxidare cu ozon ^{b)}			
	C ₁ mg/l	C _F mg/l	%	% _{TOC}	C ₁ mg/l	C _F mg/l	%	% _{TOC}
Fenol	119,2	10,3	91,2	61,5	110,5	0,08	99,9	34,5
o-Clorfenol	90,0	1,7	98,0	66,1	98,5	1,2	98,8	22,4
Anilină	105,0	36,0	65,7	66,1	101,2	0,8	99,2	36,8

a) Condiții : 1 mM H₂O₂, 1000 U/l peroxidază, pH optim, 3h, 25°C

b) Condiții : pH=8,0, 28 mg O₃/l.min , 1,5 ore , 25°C

3.5. Concluzii comparative asupra procedeelor de epurare a apelor reziduale cu fenoli și amine aromatice

1. S-a stabilit că metoda de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice prin oxidare enzimatică este superioară epurării biologice, atât prin posibilitatea aplicării la temperaturi scăzute, cât și prin aplicabilitatea pentru o gamă variată de compuși aromatici. Prin oxidare enzimatică se elimină cu randamente mari și compuși nebiodegradabili ca pentaclorfenolul, și substanțe toxice pentru microorganisme, ca de exemplu 1-naftilamina și anilina.

2. Metoda enzimatică de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apă este superioară oxidării cu hipoclorit de sodiu, atât prin randamentele de eliminare a compusului aromatic, cât și prin cele realizate la reducerea carbonului organic total din apă.

3. Eliminarea enzimatică a fenolilor și aminelor aromatice din apă este comparabilă cu oxidarea cu dioxid de clor din punct de vedere al randamentelor de eliminare a compușilor aromatici din apă, și îi este superioară din punct de vedere al eliminării carbonului total.

4. Metoda enzimatică de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apă este comparabilă ca eficiență cu oxidarea cu ozon.

4. APLICATII TEHNOLOGICE ALE PROCEDURELUI CU APA OXIGENATA SI PEROXIDAZA IN EPURAREA UNOR APE REZIDUALE FENOLICE

Fenolii sînt principelii impurificatori ai apelor reziduale de la gazeificarea cîrbutilor, distilarea lemnului, industria organică de sinteză, și deoarece ei sînt caracterizați de o toxicitate ridicată, se impune eliminarea lor din apă. Una din limitele metodelor uzuale de defenolare a apelor reziduale constă în aplicabilitatea lor pentru domenii limitate de concentrație. Astfel, unele metode de epurare, ca adsorbția pe cîrbune activ, epurarea biologică, pot fi utilizate numai pentru concentrații mici de fenoli, în timp ce extracția cu solvenți organici de exemplu, poate fi aplicată doar pentru apele reziduale caracterizate prin concentrații foarte ridicate de fenoli /295/.

Metoda enzimatică de eliminare a fenolilor din apă, studiată de noi, se caracterizează prin eficiență ridicată și printr-o largă aplicabilitate, ea putînd fi utilizată pe domenii largi de pH și de concentrație. Pentru a verifica aplicabilitatea metodei propuse în epurarea apelor reziduale impurificate cu fenoli, s-a studiat epurarea unor efluenți reziduali fenolici reali, prin oxidare cu apă oxigenată și peroxidază, urmată de coagulare cu sulfat feros.

4.1. Epurarea apelor reziduale fenolice de la fabricarea fenolului prin procedeul curen

Probele de apă reziduală provenite de la instalația de fabricare a fenolului prin procedeul curen, impurificate în special cu fenol și acetone, au fost caracterizate prin determinarea pH-ului, a naturii și concentrației substanțelor impurificatoare.

Ca metode de analiză s-au utilizat metoda gaz-cromatografică /305/, precum și metoda bromatometrică pentru determinarea concentrației fenolului și metoda iodometrică pentru acetone /291/.

Analiza gaz-cromatografică s-a efectuat pe un cromatograf tip Chromatron GCHF 183, cu detector de ionizare în flacără, cu înregistrator Speedomax 681 A. Determinarea cantitativă a fenolului prin cromatografie de gaz se bazează pe dependența liniară existentă între concentrația fenolului în probă și aria semnalului

romatografic înregistrat.

Pentru determinarea conținutului de fenol din apă, 100 ml de apă acidulată la pH = 2 - 2,5 cu HCl se extrag cu 25 ml acetat de etil, printr-o extracție prin repartiție fracționată, cu randamente de 98 - 99,5 %. Extractele se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Extractele în acetat de etil, cu concentrație necunoscută de fenol, dar cu volum bine determinat, se injectează în coloana cromatografică, la o temperatură de injecție superioară cu 30 - 40°C temperaturii de fierbere a solventului. Condițiile de cromatografie au fost: $t_{\text{injecție}} = 120^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{detector}} = 200^{\circ}\text{C}$; $t_{\text{coloană}} = 70 - 200^{\circ}\text{C}$; debit de gaze, azot = 35 ml/min; hidrogen = 25 ml/min; aer = 300 ml/min; viteza de încălzire = $10^{\circ}/\text{min}$; viteza de înregistrare = 2 cm/min; sensibilitatea electrometrului $10 \cdot 10^8$. S-au utilizat coloane 10 % SE 30/cromosorb P silanizat, de 2 m . 3 mm. În aceste condiții, timpul de retenție al fenolului relativ la acetatul de etil este 7,0. Se poate constata că fenolul eluează cu asimetrie satisfăcătoare pentru analiza cantitativă, astfel că s-a trecut la standardizarea externă a probelor de concentrație cunoscută. În tabelul 37 sînt prezentate rezultatele determinărilor experimentale, iar în figura 26, dependența concentrației fenolului de raportul A/V.

Tabelul 37 - Standardizarea externă a fenolului

Proba	conc. g/l	V l	h mm	$t_{1/2}$ mm	A_2 mm	A_{med} mm ²	A/V mm ² /l
		10	48,0	3,9	139,2		
1.	1,884	10	43,5	3,0	130,5	123,4	13,34
		10	43,5	3,0	130,5		
2.	1,524	10	30,5	3,1	94,55	91,5	9,15
		10	30,5	2,9	88,45		
		10	109,0	2,8	305,2		
3.	3,200	10	116,0	2,6	301,6	304,0	30,4
		10	109,0	2,8	305,2		
4.	4,048	7,2	102,0	3,0	306,0	306,0	42,5
5.	5,526	5,0	95,0	3,0	285,0	265,0	57,0
6.	1,209	10	29,0	3,0	92,8	92,8	9,28
7.	0,909	10	22,0	3,7	81,4	81,4	8,14
8.	0,573	10	11,0	3,5	38,5	38,5	3,85
9.	1,394	10	21,0	3,2	67,2	67,2	6,72
10.	2,600	10	66,0	3,1	204,6	204,6	20,46

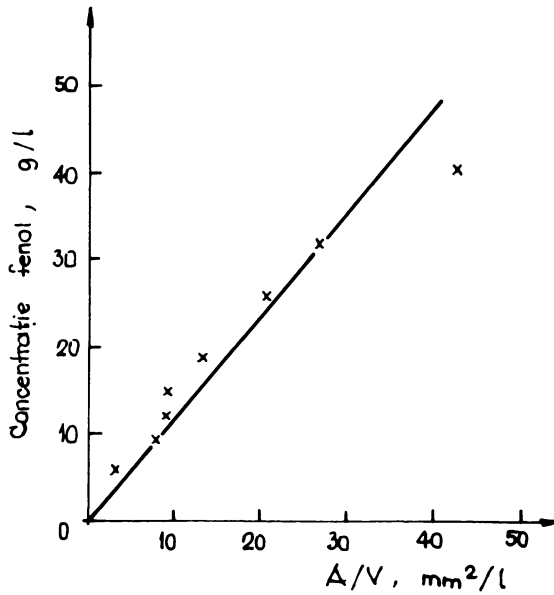


Fig.26 - Dependența concentrației fenolului de raportul A/V

In acest mod au fost analizate cele două eșantioane de ape reziduale fenolice. Din cromatogramele extractelor în acetat de etil ale celor două ape reziduale (fig.27), se observă prezența mai multor impurificatori, din care în concentrație mai mare se găsesc trei.

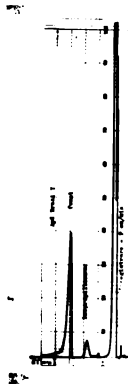


Fig.27 - Cromatograma extractului în acetat de etil pentru apa reziduală 1

Componentele au fost identificate prin compararea timpilor de retenție cu cei ai compuşilor standard. Aceste componente sînt : 1-acetonă, 2-isopropilbenzen, 3-fenol.

Caracteristicile apelor reziduale fenolice determinate experimental sînt prezentate în tabelul 38.

Tabelul 38 - Caracteristicile apelor reziduale fenolice

Probe	pH	Concentrație fenol (mg/l)		Concentrație acetonă mg/l	TOC mg/l
		Met.bromatometrică	Met.gaz cromatografică		
1.	10,45	921,5	912,2	1384,2	2420
2.	7,13	2803,5	2834,0	13,5	3615

Din studiile cu privire la aplicarea metodei enzimatică de eliminare a fenolului din aceste ape s-au determinat următoarele condiții optime : a) pentru oxidarea cu apă oxigenată și peroxidază : concentrație fenol = 100 mg/l ; concentrație peroxidază : 100 - 1000 U/l ; concentrație apă oxigenată : 1 ml ; pH = 4,0 ; 3 h , la 25°C ; b) pentru coagularea cu sulfat feros : pH = 8,5 - 9 ; doză de coagulant = 20 mg Fe²⁺/l.

Deoarece apele reziduale provenite de la instalația de obținere a fenolului prin procedeul cumen se caracterizează prin concentrații mari de fenol (0,925 g/l respectiv 2,04 g/l), condițiile standard de reacție au fost modificate, în sensul măririi corespunzătoare a concentrației enzimei și apei oxigenate. În experimentele efectuate s-a urmărit determinarea cantității minime de enzimă, necesară obținerii unor grade de eliminare a fenolului din apă cât mai ridicate.

Experimentele efectuate, pentru determinarea condițiilor optime de reacție, au constat în oxidarea cu apă oxigenată și peroxidază a unor soluții sintetice de fenol și acetonă, cu compoziție apropiată de cea a apei reziduale 1, variind pe rînd cantitatea de apă oxigenată, respectiv de enzimă, adăugată. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 39.

Din datele prezentate, se constată că, la oxidarea enzimatică a apei fenolice, în condițiile unui raport enzimă:fenol = 1:1 (U/mg), prin mărirea concentrației apei oxigenate pînă la un raport molar H₂O₂:fenol = 2:1 se realizează și creșterea gradului de eliminare al fenolului din apă. Mărirea raportului molar apă oxigenată : fenol peste această valoare nu este însoțită de o

creștere sensibilă a randamentului de eliminare al fenolului. În continuare, menținând constant raportul molar apă oxigenată:fenol la valoarea optimă determinată, s-a mărit concentrația enzimei în amestecul de reacție. Se observă că gradul de eliminare al fenolului din apă crește cu creșterea concentrației enzimei pînă la o valoare a raportului enzimă:fenol = 2,7:1, după care rămîne aproximativ constant. Mărind însă timpul reacției de oxidare de la 3 ore la 24 ore (determinarea numărului 10) gradul de eliminare crește de la 92,5 la 95,8 %, ajungînd, după coagulare, la 98,4 %.

Tabelul 39 - Oxidarea enzimatică și coagularea apei sintetice 1.
 C_1 fenol = 0,925 g/l ; C_1 acetona = 1,39 g/l

Nr. det	Raport activitate: fenol (U/mg)	Raport molar H_2O_2 :fenol	a) C_1 fenol mg/l	a) %	b) C_1 fenol mg/l	b) %	C_1 acetona mg/l
1.	1,08	0,94	518,1	44,0	492,0	46,8	542,4
2.	1,08	1,32	339,0	63,3	328,0	64,5	218,2
3.	1,08	1,50	254,2	71,5	228,0	75,3	126,6
4.	1,08	1,98	148,6	83,9	136,0	85,3	80,1
5.	1,08	2,54	146,8	84,1	135,4	85,4	20,2
6.	1,62	1,98	101,4	89,0	94,3	89,9	10,8
7.	2,16	1,98	84,2	91,0	32,4	94,1	2,0
8.	2,70	1,98	72,4	92,2	31,3	96,5	0,8
9.	3,24	1,98	69,8	92,5	20,4	97,8	
10.	2,70 ^{c)}	1,98	38,5	95,8	14,2	98,4	

a) Concentrația fenolului și gradul de eliminare după oxidarea enzimatică

b) Concentrația fenolului și gradul de eliminare după coagulare

c) Timp de reacție 24 ore

În continuare, apele reziduale fenolice reale au fost tratate prin oxidare enzimatică și coagulare, în condițiile optime determinate experimental, și anume : raport enzimă:fenol = 2,7:1, raport molar apă oxigenată:fenol = 2:1, timp de reacție 24 de ore. Rezultatele experimentale sînt prezentate în tabelul 40.

Se observă că, prin oxidarea enzimatică a apelor reziduale se obțin grade de eliminare a fenolului cuprinse între 94 și 97 %, și se realizează o reducere a încărcării organice a apei, exprimată prin carbonul organic total, variînd între 65 și 72 %. După coagularea cu sulfat feros, gradele de eliminare a fenolului cresc, atîngînd valori de 99 % și se realizează o scădere a TOC de 85-91 %.

Totodată, din cromatogramele extractelor în acetat de etil ale supernatantelor de la coagulare, se constată dispariția totală a celorlalți impurificatori, acetona și izopropilbenzenul.

Tabelul 40 - Epurarea apelor reziduale fenolice prin oxidare enzimatică și coagulare

Nr. det	C ₁ fenol mg/l	C _a) C _f fenol mg/l	% a) %	% a) % TOC	C _b) fenol mg/l	% b) %	% b) % TOC
1.	921,5	47,9	94,8	67,2	20,3	97,8	84,6
2.	921,5	40,5	95,6	65,8	16,6	98,2	88,5
3.	2834,0	136,0	95,2	68,4	22,7	99,2	91,2
4.	2834,0	113,4	96,0	72,5	36,8	98,7	89,8
5 ^c)	921,5	36,8	95,8	66,9			
6 ^c)	2834,0	90,7	96,8	69,4			

- a) Concentrația fenolului, gradul de eliminare și randamentul de reducere a TOC după oxidarea enzimatică
 b) Concentrația fenolului, gradul de eliminare și randamentul de reducere a TOC după coagulare
 c) Ape reziduale oxidate dar necoagulate

Concentrația reziduală a fenolului în apă este însă mult prea mare, variind între 40 și 140 mg/l în filtrele obținute după oxidarea enzimatică, respectiv între 16 și 37 mg/l în soluțiile rezultate după coagulare. Din acest motiv, s-a efectuat o oxidare enzimatică în trepte, substratele celei de a doua reacții enzimatică fiind soluțiile obținute în experimentele 1 - 6. Deoarece în acest caz, concentrația inițială a fenolului este mai mică de 100 mg/l, s-au utilizat concentrații de enzimă și de apă oxigenată mai reduse corespunzătoare unui raport enzimă:fenol = 1:1, și unui raport molar apă oxigenată:fenol = 1:1. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 41.

Se observă că prin epurarea în trepte a apelor reziduale fenolice, se obțin randamente globale de eliminare a fenolului din apă de 99,8 - 99,97 %, iar concentrația reziduală a fenolului în apă variază între 0,3 și 1,6 mg/l.

O altă variantă de epurare a apelor reziduale fenolice de la fabricarea fenolului prin procedeul cumen a constat în diluarea apelor reziduale, urmată de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază și coagulare cu sulfat feros. Factorul de diluție s-a ales în așa fel, încît concentrația fenolului în soluțiile rezultate să se încadreze în domeniul 100 - 150 mg/l, pentru care oxidarea enzimatică are eficiență maximă. Oxidarea enzimatică s-a realizat în condițiile

Tabelul 41 - Epurarea în trepte a apelor reziduale fenolice

Nr. det	C _f ^{c)} fenol inițial mg/l	C _f ^{a)} fenol mg/l	η ^{a)} %	C _f ^{b)} fenol mg/l	η ^{b)} %	η _t ^{d)} %
1.	20,3	1,05	94,8	-	-	99,88
2.	16,6	0,80	95,2	-	-	99,91
3.	22,7	0,86	96,2	-	-	99,96
4.	36,8	1,61	95,6	-	-	99,94
5.	36,8	1,18	96,8	0,32	72,8	99,96
6.	90,7	2,72	97,0	0,66	75,7	99,97

- a) Concentrația fenolului și gradul de eliminare după a doua oxidare enzimatică
 b) Concentrația fenolului după coagulare și randamentul coagularii
 c) Apele reziduale au fost supuse următoarei tehnologii : în experimentele 1-4 : oxidare-coagulare-oxidare ; în experimentele 5-6 : oxidare-oxidare-coagulare
 d) Randamentul total al procesului a fost calculat față de concentrația fenolului în apele reziduale supuse tratării

standard determinate anterior, și anume : 200 U/l peroxidază, 1 ml H₂O₂ , pH = 4 , 3 h , 25°C. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 42.

Tabelul 42 - Epurarea apelor reziduale fenolice prin diluare, oxidare enzimatică și coagulare

Tipul apei	C _f mg/l	Factor diluție	C _f ^{a)} mg/l	η ^{a)} %	C _f ^{b)} mg/l	η ^{b)} %	η _t %
I	92,1	10	2,8	96,95	1,2	59,90	98,70
II	98,2	10	2,5	97,46	1,05	58,0	98,93
I	91,5	10	2,1	97,70	1,02	50,0	98,90
II	141,7	20	5,6	96,75	1,8	67,85	98,72
II	138,2	20	4,8	96,52	1,42	70,0	99,20
II	120,0	24	4,5	96,25	1,38	69,20	98,83

- a) Concentrația finală de fenol și gradul de eliminare după oxidare enzimatică
 b) Concentrația finală de fenol și randamentul coagularii

Se observă că prin acest procedeu, fenolul este îndepărtat din apă în proporție de 98 - 99 %, iar concentrația reziduală de fenol este mică variind între 1 - 1,8 mg/l. Totuși, datorită consumului mare de apă necesar pentru diluarea apelor reziduale, nu se recomandă această metodă pentru aplicare industrială.

Apele reziduale fenolice provenite de la instalația de obținere a fenolului prin procedeul cumen au un conținut de fenol de aproximativ 3 g/l, ceea ce face neeconomică epurarea lor distructivă, ce are loc cu pierderi mari de fenol. S-a studiat de aceea elaborarea unei metode de epurare recuperativă, care să permită recuperarea fenolului dizolvat în apă. Se constată în extracția apei reziduale cu acetat de butil, urmată de oxidarea enzimatică a efluentului apos rezultat.

S-a ales ca agent de extracție al fenolului din apă acetatul de butil deoarece valoarea coeficientului de repartiție, determinat experimental $K = 57,78$, indică o extracție eficientă a fenolului în acetat de butil. Concentrația acetatului de butil în fază apoasă s-a determinat prin metoda gaz-cromatografică, cu un cromatograf de gaze Chromatron GCHF 188, cu detector de ionizare în flacără și înregistrator Speedomax 68/A. Pentru aceasta, 100 ml soluție de acetat de butil se extrag cu 30 ml acetat de etil prin extracție prin repartiție fracționată. Extractele se usucă pe sulfat de sodiu anhidru. Extractele în acetat de etil, cu concentrație necunoscută de acetat de butil, dar cu volum bine determinat, se injectează în coloana cromatografică, la o temperatură de injecție superioară cu 30 - 40°C temperaturii de fierbere a solventului. Condițiile de cromatografiere sînt: $t_{\text{injecție}} = 170^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{detector}} = 210^{\circ}\text{C}$, $t_{\text{coloană}} = 80 - 200^{\circ}\text{C}$, debit de gaze: azot - 35 mg/min, hidrogen - 25 ml/min, aer - 300 ml/min, viteză de încălzire = 16°/min, viteză de înregistrare = 1 cm/min, sensibilitatea electrometruului = $10 \cdot 10^8$. S-a utilizat o coloană de 10 % SE 30/Chromosorb P silonizat, 2 m x 3 mm. În aceste condiții, timpul de retenție al acetatului de butil în raport cu acetatul de etil este 2,83.

Determinarea cantitativă a acetatului de butil s-a realizat prin metoda standardizării interne, drept standard utilizîndu-se acetat de ciclohexil, de puritate cromatografică, cu p.f. = 176°C.

În tabelul 43 sînt prezentate rezultatele obținute la standardizarea internă a acetatului de butil, iar în figura 28 este prezentată dependența liniară $S_1/S_{st} = f(A_1/A_{st})$.

În acest mod s-a determinat concentrația acetatului de butil dizolvat în apă, după extracție, care este egală cu 0,0625 g acetat de butil/100 ml apă.

Extracția fenolului din apa reziduală s-a realizat astfel: trei probe de 200 ml din apa reziduală cu concentrație de fenol de 2,834 g/l, acidulate la pH = 2 - 2,5, au fost extrase cu câte 60 ml acetat de butil fiecare, utilizînd tehnica extracției prin

Tabelul 43 - Standardizarea internă a societății de buții

Proba	G_1 g	G_{at} g	h_1 mm	$1/2$ mm	h_2 mm	h_{at} mm	$1/2$ mm	A_{at_2} mm	G_1/G_{at}	A_1/A_{at}
1.	0,44742	0,96630	47,0	0,9	42,3	117,0	1,6	187,2	0,462	0,2259
			17,0	1,3	22,1	49,0	1,6	78,4	0,281	0,2818
			18,8	0,9	16,92	45,0	1,9	85,5		0,1978
2.	0,89500	0,97459	124,5	1,0	124,5	110,0	1,7	187,0	0,9183	0,6658
			56,0	1,2	67,2	47,1	1,9	89,49		0,7509
3.	1,33998	0,97180	193,0	1,4	270,2	133,8	1,9	254,22	1,3786	1,0628
			59,0	1,1	64,9	41,0	1,9	77,9		0,8331
4.	1,78992	0,96525	148,0	1,0	148,0	55,8	1,6	89,28	1,8544	1,6577

! ! !

repartiție fracționată.

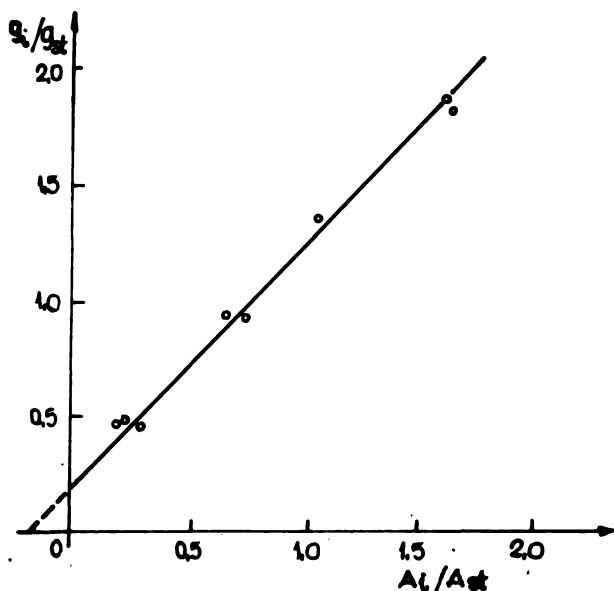


Fig.28 - Curba de etalonare pentru determinarea acetatului de butil prin metoda standardizării interne

Cele două fracțiuni - stratul organic și stratul apos - au fost analizate pentru determinarea conținutului de fenol. In tabelul 44 sînt prezentate rezultatele obținute pentru trei extracții.

Tabelul 44 - Extracția apei reziduale fenolice cu acetat de butil. Concentrația fenolului = 2,384 g/l

Nr. det	Concentrația fenolului		Concentrația acetat de butil în apă g/l
	în apă mg/l	în acetat de butil g/l	
1.	12,125	9,5455	0,6625
2.	12,250	9,4226	0,5940
3.	9,625	9,5520	0,6548

Se observă că în apa extrasă rămîn 9-12 mg fenol/l, iar concentrația acetatului de butil dizolvat în apă nu depășește 0,6 %. Stratul organic conține, în medie, 9,5 g fenol/l.

Cele două fracțiuni au fost prelucrate în continuare

astfel : stratul apos,cu conținut de fenol,s-a fost oxidat cu apă oxigenată și peroxidază,peñtu eliminarea totală a fenolului,iar stratul organic,cu concentrație ridicată de fenol a fost concentrat,în scopul recuperării fenolului.

Oxidarea enzimatică a fazei apoase,cu conținut de fenol de 12 mg/l,s-a realizat în condițiile optime determinate anterior. După terminarea reacției,în soluție s-a determinat prezența a 0,2 mg fenol/l,ce corespunde unui randament de eliminare de 99,6 %. Concentrația acetatului de butil în apă este de 0,04 %.

Concentrarea stratului organic s-a efectuat prin distilare.

S-au separat trei fracțiuni,care au fost analizate pentru determinarea conținutului de fenol.Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 45.Se observă că prin concentrare se recuperează aproximativ 80 % din fenolul extras din acetatul de butil.

Tabelul 45 - Concentrarea acetatului de butil

Proba	Volum ml	C _{fenol} mg/ml	G _{fenol} mg	Observații
Extract acetat de butil			1696,8	
Cap distilare	12,0	2,975	35,6	p.f. 90°C
Acetat de butil	156,0	1,950	314,2	p.f. 126°C
Reziduu	10,5	5,0	1312,5	proba a fost diluată 1 : 25

Din rezultatele prezentate se desprinde concluzia că : prin extracția fenolului din apă cu acetat de butil,urmată de oxidarea enzimatică a fazei apoase și concentrarea stratului organic,se obține atît o epurare evansată a apei reziduale (concentrație reziduală de fenol 0,2 mg/l),cît și o recuperare a fenolului cu un randament de 78 %.

Pe baza rezultatelor obținute se propune un proces tehnologic de epurare recuperativă a apelor reziduale fenolice,care constă din următoarele faze :

- a) Extracția fenolului cu acetat de butil
- b) Oxidarea enzimatică a fazei apoase,urmată de coagulare pentru separarea suspensiei și a filtratului.
- c) Concentrarea extractului organic pentru recuperarea fenolului.

În fig.29 este prezentat fluxul tehnologic al procedurii propus.

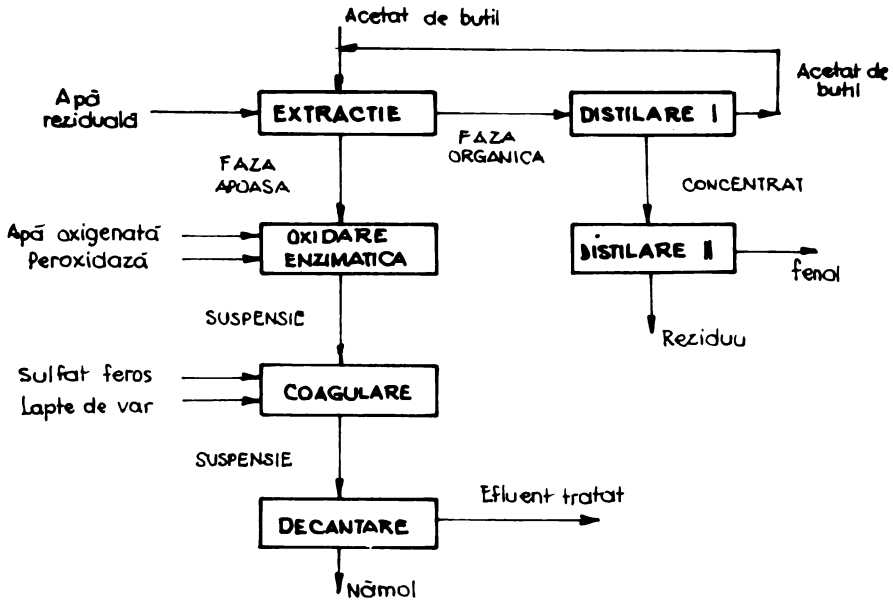


Fig.29 - Fluxul tehnologic al procesului de epurare a apelor fenolice prin extracție cu acetat de butil și oxidare enzimatică

Procedul de epurare recuperativă a apelor reziduale de la obținerea fenolului prin procedeul comun, propus, este simplu și eficient.

4.2. Epurarea apelor reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului

Apele reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului conțin, alături de alți impurificatori organici și anorganici, cantități variabile de fenol, o-, m-, și p-crezoli, xilenoli, trialchilfenoli etc. În experimentele efectuate în laborator s-a utilizat o apă reziduală fenolică, caracterizată printr-o concentrație de fenol de 173 mg/l, cu o încărcare organică, exprimată prin COO-Cr de 7700 mgO/l și pH = 3,5. Determinarea concentrației fenolului în apă s-a realizat prin metodele descrise anterior—metoda gaz cromatografică și metoda spectrofotometrică cu 4-aminocantipirină.

Epurarea acestor ape reziduale fenolice s-a realizat prin două variante, și anume : a) oxidare enzimatică, urmată de coagulare și separarea suspensiilor, și b) coagulare-oxidare enzimatică și separarea suspensiilor. În ambele cazuri oxidarea enzimatică s-a realizat în condițiile determinate anterior pentru ape reziduale, și anume : raport enzimă:fenol = 2,7:1 ; raport molar apă oxigenată:fenol = 2:1 ; timp de reacție 24 ore. După adăugarea enzimei în amestecul de reacție format din apa reziduală și apa oxigenată, se observă formarea unui precipitat brun, foarte fin.

În prima variantă de epurare a apei reziduale fenolice, prin oxidarea enzimatică în condițiile optime determinate, se realizează o eliminare a fenolului din apă de 94,7 %, ce corespunde unei concentrații reziduale de fenol de 9,2 mg/l, și o scădere a încărcării organice a apei de 18,6 %, valoarea reziduală a consumului chimic de oxigen COO-Cr fiind de 5290 mgO/l.

Soluția astfel obținută a fost coagulată cu sulfat feros, la pH = 3,5, realizat cu lapte de var. Doza optimă de coagulare s-a determinat experimental prin Jar-test. În tabelul 46 sînt prezentate rezultatele obținute la coagulare și decantare.

Se observă că prin coagulare, concentrația fenolului din apă scade pînă la 5 mg/l, realizîndu-se astfel un randament global de eliminare a fenolului de 97 %. Se realizează totodată și scăderea încărcării organice a apei variînd între 6 și 22 %, ce corespunde unui randament total de reducere a COO-Cr de 30 - 36 %.

A doua variantă de epurare a apei reziduale fenolice constă într-o coagulare primară, urmată de oxidare enzimatică și coagulare generală. Rezultatele obținute sînt prezentate în tabelul 47.

Din datele prezentate, se observă că doza optimă de coagulant este de 100 mg/Fe²⁺/l, cînd se realizează o reducere a fenolu-

Tabelul 46 - Coagulare cu sulfat feros a apei reziduale oxidate enzimatic. Concentrație fenol = 9,2 mg/l, COO-Cr = 5290 mgO/l, pH = 8,5

Nr. det	mg Fe ²⁺ /l	C fenol mg/l	%	% ^{a)} t	COO-Cr mgO/l	% COO-Cr	% COO-Cr total
			%	%		%	%
1. b)	-	7,5	18,5	95,6	4600	13,0	29,2
2.	2	6,5	29,4	96,2	4140	21,8	36,3
3.	5	5,2	43,5	97,0	4485	15,2	31,0
4.	10	5,2	43,5	97,0	4485	15,2	31,0
5.	25	6,5	29,4	96,2	4945	6,5	34,0
6.	50	7,8	18,2	95,4	4945	6,5	34,0

a) Randamentul global de eliminare al fenolului s-a calculat față de concentrația fenolului din apa reziduală

b) în experimentul 1, precipitarea s-a efectuat numai cu lapte de var adăugat pentru scuderea pH-ului la valoarea de 8,5

lui din apă cu 94 % și o scădere a COO-Cr de 17 %. Prin oxidarea enzimatică ulterioară, a soluțiilor rezultate după coagulare și decantare, cu apă oxigenată și peroxidază și filtrare, fenolul este eliminat în proporție de 93 - 95 %, iar COO-Cr se reduce cu 13 - 17 %. Prin acest procedeu de epurare, se obțin randamente globale de eliminare a fenolului cuprinse între 95 și 98 %. Valoarea minimă a concentrației reziduale de fenol din efluentul final (3,8 mg/l) se obține în experimentul 2.

Deși prin acest procedeu de epurare se realizează o eliminare avansată a fenolului din apă, încărcarea organică a apei, exprimată prin COO-Cr, rămâne foarte ridicată, fapt ce se explică prin existența în ape reziduale a unor compuși organici rezistenți la oxidarea enzimatică, și care nu pot fi eliminați din apă prin coagulare.

Din aceste motive, apele reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului, nu pot fi epurate numai prin oxidare enzimatică și coagulare, fiind necesară și utilizarea altor procese unitare de epurare. În acest caz, se propune utilizarea oxidării enzimatică ca o treaptă de epurare avansată, într-o tehnologie complexă de epurare.

Tabelul 47 - Epurarea apei reziduale fenolice de la distilarea uleiului
 Lemnului prin coagulare, oxidare enzimatică și filtrare.
 Concentrația inițială a fenolului - 173 mg/l ; COO-CF = 6500 mgO/l ;
 pH coagulare = 8,5 ; pH oxidare = 6,0

Nr. de de	Coagulare		Oxidare enzimatică				Parametrii globali				
	mgFe ²⁺ /l	C fenol mg/l	% %	COO-CF mgO/l	% COO %	C fenol mg/l	% %	% COO-CF %	% %		
1.	50	107,6	37,8	6200	4,6	6,25	94,2	5160	16,8	96,4	20,6
2.	100	79,2	54,2	5370	17,2	3,95	95,0	4680	17,2	97,7	23,4
3.	150	85,2	50,8	5000	13,8	4,80	94,4	4788	14,5	97,2	23,0
4.	200	88,4	48,9	5400	16,9	4,65	94,7	4650	13,8	97,3	25,5
5.	250	90,4	47,8	5520	15,1	5,42	93,7	4600	16,7	96,9	29,2
6.	300	106,8	36,2	6000	6,5	7,40	93,1	5120	15,8	95,7	21,2

Obs. Decoree oxidarea enzimatică se poate realiza într-un domeniu larg de pH, pentru a evita consumul mare de reactivi necesari pentru varierea pH-ului , s-a realizat oxidarea enzimatică la pH = 6,0

4.3. Concluzii asupra posibilităților de aplicare industrială a procedurii de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază în epurarea apelor reziduale cu conținut de fenoli

Prin aplicarea procedurii de oxidare enzimatică în epurarea unor ape reziduale fenolice s-au desprins următoarele concluzii :

1. Epurarea apelor reziduale fenolice de la obținerea fenolului prin procedeul comun prin oxidare enzimatică în două trepte și coagulare finală cu sulfat feros are loc cu randamente de 99,9 % care corespund unei concentrații reziduale medii de fenol în apă de 1 mg/l.

2. Epurarea acestor ape reziduale fenolice prin diluare, oxidare enzimatică și coagulare cu sulfat feros duce la o îndepărtare a fenolului din apă cu randamente de 98 - 99 %.

3. Extracția cu acetat de butil, urmată de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază asigură eliminări ale fenolului de 99,9 %, concentrația fenolului rămas în apă fiind de 0,8 - 0,9 mg/l. Totodată, se realizează o recuperare a fenolului din apa reziduală de 80 %.

4. Epurarea apelor reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului prin două variante, și anume : oxidare-coagulare-decantare și coagulare-decantare-oxidare-filtrare, realizează grade de eliminări ale fenolului din apă de aprox. 98 %. Încărcarea organică a apei rămâne însă la valori ridicate, datorită prezenței în apa reziduală a unor compuși organici rezistenți la oxidare, care nu pot fi eliminați prin coagulare. În acest caz, se propune utilizarea oxidării enzimatică ca o treaptă de epurare avansată pentru eliminarea fenolului, într-o tehnologie complexă de epurare.

5. CONCLUZII FINALE

Teza de față cuprinde contribuțiile originale ale autoarei în studiul eliminării fenolilor și aminelor aromatice din apele reziduale prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază, consemnate în nouă note publicate sau în curs de publicare, și comunicate /296-302, 306/. Principalele rezultate cu caracter teoretic și aplicativ pot fi rezumate în următoarele concluzii :

1. S-a elaborat o metodă de obținere și de purificare a peroxidazei din hrean. Purificarea avansată a extractului enzimatic se realizează prin gel-cromatografie pe Sephadex G75.

2. S-a studiat oxidarea unei serii de 30 de fenoli cu apă oxigenată și peroxidază, în scopul eliminării lor din apele reziduale și s-au determinat parametrii optimi ai reacției : pH, concentrația enzimei, concentrația apei oxigenate și concentrația fenolului.

3. S-a pus în evidență existența unor relații între structura fenolilor și eliminarea lor din apă prin oxidare enzimatică.

4. S-a demonstrat că, prin cuplarea reacției de oxidare enzimatică a fenolilor cu coagularea cu sulfat feros, se realizează o eliminare avansată a fenolilor din ape.

5. S-a studiat oxidarea fenolilor cu apă oxigenată și extracte enzimatice brute obținute în laborator, și s-au obținut grade de eliminare cuprinși la 90 %.

6. S-a elaborat studiul cinetic al reacției de oxidare enzimatică a fenolilor pentru o serie de 9 fenoli, prin metoda spectrofotometrică și metoda termică. S-a demonstrat că metoda termică poate fi utilizată ca metodă de investigare în studiul cineticii reacțiilor enzimatice.

a) Pentru sistemul fenol-apă oxigenată - peroxidază s-au determinat valorile energiei de activare E_a , și ale parametrilor de activare ΔH^\ddagger , ΔS^\ddagger .

b) Din studiul vitezelor de reacție în funcție de concentrația substratului aromatic, la diferite pH-uri, s-a stabilit că ionii de hidrogen manifestă o inhibiție necompetitivă asupra activității enzimei. Totodată, s-au determinat valorile pK_1 es și pK_2 es, pentru ionizarea compusului I și compusului II în timpul procesului.

c) S-au determinat constantele de viteză k_3 pentru 9 fenoli,

și s-a demonstrat că cea mai mare reactivitate față de sistemul apă oxigenată-peroxidază o prezintă hidrochinona, alături de o- și m-aminofenol și pirogalol, compusul cu reactivitate minimă fiind fenolul.

d) Studiind dependența vitezei inițiale de reacție în funcție de concentrația apei oxigenate, s-a demonstrat că la concentrații mai mari de $16,5 \cdot 10^{-3} M$, apa oxigenată inhibă reacția enzimatică, reacționând cu complexul Michaelis CII, cu formarea compusului III inactiv, și s-a determinat valoarea constantei de inhibiție K_i .

e) S-a demonstrat că reacția de oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază a fenolilor are loc conform unui mecanism ping-pong pentru reacții cu trei substraturi, și s-a propus o schemă pentru acest mecanism.

7. S-a elaborat o metodă generală de tratare a apelor cu conținut de amine aromatice prin oxidare enzimatică cu apă oxigenată și peroxidază, urmată de coagulare cu sulfat ferros. Coagularea cu sulfat ferros a soluțiilor oxidate enzimatic în prealabil, duce la mărirea gradelor de eliminare a aminelor aromatice din apă cu 10 - 30 %, datorită faptului că se realizează și o eliminare a compuşilor dizolvați în apă prin adsorbție și complexare.

8. S-au stabilit parametri optimi ai reacției de oxidare enzimatică a aminelor aromatice : pH, concentrație de substrat, concentrația apei oxigenate și concentrația peroxidazei.

9. S-a stabilit existența unei relații între structura aminelor aromatice și eliminarea lor din apă prin oxidare enzimatică. S-a arătat că substituenții cu efect inductiv sau electromer donor de electroni măresc reactivitatea anilinei față de sistemul apă oxigenată-peroxidază, în timp ce substituenții cu efect electromer atrăgător de electroni o micșorează.

10. S-a demonstrat că metoda de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice prin oxidare enzimatică este superioară epurării biologice, atât prin posibilitatea aplicării la temperaturi scăzute, cât și prin aplicabilitatea pentru o gamă variată de compuşii aromatici. Prin oxidare enzimatică se elimină cu randamente mari și compuşii nebiodegradabili, și substanțe toxice pentru microorganismele.

11. Metoda enzimatică de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apă este superioară oxidării cu hipoclorit de sodiu, atât prin randamentele de eliminare a compusului aromatic, cât și prin cele realizate la reducerea carbonului organic total din apă.

12. Eliminarea enzimatică a fenolilor și aminelor aroma-

tice din apă este comparabilă cu oxidarea cu bioxid de elor din punct de vedere al randamentelor de eliminare a compușilor aromatici din apă și îi este superioară din punct de vedere al eliminării carbonului total.

13. Metoda enzimatică de eliminare a fenolilor și aminelor aromatice din apă este comparabilă ca eficiență cu oxidarea cu ozon.

14. Epurarea apelor reziduale fenolice de la obținerea fenolului prin procedeul cumen prin oxidare enzimatică în două trepte și coagularea finală cu sulfat feros are loc cu randamente de 99,9 %, care corespund unei concentrații reziduale medii de fenol în apă de 1 mg/l.

Epurarea acestor ape reziduale fenolice prin diluare, oxidare enzimatică și coagulare cu sulfat feros duce la o îndepărtare a fenolului din apă cu randamente de 98 - 99 %.

Extracția cu acetat de lutil, urmată de oxidare cu apă oxigenată și peroxidază duce la eliminări ale fenolului de 99,9 % concentrația fenolului rămas în apă fiind de 0,8 - 0,9 mg/l. Totodată, se realizează o recuperare a fenolului din apa reziduală în proporție de 80 %.

15. Epurarea apelor reziduale fenolice de la distilarea uscată a lemnului prin două variante, și anume : oxidare-coagulare-decantare și coagulare-decantare-oxidare-filtrare, realizează grade de eliminări ale fenolului din apă de aprox. 98 %. Încărcarea organică a apei rămâne însă la valori ridicate, datorită prezenței în apa reziduală a unor compuși organici rezistenți la oxidare enzimatică, care nu pot fi eliminați prin coagulare. Se propune în acest caz utilizarea oxidării enzimatică, ca o treaptă de epurare avansată pentru eliminarea fenolului, într-o tehnologie complexă de epurare.

BIBLIOGRAFIE

1. V.Cochea, A.Martin, L.Vlad, V.Dalea și E.Lărinzi, "Bazele Tehnologiei Chimice" vol.2, Litografia I.P.T.V. Timișoara, 1979, p.1-132.
2. M.Negulescu, "Purarea apelor uzate orășenești" Ed.Tehnică București, 1978, p.405-415
3. L.M.Vaicum, "Purarea apelor uzate cu nămol activ-Bazele biochimice". Ed.Acad.R.S.R., București, 1981
4. F.Eldridge, Trans.2-nd.Sem.Biol.Problems on Water Poll.in R.A.Taft.Saint Eng.Center.Rechn.Rept., W 60-3, 255, (1959)
5. K.Christofferson - *Anal. Chim. Acta*, 31, 233 (1969)
6. R.Maenpaa, P.Hyminen și J.Tikka - *Chem. Abstr.* 68, 117039q (1968)
7. S.Faust și J.V.Hunter - *The Aquatic Environment*, New York, M.Dekker, 1971
8. L.Runs, *Chem. Abstr.*, 51, 6771 d (1964)
9. A.Elliot și A.Lafreniere, *Water Sew. Works*, 111, R 325 (1964)
10. K.Ersova, *Gig. i Sanit.*, 33, 102 (1968)
11. Z.Fedorenko, *Gig. i Sanit.*, 29, 17 (1964)
12. P.W.Graham, *Fourth Inter. Conf. on Water Pol. Res.*, Prague (1969)
13. M.Hughes, *J. Appl. Chem.*, 450 (1962)
14. K.H.Lanouette, *Chem. Eng.*, 84, 22, 99 (1976)
15. A.M.Klibanov, B.N.Alberti, P.D.Morris și L.M.Yelshin, *J. Appl. Biochem.*, 2, 414, (1980)
16. P.N.Alberti și A.M.Klibanov - *Biotech. Bioeng. Symp.*, No.11, 373 (1981)
17. M.Cotrău, *Toxicologia*, Ed. Junimea, Iași, 1978
18. P.A.Schonke și D.S.Warren, *Chem. Abstr.*, 78, 75602 s, (1973)
19. H.B.Tench și Z.Y.Morton, *J. Inst. Sew. Purif.*, 5, 478 (1962)
20. P.Farkas, *Fourth Int. Conf. on Water Poll. Res.*, Prague, 1969
21. R.D.Neufeld, *J. S. P. C. F.*, 38 (1966)
22. L.Hartmann și G.Laubenberger, *J. Saint. Eng. Dir.*, ASCE, 94, SA 2, 247 (1968)
23. J.W.Patterson, P.L.Brezonik și H.D.Putman - *Proc. Ind. Waste Conf.*, 24th, Purdue Univ., 1969
24. S.Matsushita, *Chem. Abstr.*, 1304, (1962)
25. V.Liubimov și S.Kagen, *Gig. i Sanit.*, 1, (1955)
26. D.Thon, *Vom Wasser*, 25 (1958)

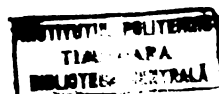
27. C. Viswahathan, *Naturwiss.*, 48 (1961)
28. W. Bucksteeg și H. Thiele, *G.W.F.*, 100, 916 (1959)
29. R. Roppen, *Gesundheits Ing.*, 76 (1955)
30. G. Lenhard, *Hydrobiologia*, 25, 1-2, (1965)
31. L. Vaicum și A. Eminovici, *Water Res.*, 8, 12, 1007 (1974)
32. C. Weddle și D. Jenkins, *Water Res.*, 5, 621 (1971)
33. L. I. Ciplea și Al. Ciplea, *Poluarea mediului ambiant*, Ed. Tehnică București, 1978, p. 83
34. J. Müller, *Gas und Wasserfach*, 28, 761, (1964)
35. P. L. Mc Carty, "Energetics of Organic Matter Degradation", in R. Mitchell, "Water Pollution Microbiology", New York, Wiley-Interscience, 1972
36. F. Böpel, *G.W.F.*, 8, 407 (1971)
37. I. F. Dumitru și D. Iordăchescu, "Introducere în Enzimologie", Ed. Medicală, București (1981)
38. B. V. Rogers, "Enzyme Kinetics", Cambridge Univ. Press, 1977
39. W. Lineweaver și D. Burk, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 658 (1934)
40. G. S. Ladie, *J. Biol. Chem.*, 146, 85 (1942); B. H. J. Hofstee, *J. Biol. Chem.*, 199, 137 (1952)
41. S. C. Hanes, *Biochem. J.*, 128, 425 (1940)
42. R. Kuhn, *Z. physiol. Chem.*, 125, 1 (1923)
43. J. L. Webb, "Enzyme und Metabolic Inhibitors" vol. 1, Academic Press, New York, 1963
44. G. Zarnea, "Microbiologie generală", Ed. did. și pedagogică București, 1970
45. G. Zarnea, Gh. Menciucopski și St. Brăgărea, "Bioingineria preparatelor enzimatic microbiene", București, Ed. Tehnică, 1980
46. A. Cornish-Bowden, "Principles of Enzyme Kinetics", Butterworth, London, 1976
47. M. Dixon, *Biochem. J.*, 55, 161 (1953)
48. W. W. Cleland, *Advances in Enzymology*, 29, 1 (1967)
49. J. Cairns și G. Lanza, in R. Mitchell "Water Pollution Microbiology", Wiley Interscience, New York, 1972
50. P. R. Dugan și H. M. Pickrum - Proc. 27th Ind. Waste Conf., Purdue Univ. Ext. Ses., 141, 1019 (1971)
51. R. P. Neufeld și E. Hermann, *J. W. P. C. F.*, 47, 2, 310 (1975)
52. A. Parsons și P. Dugan, *Appl. Microbiol.*, 21, 4, 657 (1971)
53. L. Vaicum și A. Eminovici, *Water Res.*, 8, 12, 1007 (1974)
54. L. Vaicum și A. Eminovici, *Studii de protecția și epurarea apelor*, vol. 19, București, ICRGA, 1979

55. E.Gloyne și D.Ford, J.W.P.C.F., 51, 11, 2577 (1979)
56. J.T.Novack, J.W.P.C.F., 46, 8, 1984 (1974)
57. C.Rogovskaia, M.Lazareva și L.Kostina, Fourth Inter.Conf.on Water Pol.Res., Prague, 1969
58. A.H.Benedict și D.A.Carlson, J.W.P.C.F., 45, 1, 10 (1979)
59. A.A.Friedman și E.D.Schroeder, J.W.P.C.F., 44, 7, 1433 (1972)
60. A.E.Zanoni, Water Res., 1, 543 (1967)
61. L.Vaicum, M.Ciceu și L.Stafănescu, Studii de protecția și epurarea apelor, vol.17, București, ICRA, 1976
62. T.Y.Casey și O.T.Karmo, Water Res., 8, 10, 605 (1974)
63. J.W.McLa Riviere, "Waste Treatment", in R.Mitchell, "Water Pollution Microbiology", New York, Wiley-Interscience, 1972
64. R.E.Mc Kinney, Microbiology for Sanitary Engineers, Mc Graw Hill Book, New York, 1962
65. P.Brouzes, "Trécis d'Épuration biologique par boues activées", Techn.et documentation, Paris, 1975
66. G.J.Thabara și A.F.Gaudy, J.W.P.C.F., 41, 322 (1969)
67. L.Vaicum, "Biodegradabilitatea detergenților", Ed.Academiei, București, 1971
68. H.Liebmann, Handbuch der Frischwasser und Abwasser biologis, vol.II, R.Oldenbourgh, München, 1958
69. J.K.Petros și E.S.Davis, Chem.Abstr., 88, 141188 (1978)
70. x x x , J.W.P.C.F., 39, 1232 (1967)
71. E.D.Kaufmann și J.R.Plimmer, "Approches to the synthesis of soft pesticides", in R.Mitchell "Water Pollution Microbiology", Wiley Interscience, New York, 1972
72. R.D.Swisher, "Surfactant biodegradation", N.Decker ed., New York, 1970
73. A.H.Lehninger, Biochimie, vol.I, Ed.Tehnică, București, 1987
74. J.F.Chu și E.J.Kirsch, appl.Microbiol., 25, 1033 (1972)
75. I.J.Higgins și R.F.Burns, "The Chemistry and Microbiology of Pollution", Academic Press, London, 1975
76. R.Bairds, L.Cermona și R.L.Jenkins, J.W.P.C.F., 49, 7, 1609 (1977)
77. G.Malaney, J.W.P.C.F., 39, 2020 (1967)
78. J.Monod, Ann.Rev.Microbiol., 3, 371 (1949)
79. A.T.Gaudy, in R.Mitchell "Water Pollution Microbiology", New York, Wiley Interscience, 1972
80. P.Simon și R.Meunier, Microbiologie industrielle et génie biochimique, Paris, Masson et.cie., 1970
81. V.Cocheu, A.Martin și C.Minea, Siap. "Probleme actuale ale pro-

tecției, tratării și epurării apelor în R.S.R.",
vol.VI, Timișoara, 1984, p.34

82. Fr. Evans, *Ozone in Water and Wastewater Treatment*, Ed. Ann Arbor Science, Michigan, 1972
83. J.P. Gould și W.J. Wabber, *J. Water Poll. Control*, 48, 1, 47 (1976)
84. H.R. Eisenhauer, *J. Water Poll. Control.*, 4a, 11, 1887 (1968)
85. H.R. Eisenhauer, *J. Water Poll. Control.*, 43, 201 (1971)
86. L.B. Wingsard și R.K. Finn, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.*, 8, 65 (1969)
87. E. Bornatek și C. Frengen, *Acta Chem. Scand.*, 15, 2421 (1962)
88. P.S. Bailey, J.E. Batterbee și A.G. Lane, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 1027 (1968)
89. M.G. Stunock, E.L. Cline și K.R. Robinson, *J. Org. Chem.*, 28, 2340 (1963)
90. P.R. Story, J.A. Alford, W.C. Ray și J.R. Burgess, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 3044 (1971)
91. H.G. Reinhardt, G.A. Doorekian și H.H. Freedman, *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5934 (1968)
92. H.M. White, H.O. Colomb și P.S. Bailey, *J. Org. Chem.*, 30, 481 (1965)
93. P.S. Bailey, J.E. Keller și T.P. Carter, *J. Org. Chem.*, 35, 2777 (1970)
94. F. Edeline, R. Deswaef și G. Lambert, *Le Tribune de Cebedeau*, 412, 137 (1978)
95. H. Fathmann și S.E. Delft, *Centre Belge d'etude et de Documentation des eaux*, 371, 292, 1974
96. J. Mallevialle, *La technique de l'eau*, 17 (1975)
97. F. Meciejowski și J. Sokolovska, *Gas, Woda, Technika sanitarna*, 3 (1968)
98. E.H. Snider și J.J. Porter, *J. Water Poll. Control*, 46, 5, 886 (1974)
99. H. Burchard, *Inquinamento*, 3, 39 (1975)
100. W.W. Eckenfelder și D.J. O'Connor, "Biological Waste Treatment", Ed. Pergamon Press, New York, 1961
101. J. Mallevialle, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potables", Karlsruhe, 1979, p.319
102. J.C. Kruthof, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potables", Karlsruhe, 1979, p.406
103. D. Maier, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potables", Karlsruhe, 1979, p.435
104. M. Drapo, P. Cescov și R. Frache, *Inquinamento*, 3, 22, (1975)
105. P. Singer și W.B. Zilli, *Water Res.*, 9, 127 (1975)
106. J. Hoiens și H. Pader, *Environ. Science Techn.*, 12, (1), 79 (1974)

107. F.Damez și J.C.Dernantourt, *Technique de l'eau et de l'assainissement*, 388, 17 (1979)
108. H.De Greef și J.C.Morris, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potables", Karlsruhe, 1979, p.442
109. J.Hoigné și H.Bader, *Environ.Science Techn.*, 12, 79 (1978)
110. J.Hoigné și H.Bader, *Prog.Water.Tech.*, 10, 516, 557 (1978)
111. M.Doré, N.Merlet, T.Blanchard și B.Langlais, *Prog.Water Techn.*, 10, 516, 526 (1978)
112. W.Kuhn, H.Sontheimer, L.Steiglitz, D.Maier și H.Kurz, *J.A.W.W.A.*, 6, 326 (1978)
113. H.Sontheimer, S.Heilker, M.R.Jekel, H.Wolte și F.Volmek, *J.A.W.W.A.*, 7, 393 (1978)
114. C.Gonella, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potable", Karlsruhe, 1979, p.390
115. R.G.Rice, C.Cameronson, C.W.Miller și A.G.Hill, *J.A.W.W.A.*, 1, 44 (1981)
116. J.Hoigné și H.Bader, "Ozone: Science and Technology" vol.1, Pergamon Press, New York, 1979, p.73-85
117. L.Divet, *Technique de l'eau*, 5, 309 (1979)
118. A.Wachs, N.Markis, M.Scheider și P.Wasserstrom, *Progress Water Techn.*, 10, 153 (1978)
119. H.L.Lewis, *Dir.Eng.Res.*, 60, 48 (1965)
120. S.Mydlarczyk, P.Kompowski și T.Kruppink, *Koks, Snola, Gas*, 11, 3, 107 (1966)
121. M.Osenedy, *Hidrol.Hozl.*, 44, 371 (1964)
122. S.Goren-Strul, H.W.R.Kliyn și A.E.Mostaert, *Anal.Chim.Acts*, 34, 3, 322 (1966)
123. C.Chavez și W.H.Murkey, *J.Chromat.*, 298, 169 (1984)
124. H.B.Dunford, W.D.Hewson și K.Steiner, *Can.J.Chem.*, 56, 22, 2844 (1978)
125. A.Nadeshdin și H.B.Dunford, *Can.J.Chem.*, 58, 23, 2504 (1980)
126. T.Araiso, R.Kutter, M.Falcic, L.Hager și H.B.Dunford, *Can.J. Biochem.*, 59, 4, 233 (1981)
127. J.Katz, "Ozone and Chlorine Dioxide Technology for Disinfection of Drinking Water", Noyes Deto Corp., New Jersey, 1980
128. J.Mallevalle, Y.Laval, M.Letevra și C.Rousseau, in "Ozone/Chlorine Dioxide Oxidation Products Organic Materials", Ed.Rice and Cotruco, Intl.Ozone Inst., Cleveland, p.189 (1978)



129. L.Weil, B.Strintz și K.E.Quentin, Intl.Symp.on Ozone an. Water, Intl.Ozone Inst., Cleveland, (1977).
130. Y.Richard și L.Brerner, in "Ozone/Chlorine Dioxide Oxidation Products of Organic Materials", Ed. Rice and Cotrucco, Intl.Ozone Inst., Cleveland, p.169, (1978)
131. J.Hoffman și D.Richelsdorfer, Vom Wasser, 38, 179 (1971)
132. R.D.Gabovich, K.R.Vrochinskii și I.L.Zurinsky, Gig.i Sanit., 34, 336 (1969)
133. L.J.Klein, N.I.Brabets și L.C.Kinney, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Intl.Ozone Inst., Waterbury, Connecticut 1, (1975)
134. P.S.Bailey, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Intl.Ozone Inst., Waterbury, Connecticut p.101 (1975)
135. L.J.Bollik, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Intl.Ozone Inst., Waterbury, Connecticut, p.522 (1975)
136. R.L.Garrison, C.F.Wank și H.V.Frangle, Intl.Symp.on Ozone for water and Wastewater Treatment, p.551 (1975)
137. T.N.Hendrikson, Intl.Symp.on Ozone for water and Wastewater Treatment, Intl.Ozone Inst., Waterbury, Connecticut p.578 (1975)
138. G.Klingsick, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Intl.Ozone Inst., Waterbury, Connecticut p.587 (1975)
139. G.E.Adams, W.E.Lickenfelder, și R.N.Stein, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut, p.591 (1975)
140. N.Liebergott, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut, p.688 (1975)
141. A.Ikehata, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut, p.614 (1975)
142. H.A.Swain și R.B.Rozella, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut p.748 (1975)
143. A.Netzer și A.Bowers, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut, p.731 (1975)
144. M.Steinberg, M.Beller și J.K.Powell, Intl.Symp.on Ozone for Water and Wastewater Treatment, Waterbury, Connecticut, p.10 (1975)

145. x x x , *Encyclopedia of Industrial Chemical Analysis*, vol.16, Mc Graw-Hill, New York, p.538-557, 1972
146. B.L.Hackman, *Toxic Organic Chemicals; Destruction and Waste Treatment*, Noyes Data Corp., Park Ridge, N.J., p.52, 1978
147. R.G.Kice, C.M.Robson, G.W.Miller și A.G.Hill, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potable" Karlsruhe, p.463, (1979)
148. E.Gilbert, in "Procédés d'oxidation appliqués au traitement de l'eau potable", Karlsruhe, p.256 (1979)
149. x x x , "Phenol-free Waste Water", *Chem.Eng.*, 66, 8 (1959) .
150. W.W.Kwie, *Water and Sewage Works*, 116, 2, 74 (1969)
151. x x x , "Ozone Counters waste Cyanides Lethal Punch", *Chem. Eng.*, 63, 3 (1958)
152. J.Guillard și C.Valin, *L'eau*, 48, 5, 138 (1961)
153. P.S.Bailey, in "Ozone in Water and Wastewater Treatment". (I.L.Evans ed), Sep.3, Ann Arbor Sci.Publ., Michigan, 1972
154. E.M.Sernatek și C.Irengen, *Acta Chem.Scand.*, 15, 471 (1961)
155. E.Beknatek, J.Moskeland și A.Valen, *Acta Chem.Scand.*, 15, 1454 (1961)
156. H.R.Eisenhauer, *Water Res.*, 5, 467 (1971)
157. H.Bauch, R.Berghard și J.M.Arsovic, *Gesund. Ing.*, 91, 258 (1970)
158. S.D.Razumovskii, G.M.Globonko, G.A.Nikiforov, J.A.Gurvich, J.A.Karelin și G.S.Zaikov, *Neftekimiya*, 12, 65 (1972)
159. S.D.Razumovskii, G.A.Nikiforov, G.M.Globenko, G.A.Karelin, J.A.Gurvich, H.A.Karelin și G.S.Zaikov, *Neftekimiya*, 12, 376 (1972)
160. Y.Skarlatos, R.C.Barker, G.L.Haller și A.Yelon, *J.Phys.Chem.*, 79, 2587 (1975)
161. G.L.Anderson, *AIChE Symp.*, Ser., 73, 265 (1977)
162. M.Doré, B.Langlais și B.Legube, *Water Res.*, 13, 413 (1978)
163. V.Augugliaro și L.Rizzuti, *Chem.Eng.Sci.*, 33, 1441 (1978)
164. T.Otobe, S.Tone, K.Kono și K.Nakao, *J.Chem.Eng.Jpn.*, 12, 289 (1979)
165. Y.Yamamoto, I.Niki, H.Shiokawa și Y.Kamiya, *J.Org.Chem.*, 44, 2137 (1979)
166. P.S.Bailey, in "Ozone for Water and Wastewater Treatment", (R.G.Kice and M.F.Browning eds.), p.101, Intl.Ozone Assoc., Cleveland, Ohio, 1975

167. P.S.Bailey, "Ozonation in Organic Chemistry", vol.2, Nonolefinic Compounds, Academic Press, New York, p.31-37, 186-188, 1982
168. L.B.Wingard Jr. și R.K.Finn, Ind.Eng.Chem., Prod.Res.Dev., 8,65 (1979)
169. K.Herman și P.A.Giguere, Can.J.Chem., 43,1746 (1965)
170. K.J.Olszyna și J.Heicklen, Adv.Chem.Ser., 113,191 (1978)
171. R.G.de Pena, K.J.Olszyna și J.Heicklen, J.Phys.Chem., 77,438 (1973)
172. D.T.Hill și C.L.Barth, Trans.ASAE, 19,935 (1976)
173. J.Pasero, J.Chouteau și M.Naudet, Bull.Soc.Chim.Fr., p.2123 (1963)
174. G.B.Bachman și K.G.Strawn, J.Org.Chem., 33,313, (1968)
175. P.S.Bailey și J.E.Keller, J.Org.Chem., 33,2680 (1968)
176. P.S.Bailey, T.P.Carter Jr. și L.M.Southwick, J.Org.Chem., 37,2997 (1972)
177. E.Keinan și Y.Mazul, J.Org.Chem., 42,844 (1977)
178. P.S.Bailey, J.E.Keller și T.P.Carter, J.Org.Chem., 35,2777 (1970)
179. R.S.Miller, J.Org.Chem., 26,2327, (1961)
180. P.S.Bailey și J.E.Keller, J.Org.Chem., 35,2782 (1970)
181. P.S.Bailey, L.M.Southwick și T.P.Carter, J.Org.Chem., 35,2782 (1970)
182. S.A.Șukarev-"Chimie Anorganică", vol.I, Ed."Visnia Șkola" Moscova, p.251-270, 1970
183. M.Suard, B.Praud și L.Praud, "Éléments de chimie générale" ed.II-a, Flammarion, 1975, p.251-255
184. K.S.Werdehoff, P.C.Singer, J.A.W.W.A., 79,9,107 (1987)
185. C.H.Rav-Acha, Water Sci.Technol, 17,611, (1984)
186. D.Couri, M.S.Abdel-Rehman și J.R.Bull, Envir.Health Perspectives, 46,13 (1982)
187. R.C.Dressman, și A.A.Stevens, J.A.W.W.A., 75,8,431, 1983
188. E.M.Aieta, P.V.Roberts, M.Hernandez, J.A.W.W.A., 76,1,64 (1984)
189. C.H.Rav-Acha și R.Blitz, Water Res., 19,10,1273 (1985)
190. J.B.Wajon, D.H.Rosenblatt și E.Burrows, Envir.Sci.and Technol., 16,7,396 (1982)
191. C.H.Rav-Acha, Water Res., 18,11,1329 (1984)
192. A.A.Stevens, Envir.Health Perspectives, 46,101 (1982)
193. V.Cocheșci, A.Martin, L.Vlad și G.Burtică, Simp "Probleme actuale ale protecției, tratării și epurării apelor în RSR", 4-6 oct.1984, Timișoara, vol.II, p.89

194. V. Cochea, A. Martin și C. Bogatu, Simp. "Probleme actuale ale protecției, tratării și epurării apelor în RSR", 4-6 oct. 1984, Timișoara, vol. VI, p. 1-33
195. K. W. Sontheimer, J. A. W. W. A., 70, 6, 326 (1978)
196. J. M. Veenstra și J. Schnoor, J. A. W. W. A., 72, 10, 584 (1980)
197. M. C. Kavanaugh, A. R. Trussel, J. Cremer și R. Brussel, J. A. W. W. A., 72, 10, 578 (1980)
198. B. G. Oliver și J. Lawrence, J. A. W. W. A., 71, 3, 161 (1979)
199. B. M. Chow și P. V. Roberts, Environ. Eng. Div., 107, 8, 509 (1981)
200. M. Doré, M. Merlet, J. Delaet, J. Coichon, J. A. W. W. A., 74, 2, 103 (1982)
201. M. Doré, M. Merlet, T. Blanchard și B. Langlais, Water Poll. Res., 10, 6, (1988)
202. H. Yamada și I. Yamazaki, Arch. Biochem. and Biophys., 171, 737-744, (1975)
203. W. Straus, J. Histochem. and Cytochem., 27, 10, 1349 (1979)
204. J. S. Wiseman, J. S. Nichols și M. K. Kolpak, J. Biol. Chem., 257, 11, 6328 (1982)
205. L. Vámos-Vigvazo, J. Farkas și R. Babos-Szebenyi, Acta Alim., 9, 1, 11 (1980)
206. R. Deponte, V. Berkes-Sojak, Kem. Ind. 31, 7, 363 (1982)
207. T. Ishikawa, M. Tamura și I. Yamazaki, J. Biol. Chem., 255, 22, 10764 (1980)
208. T. Postmann și B. Forstmann, Acta Biol. Med. Genm., 38, 1039 (1979)
209. M. Kato, S. Aibara, Y. Morita, M. Nakatani și K. Hiromi, J. Biochem., 95, 861 (1984)
210. Von H. Gallati și H. Brodbeck, J. Clin. Chem. Clin. Biochem., 20, 221 (1982)
211. P. D. Josephy, T. Lebling, R. P. Mason, J. Biol. Chem., 258, 9, 5561 (1983)
212. P. D. Josephy, T. Lebling și R. P. Mason, Molec. Pharm., 23, 766 (1982)
213. H. B. Dunford și A. D. Nadezhdin, în "Oxidases and Related Redox Systems", T. L. KING Editor, Pergamon Press, New York, 1982, p. 653-668
214. W. D. Hewson și L. P. Hager, în "The Porphyrins", vol. VII, Academic Press, New York, 1979, p. 295-332
215. B. Chance, L. Powers, Y. Ching, T. Poulos, G. R. Schonbaum, I. Yamazaki și K. G. Paul, Arch. Biochim. Biophys., 235, 2, 596-611, (1984)
216. I. M. Savenkova, V. P. Kurchenko și D. I. Metelitsa, Biochimia, 49, 5, 850 (1984)
217. M. I. Savenkova, V. P. Kurchenko și I. B. Metelitsa, Biochimia, 49, 7, 1147 (1984)

218. M.I.Savenkova, V.P.Kurchenko și I.D.Motelitsa, *Biochimia*, 5,41,(1983)
219. P.George, *Biochem.J.*, 54,267,(1953)
220. P.George, *Advances in Citol.*, 4,367 (1952)
221. P.George, *Nature*, 169,612 (1952)
222. D.Keilin și E.E.Hartree, *Biochem.J.*, 49, 88,(1951)
223. H.Theorell și B.Swedén, *Nature*, 143,71,(1940)
224. H.Theorell, *Enzymologia*, 10,1280,(1940)
225. G.R.Schänbaum, *J.Biol.Chem*, 248,502 (1973)
226. I.Morishima, S.Ogawa și T.Yonezawa, *Biochem., Biophys., Res. Commun.*, 83,724,(1978)
227. K.G.Melinder, *Em.J., Biochem.*, 56,483 (1979)
228. G.Rakshit și G.T.Spiro, *Biochemistry*, 13,5317(1974)
229. T.C.Spiro și J.M.Burke, *J.Amer.Chem.Soc.*, 98,5482 (1976)
230. H.B.Dunford și J.S.Stillman, *Jord.Chem.Rev.*, 19,187 (1976)
231. T.Ionetani, in "The Enzymes", vol.XIII, p.345, Academic Press, New York, 1976
232. I.Morishima și S.Ogawa, *Biochem., Biophys. Res. Commun.*, 83,946,(1978)
233. I.Morishima și S.Ogawa, *J.Amer.Chem.Soc.*, 100,7125 (1978)
234. I.Morishima și S.Ogawa, *Biochemistry*, 17,4384,(1978)
235. C.K.Chang, și M.S.Kuo, *J.Amer.Chem.Soc.*, 101,3413,(1979)
236. C.R.Castro, *Pharmac. Ther.*, 10,171,(1980)
237. I.Aviram, *Biochem. Biophys.*, 212,2,483,(1981)
238. B.Chance, *Arch. Biochem. Biophys.*, 41,416,(1952)
239. H.B.Dunford și M.L.Cotton, *J. Biol. Chem.*, 250,2920 (1975)
240. H.B.Dunford, in "The Biological Chemistry of Iron", Reidel Publishing Comp., p.337-355, 1982
241. T.Sawahata și R.A.Neal, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 109, 3,988,(1982)
242. D.Dolman, G.A.Hewell, M.D.Thurlo w și H.B.Dunford, *J. Biochem.*, 53,495,(1975)
243. D.J.Manner, P.J.Brignac, D.Arceneaux și V.Patel, *Arch. Biochem. Biophys.*, 156,759,(1973)
244. B.S.Saunders, A.G.Holmes-Siedle și B.P.Stark "Peroxidase" London, Butterworth, 1964
245. U.Kirso, L.Belykh și D.Stom, *Acta hydrochem. hydrobiol.*, 9,4,427,(1981)
246. S.Aibara, T.Kobayashi și T.Morita, *J. Biochem.*, 90,489,(1981)
247. R.Baruffaldi, A.J.Colombo, B.C.Almeida, T.C.Vessoni și M.Vitolo *Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo*, 16(1/2), 03(1980)

248. Y. Hayashi & I. Yamazaki, *Arch. Biochem. Biophys.*, 190, 2, 446, (1978)
249. I. Yamazaki, Y. Hayashi, R. Makino & H. Yamada, in "Iron and copper Proteins", (1976), p. 362-388
250. Von M. Gellert, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 17, 1, (1979)
251. P. D. Josephy, T. B. Eling & R. P. Mason, *Molec. Pharm.*, 23, 461, (1983)
252. H. Yamada & I. Yamazaki, *Arch. Biochem. Biophys.*, 165, 728, (1974)
253. R. P. Mason, in "Free Radicals in Biology", vol. V, Academic Press, New York, 1982, p. 161-218
254. K. Teraoka, T. Oyura & T. Kitagawa, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 187251 (1982)
255. M. Daxen & E. C. Webb, "Enzymes", 3rd. Ed., Academic Press, New York, 1979
256. W. C. Schumb, C. N. Satterfield & R. L. Wentworth, "Hydrogen Peroxide" Reinhold Publishing Cos, New York, 1955, p. 553-557
257. G. Galliani, B. Rindone & A. Marchesini, *J. C. S. Perkin I*, 456 (1977)
258. I. Yamazaki, K. Yokota & R. Nakajima, "Oxidases and Related Redox Systems", vol. I, New York, 1965, p. 485
259. I. Yamazaki & L. H. Piette, *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 47, (1963)
260. C. A. Auden & J. R. Lindsay-Smith, *J. Chem. Soc. (B)*, 1741 (1971)
261. I. Yamazaki, H. Mason & L. H. Piette, *J. Biol. Chem.*, 235, 2444 (1960)
262. I. Yamazaki, H. Mason & L. H. Piette, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1, 336 (1959)
263. B. Halliwell & S. Ahluwalia, *Biochim. Acta*, 153, 513 (1976)
264. T. Yonetani & H. Yamamoto, *Oxidases and Related Redox Systems*, University Park Press, Baltimore, p. 279-298 (1973)
265. G. R. Schonbaum, K. G. Melinder & L. B. Smillie, *Probes of Structure and Function of Macromolecules and Membranes.* (B. Chance, T. Yonetani, A. Mildvan eds.), Academic Press, New York, vol. II, p. 533, (1971)
266. S. Vuk-Pavlovic & Y. Siderer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79, 885 (1977)
267. S. Vuk-Pavlovic & B. Benko, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 66, 1154 (1975)
268. R. H. Felton, A. Y. Romans, N. T. Yu & G. R. Schonbaum, *Biochem. Biophys. Acta*, 434, 82, (1976)
269. L. D. Spaulding, C. C. Chang, N. T. Yu & R. H. Felton, *J. Amer. Chem. Soc.*, 97, 2517, (1975)
270. R. Makino & I. Yamazaki - *Arch. Biochem. Biophys.*, 157, 356 (1973)
271. H. Yamada, R. Makino & I. Yamazaki, *Arch. Biochem. Biophys.*, 169, 344, (1975)
272. B. Chance & J. Cell, *Comp. Physiol.*, 22, 33, (1943)

273. B.Chance, Arch.Biochem.Biophys., 40, 153, (1952)
274. N.B.Millis și H.B.Dunford, Biochemistry, 7, 2054, (1968)
275. M.Morrison și G.R.Schonbaum, Ann.Rev.Biochem, 45, 861, (1976)
276. A.M.Klibanov, Z.Bekman și B.N.Alberti, J.Am.Chem.Soc.,
103, 6263 (1981)
277. M.Singh și M.Thomas, Biotechn.Letters, 7, 9, 663, (1985)
278. R.Z.Kazandyian și A.M.Klibanov, J.Am.Chem.Soc., 107, 5448 (1985)
279. J.E.Brunet, A.Gonzales și C.. Sotomayer, Photochem.Photobiol.
38, 2, 253, (1983)
280. L.M.Bordeleau și R.Bartha, Can.J.Microbiol., 18, 1873, (1972)
281. J.B.Letter și E.Grunwald, "Rates and Equilibria of Organic
Reactions", J.Wiley and Sons, New York, 1963,
p.172-254
282. E.Emerson, J.Appl.Chem., 6, 525, (1943)
283. L.N.Piette, I.Yamazaki și H.S.Mason, in "Free Radicals in
Biological Systems", Academic Press, New York,
1961, p.195
284. I.Yamazaki, Y.Hayashi, S.Kimura, T.Araiso, H.Yamada și
R.Makino, in "Oxidases and Related Redox Systems"
Proc.Int.Symp.T.E.King Ed., Pergamon Press,
1982, p.703
285. E.Kimmel, R.Groșșianu și E.Cotoșman, Ghid de laborator,
Litografia IPT, 1978
286. A.M.Klibanov și L.D.Morris, Enzyme.Microb.Technol., 3, 119 (1981)
287. J.Putter, Methods of Enzymatic Analysis, vol.2, Academic Press,
New York, 1971, p.685
288. C.Walsh, Enzymatic Reactions Mechanisms, Freeman, San Francisco,
1979, cap.15
289. E.M.Kosower, "An Introduction to Physical Organic Chemistry",
J.Wiley, New York, 1968, p.69
290. x x x Manualul Inginerului Chimist, Ed.Tehnică București,
vol.2, 1973
291. C.Liteanu, Chimie Analitică Cantitativă. Volumetrie ed.a 6-a,
Ed.did.și ped. București, 1972, p.414
292. Y.Hayashi și I.Yamazaki, J.Biol.Chem., 254, 18, 9101, (1979)
293. K.Pruitt și J.Tenovuo, Biochim.Biophys.Acta, 704, 204, (1982)
294. B.F.Griffin, D.K.Davis și G.V.Bruno, Bioorg.Chem., 10, 342 (1981)
295. A.M.Klibanov, Tsu-Man Tu și K.P.Scott, Science, 221, p.259 (1983)

296. V.Cocheci, C.Boeriu, D.Oana și R.Bacaloglu, Simp."Probleme actuale ale protecției, tratării și epurării apelor în RSR", Timișoara, 1984, V, p.5
297. C.Boeriu, J.S.Dardick și A.M.Klibanov, Bio/Technology, 4, 997(1986)
298. V.Cocheci și C.Boeriu, Rev.Chimie, 39, 2, 175 (1988)
299. V.Cocheci și C.Boeriu, Rev.Chimie, 39, 6, 531 (1988)
300. V.Cocheci și C.Boeriu, C.Csunderlik, D.Domuta, O.Ivancius, al III-lea Congres Național de Chimie, București, 1988, vol.III de rezumate, p.804
301. V.Cocheci și C.Boeriu, Rev.Chimie, sub tipar
302. V.Cocheci și C.Boeriu, al III-lea Congres Național de Chimie, București, 1988, vol.III de rezumate, p.946
303. V.Cocheci, C.Boeriu și R.Bacaloglu, Simpozionul ICECHIM București, 1986
304. x x x "La Revue des Produits Chimiques", 4, p.3 (1937)
305. P.Seimu și N.Vâlceanu, Simp."Probleme actuale ale protecției, tratării și epurării apelor în RSR", Timișoara, 1984, vol.1, p.39
306. C.Boeriu, Simpozionul ICECHIM , București, 1987
307. V.Cocheci și A.Martin, Bazele Tehnologiei Chimice, vol.II (anexă), Litografia I.P.T., Timișoara, 1984