

Mono-nitrotolueenien muuntuminen

Pro gradu -tutkielma
Jyväskylän yliopisto
Kemian laitos
Orgaanisen kemian osasto
3.7.2008
Eerik Järvinen

TIIVISTELMÄ

Nitrotolueenit ovat vierasbiootteja, jotka hajoavat luonnossa hitaasti. Tässä tutkielmassa tarkastellaan pääasiassa mono-nitrotolueenien muuntumista bioottisten ja abioottisten prosessien seurauksena sekä muodostuvia tuotteita. Mikrobiologiset prosessit pystyvät muuttamaan ja osin hajottamaan nitrotolueeneja, mutta usein täydellinen mineralisointi jää saavuttamatta yksittäisen kannan vaikutuksesta. Ongelmaksi voi muodostua tällöin lopputuotteiden korkeampi toksisuus verrattuna lähtöyhdisteisiin. Tämä on ongelma käytettäessä mikrobiologisia prosesseja luonnonympäristöjen ja luontoon päätyvien ainevirtojen käsittelyssä. Useiden mikrobien yhdistelmät tarjoavat kuitenkin mahdollisuuden täydelliseen mineralisaatioon, joskin näistä on suhteellisen vähän julkaisuja tarjolla.

Yhdistelmämenetelmillä esim. fotokatalyyttinen hapetus, sonolyysi yhdistettynä käsitte-
lyyn Fentonin reagenssilla, otsonilla, titaanidioksidilla tai vetyperoksidilla on mahdollista mineralisoida nitrotolueenit. Näissä heikkoutena on energian ja reagenssien tarve.

ESIPUHE

Kiinnostukseni nitrotolueenien muuntumiseen on käytännönläheinen, sillä työskentelin tolueenilla ja 2-nitrotolueenilla pilaantuneen maa-alueen kunnostamisen tutkimus- ja kehityshankkeessa vuosina 2004 - 2007. Hankkeessa tolueenilla ja 2-nitrotolueenilla pilaantunutta pohjavettä ja maaperää kunnostettiin ensiksi aktiivisin menetelmin ja tämän jälkeen monitoroitua luontaista puhdistumista (MLP) hyödyntäen. MLP-menetelmässä haitta-aineet hajoavat maaperässä tai pohjavedessä luontaisten prosessien, pääosin mikrobien, vaikutuksesta. Hankkeen aikana tehtiin mm. 2-nitrotolueenin biohajoamiseen liittyviä laboratoriokokeita, joilla varmistettiin edellytykset luontaisen biohajoamisen onnistumiselle.

Tämä kirjallisuustutkimus on kirjoitettu Vesivehmailla 25.5. - 2.7.2008. Lähdekirjallisuus on haettu etäyhteyksien avulla useista tietokannoista, kuten ScienceDirect, Chemical Abstract Service ja Jyväskylän yliopiston kirjasto.

Haluan kiittää tämän työn tarkistajia Katri Laihiaa ja Erkki Kolehmaista. Kiitokseni osoitan myös perheelleni, ystäville, sukulaisille ja työtovereille sekä erityisesti Tuijalle.

SISÄLLYSLUETTELO

TIIVISTELMÄ	i
ESIPUHE	ii
SISÄLLYSLUETTELO.....	iii
LYHENTEET	iv
1. JOHDANTO	1
2. MONO-NITROTOLUEENIEN OMINAISUUDET	1
2.1. Aromaattisen nitroryhmän ominaisuuksia	3
2.2. Monoaromaattisten yhdisteiden muuntumisen yleispiirteitä	4
2.3. Nitroyhdisteiden oksigenaasi	7
3. MONONITROTOLUEENIEN BIOMUUNTUMINEN.....	7
3.1. Muuntumisreitit.....	7
4. ABIOOTTISET MUUNTUMISREITIT	18
4.1. Otsonointi ja sonolyysi.....	18
4.2. Fotokatalyyttinen hajottaminen TiO ₂ :lla vesiliuoksessa.....	22
4.3. Hajotus nanomittakaavan Fe ⁰ pelkistyksellä.....	30
4.4. Fenton-hapetus	31
5. YHTEENVETO	34

LYHENTEET

MLP	monitoroitu luontainen puhdistuminen (engl. MNA)
TDO	toluene dioxygenase
TDD	toluene dehydrogenase
HPLC	high performance liquid chromatography
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
BTEX	benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes
TOC	total organic carbon, orgaaninen kokonaishiili
PTFE	polytetrafluorieteeni
NMR	nuclear magnetic resonance

1. JOHDANTO

Pitkään jatkuneen teollisen toiminnan rinnalla kulkee aina riski lähtöyhdisteiden, prosessin sivutuotteiden, lopputuotteen tai sen hajoamistuotteiden päätyemisestä ympäristöön. Suuri osa orgaanisista yhdisteistä on luonnossa hajoavia joko abioottisten tai biologisten prosessien seurauksena, mutta osa yhdisteistä on pysyviä tai suhteellisen pysyviä. Tällaiset yhdisteet ovat pääsääntöisesti ihmisen tuottamia joko tahallisesti tai sattumalta. Luonnossa hajoamattomien yhdisteiden määrä on lisääntynyt kasvaneen kemiantekniikan ja -teollisuuden seurauksena. Eräs syy tähän on, että yleisesti esiintyvät mikrobit eivät kykene käyttämään joitakin luonnossa normaalisti esiintymättömiä yhdisteitä ravintonaan niiden poikkeuksellisten kemiallisten ominaisuuksien johdosta.

Orgaanisten yhdisteiden hajoamisella ja hajoamisen lopputuotteilla on merkitystä paitsi pilaantuneen maaperän tai pohjaveden aiheuttaman riskin arvioinnissa, myös jätevesien käsittelylaitoksilla sekä puhdistettuja jätevesiä vastaanottavissa vesistöissä. Useiden orgaanisten vierasbioottisten yhdisteiden ongelmaksi on osoittautumassa niiden taipumus läpäistä esimerkiksi normaalille yhdyskunta- tai teollisuusjätevedelle suunnitellut puhdistusprosessit. Tällaisia yhdisteitä ovat mm. jätevesissä olevat mm. hormonit, klooratut yhdisteet ja nitrotolueenit. Vaikka näiden yksikköpäästö saattaa olla suhteellisen vähäinen, niiden vaikutus ja kertyminen voivat aiheuttaa merkittäviä muutoksia ekosysteemissä pitkällä aikavälillä.

Tässä tutkielmassa tarkastellaan etupäässä mono-nitrotolueeneja.

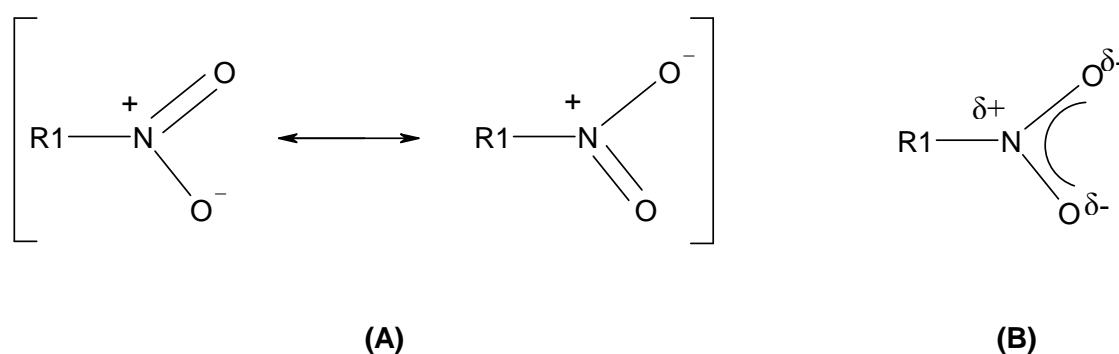
2. MONO-NITROTOLUEENIEN OMINAISUUDET

2- ja 3-Nitrotolueenia käytetään lähtöyhdisteinä maatalous- ja kumikemikaalien, atso- ja rikkiväriaineiden sekä villan, puuvillan, silkin, nahkan ja paperin väriaineiden sekä räjähdysaineiden valmistuksessa.¹ 2-Nitrotolueenia on Suomessa käytetty 2,4,6-trinitrotolueenin valmistuksessa lähtöaineena.² Nitrotolueeneja on löydetty myös paperi- ja kemiantehtaiden jätevesistä.³

Kuitenkin 2-nitrotolueenin pelkistymisessä muodostuvalle 2-metyylianiiliinille altistuneiden työntekijöiden keskuudessa on havaittu syövän lisääntymistä⁵ ja altistumista sille pidetään riskinä terveydelle.⁶ Toisaalta 2-nitrotolueenin aiheuttamaa terveydellistä riskiä ihmisille kulutushyödykkeiden tai ympäristön kautta pidetään vähäisenä.⁶ Tutkimuksissa 3- ja 4-nitrotolueenien toksisuuden on osoitettu olevan 2-nitrotolueenia vähäisempää.^{1,5}

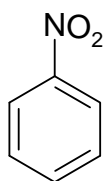
2.1. Aromaattisen nitroryhmän ominaisuuksia

Aromaattisten yhdisteiden muuntuminen ja erityisesti biologinen hajoaminen riippuu merkittävästi renkaaseen kiinnittyneistä substituenteista. Nitroryhmä poikkeaa kemiallisilta ominaisuuksiltaan useista muista orgaaniseen yhdisteeseen liittyneistä substituenteista. Typen elektronegatiivisuus on 3,0 ja siihen liittyneiden happiatomien 3,5 Paulingin asteikolla. Typpi on elektropositiivisempi kuin hapet, mikä johtaa induktiivisen vaikutuksen seurauksena typen muodolliseen positiiviseen varaukseen. Tämän lisäksi nitroryhmällä on resonanssirakenne (kuva 2)



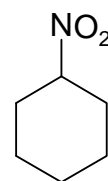
Kuva 2. Nitroryhmän resonanssirakenne

Yleisesti resonanssi stabiloi yhdistettä, jolloin sen (kuva 2, B-rakenne) energia on pienempi kuin yksittäisen resonanssirakenteen (kuva 2, A-rakenteet). Energiaero on suhteellisen pieni suurimmassa osassa tapauksia, mutta esimerkiksi bentseeni on 150 kJ stabiilimpi kuin 1,3,5-sykloheksatrieni. Aromaattiseen renkaaseen liittynyt nitroryhmä on konjugoitunut bentseenin π -elektronien kanssa ja sillä on merkittävä vaikutus yhdisteen sisäiseen energiaan ja stabiilisuuteen. Tämä näkyy esimerkiksi verrattaessa nitrosykloheksaanin ja nitrobentseenin muodostumisentalpioita (kuva 3).



nitrobentseeni

$$\Delta_f H^0 (\text{g}, 298,15 \text{ K}) = 67,5 \text{ kJmol}^{-1}$$



nitrosykloheksaani

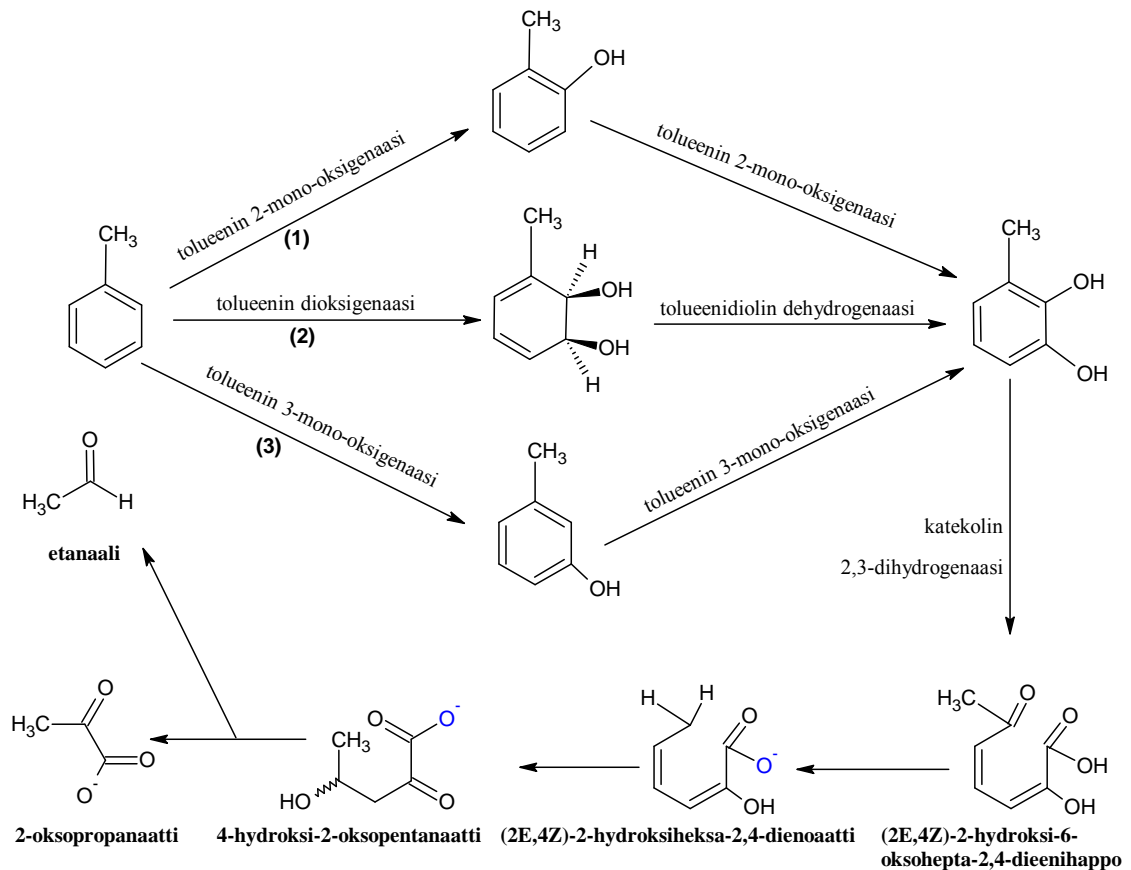
$$\Delta_f H^0 (\text{g}, 298,15 \text{ K}) = - 159,3 \text{ kJmol}^{-1}$$

Kuva 3. Nitrobentseenin ja nitrosykloheksaanin muodostumisentalpiat⁷

Edellä esitetystä resonanssienergiasta johtuen nitrobentseeni $226,8 \text{ kJmol}^{-1}$ stabiilimpi kuin nitrosykloheksaani.

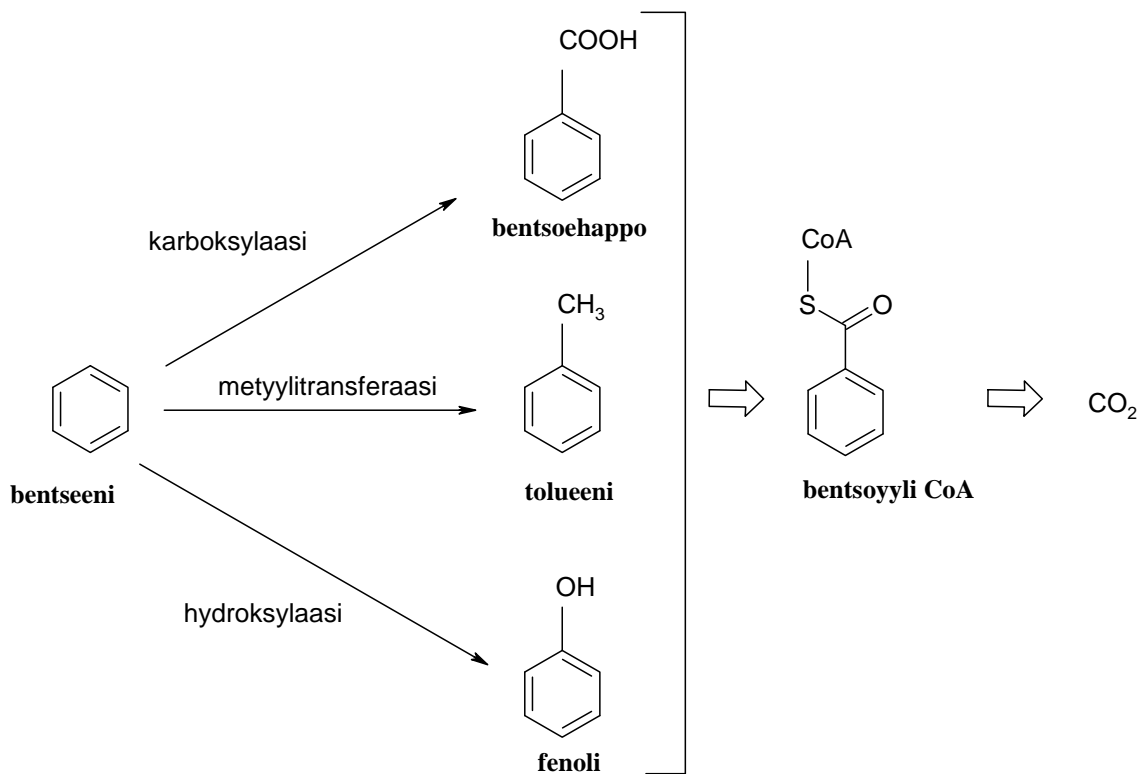
2.2. Monoaromaattisten yhdisteiden muuntumisen yleispiirteitä

Tutkimuksissa bentseenin, toluenin, etyylibentseenin ja ksyleenien on osoitettu muuttuvan aerobisissa olosuhteissa vähintään yhden reaktiomekanismin kautta vastaavaksi substituoiduiksi katekoliksi.⁸ Esimerkiksi bentseeni muuntuu katekoliksi, tolueni 3-metyylikatekoliksi (kts. kuva 4) ja etyylibentseeni 3-etyylikatekoliksi. Ksyleenit muuttuvat monometyloiduiksi katekoleiksi. Useiden mikrobikantojen yhteisvaikutuksesta hajoaminen jatkuu useissa tapauksissa katekoleista edelleen täydelliseen mineralisaatioon.⁸



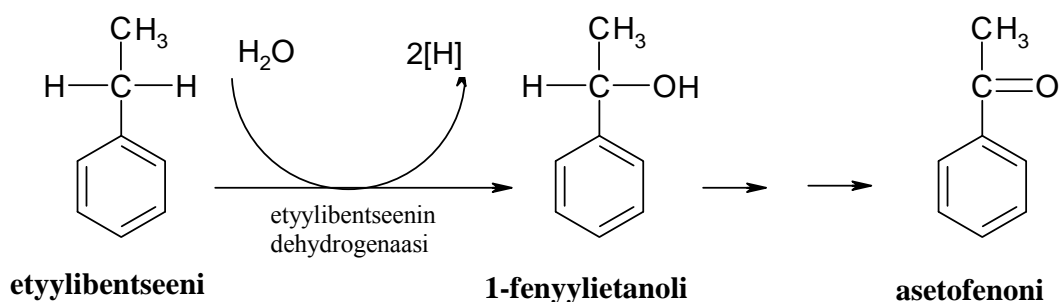
Kuva 4. Tolueenin oksigenaasireaktioita ja renkaan aukeaminen (1) *Pseudomonas mendocina* PWWo tai pTOL (2) *Pseudomonas putida* (3) *Pseudomonas pickettii* kantojen vaikutuksesta⁹

Bentseenin, tolueenin, etyylibentseenin ja ksyleenien tiedetään hajoavan anaerobisissa olosuhteissa,¹⁰ joskin tieto täsmällisistä reaktiomekanismeista esim. bentseenin hajoamisen suhteen on puutteellista.¹¹ Hajoamiseen liittyvät kuitenkin välituotteina tolueeni, fenoli ja bentsoehappo (kuva 5).



Kuva 5. Bentseenin anaerobiselle biohajoamiselle esitettyjä alkureaktioita¹⁰

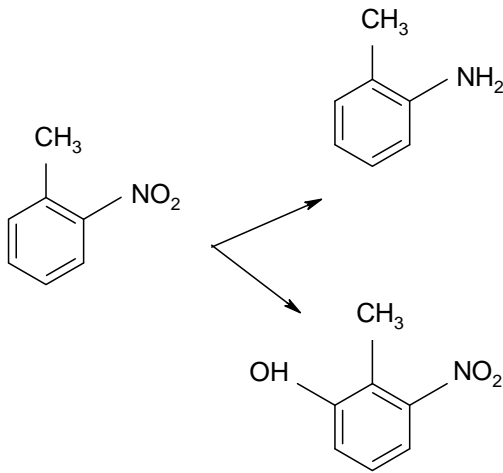
Etylibentseenin osalta tunnetaan vain kolme organismia, jotka voivat suorittaa hajottamisen anaerobisissa olosuhteissa. Nämä organismit ovat *Azoarcus sp.* kannat EbN1, PbN1 ja EB1 ja ne hapettavat etylibentseenin nitraattia sisältävissä olosuhteissa.¹² Nitraatin pelkistyessä etylibentseeni muodostaa 1-fenyylietanolia, mikä hapettuu edelleen muodostaen asetofenonia (kuva 6). Ensimmäisessä vaiheessa kiinnittyvä hydroksyyli-ryhmä on isotooppitutkimusten perusteella peräisin vedestä.¹⁰



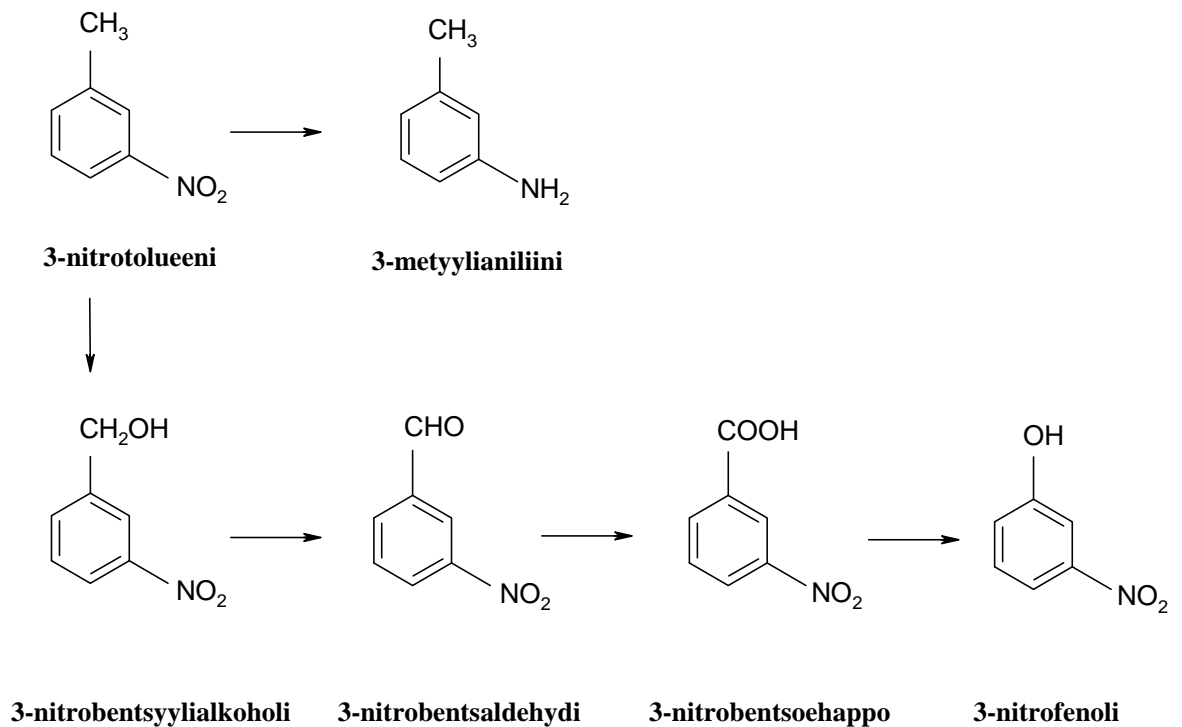
Kuva 6. Etylibentseenin biologinen, anaerobinen muuntuminen.

Tutkimuksissa on osoittautunut, että toluenille, etylibentseenille ja ksyleeneille hajoamisen ensimmäisenä vaiheena voi toimia fumaraatin liittyminen renkaassa kiinni

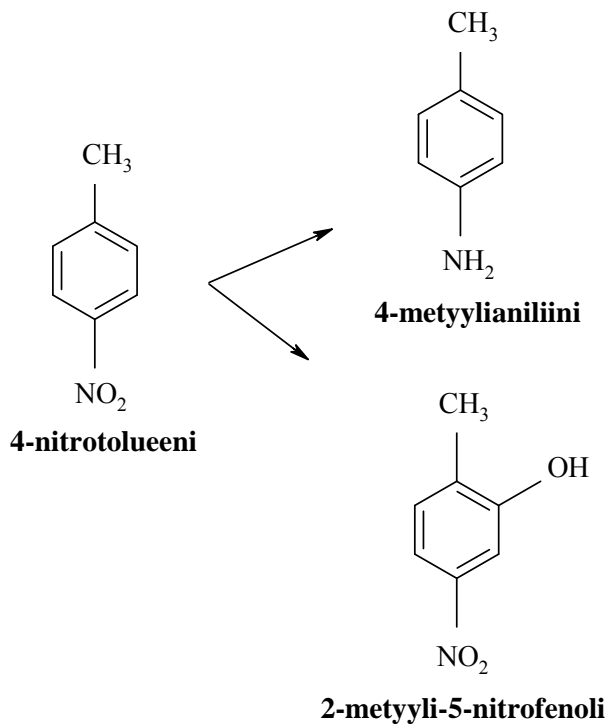
kantaa inkuboitii 30 °C lämpöisessä suolaliuoksessa (pH 7,5) yhdessä 2-, 3- ja 4-nitrotolueenien kanssa (c = 1 mg/l). Yhdisteet ja metaboliitit analysoitiin HPLC-, GC-MS- ja ¹H NMR-tekniikoita käyttäen. 25 h inkuboinnin jälkeen 2-, 3- ja 4-nitrotolueeneista oli muuntunut metaboliiteikseen 60 %, 75 % ja 50 %. Tämän perustella *P. putida* OU83 kannalla on suurin affiniteetti 3-nitrotolueeniin, mistä johtuen myös sen biomuuntuminen on 2- tai 4- nitrotolueenien muuntumista nopeampaa.



Kuva 8. 2-nitrotolueenin *P. putida* OU83 metaboliatuotteet¹⁷



Kuva 9. *P. putidan* aiheuttama 3-nitrotolueenin biomuuntuminen¹⁷



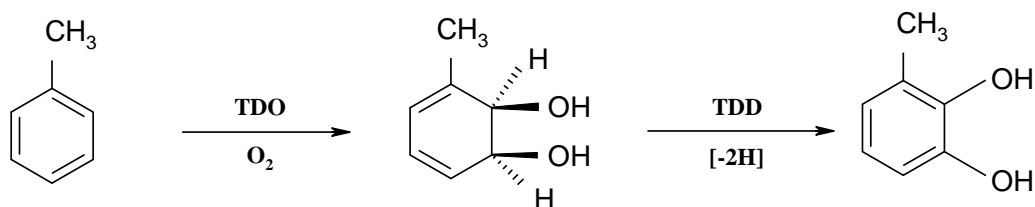
Kuva 10. *P. putida* OU83 vaikutuksesta syntyvät 4-nitrotolueenin muuntumistuotteet ¹⁷

Aiemmin suorittamissaan kokeissa Ali-Sadat *et al.* käyttivät *P. putida* OU83 kantaa 3-nitrotolueenin hajottamiseen. Näissä kokeissa 3-nitrotolueeni hapettui kuvan 9 mukaisesti 3-nitrofenoliksi, joka hajosi edelleen vapauttaen nitriliin.¹⁸

Mikäli kyseistä bakteerikantaa hyödynnetään nitrotolueenien biohajottamisessa, esim. mikrobiologisessa puhdistamossa tai MLP-tekniikkaa¹⁹ hyödyntävässä maaperän kunnostamisessa, voi ongelmaksi muodostua biologisen muuntumisen seurauksena muodostuvat aromaattiset amiinit, jotka ovat karsinogeenisiä.²⁰ Tästä johtuen aromaattisten aminoyhdisteiden muuntumisen ja hajoamisen tulisi jatkua edeten haitattomampiin yhdisteisiin.

Robertson *et al.* ovat tutkineet nitrotolueenien hajoamista *Pseudomonas putida* F1 ja *Pseudomonas sp.* JS150 kantojen vaikutuksesta.¹⁵ Kokeissa osoittautui, että kannat joita oli kasvatettu tolueenia sisältävässä liuoksessa, kykenivät hapettamaan nitrotolueeneja. Glukoosissa kasvatetut vertailukannat eivät katalysoineet 2-, 3- tai 4-nitrotolueenien hapettumista.

Tolueenin hajoamisen alkureaktio JS150 ja *P. putida* F1 kannoilla katalysoituu tolueenidioksigenaasireaktion (TDO) avulla,²¹⁻²³ jolloin muodostuu (1S,2R)-3-metyylisykloheksa-3,5-dieeni-1,2-diolia. Tätä seuraa tolueenidiolin dehydrogenaasi (TDD), joka johtaa 3-metyylivatekolon muodostumiseen (kuva 11).

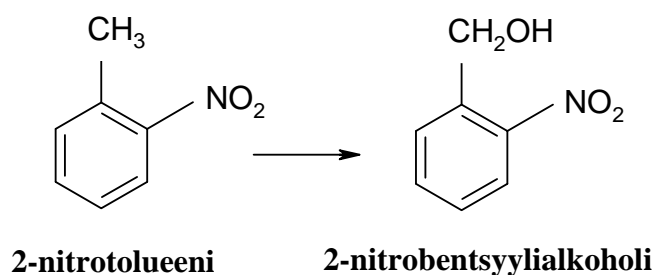


Tolueeni **(1S,2R)-3-metyylisykloheksa-3,5-dieeni-1,2-diol** **3-metyylivatekole**

Kuva 11. Tolueenin dioksigenaasireaktio ja tolueenidiolin dehydrogenaatio

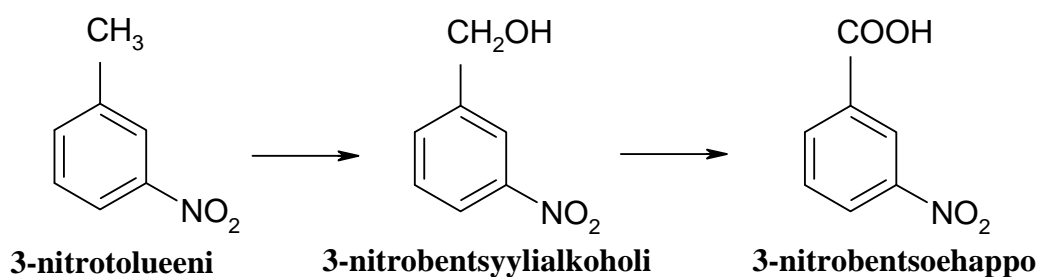
Yllä kuvatun reaktion perusteella Robertson *et al.*¹⁵ odottivat 2-, 3- ja 4-nitrotolueenien hapettumisen tapahtuvan tolueenin dioksigenaasin kautta. Kuitenkin yllä esitettyjen tulosten perusteella 2- ja 3-nitrotolueenien päähapettumistuotteet olivat vastaavat nitrobentsyylialkoholit ja vain 4-nitrotolueeni hapettui vastaavaksi katekoliksi. Vastaavasti tapahtui käytettäessä tolueenidioksigenaasigeenin sisältävää *E. coli* JM109(pDTG601) kantaa. Tulosten perusteella tolueenidioksigenaasientsyymien reaktio riippuu aromaattisen renkaan substitueista ja niiden sijainnista renkaassa. Edellä esitettyä tolueenidioksigenaasin välituotetta (1S,2R)-3-metyylisykloheksa-3,5-dieeni-1,2-diolia onkin käytetty menestyksekkäästi lähtöyhdisteenä entsyymikatalyysissä synteesissä (1S,2R)-4-metyylisykloheksa-3,5-dieeni-1,2-diolin ja (1R,2S)-1-metyylisykloheksa-3,5-dieeni-1,2-diolin valmistamiseen.²⁴ Boyd *et al.* ovat myös esittäneet synteesireitit näitä vastaavien enantiomeerien valmistamiseen.²⁴

Robertsonin ryhmän kokeissa 2-nitrotolueenin hapettuminen tapahtui lähes stoikiometrisesti 2-nitrobentsyylialkoholiksi (kuva 12). Käytettäessä ¹⁸O₂ isotooppia osoittautui, että 2-nitrobentsyylialkoholi muodostuu molekulaarisesta hapestä monooksigenaasireaktion kautta. JS150 kanta tuotti lisäksi sivumetaboliittia, jonka massaspektrin hajoamistuotteet vastasivat 3-metyyli-6-nitrokatekolia, joskin massaspektrin perusteella ei hydroksyyliyhdyntien sijaintia voitu määrittää, eikä sivumetaboliitin tarkempaa koostumusta selvitetty.



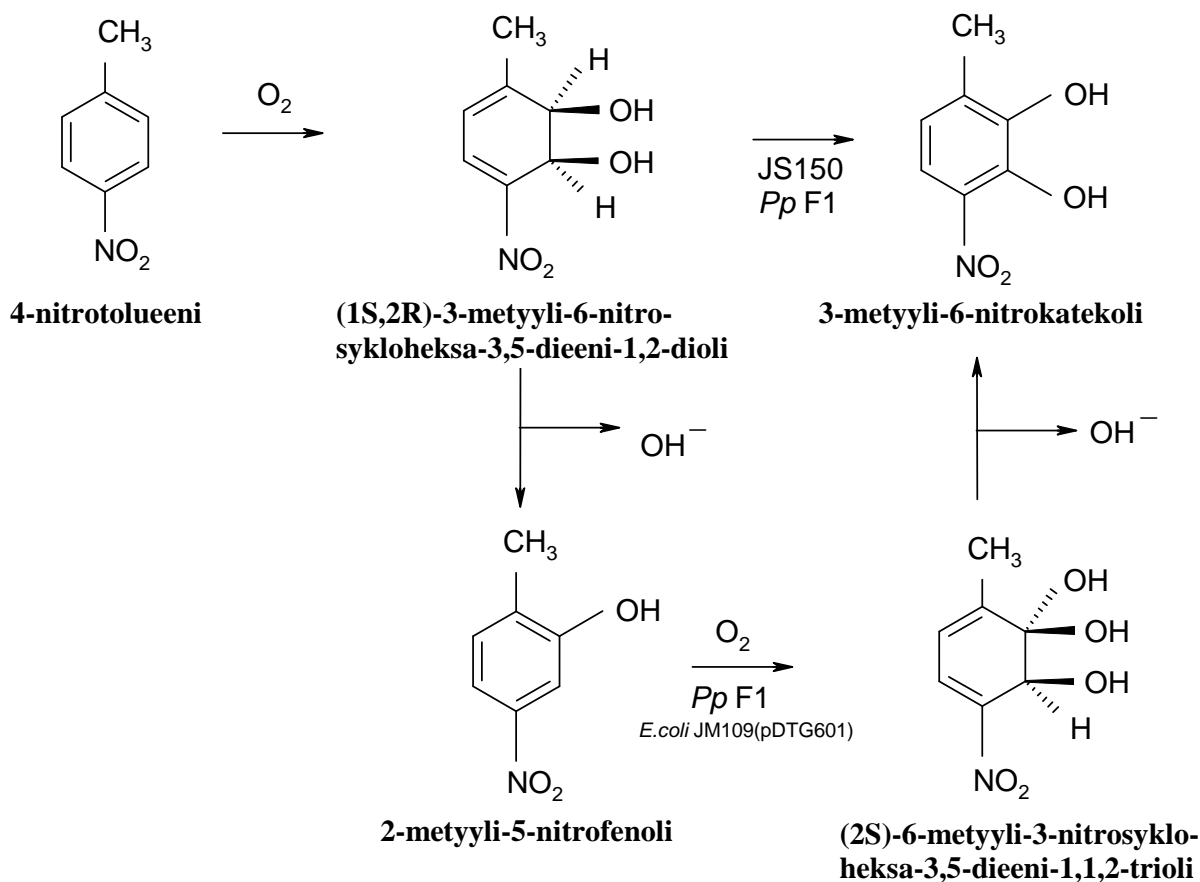
Kuva 12. 2-nitrotolueenin mono-oksigenaasi *P. putida* F1 ja JS150 kannoilla¹⁵

Tolueenissa kasvatettu JS150 kanta hapetti 3-nitrotolueenin 3-nitrobentsyylialkoholiksi ja 3-nitrobentsoehapoksi. Erillisessä kokeessa sama soluvalmiste hapetti 3-nitrobentsyylialkoholin 3-nitrobentsoehapoksi 24 tunnin aikana.¹⁵ Sitä vastoin *P. putida* F1 –kanta hapetti 3-nitrotolueenin 3-nitrobentsyylialkoholiksi, mutta 3-nitrobentsoehappoa ei havaittu.



Kuva 13. 3-nitrotolueenin hapettuminen JS 150 kannan vaikutuksesta.

Kokeessa, jossa Robertson *et al.* käyttivät JS150 tai *P. Putida* F1 –kantoja 4-nitrotolueenin hapettamiseen, muodostui kahta tuotetta: 2-metyyli-5-nitrofenolia sekä 3-metyyli-6-nitrokatekolia. Näistä ensimmäinen oli päätuote *P. putida* F1 –kannan toimiessa hapettajana, jälkimmäisen ollessa päätuote JS150 kannan toimiessa hapettajana. Tehtäessä koe ¹⁸O₂ –atmosfäärissä ilmeni että JS150 kannan hapettaminen perustuu mono-oksigenaasiin. Esitetty hapettumisreitti on esitetty kuvassa 14.



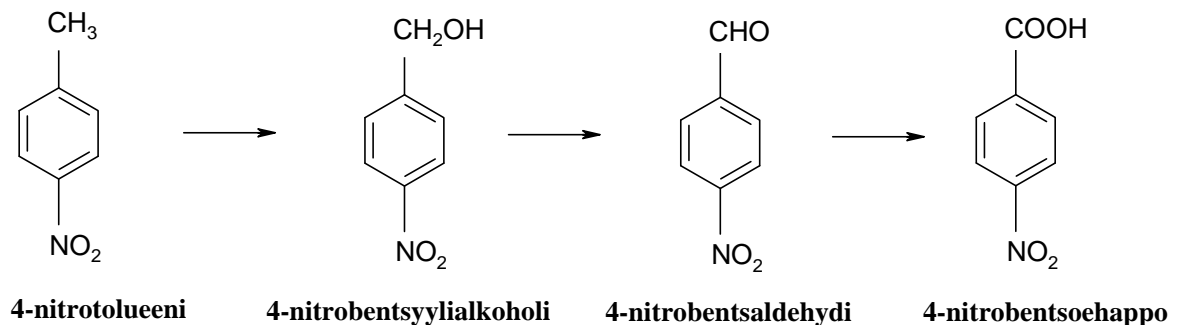
Kuva 14. Reaktiomekanismi 3-metyyli-6-katekolin muodostumiselle 4-nitrotolueenista¹⁵

Yllä kuvatussa reaktiomekanismissa on esitetty myös *E. Coli* JM109(pDTG601) kannalla havaittu hapettumisreitti. *E. Coli* JM109(pDTG601), jossa on saatuja tolueeni-dioksigenaasigeenejä (todC1C2BA) *P. Putida* F1 kannalta, hapetti kokeissa 2- ja 3-nitrotolueenit 2- ja 3-nitrobentsyylialkoholeiksi. Hapettuminen ei kuitenkaan edennyt nitrobentsoehapoksi saakka kuten 3-nitrotolueenin hapettumisessa JS 150 kannan vaikutuksesta. *E. Coli* JM109(pDTG601) hapetti 4-nitrobentseenin 2-metyyli-5-nitrofenoliksi ja 3-metyyli-6-nitrokatekoliksi. Käytettäessä kontrolliryhmänä *E. Coli* JM109(pKK223-3) kantaa, joka ei sisällä tolueenidioksigenaasigeenejä (todC1C2BA), 2-, 3- ja 4-nitrotolueenien hapettumistuotteita ei havaittu 6 tunnin inkuboinnin aikana.¹⁵

Soojahawon *et al.* suorittivat kokeita inkuboimalla aerobisissa olosuhteissa *Acinetobacteri junii* A8 kantaa liuksissa, joissa oli 2-nitroaniliinia, 2-nitrotolueenia, 3-nitrotolueenia, 2,4,6-trinitrotolueenia ja 2-nitrofenolia.²⁵ Inkubointi 36 tunnin aikana

johti merkittävään sytokromi P-450 proteiinien lisäykseen. 2-Nitrotolueenin osalta määrä lisääntyi kontrolliryhmään verrattuna 169 % ja 3-nitrotolueeniryhmään 178 %. Kokeessa 2-nitrotolueeni hapettui 2-nitrobentsoehapoksi kun taas 3-nitrotolueeni pelkistyi 3-metyylianiiliiniksi, samoin kuin aiemmin esitetystä Walia *et al.* kokeessa *Pseudomonas putida* OU83 bakteerikannan vaikutuksesta.¹⁷

Valkolahosienet (*basidomyskeetit*) ovat ainoita tunnettuja mikro-organismeja, jotka kykenevät täysin hajottamaan ligniiniin, joka on yksi vaikeimmin hajoavista biologisesti muodostuneista aromaattisista yhdisteistä maapallolla.²⁶ Teramoto *et al.* tutkivat nitrotolueenien hajoamista valkolahosieni, *Phanerochaete chrysosporium*-valkolahosienien, vaikutuksesta.²⁷ Ensimmäinen vaihe nitrotolueenien eri isomeereillä oli metyyliiryhmän hapettuminen, jolloin muodostui ko. isomeeriä vastaava nitrobentsyylialkoholi. 2- ja 3-Nitrotolueenin isomeerien hapettuminen pysähtyi nitrobentsyylialkoholi-vaiheeseen, kun taas 4-nitrotolueenin tapauksessa reaktio jatkui 4-nitrobentsyylialkoholista edelleen 4-nitrobentsaldehydiin, joka hapettui 4-nitrobentsoehapoksi.



Kuva 15. 4-Nitrotolueenin muuntuminen *Phanerochaete chrysosporium* vaikutuksesta

Kokeissaan Teramoto *et al.* havaitsivat 4-klooritolueenin muuntuvan 4-klooribentsyylialkoholiksi *P. chrysosporium* kannan vaikutuksesta. Aromaattiseen renkaaseen kiinnittyneet nitro- tai klooriryhmät vetävät elektroneja voimakkaasti puoleensa vähentäen renkaan elektronitiheyttä. Tolueenilla ei ole kyseistä rakennetta ja vastaavissa kokeissa ei havaittu muuttumista bentsyylialkoholiksi.²⁷ Myöskään 4-metoksitolueeni, jonka metoksiyryhmä on luonteeltaan elektroneja luovuttava ja vapaana ionina nukleofiili,¹⁶ ei hydroksyloitunut *P. chrysosporium* kannan vaikutuksesta. Tulokset viittaavat sytokromi P450:n katalysoimien hapetusreaktioiden riippuvan aromaattisen renkaan alentuneesta elektronitiheydestä.

Käytännön sovellusten kannalta ongelmallisia edellä kuvatuissa tuloksissa ovat muodostuvat lopputuotteet. Hapettumisessa renkaaseen jäävä nitroryhmä suojaa aromaattista rengasta oksigenaasilta jatkossa. Hapettuminen ei tästä johtuen etene kohti mineralisatiota hiilidioksidiksi ja vedeksi. Toisaalta nitroryhmän pelkistyessä aminoryhmäksi ja sen kyky delokalisoida elektroneja aromaattiseen renkaaseen muodostaa nukleofiilisen esteen pelkistymisen etenemiseksi anaerobisissa olosuhteissa. Tästä johtuen aromaattiset nitroyhdisteet ovat joko suhteellisen pysyviä ympäristössä tai muodostavat amiineja anaerobisissa olosuhteissa.²⁵

Taulukossa 2 on aromaattisten nitroyhdisteiden ja niiden muuntumistuotteiden toksisuutta kuvaava arvo suhteessa *T. pyriformis* kannan kasvun. Taulukossa esitetty IGC₅₀ – arvo on 50 % kasvua hidastava pitoisuus, joka perustuu kokeellisiin mittauksiin.²⁸ Taulukossa 2. pienempi luku kuvaa korkeampaa toksisuutta.

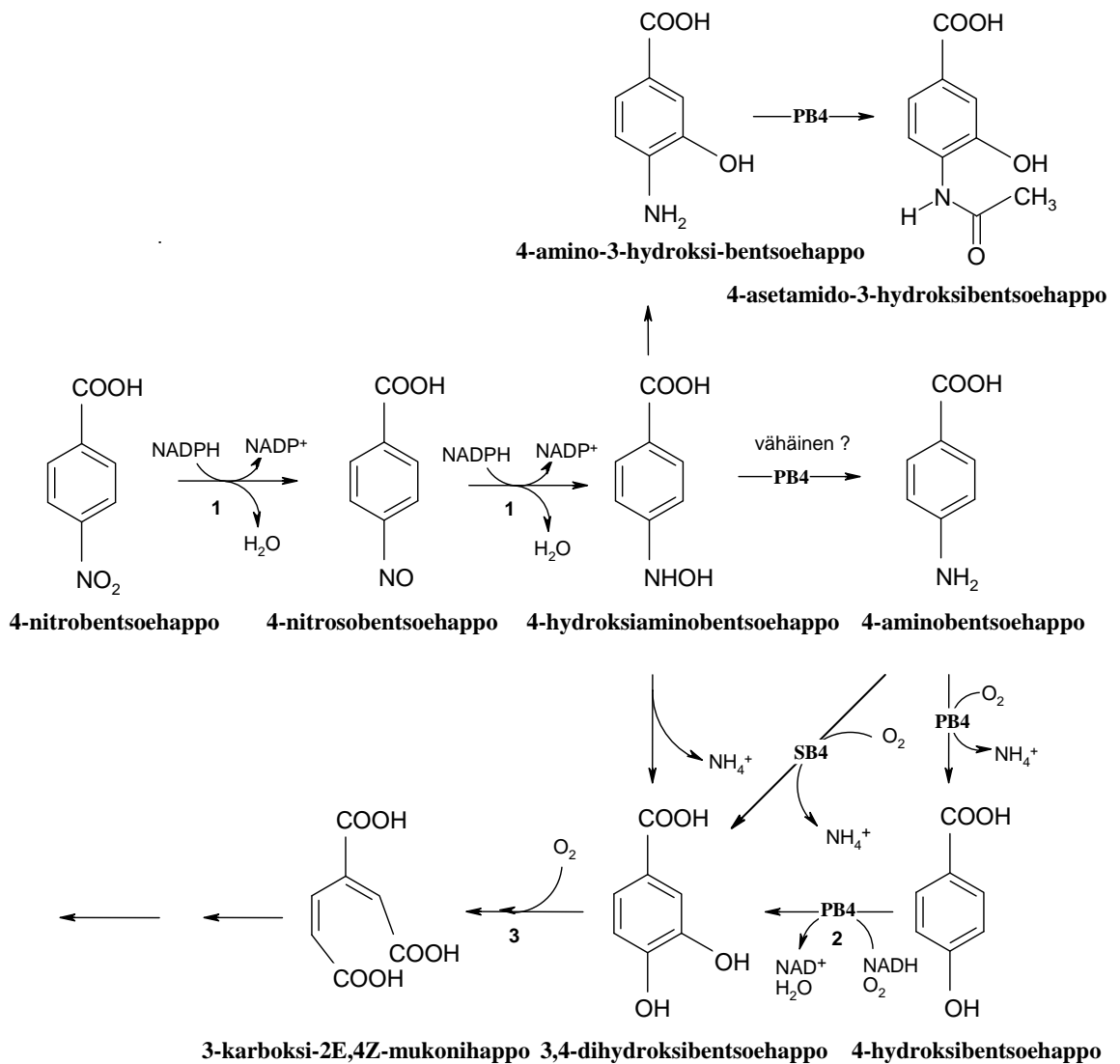
Taulukko 2. Aromaattisten nitroyhdisteiden sekä niiden hapettuneiden ja pelkistyneiden muotojen toksisuus²⁸

Yhdiste	Kokeellinen arvo log (IGC ₅₀) ⁻¹
2-nitrobentsoehappo	-1,64
3-nitrobentsoehappo	-1,09
4-nitrobentsoehappo	-0,86
2-nitrobentsyylialkoholi	-0,16
3-nitrobentsyylialkoholi	-0,22
4-nitrobentsyylialkoholi	0,10
2-nitrotolueeni	0,05
3-nitrotolueeni	0,05
4-nitrotolueeni	0,17
2-nitrobentsaldehydi	0,17
3-nitrobentsaldehydi	0,14
4-nitrobentsaldehydi	0,20
2-nitroaniliini	0,08
3-nitroaniliini	0,03

Aromaattisten nitroyhdisteiden hajoamistuotteiden edelleen hajoamisesta ja mineralisatiosta on joitakin tutkimustuloksia. Esimerkiksi Peres *et al.* suorittivat kokeita *Burkholderia cepacia* PB4 ja *Ralstonia paucula* SB4 kannoilla. Kokeessa käytettyjä kantoja kasvatettiin ennen koetta tyypettömässä elatusaineessa, johon lisättiin 1-4 mM 4-nitro- tai 4-aminobentsoehappoa solujen indusoimiseksi. Kokeet suoritettiin sekä aerobisissa että anaerobisissa olosuhteissa. Tämän lisäksi mitattiin eri entsyymien aktiivisuuksia hajoamisreittien tarkemmaksi selvittämiseksi.

Indusoidut solut kasvoivat olosuhteissa, joissa ainoana hiilen-, typen- ja energianlähteenä oli 4-aminobentsoehappo.²⁹ Lisäksi osoittautui, että kannat pystyvät kasvamaan vastaavasti myös 4-nitrobentsoehapossa ja 2-aminobentsoehapossa. PB4-kanta kasvoi myös 4-hydroksibentsoehapossa, mutta kumpikaan kannoista ei kasvanut 4-nitrotolueenissa, 2-nitrobentsoehapossa, 3-nitrobentsoehapossa tai 3-aminobentsoehapossa.

Kuvassa 16 on Peres *et al.* esittämät hajoamisreitit sekä anaerobisissa että aerobisissa olosuhteissa tapahtuvalle 4-nitrobentsoaatin hajoamiselle.



Kuva 16. Hajoamisreitit 4-nitrobentsoehapolle PB4 ja SB4 kantojen vaikutuksesta.²⁹ PB4 merkityt nuolet ovat vain PB4 kannalle esitettyjä reittejä ja SB4 merkityt nuolet (4-aminobentsoehaposta 3,4-dihydroksibentsoehappoon) vain SB4 kannalle esitettyä reittä. Ilman merkintää olevat nuolet ovat molemmille kannoille yhteisiä reittejä.

Hajoaminen käynnistyy NADPH:n entsyymien (nikotiiniamidiadeniini-dinukleotidifosfaatti) pelkistäessä 4-nitrobentsoehapon 4-nitrosobentsoehapoksi ja edelleen 4-hydroksiaminobentsoehapoksi. Tästä molemmilla kannoilla pääreitti on mutaasin kautta 4-amino-3-hydroksibentsoehapoksi ja PB4 kannalla edelleen 4-asetamido-3-hydroksibentsoehapoksi.

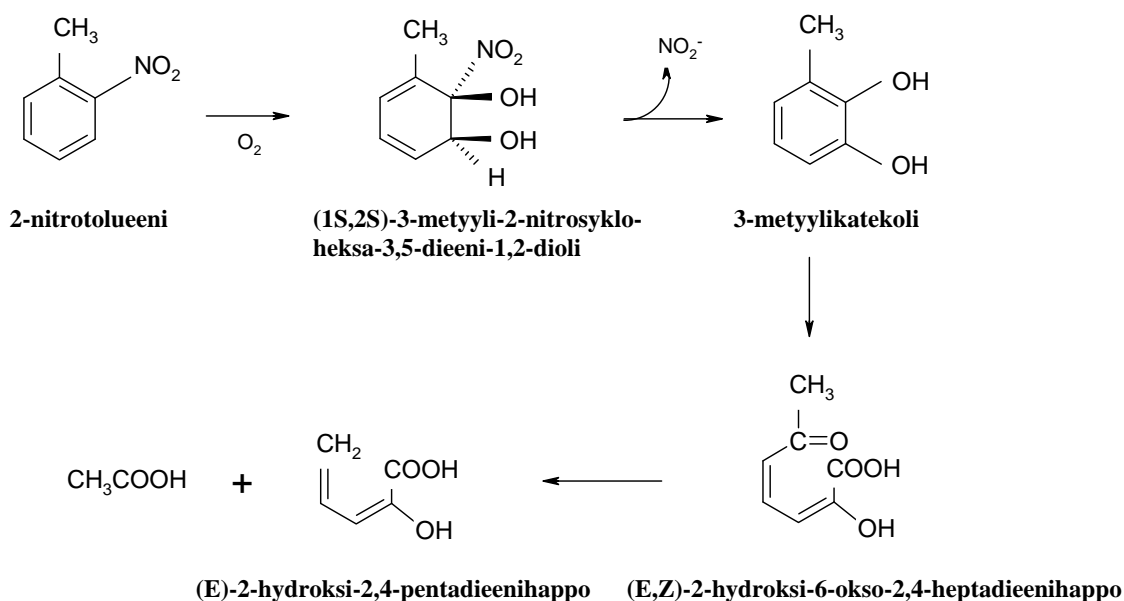
Mahdollinen epäsuositumpi hajoamisreitti PB4 kannalle on 4-hydroksiaminobentsoaatista 4-aminobentsoehapoksi, jonka hajoaminen kannan PB4 vaikutuksesta jatkuu mono-oksigenaasilla muodostaen 4-hydroksibentsoehappoa ammonium-ionin vapautuessa. Tätä seuraa toinen mono-oksigenaasireaktio, jossa lohkeaa vettä ja muodostuu 3,4-dihydroksibentsoehappoa. Kokeissaan Peres *et al.* tutkivat myös 4-aminobentsoehapon hajoamista SB4 kannan vaikutuksesta. Tällöin hajoaminen tapahtuu suoraan dioksigenaasin kautta, jolloin lohkeaa ammonium-ioni ja muodostuu 3,4-dihydroksibentsoehappoa. 3,4-Dihydroksibentsoehappo hapettuu molemmilla kannoilla 3,4-dihydroksibentsoehapon 3,4-dioksigenaasi-reaktion kautta (kuva 16, reaktio 3), jolloin aromaattinen rengas aukeaa ja muodostuu 3-karboksi-2*E*,4*Z*-mukonihappo. Tämä mineralisoituu edelleen hiilidioksidiksi ja vedeksi (tarkempaa reaktiomekanismia ei esitetty).

Anaerobisissa olosuhteissa 4-nitrobentsoehappo muuntui PB4 kannan vaikutuksesta pääosin 3,4-dihydroksibentsoehapoksi 4-asetamido-3-hydroksibentsoehapon ja 4-aminobentsoehapon esiintyessä vähäisinä sivutuotteina. Sitä vastoin SB4 kanta muunsi anaerobisissa olosuhteissa vain 5 % 4-nitrobentsoehaposta 3,4-dihydroksibentsoehapoksi (päätuote) ja vähäisessä määrin 4-amino-3-hydroksibentsoehapoksi.

Tarkasteltaessa kokonaisuutena 4-nitrotolueenin hajoamista *P. chrysosporium* vaikutuksesta 4-metyylianiiliiniksi²⁷ ja 4-metyylianiiliinin mineralisaatiota *Burkholderia cepacia* PB4 ja *Ralstonia paucula* SB4 kantojen vaikutuksesta²⁹ voidaan havaita 4-nitrotolueenin täydellinen mineralisaatio kahden kannan yhteisvaikutuksesta.

Spain *et al.* ovat esittäneet *Pseudomonas sp.* JS42 kannalle hajoamisreitit, joka johtaa nitror ryhmän irtoamiseen ja aromaattisen renkaan hajoamiseen.³⁰ Kokeissa käytetty kanta eristettiin nitrobentseenin saastuttamasta maasta ja pohjavedestä. Vaikka JS 42 kanta pystyi hajottamaan 3- ja 4-nitrotolueenia, se ei pystynyt kasvamaan käyttäen niitä ainoana typen ja hiilen lähteenä.

Yhteenvetona *Pseudomonas sp.* JS42 kannan reaktioista eri yhdisteiden kanssa, metabolisesta hapenkulutuksesta sekä entsyymi-analyyseistä Spain *et al.* ovat esittäneet kuvassa 17 esitetyn hajoamisreitit.



Kuva 17. 2-Nitrotolueenin hajoamisreitti *Pseudomonas sp.* JS42 kannalle

2-Nitrotolueenin hajoaminen käynnistyy samalla periaatteella kuin edellä esitetyn tolueenin hajoamisen alkureaktio JS150 ja *P. putida* F1 kannoilla tolueenidioksigenaasireaktion avulla.²¹⁻²³ JS42 kanta katalysoi seuraavassa vaiheessa hajoamista, jolloin 2-nitrotolueenista irtoaa nitriitti-ioni (ammonium-ionia ei havaittu) muodostaen 3-metyylikatekolin. 3-Metyylikatekoli hajoaa rengasfission kautta (E,Z)-2-hydroksi-6-okso-2,4-heptadieenihapoksi, josta hapettumisen kautta lohkeaa etikkahappoa ja jää (E)-2-hydroksi-2,4-pentadieenihappoa.

4. ABIOOTTISET MUUNTUMISREITIT

Seuraavassa on tarkasteltu joitakin abioottisia nitrotolueenien muuntumis- ja hajoamisreittejä. Niiden sovellukset voivat olla jätevesien tai pilaantuneiden maa-alueiden tai pohjavesien kunnostuksen erikoiskohteita tai tolueenin nitrauksessa käytettävän hapon puhdistamisessa uudelleen käytettäväksi.

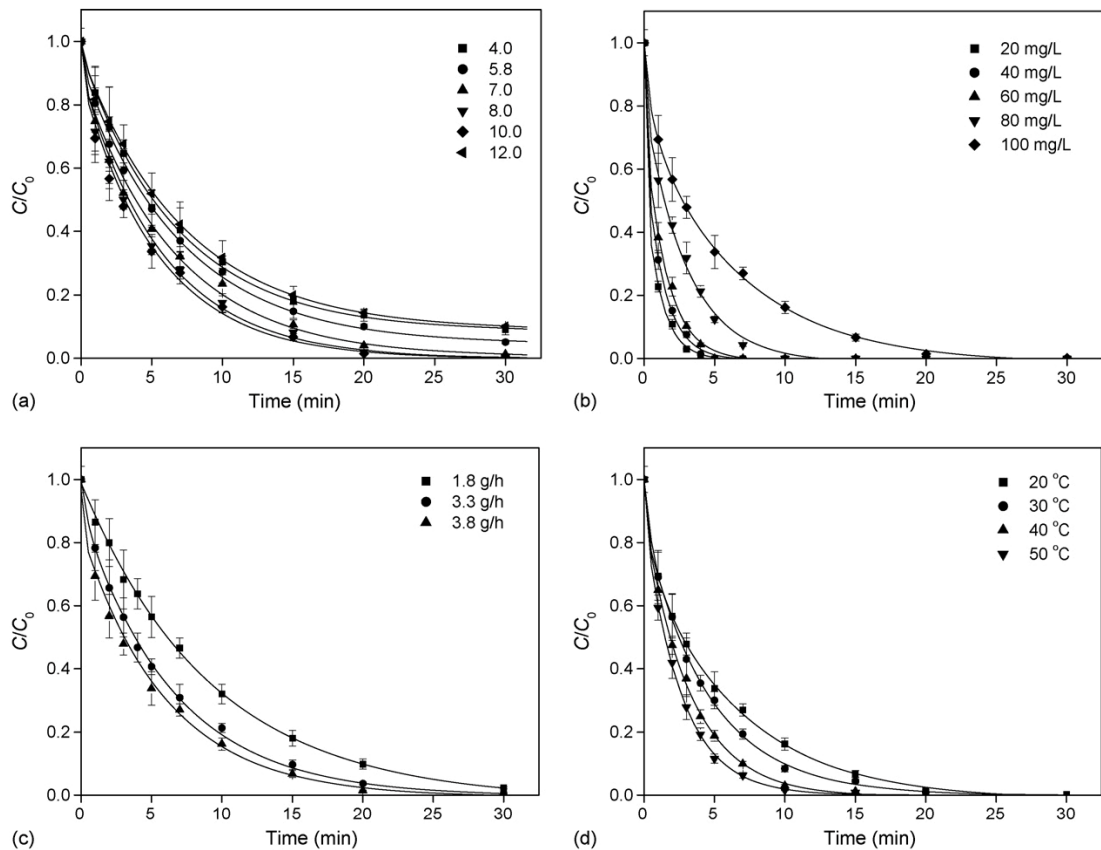
4.1. Otsonointi ja sonolyysi

Song *et al.* ovat tutkineet 4-nitrotolueenin abioottista hajottamista laboratoriomittakaavan laitteistolla.³¹ Kokeissa käytettiin menetelmänä sonolyysiä yhdistettynä otsonointiin. Tämän lisäksi systeemin lämpötilaa, pH:ta, alkukonsentraatiota ja otsoniannosta vaihdeltiin.

Kokeet suoritettiin lasisessa reaktorissa, johon oli asennettu 20 kHz ultraäänilähetin. Otsonia syötettiin systeemiin virtaamalla 1,8 - 3,8 g/h. Systeemin vesitilavuus oli 500 ml. Lähtöyhdisteet ja välituotteet analysoitiin HPLC ja GC-MS –tekniikoita käyttäen.

Tulosten perusteella hajoamisnopeus kasvoi pH:n noustessa neljästä kymmeneen. pH:n ylittäessä kymmenen hajoamisnopeus alkoi laskea (kuva 18, kohta a). Hajoamisen kokonaisnopeus riippuu muodostuvien hydroksyyli-radikaalien määrästä ja niiden siirtymisnopeudesta ympäröivään aineeseen. Kokeen perusteella hydroksyyli-radikaalien muodostumis- ja siirtymisnopeus veteen oli likimain vakio. 4-Nitrotolueenin alkupitoisuuden kasvaessa kokonaishajoamisnopeus laski, mikä johtui hydroksyyli-radikaalien kulumiseen alkutuotteen lisäksi myös välituotteiden hajottamisessa (kuva 18, kohta b) Otsonin määrän lisääntyminen liuoksessa kasvatti vapaiden radikaalien määrää, mikä nopeutti 4-nitrotolueenin hajoamista (kuva 18, kohta c). Kuitenkin otsonilla on systeemikohtainen optimipitoisuus, jonka ylityttyä otsonipitoisuuden kasvattaminen ei lisää hajoamista samassa suhteessa. Tämä on syytä huomioida, mikäli menetelmää käytetään haitta-aineiden hajottamiseen suuremmassa mittakaavassa, sillä otsonin tuottaminen on suhteellisen paljon energiaa kuluttavaa.

Lämpötilan kohottaminen välillä 20 - 50 °C kasvatti hajoamisnopeutta asteittain. Näin tapahtui, vaikka lämpötilan kohottaminen pienentää otsonin liukenemistä veteen. Toisaalta lämpötilan kohottaminen lisää otsonin hajoamisnopeutta vesiliuoksessa. Käytännössä otsonin hajoamisnopeuden ja siitä seuraava vapaiden happiradikaalien pitoisuuden kasvu liuoksessa on merkittävämpi tekijä kuin lämpötilan pienentämä otsonin liukenevuus veteen (kuva 18, kohta d).

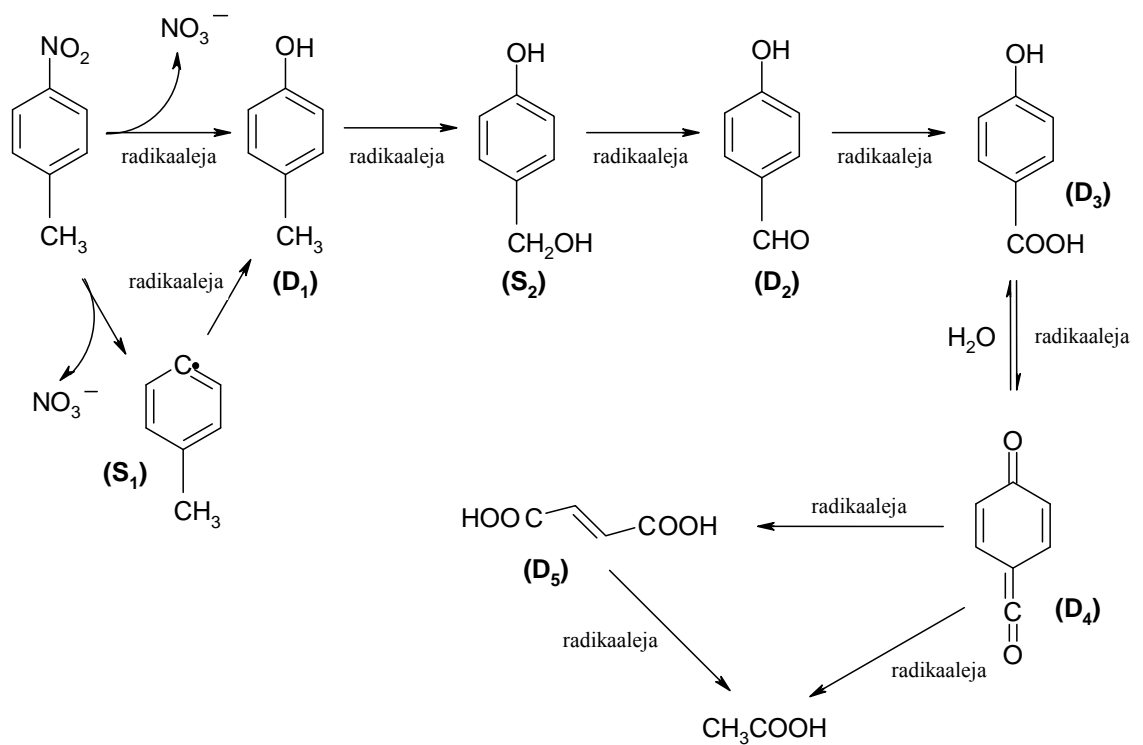


Kuva 18. Prosessimuuttujien vaikutus 4-nitrotolueenin hajoamiseen O₃-sonolyysissä

- (a) pH:n vaikutus C₀: C_{4-nitrotolueeni} = 100 mg/l; O₃ = 3,8 g/h; ultraäänienergia 0,3 W/ml; T = 20 °C
 (b) pitoisuuden vaikutus C₀: pH = 10; O₃ = 3,8 g/h; ultraäänienergia 0,3 W/ml; T = 20 °C
 (c) otsonin vaikutus C₀: pH = 10; C_{4-nitrotolueeni} = 100 mg/l; ultraäänienergia 0,3 W/ml; T = 20 °C
 (d) lämpötilan vaikutus C₀: pH = 10; C_{4-nitrotolueeni} = 100 mg/l; O₃ = 3,8 g/h; ultraäänienergia 0,3 W/ml

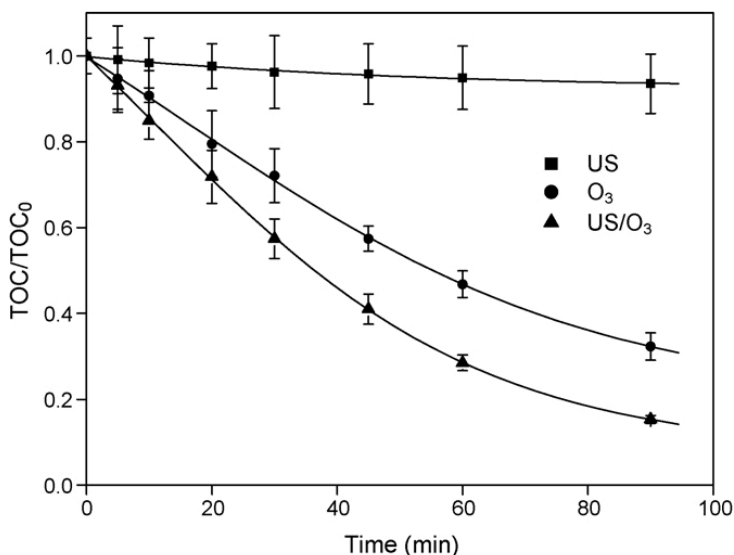
Ultraääni-otsonointiprosessissa •OH-radikaalit toimivat pääasiallisina hapettajina. Alkureaktion oletetaan olevan •OH-radikaalin hyökkäys 4-nitrotolueenin C-N-sidokseen, jolloin muodostuu 4-kresolia ja vapautuu nitraatti-ioni (kuva 19, D₁). Rinnan mainitun reaktion kanssa voi tapahtua nitroradikaalin irtoaminen pyrolyysin vaikutuksesta kaasufaasissa, jolloin voisi muodostua 4-metyylifenyyliradikaali, joka reagoi •OH-radikaalin kanssa 4-kresoliksi (kuva 18, S₁). Liuoksessa tapahtuvan pyrolyysin aiheuttaa korkea lämpötila, joka muodostuu ultraäänen nesteeseen muodostamien pienten kavitaatiokuplien romahtaessa. Song *et al.* suorittamien kokeiden perusteella 4-nitrotolueenin hajoaminen oli pelkän ultraäänen vaikutuksesta suhteellisen vähäistä. Tämä viittaa siihen, että kyseessä ei ollut todellinen sonokemiallinen reaktio, vaan ultraäänen aiheuttama parempi sekoitus ja reaktiivisten partikkelien eteneminen.

Hapettuminen jatkuu 4-kresolin metyyliryhmän hapettuessa 4-hydroksibentsaldehydiksi ja edelleen 4-hydroksibentsoehapoksi (Kuva 19). Tätä seuraa aromaattisen rakenteen hajoaminen ilmeisesti 4-(oksometyleeni)-sykloheksa-2,5-dien-1-oniksi reaktiomekanismilla, joka ei ole täysin tunnettu. Radikaalien vaikutuksesta rengas avautuu ja muodostuu fumaarihappoa, joka hajoaa edelleen etikkahapoksi.



Kuva 19. 4-Nitrotolueenin hajoamisreitti; D = GC/MS tekniikalla määritetty hajoamistuote, S = analysoimaton mahdollinen välituote

Edellä esitettyssä reaktiossa hajoamisen kannalta merkittävin tekijä on otsoni, joka 90 min. aikana hajotti 68 % 4-nitrotolueenista. Ultraääni yksin ei toiminut merkittävänä hajottajana tuottaen 90 min. 8 % vähemmän TOC-pitoisuuteen. Toisaalta ultraääni yhdistettynä otsonointiin tehostaa otsonin reaktiota synergisesti noin 10 %-yksikköä edellä mainittujen yksikköreaktioiden summaan verrattaessa. (kuva 20).

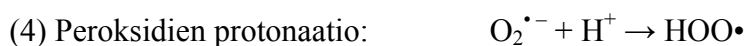
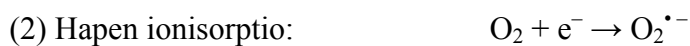


Kuva 20. Ultraäänen, otsonoinnin sekä näiden yhdistelmän vertailua 4-nitrotolueenin hajottamisessa. Vertailussa käytetyt olosuhteet: C₀ 100 mg/l; pH 10,0; O₃ annos 3,8 g/h; ultraäänen energia 0,3 W/ml; lämpötila 20 °C³¹

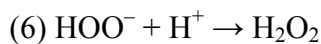
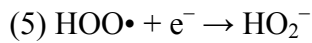
4.2. Fotokatalyyttinen hajottaminen TiO₂:lla vesiliuoksessa

Titaanidioksidin katalysoima heterogeeninen fotokatalyyttinen hapetus on vaihtoehto ilman ja veden puhdistamiseen orgaanisista yhdisteistä. Käytännössä se vaatii hajotettavien yhdisteiden ja katalyytin suoran kosketuksen.

Reaktio käynnistyy valolla viritetyn elektronin poistuessa fotokatalyytti-puolijohteen valenssielektronivyöltä. Tämä jättää vyöhön aukon, jolloin muodostuu elektroni-aukkopari (e⁻ -h⁺). Tätä seuraavat ketjureaktiot:³²

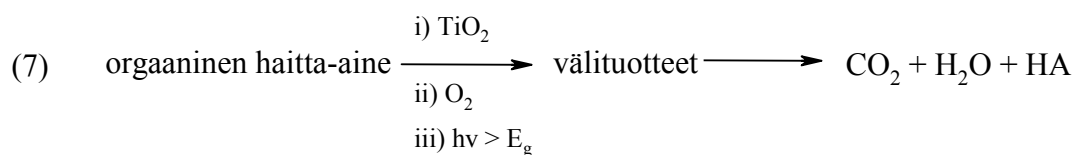


Edellisen kohdan (4) vetyperoksidiradikaali voi edelleen lisätä muodostuneiden aukkojen määrää:



Valolla viritetyn puolijohteen pinnalla voi tapahtua sekä hapetus- että pelkistysreaktioita. Elektronin ja puolijohteen aukon jälleenyhtyminen voi tapahtua, jos happea ei ole kaappaamaan elektroneja ja muodostamaan peroksideja $\text{O}_2^{\cdot-}$, HO_2^{\cdot} ja vetyperoksidia.

Aerobinen titaanidioksidin katalysoima reaktio on vastakkainen reaktio fotosynteettiselle reaktiolle, jolloin sen ΔG on negatiivinen. Yleisreaktio on³² :



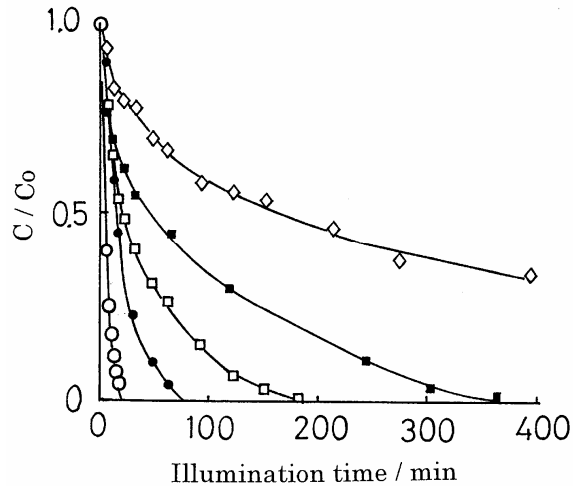
HA = vastaava happo

Vohra *et al.* suorittivat kokeita 2-, 3- ja 4-nitrotolueenilla tavoitteenaan selvittää titaanidioksidin valokatalyyttistä hajotuskykyä.³³ Kokeita suoritettiin eri nitrotolueenipitoisuuksissa 500 ml:n näytetilavuudessa, johon oli lisätty 2 mg titaanidioksidia. Valonlähteenä käytettiin koeastian keskelle pyrex-lasiin asennettua 6 W:n UV-lamppua, jonka valoteho oli 1 mWcm^{-2} 10 mm:n etäisyydellä lasin seinämistä aallonpituusalueella 330 - 390 nm.

Toisessa Vohra *et al.* suorittamissa koejärjestelyissä selvitettiin valotehon vaikutusta hajoamiseen. Tässä käytettiin 500 W korkeapaine-elohopealamppua. Valotehoa vaihdeltiin 40 % ja 2 % läpäisykyvyn filtereillä 360 nm aallonpituusalueella. Kokeissa selvitettiin myös Pt-TiO₂:n vaikutusta verrattuna pelkkään TiO₂:iin. Lähtö- ja hajoamistuotteiden analyysit tehtiin HPLC/UV-VIS ja ionikromatografiaa käyttäen.

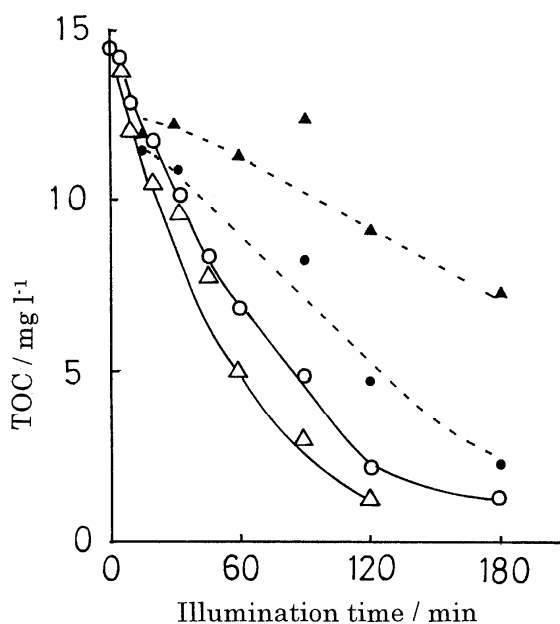
Tulokset osoittivat valokatalyyttisen hajoamisnopeuden hidastuvan 4-nitrotolueenin pitoisuuden kasvaessa (kuva 21). 2-, 3- ja 4-Nitrotolueenien hajoamisnopeuksissa ei ollut merkittävää eroa, vaikka Kumar ja Davis³⁴ ovat raportoineet 2-nitrotolueenin hajoamisnopeuden olevan suurempi kuin muiden isomeerien. Tämän on esitetty johtuvan

Hammettin lain mukaan nitroryhmän sijainnista *orto*-asemassa, mikä on OH –radikaalin elektrofiilisen reaktion kannalta merkittävämpi kuin *meta*-asema. Platinan lisäämisellä ei havaittu kokeissa olevan vaikutusta hajoamisnopeuteen.



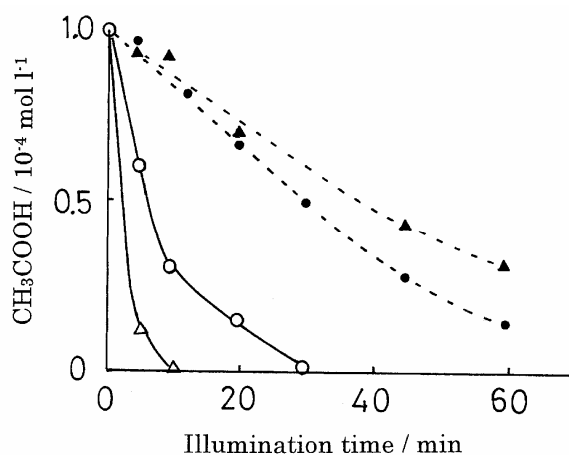
Kuva 21. 4-Nitrotolueenin hajoaminen eri pitoisuuksissa³³ ; ◇ = 10^{-3} M, ■ = 5×10^{-4} M, □ = 2×10^{-5} M, ● = 10^{-4} M, ○ = 5×10^{-5} M

Vohra *et al.* suorittamissa kokeissa 4-nitrotolueenin hajoamisnopeudessa ei ollut merkittäviä eroja eri valotehoilla käytettiin pelkkää TiO_2 tai $\text{TiO}_2\text{-Pt}$ yhdistelmää. Poikkeuksen tähän muodostaa TOC-pitoisuuden väheneminen, mikä kyseisessä tapauksessa tarkoittaa hajoamistuotteiden hajoamisnopeutta. Merkittävä ero TOC-pitoisuuden muutosnopeudessa oli havaittavissa käytettäessä $\text{TiO}_2\text{-Pt}$ -yhdistelmää ja pudotettaessa valotehoa sadasta kymmeneen prosenttiin (kuva 22). Platinan lisääminen systeemiin näyttääkin parantavan hajoamisnopeutta vain tilanteissa, joissa käytetään suuritehoista valonlähdettä.



Kuva 22. Valotehon ja platinan vaikutus TOC-yhdisteiden hajoamisnopeuteen (4-nitrotolueenin pitoisuus 2×10^{-4} mol/l) ³³; ○ = TiO₂, ei valonsuodatinta; ● = TiO₂, valoteho 10 %; △ = TiO₂-Pt, ei valonsuodatinta; ▲ = TiO₂-Pt, valoteho 10 %

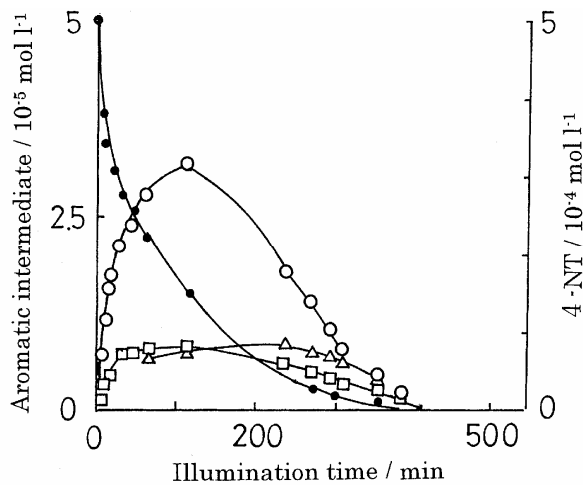
TOC-pitoisuuden vähenemistä edellä esitettyjen olosuhteiden vallitessa tarkasteltiin käyttämällä lähtöyhdisteenä etikkahappoa. Valotehon vaikutus oli merkittävin käytettäessä TiO₂-Pt-yhdistelmää, joskin valotehon vaikutus oli merkittävä myös pelkän titaanioksidin tapauksessa, kuva 23.



Kuva 23. Valotehon vaikutus sekä platinan vaikutus etikkahapon hajoamisnopeuteen ³³; ○ = TiO₂, ei valonsuodatinta; ● = TiO₂, valoteho 10 %; △ = TiO₂-Pt, ei valonsuodatinta; ▲ = TiO₂-Pt, valoteho 10 %

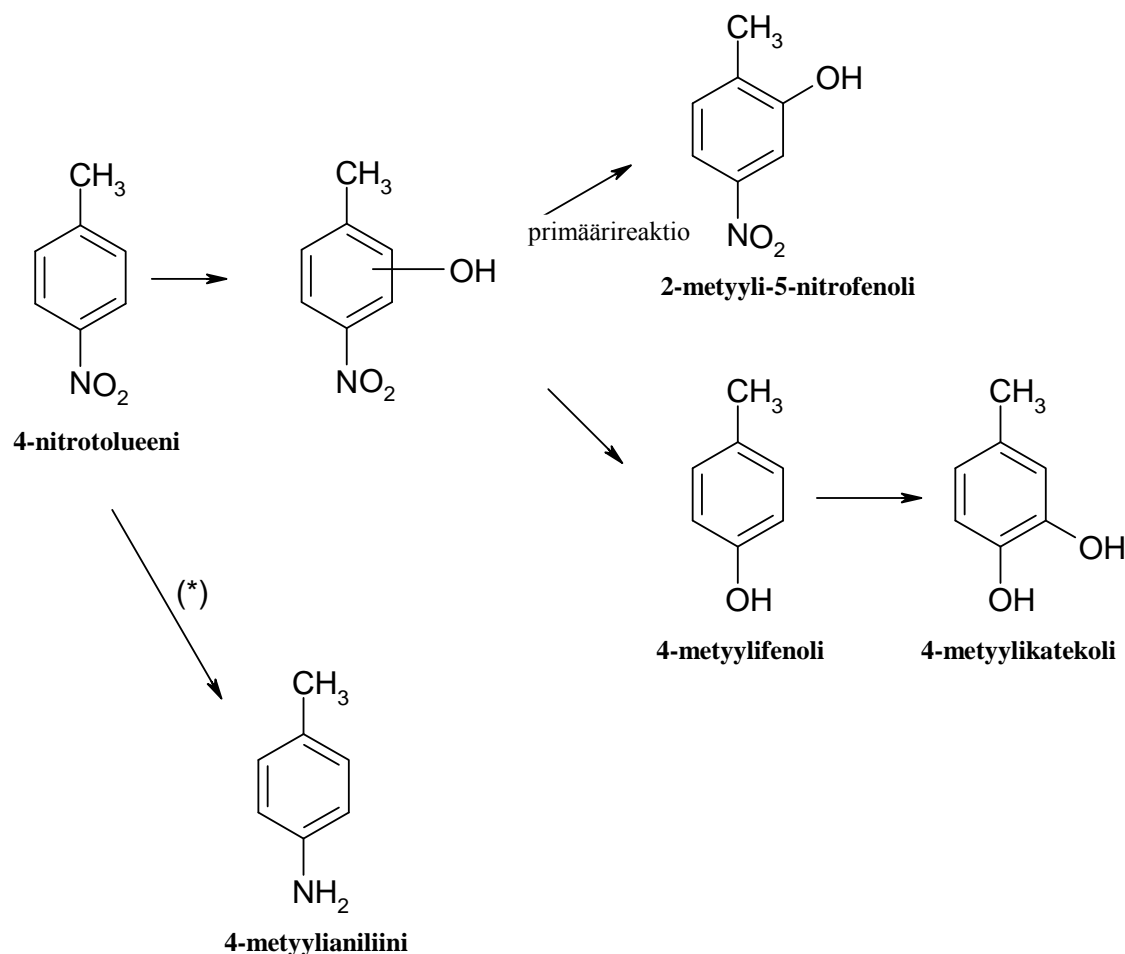
Edellä esitetyt koejärjestelyt tuloksineen vahvistavat näkemystä orgaanisen yhdisteen valokatalyyttiseen hajoamisnopeuteen vaikuttavista tekijöistä, joita ovat liuoksen pitoisuus ja tilavuus, titaanidioksidin määrä ja muoto, valoteho sekä reaktorin tyyppi.

TiO₂ ja TiO₂-Pt-yhdistelmän aiheuttama valokatalyyttinen reaktio 4-nitrotolueenin kanssa tuottaa aromaattisia ja alifaattisia välituotteita. Käytetystä koejärjestelystä ja valonlähteen tehosta riippuen nämä mineralisoituvat muodostaen NO₃⁻, NH₄⁺ -ioneja sekä hiilidioksidia.³³



Kuva 24. 4-Nitrotolueenin aromaattisten hajoamistuotteiden esiintyminen³³; ○ = 2-metyyli-5-nitrofenoli; ● = 4-nitrotolueeni; Δ = 2-metyyliresorsinoli; □ = 4-metyylifenoli

Ensimmäisessä vaiheessa muodostuvat aromaattiset tuotteet ovat 2-metyyli-5-nitrofenoli, 4-metyylifenoli ja 4-metyylikatekoli (kuva 24). 2-metyyli-5-nitrofenoli esiintyy hajoamisketjussa aromaattisena päätuotteena.



Kuva 24. 4-Nitrotolueenin aromaattiset hapettumistuotteet. 4-Metyylianiiliiniä esiintyy liuoksissa, joissa happea on rajoitetusti tai aukkoakseptorin läsnä ollessa.³³

Vohra *et al.* esittävät metyyliryhmän suhteen *orto*-aseman olevan suosiollinen OH-radikaalin liittymiselle metyyliryhmän elektroneja luovuttavasta ominaisuudesta johtuen, kun taas *para*-asemaan OH-radikaalia vetää nitroryhmän elektroneja sitova ominaisuus. Vohra *et al.* esittävät näiden yhteisvaikutuksesta 2-metyyli-5-nitrofenolin olevan ensisijainen aromaattinen tuote. Toissijaiseksi tuotteeksi he esittävät 4-metyyli-3-nitrofenolia perustellen sen seuraavasti: metyyliryhmä tekee *para*-aseman alttiiksi OH-radikaalin hyökkäykselle, mikä aiheuttaa nitroryhmän uudelleen järjestäytymisen renkaassa, jolloin muodostuu 4-metyylifenolin kaltaisia yhdisteitä. Tätä he eivät kuitenkaan voineet varmentaa, koska 4-metyyli-3-nitrofenolia ei ollut kaupallisesti saatavilla.

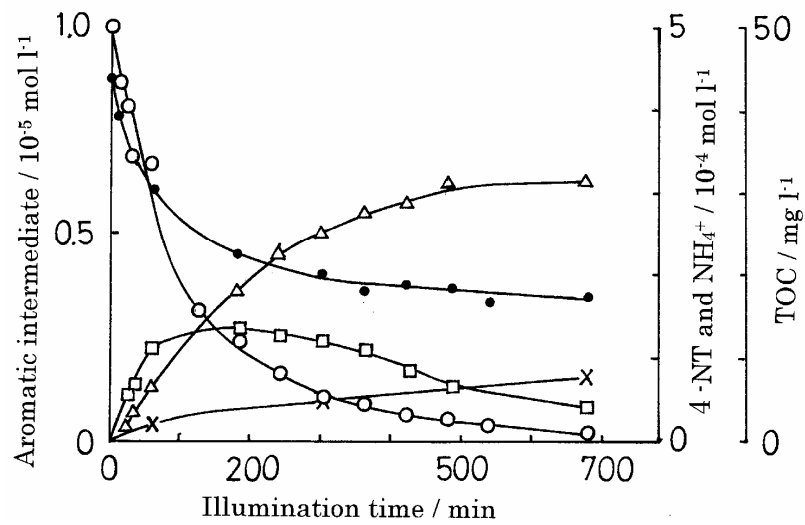
Vohra *et al.* esittävät vastaavasti 2-metyyli-3-nitrofenolia muodostuvan 2-nitrotolueenista edellä esitetyistä syistä johtuen: metyyli-ryhmä aktivoi *orto*-asemaa alttiimmaksi OH-radikaalin hyökkäykselle, kun taas nitro-ryhmä tekee vastaavan *meta*-asemalle.

3-Nitrotolueenin rakenne ei mahdollista vastaavaa mekanismia, eikä kokeissa havaittu määritettäviä pitoisuuksia edellä esitettyjä yhdisteitä. Hajoamistuotteena havaittiin tunnistamatonta aromaattista yhdistettä.³³

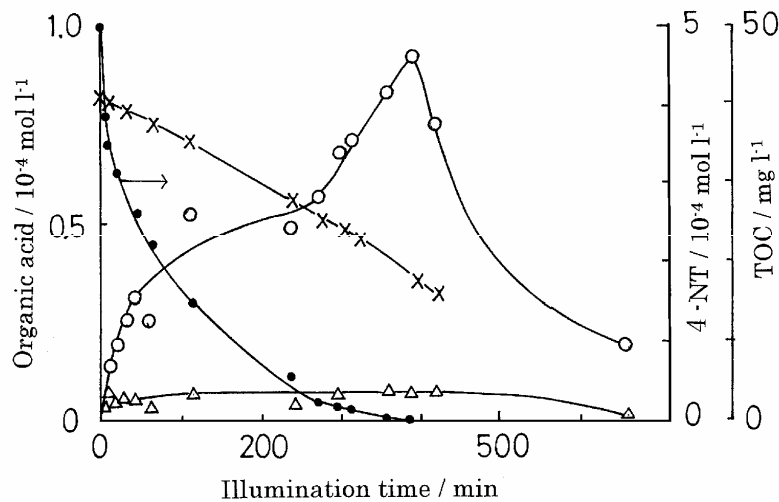
Tarkasteltaessa 4-nitrotolueenin hajoamistuotteita erillisessä kokeessa, ei 2-metyyli-5-nitrofenolista muodostunut 4-metyylinitrofenolia tai 2-metyylikatekolia. Tämän perusteella ensisijainen ja toissijainen hajoamisreitti ovat toisistaan riippumattomia.

Fotokatalyyysi tyypellä kuplitetussa anaerobisessa systeemissä johti osittain edellä esitetyistä poikkeaviin hajoamistuotteisiin.³³ 4-Nitrotolueenin hajoamisessa muodostui suhteellisen suuri määrä 4-metyylianiiliinia ja 2-metyyli-5-nitrofenolia.

Edellä esitetyt aromaattiset välituotteet hajoavat edelleen renkaan aukeamisen kautta tuottaen etikkahappoa, muurahaishappoa sekä pienemmässä määrin metanaalia. Alifaattiset hajoamistuotteet mineralisoituvat edelleen muodostaen lopputuotteena NH_4^+ , NO_3^- ja CO_2 . 4-Nitrotolueenin hajotessa NH_4^+ -pitoisuus jatkoi kasvamistaan aromaattisten hajoamistuotteiden hävittyä sekä myös alifaattisten hajoamistuotteiden vähetessä. Siten NH_4^+ -ioneja muodostuu sekä aromaattisista että alifaattisista yhdisteistä.³³



Kuva 25. 4-Nitrotolueenin hajoaminen ja hajoamistuotteiden muodostuminen anaerobisissa olosuhteissa³³; ○ = 4-nitrotolueeni; ● = TOC; Δ = 4-aminotolueeni; □ = 2-metyyli-5-nitrofenoli; X = NH₄⁺;



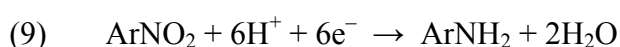
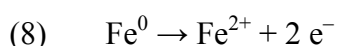
Kuva 26. 4-Nitrotolueenin hajoaminen ja alifaattiset hajomistuotteet³³; ○ = CH₃COOH; ● = 4-nitrotolueeni; Δ = HCOOH; X = TOC;

Yhteenvedona fotokatalyyttinen nitrotolueenin hajottaminen titaanidioksidin kanssa on toimiva menetelmä ja sovelluskohteita voisi löytyä mm. jätevesien tai pilaantuneiden pohjavesien käsittelyssä. Menetelmän käyttöä puoltaa yhdisteiden täydellinen mineralisoituminen. Platina tehostaa reaktiota käytettäessä korkeampia valotehoja, mutta käytännössä taloudelliset tekijät voivat rajoittaa sen käyttöä.

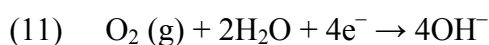
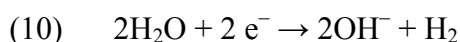
4.3. Hajotus nanomittakaavan Fe⁰ pelkistyksellä

Kiinteän raudan vesiseosta on mahdollista käyttää orgaanisten kloorattujen ja nitrattujen yhdisteiden pelkistämiseen. Menetelmän käyttömahdollisuuksia on tutkittu tarkoituksena hajottaa tai muuntaa mainittuja yhdisteitä haitattomampaan muotoon.

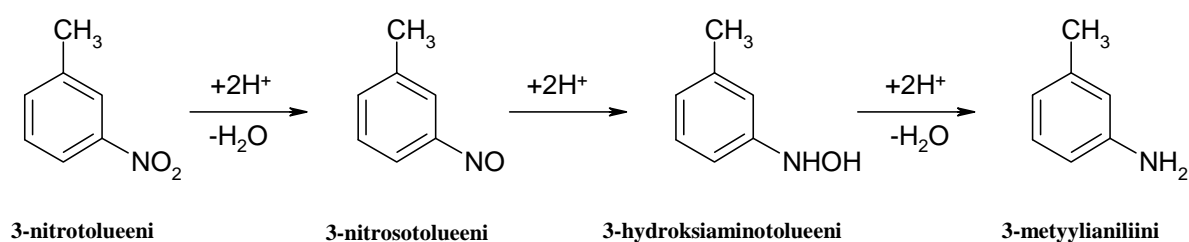
Metallisen raudan hapettumista kuvaa reaktio (8) ja vapautuvat elektronit voivat sitoutua nitrobenseenin pelkistyessä aniliiniksi (9)³⁵ :



Myös vesi ja veteen liuennut happi kilpailevat raudan hapettumisessa vapautuvista elektroneista:

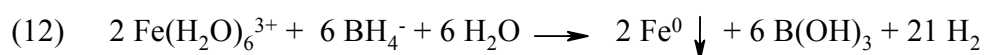


Esimerkiksi 3-nitrotolueeni pelkistyy edellä kuvatuissa olosuhteissa seuraavasti:



Kuva 27. 3-Nitrotolueenin pelkistymismekanismi³⁵

Nanomittakaavan Fe⁰ -partikkeleita voidaan syntetisoida pelkistämällä FeCl₃ -vesiliuosta NaBH₄:lla, jolloin tapahtuu seuraava reaktio³⁵ :



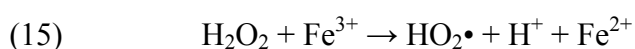
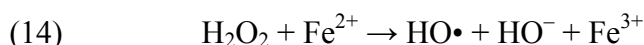
Reaktio on tehtävä liuoksilla, joista happi on huuhdeltu pois esim. tyvellä. Saostunut rauta pestään laimealla suolahapolla, vedellä ja asetonilla, jonka jälkeen muodostuneet nanomittakaavan rautahiukkaset kuivataan ja varastoidaan typen alla. Näin tehdyn jauheen hiukkaskokojakauma on 1-200 nm vastaten kolloidien suuruusluokkaa.

Choe *et al.* suorittivat kokeita edellä kuvatulla rautananojauheella, käyttäen nitrotolueenin alkupitoisuutena 10 mg/l.³⁵ Koe tehtiin sekoittamalla typetettyjä liuoksia typpiattomofääriissä ja analysoimalla lähtö- ja hajoamisyhdisteet GC-FID ja GC-ECD – tekniikoilla.

Kokeissa 85 % nitrotolueenista muuntui kuvan 27 mukaisesti käytettäessä edellä kuvattua rautananojauhetta. Muuntumista ei tapahtunut käytettäessä vastaavasti käsiteltyä hiukkaskooltaan 75-150 µm rautajauhetta. Verrattaessa nitrobentseeniä, nitrotolueenia ja dinitrotolueenia muuntuminen oli sitä nopeampaa ja täydellisempää, mitä vähemmän funktionaalisia ryhmiä lähtöyhdisteessä oli. Kokeessa yhdisteet muuntuivat lähtöyhdistettä vastaaviksi metyylianiilineiksi. Tästä johtuen kuvattu menetelmä soveltuu todennäköisesti huonosti käytännön kohteisiin.

4.4. Fenton-hapetus

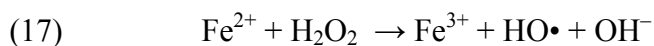
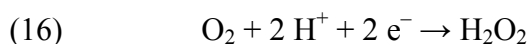
Fentonin reagenssi on voimakas hapettaja, jonka vaikutus perustuu vetyperoksidin ja rauta (II)- ja (III) –ionien reaktioon³⁶ :



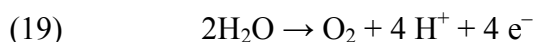
Orgaaninen yhdiste voi pelkistyä tai hapettua Fentonin reaktiossa. Hapettuminen jatkuu, mikäli OH-radikaaleja on riittävästi hapettamaan orgaaniset yhdisteet alifaattisiksi hapoiksi, hiilidioksidiksi ja vedeksi.

Fentonin reaktion tehostamiseksi on kehitetty useita parannuksia. Näissä reaktion tehostamiseen käytetään UV-valoa tai otsonia. Reaktiossa tarvittava vetyperoksidi voidaan tuottaa myös suoraan prosessissa ns. sähkö-Fenton menetelmällä. Liuoksessa katodi voi

olla mm. grafiittia,³⁷ platinaa tai hiili-PTFE-seosta. Rauta(II) -ionien ja hapen läsnä ollessa muodostuu OH-radikaaleja seuraavasti³⁸ :

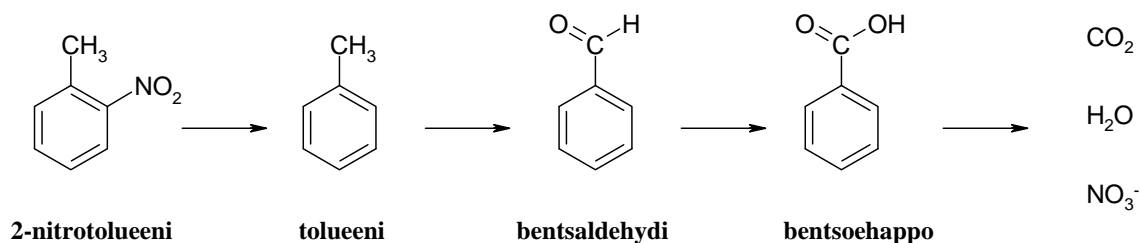


Anodilla muodostuu vedestä happea seuraavasti:



Sähkö-Fenton prosessia on kehitetty mm. nitrauksessa käytettävän rikkihapon puhdistamiseen, jolloin reaktio tapahtuu happamissa olosuhteissa.³⁸

Sähkö-Fenton prosessissa nitrotolueeneille on esitetty seuraava hajoamisreitti:



Kuva 28. 2-Nitrotolueenin muuntuminen sähkö-Fenton prosessissa³⁸

UV-valon katalysoimaa Fenton-reaktiota on tutkittu maaperän ja pohjaveden puhdistamisessa. Suora UV-valon aiheuttama fotolyysi 254 nm aallonpituudella, (jota aallonpituutta nitrotolueenit absorboivat hyvin), ei yleensä aiheuta nitrotolueenin hajoamista. Myös pelkän vetyperoksidin vaikutuksesta nitrotolueenit eivät hapetu. Sen sijaan Fenton-reaktion vaikutuksesta nitrotolueenien hajoaminen on nopeaa. Hajoamista nopeuttaa edelleen reagenssien altistaminen UV-valolle. Tämä johtuu siitä, että Fe³⁺ reagoi hitaammin H₂O₂:n kanssa kuin Fe²⁺. UV-valo regeneroi Fe²⁺ -ioneja, mikä nopeuttaa kokonaisreaktiota.³⁶

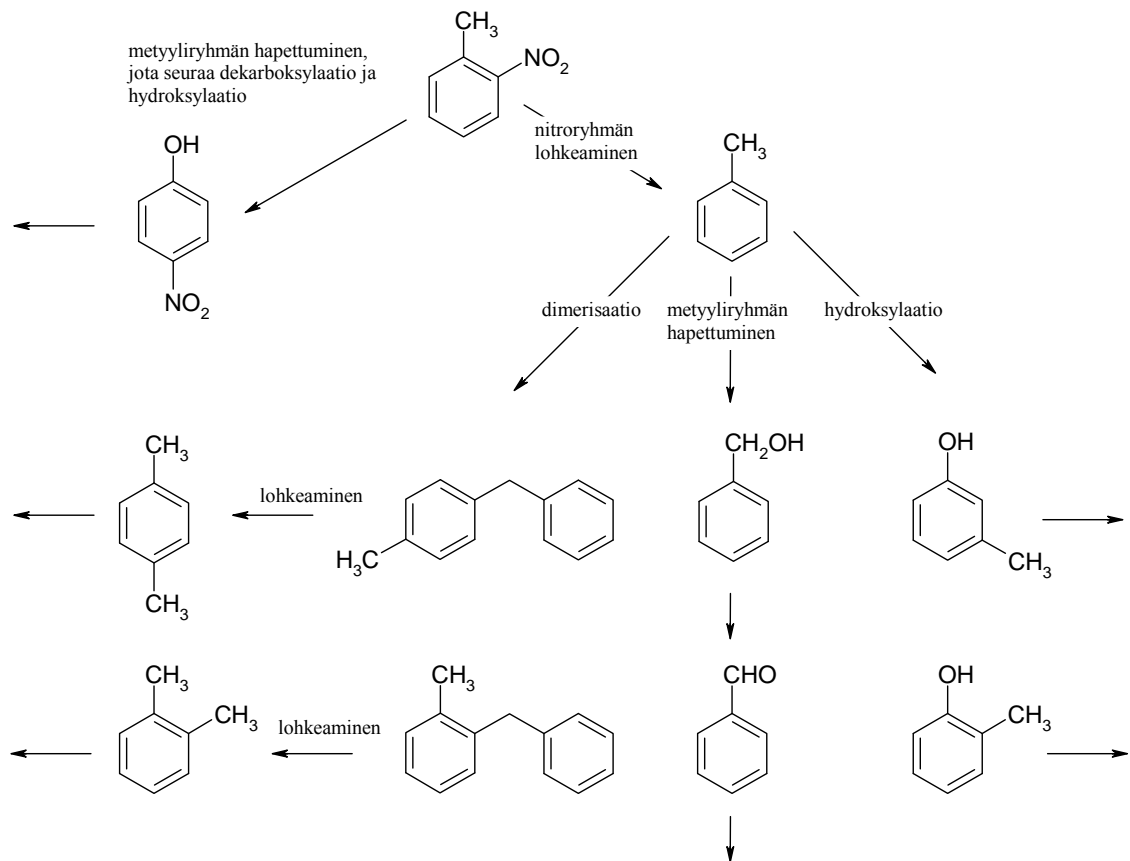
Muutettaessa liuoksen happamuutta, UV-valoa ja hapettimia, nitrotolueenien hapettuminen tapahtui Li *et al.* mukaan seuraavassa järjestyksessä (nopein ensin):

UV/Fenton, pH 3 > Fenton, pH 3, ei valoa > UV/Fenton, pH 6,1 > UV/H₂O₂ > H₂O₂, ei valoa

2-Nitrotolueeni hajosi nopeammin kuin 4-nitrotolueeni, mikä voi johtua kahdesta tekijästä: 2-nitrotolueenin resonanssistabilisaatio on pienempi kuin 4-nitrotolueenin, koska nitroriippymä on pakotettu pois rengastasosta metyyliiryhmän steerisistä esteistä johtuen. Tämä epästabiilisuus voi kasvattaa alttiutta hydroksyyliiradikaalin hyökkäykselle.³⁶

2,4,6-Trinitrotolueenilla tehdyissä kenttäkokeissa fulvo- ja humushapot eivät vaikuttaneet oleellisesti hajoamisnopeuteen Fenton- tai UV/Fenton -menetelmää käytettäessä. Fulvohapot lisäsivät hieman hajoamisnopeutta humushappojen vaikuttaessa päinvastoin. Tämän arvellaan aiheutuvan humushappojen pH:ta laskevasta vaikutuksesta ja fulvohappojen pelkistyspotentiaalista, joka ylläpitää korkeampaa Fe²⁺ -pitoisuutta kuin humushapot.³⁶

Pelkän Fenton-reagenssin vaikutuksesta tapahtuvan 2-nitrotolueenin hajoamisreitiksi on esitetty seuraavaa³⁹ :



Kuva 29. 2-Nitrotolueenin hajoamisreitit Fentonin reagenssin vaikutuksesta³⁹

5. YHTEENVETO

Nitrotolueeneja syntyy mm. teollisuudessa, ja niitä käytetään mm. väri- ja räjähdysainneiden lähtöaineina. Niitä on siten myös kemianteollisuuden jätevesissä.

Nitrotolueenit kuuluvat niihin orgaanisiin yhdisteisiin, joita luonnon omat prosessit eivät tuota merkittävässä määrin ja niitä pidetäänkin luonnossa aitoina vierasaineina⁴⁰. Tästä johtuen ne ovat suhteellisen pysyviä luonnossa, sillä vain harvat mikrobit pystyvät hajottamaan tai käyttämään niitä energianlähteenä. Nitrotolueenilla pilaantuneiden alueiden tai niitä sisältävien vesien puhdistaminen on usein ongelmallista, sillä niiden polttaminen esim. maasta on suhteellisen kallista ja tuottaa korkeissa pitoisuuksissa ilman laatua heikentäviä typen oksideja. Nitrotolueenien sitominen aktiivihiileen ei varsinaisesti poista ongelmaa, vaan siirtää sen toiseen muotoon. Tämän vuoksi on laajalti etsitty keinoja nitrotolueenien hajottamiseen riittävän nopeasti ja kohtuullisin kustannuksin.

Monet mikrobit pystyvät hapettamaan nitrotolueeneja mm. mono- ja dioksigenaasientsyymien avulla. Muodostuvat yhdisteet ovat tyypillisesti lähtöyhdistettä vastaavia karboksyylihappoja, metyylianiiliineja, nitrofenoleita tai alkoholeja. Yksittäisten mikrobikantojen aiheuttama muuntuminen ei yleensä johda nitrotolueenin mineralisoitumiseen. Tällainen on mahdollista joillakin mikrobeilla aerobisten ja anaerobisten olosuhteiden vuorottelussa prosessissa. Täydellinen mineralisoituminen on mahdollista myös useiden mikrobien yhteisvaikutuksesta.

Nitrotolueenien abioottisina hajottamismenetelminä on tutkittu mm. jätevesien puhdistamisessa käytettäviä perustekniikoita ja näiden sovelluksia. Fotokatalyyttinen hajottaminen ei yleensä yksin hajota nitrotolueeneja. Yhdistettynä hapettamiseen otsonilla tai vetyperoksidilla fotokatalyyysi titaanidioksidin kanssa voi edetä täydelliseen mineralisaatioon radikaalireaktioiden kautta. Pelkistäminen raudalla sen sijaan ei johda mineralisaatioon, mutta lähtöyhdisteiden muuntumiseen kylläkin. Fentonin reagenssi hajottaa kaikki nitrotolueenit. Reaktiota voi tehostaa UV-valolla. Sähkö-Fenton prosessi tarjoaa mielenkiintoisen vaihtoehdon, sillä siinä Fentonin reagenssina käytettävä vetyperoksidi tuotetaan prosessissa *in situ*.

Kirjallisuusviitteet

1. J. K. Dunnick, *NTP Technical Report on Toxicity Studies of o-, m-, and p-nitrotoluenes*, United States Department of Health and Human Services, **1992**.
2. Uudenmaan ympäristökeskus, Päätös ympäristönsuojelulain (86/2000) 35 §:n mukaisesta hakemuksesta, joka koskee Oy Forcit Ab:n räjähdysainetehtaan nykyistä toimintaa Hangon kaupungissa. **2004**, YS 1184.
3. U.S. Environmental Protection Agency, *Health and Environmental Effects Profile for Nitrotoluenes (o-, m-, p-)*. Report EPA/600/X-86/143, U.S. EPA, **1986**.
4. J. K. Dunnick, M. R. Elwell and J. R. Bucher, Comparative toxicities of o-, m-, and p-nitrotoluene in 13-week feed studies in F344 rats and B6C3F1 mice. *Fundam. Appl. Toxicol.* **1994**, 22, 411-421.
5. J. K. Dunnick, L. T. Burka, J. Mahler and R. Sills, Carcinogenic potential of o-nitrotoluene and p-nitrotoluene, *Toxicol.* **2003**, 183, 221-234.
6. Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), *Scientific opinion on the risk assessment report on 2-nitrotoluene, human health part*, CAS 88-72-2, European Commission, **2008**.
7. S. P. Verevkin, Thermochemistry of nitro compounds. Experimental standard enthalpies of formation and improved group-additivity values, *Thermochim. Acta.* **1997**, 307, 17-25.
8. M. Farhadian, C. Vachelard, D. Duchez and C. Larroche, In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review, *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 5296-5308.
9. Toluene Pathway Map, http://umbbd.msi.umn.edu/tol/tol_map.html, University of Minnesota, (2.7.2008).
10. R. Chakraborty and J. D. Coates, Anaerobic degradation of monoaromatic hydrocarbons, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**, 64, 437-446.
11. J. D. Coates, R. Chakraborty and M. J. McInerney, Anaerobic benzene biodegradation—a new era, *Res. Microbiol.* **2002**, 153, 621-628.

12. F. Widdel and R. Rabus, Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 259-276.
13. M. Boll, G. Fuchs and J. Heider, Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *6*, 604-611.
14. O. Hayaishi, An odyssey with oxygen, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2005**, *338*, 2-6.
15. J. B. Robertson, J. C. Spain, J. D. Haddock and D. T. Gibson, Oxidation of nitrotoluenes by toluene dioxygenase: evidence for a monooxygenase reaction, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2643-2648.
16. R. J. Fessenden and J. S. Fessenden, *Organic Chemistry*, 5. Painos, Brooks/Cole Publishing Company, **1993**, ss. 519-520.
17. S. K. Walia, S. Ali-Sadat and C. G. Rasul, Influence of nitro group on biotransformation of nitrotoluenes in *Pseudomonas putida* strain OU83, *Pestic. Biochem. Physiol.* **2003**, *76*, 73-81.
18. S. Ali-Sadat, K. S. Mohan and S. K. Walia, A novel pathway for the biodegradation of 3-nitrotoluene in *Pseudomonas putida*, *FEMS Microbiol. Ecol.* **1995**, *17*, 169-176.
19. K. S. Jørgensen, In Situ Bioremediation, *Adv. Appl. Microbiol.* **2007**, *61*, 285-305.
20. R. J. Brennan and R. H. Schiestl, The aromatic amine carcinogens *o*-toluidine and *o*-anisidine induce free radicals and intrachromosomal recombination in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **1999**, *430*, 37-45.
21. D. T. Gibson, M. Hensley, H. Yoshioka and T. J. Mabry, Formation of (+)-*cis*-2,3-dihydroxy-1-methylcyclohexa-4,6-diene from toluene by *Pseudomonas putida*, *Biochem.* **1970**, *9*, 1626-1630.
22. D. T. Gibson and V. Subramanian, *Microbiological degradation of aromatic hydrocarbons*, 1. Painos, Marcel Dekker, New York, **1984**, ss. 181-252.
23. B. E. Higler, C. A. Pettigrew and J. C. Spain, Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas sp* strain 150, *Appl. Environ. Microbiol.* **1992**, *58*, 2237-2244.
24. D. R. Boyd, N. D. Sharma, N. M. Llamas, C. R. O'Dowd and C. C. R. Allen, *syn*-Benzene dioxides: chemoenzymatic synthesis from 2,3-*cis*-dihydrodiol derivatives

of monosubstituted benzenes and their application in the synthesis of regioisomeric 1,2- and 3,4-*cis*-dihydrodiols and 1,4-dioxocins, *Org. Biomol. Chem.* **2007**, *5*, 2267-2273.

25. I. Soojhawon, P. D. Lokhande, K. M. Kodam and K. R. Gawai, Biotransformation of nitroaromatics and their effects on mixed function oxidase system, *Enzyme Microb. Technol.* **2005**, *37*, 527-533.
26. T. K. Kirk and R. L. Farrel, Enzymatic 'combustion': the microbial degradation of lignin, *Annu. Rev. Microbiol.* **1987**, *41*, 465-505.
27. H. Teramoto, H. Tanaka and H. Wariishi, Fungal cytochrome P450s catalyzing hydroxylation of substituted toluenes to form their hydroxymethyl derivatives, *FEMS Microbiol. Lett.* **2004**, *234*, 255-260.
28. M. T. D. Cronin and T. W. Schultz, Development of Quantitative Structure-Activity Relationships for the Toxicity of Aromatic Compounds to *Tetrahymena pyriformis*: Comparative Assessment of the Methodologies, *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 1284-1295.
29. C. M. Peres, R. Russ, H. Lenke and S. N. Agathos, Biodegradation of 4-nitrobenzoate, 4-aminobenzoate and their mixtures: new strains, unusual metabolites and insights into pathway regulation, *FEMS Microbiol. Ecol.* **2001**, *37*, 151-159.
30. J. C. Spain, B. E. Haigler and W. H. Wallace, Biodegradation of 2-nitrotoluene by *Pseudomonas* sp. Strain JS42, *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**, *60*, 3466-3469.
31. S. Song, M. Xia, Z. He, H. Ying, B. Lü and J. Chen, Degradation of *p*-nitrotoluene in aqueous solution by ozonation combined with sonolysis, *J. Hazard. Mater.* **2007**, *144*, 532-537.
32. U. I. Gaya and A. H. Abdullah, Heterogeneous photocatalytic degradation of organic contaminants over titanium dioxide: A review of fundamentals, progress and problems, *J. Photochem. Photobiol. , C.* **2008**, *9*, 1-12.
33. M. S. Vohra and K. Tanaka, Photocatalytic degradation of nitrotoluene in aqueous TiO₂ suspension, *Water Res.* **2002**, *36*, 59-64.
34. S. Kumar and A. P. Davis, Heterogeneous photocatalytic oxidation of nitrotoluenes. *Water Environ. Res.* **1997**, *69*, 1238-1245.

35. S. Choe, S. H. Lee, Y. Y. Chang, K. Y. Hwang and J. Khim, Rapid reductive destruction of hazardous organic compounds by nanoscale Fe⁽⁰⁾, *Chemosphere*. **2001**, *42*, 367-372.
36. Z. M. Li, P. J. Shea and S. D. Comfort, Nitrotoluene destruction by UV-catalyzed fenton oxidation, *Chemosphere*. **1998**, *36*, 1849-1865.
37. Z. Qiang, J. H. Chang and C. P. Huang, Electrochemical generation of hydrogen peroxide from dissolved oxygen in acidic solutions, *Water Res.* **2002**, *36*, 85-94.
38. W. S. Chen and J. S. Liang, Decomposition of nitrotoluenes from trinitrotoluene manufacturing process by electro-Fenton oxidation, *Chemosphere*. **2008**, *72*, 601-607.
39. A. Schmidt and W. Butte, Photocatalytic degradation of reduction products of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT), *Chemosphere*. **1999**, *38*, 1293-1298.
40. J. L. Ramos, M. M. González-Pérez, A. Caballero and P. Dillewijn, Bioremediation of polynitrated aromatic compounds: plants and microbes put up a fight, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2005**, *16*, 275-281.