Faza 2

Obiectivele fazei de executie

Prezenta etapa este destinata realizarii unor studii si analize ale biodegradabilitatii compusilor fenolici prin determinarea interactiei diversilor fenoli di-, tri- si tetra-hidroxilici, mono sau polihalogenati ca si substrat pentru *Pelobacter acidogallici*.

Conform Planului de realizare sunt prevazute obiectivele:

- Identificare structuri de degradare
- Caracterizarea interactiei fenol-microorganisme
- Determinarea influentei amestecurilor fenolice asupra microorganismelor testate

III. Rezumat

In cadrul prezentei etape s-au realizat studii si analize ale biodegradabilitatii compusilor fenolici prin determinarea interactiei diversilor fenoli di-, tri- si tetra-hidroxilici, mono sau polihalogenati ca si substrat pentru *Pelobacter acidogallici*; s-au identificat structurile de degradare ale fenolilor, s-a caracterizat interactia complexa fenol-microroganisme si s-a determinat influenta amestecurilor fenolice asupra microorga-nismelor testate.

Pentru investigarea produsilor de degradare intermediara si finala a diversilor fenoli s-au incubat pe rand toti ►di- si ►trihidroxibenzenii existenti si ►clorocatecolul la 25 ºC cu o suspensie celulara de *Pelobacter acidigallici.* Pentru certitudinea atribuirii structurale aferente spectrelor de masa inregistrata s-au parcurs urmatoarele etape: ►sinteza compusilor necomerciali de tip polihidroxi(cloro)fenolice cu rol de *substrat (poluant)* sau *intermediar de degradare* celulara; ►izolarea enzimelor cheie in biodegradarea fenolilor, si ►stabilirea interactiunii enzime-fenoli. S-a efectuat sinteza hexa-hidrodifenil eterilor Hexa-hidroxidifenil eterii au fost caracterizati pentru prima data prin metode spectroscopice (^{1}H- si ^{13}C-RMN si spectrometrie de masa). S-au sintetizat 3,4,5-trimetoxibromobenzenul (2) si 2,4,6-trimetoxifenol (3). S-a preparat hexa-metoxidifenil eterii 4 si 5 (randament 41% respectiv 48%) si 1,2,3,5-tetra-hidroxibenzenul (1) (randament 52%) si hexahidroxidifenil eterii 6 si 7 (randament 58%, respectiv 78%).

In vederea efectuarii masuratorilor cinetice pentru reactiile individuale cu enzime izolate respectiv, cu microorganisme a fost necesara stabilirea conditiilor analitice pentru separarea acestora si a metabolitilor (**structurilor de degradare**) presupusi. Deoarece nu exista nici o diferenta masurabila in absorptia UV a fenolilor in cauza, s-a dezvoltat o metoda de identificare a compusilor si masurare a activitatii enzimatice bazata pe analize la HPLC.

S-a investigat actiunea enzimelor cheie din *Pelobacter acidigallici* asupra polihidroxi benzenilor si asupra clorocatecolului. **Pirogalol-floroglucinol transhidroxilaza (TH)** din *Pelobacter acidigallici* este una din enzimele cheie in procesul de degradare anaeroba a compusilor aromatici hidroxilati, cum ar fi acidul galic si a diferitilor fenoli. Toti acesti compusi sunt transformati in floroglucinol, care la randul

sau este redus si degradat la trei molecule de acetil-CoA *via* 3-hidroxi-5-oxohexanoatului. Aceasta cale duce nu numai la sintoni importanti, dar poate fi folosita si la sinteza de ATP. S-au propus 2 mecanisme ale reactiei catalizate de TH.

S-au efectuat experimente enzimatice conduse in conditii anaerobe. In urma experimenetlor realizate s-au propus ►scheme de transfromare a compusilor di- si trihidroxibenzenici mediata de transhidroxilaza si fenol hidroxilaza ►scheme de biodegradare a clorocatecolului in celule *Pelobacter acidogallici.* S-au efectuat si experimente cu culturi celulare dat fiind faptul ca transformarea altor tipuri de fenol necesita alte tipuri de enzime care nu au putut fi separate sau sunt necesare actiune succesiva si/sau concomitetnta a mai multor enzime, care nu pot fi utilizate *in vitro*. Rezultatele obtinute au permis identificarea si caluclul activitatii specife de transformare a fenolilor folosind diferite solutii ca substrat. Folsind metoda de linearizare Lineweaver-Burke s-a calculat si viteza maxima de transformare pentru fiecare compus in parte si constanta Michaelis K_M; raportat la viteza maxima de transformare a substratului natural al bacteriei, acidul galic.

S-a investigat influenta diferitilor fenoli asupra biodegradarii acidului galic, substratul natural al *Pelobacter acidigallici.*

Analizand rezultatele obtinute se poate afirma ca fiecare transformare in parte inhiba usor, K_i fiind in domeniul μM. Viteza maxima de transformare si K_M nu sunt influentate de prezenta fenolilor in mediu

S-a investigat transformarea amestecului complex de fenoli de catre cultura celulara Folosind cromatogramele de referinta pentru determinarile cantitative, prin injectarea solutiei concentrata de 1000 de ori s-a reusit stabilirea concentratiei recalculate la volumul initial de ordinul 0.1-0.15 μM al fenolilor reziduali.

Bazandu-ne pe spectrele de masa inregistrate pentru fiecare compus rezidual separat prin HPLC-MS nu au fost detectati alti compusi metabolici cu continut de clor in afara ionilor de Cl^-.