

SESJA II

Przewodniczący Dr J. Henry
Prezydium K. n. A. N. Szakin
Dr R. Carolan

1/7

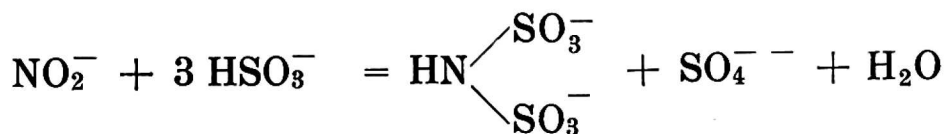
REDUKCJA AZOTANÓW PRZEZ BAKTERIE TERMOFILNE
NA STACJI DYFUZJI

A. CARRUTHERS, J. F. T. OLDFIELD

British Sugar Corporation Ltd, Laboratoria Badawcze Bramcote (Anglia)

Zawartość azotanów w zdrowych burakach cukrowych jest znikoma, natomiast w sokach fabrycznych stężenie azotanów odpowiada często zawartości azotu od 5 do 25 mg/litr. Chociaż azotyny stanowią mały ułamek całkowitej ilości niecukrów w soku, mogą jednak spowodować zakłócenia, jeżeli w cukrowni stosuje się siarkowanie.

Przyczyną tego jest skomplikowana reakcja między jonami azotynowymi i wodorosiarczynowymi. Głównymi produktami tej reakcji są imidodwusulfoniany i siarczan. W czystych roztworach wodnych jeden jon azotynowy i trzy jony wodorosiarczynowe mogą reagować, prawdopodobnie przez jon nitrylosulfonowy $N(SO_3)_3^{3-}$, dając jony imidodwusulfonianowe i siarczanowe w ilości odpowiadającej następującemu równaniu sumarycznemu:



Badania soków fabrycznych wykazały, że w trakcie przerobu buraków zachodzą reakcje bardziej skomplikowane niż reakcja ujęta tym równaniem. Możliwe jest powstanie innych produktów końcowych zawierających azot i siarkę. Prócz tego stwierdzono, że zanik azotanów w czasie zagęszczania w wyparce, nawet w cukrowniach nie stosujących dwutlenku siarki, zależy od stężenia inwertu w soku.

Ilości powstałych imidodwusulfonianów i straconego dwutlenku siarki

nie można więc wyliczyć stechiometrycznie ze stężenia azotynów w soku rzadkim. W doświadczeniach modelowych jednak stwierdzono, że ilość azotynów odpowiadająca zawartości azotu 10 mg/litr wiąże od 80 do 110 mg SO₂ w litrze. Ta stosunkowo mała ilość azotynów może więc być przyczyną straty przeszło 25% dwutlenku siarki zużywanego do siarkowania soków.

Sól potasowa kwasu imidodwusulfonowego jest dość trudno rozpuszczalna i często krystalizuje wraz z mączką III rzutu. Jeżeli ilość imidodwusulfonianu jest duża, zawracanie mączki w klarówce powoduje dalszy wzrost stężenia w odciekach aż do wykrystalizowania imidodwusulfonianu w mączce II rzutu i w końcu w cukrze białym.

Jon azotynowy jest więc niebezpieczny dla jakości cukru, zarówno wskutek osłabiania odbarwiającego działania SO₂, jak też w skrajnych przypadkach przez anormalne zwiększenie zawartości popiołu w cukrze białym.

Ponieważ azotyny tworzą się we wczesnych stadiach procesu fabrycznego, ograniczenie ich powstawania ma bardzo duże znaczenie dla produkcji cukru wysokiej jakości.

Powstawanie azotynów podczas dyfuzji

W sokach z dyfuzji ciągłej znajdowano zazwyczaj zawartość azotu azotynowego od 2 do 15 mg/litr, a przygodnie nawet od 25 do 45 mg/litr. Azotyny nie powstawały w wyniku reakcji chemicznej ani w czasie dyfuzji, ani w czasie defekacji, ponieważ w laboratoryjnych bateriach dyfuzyjnych pracujących w temperaturze 78°C można było otrzymać soki wolne od azotynów. Także sok II saturacji i siarkowany sok rzadki otrzymane w skali laboratoryjnej nie zawierały azotynów.

Najprawdopodobniejszą przyczyną obecności azotynów w sokach fabrycznych było więc albo utlenianie amoniaku przez bakterie, albo redukcja azotanów również przez bakterie. Temperatury panujące w większości dyfuzorów są jednak dostatecznie wysokie, aby uniemożliwić działalność wszelkich znanych mikroorganizmów nitryfikujących, tak że utlenianie amoniaku było mało prawdopodobne. W aparatach do dyfuzji przeciwprądowej istnieją natomiast dostatecznie sprzyjające warunki stałego dopływu substancji odżywczych i odpływu produktów metabolizmu, aby szczepy *B. stearothermophilus* produkujące kwas mlekowy mogły żyć nawet w temperaturach przekraczających 70°C. Stwierdzono, że organizmy te również redukują w soku azotany do azotynów.

Zakażenia bakteryjne aparatów dyfuzyjnych pochodzą z resztek gleby przywierających do buraków, a szczepy *B. stearothermophilus* można wyizolować z większości próbek gleby.

Jeżeli próbki sterylnego soku dyfuzyjnego zaszczyć glebą i prowadzić inkubację w temperaturze odpowiadającej temperaturze stosowanej zazwyczaj podczas dyfuzji ciągłej, obserwuje się charakterystyczne zmiany stężenia azotanów i azotynów. W tabeli 10 zestawiono wyniki inkubacji w temperaturze 65°C. Bardzo podobne wyniki otrzymano przy inkubacji w 70°C.

Po lag-fazie trwającej około 3,5 godzin rozpoczynało się jednoczesne wytwarzanie kwasu i redukcja azotanów. Zawartość azotanów wskutek redukcji przez bakterie spadała szybko do zera. Azotyny nie były zresztą produktem końcowym, ponieważ i one częściowo redukowały się do azotu.

Stosunkowo szybkie znikanie anionów azotanowych i azotynowych w ciągu 5,5—7,5 godzin wystarczyło, aby zrównoważyć spadek pH spowodowany wytwarzaniem kwasu mlekowego przez te same bakterie. W próbkach, do których dodano azotanu, zjawisko to tak przeważało nad

Tabela 10

Zmiany pH oraz zawartości azotanów i azotynów w 66% soku dyfuzyjnym zaszczyć glebą i inkubowanym w 65°C

Czas inkubacji godziny	pH	Azotany mg N/litr	Azotyny mg N/litr
0	6,27	72	0
3,5	6,23	71	0
4,5	6,13	61	8
5,5	5,88	11	43
6,5	5,90	0	37
7,5	5,87	0	23
8,5	5,70	0	11
24	4,65	0	0

Tabela 11

Redukcja azotanów w fabrycznym soku dyfuzyjnym

Czas inkubacji godzin	Inkubacja w 70°C		Inkubacja w 74°C	
	pH	azotyny mg N/litr	pH	azotyny mg N/litr
0	5,95	6	5,95	6
1,5	5,78	18	5,78	8
2,3	5,54	41	5,75	12
3,5	5,52	17	5,65	18
26	4,64	0	5,63	44

wytwarzaniem się kwasu, że po wstępnym spadku pH obserwowano jego wzrost nawet do 0,9 jednostek w okresie najsilniejszego rozkładu azotynów. W aparatach dyfuzji przeciwprądowej istnieją warunki umożliwiające bakteriom stałe pozostawanie w fazie aktywnej bez lag-fazy. Ponieważ zaś świeża krajanka stanowi ciągle źródło azotanów, azotyny nie rozkładają się, lecz gromadzą w soku dyfuzyjnym.

Część bakterii jest wypłukiwana do soku dyfuzyjnego. Inkubacja próbek fabrycznego soku dyfuzyjnego w 70 i 74°C wykazała istnienie procesu redukcji azotanów (tab. 11).

Bakterie mogły wytwarzać azotyny nawet w temperaturze 74°C, lecz

szybkość wytwarzania była znacznie mniejsza niż w 70°C, a dalsza redukcja azotynów w wyższej temperaturze była znikoma.

Oznaczanie zdolności redukowania azotanów

Skoro całkowita redukcja azotanów i azotynów powoduje znikanie anionów, to ani pH, ani stężenie azotynów nie mogą być dobrą miarą aktywności bakterii.

Aktywność tę można uchwycić i porównać przez oznaczenie wzrostu stężenia azotynów w inkubowanej próbce po dodaniu azotanów (aby wytwarzanie azotynów nie było zahamowane niedoborem azotanów).

Tą metodą porównano aktywność bakterii w różnych miejscach aparatu dyfuzyjnego RT i w próbkach oczyszczonych soków. Do każdej

Tabela 12

Aktywność bakterii wytwarzających azotyny
w sokach

Próbka soku	Początkowe stężenie azotynów mg N/litr	Szybkość tworzenia azotynów mg N/litr na godz.
dyfuzja przedział 9	6,0	30
dyfuzja, przedział 5	18,0	44
sok cyrkulacyjny	14,0	4
sok dyfuzyjny	12,5	1
sok po II błotniarkach	13,0	0

próbki dodano 60 mg/100 ml azotanu sodowego, oznaczano początkowe stężenie azotynów i inkubowano w 65°C w ciągu około 45 minut (tab. 12).

Zdolność redukowania azotanów była znacznie większa w przedziałach bliższych czoła dyfuzora niż w soku cyrkulacyjnym, używanym do zaparzania krajanki, lub w soku dyfuzyjnym. Początkowe stężenie w przedziale 5 było wyższe niż w soku dyfuzyjnym.

Wyniki te wykazują analogię do krzywych stężenia kwasu mlekowego i zdolności jego wytwarzania w poszczególnych przedziałach aparatu dyfuzyjnego; prawdopodobnie bakterie łatwiej utrzymują się w stanie aktywnym w stałej temperaturze panującej wewnątrz dyfuzora niż w soku cyrkulacyjnym i dyfuzyjnym, których temperatura zmienia się raptownie. Większa zawartość azotynów w dyfuzorze jest tylko pozornie sprzeczna z niższą zawartością w wychodzącym soku dyfuzyjnym. W aparacie do dyfuzji przeciwprądowej może się w pewnej odległości od czoła wytworzyć stałe maksimum stężenia azotynów, ponieważ część ich płynie

w soku ku czołowi, dyfunduje do wnętrza krajanki idącej w przeciwnym kierunku i wraca do miejsca najwyższej aktywności. Również analogiczny ruch samych bakterii sprzyja wzmożeniu aktywności wewnątrz dyfuzora. Bliżej czoła sok napotyka świeżą krajankę, zawierającą mało azotanów i niosącą stosunkowo mało bakterii w stanie aktywnym, tak że azotyny dyfundują do wnętrza krajanki, a bakterie osadzają się na powierzchni; tym sposobem zmniejsza się stopień zakażenia soku dyfuzyjnego.

Tworzenie się azotanów w sokach oczyszczonych

Jak widać z tabeli 12, podczas inkubacji soku po saturacji II nie tworzyły się azotyny, co zresztą było do przewidzenia, biorąc pod uwagę warunki defekacji i filtracji nie sprzyjające aktywności bakterii. Często natomiast znajdowano w soku wchodzącym do wyparki zawartość azotanów wyższą o 1—2 mg/litr niż w soku po saturacji II, chociaż w tym punkcie schematu temperatura soku wynosiła 80°C. Dalszy wzrost stężenia azotanów, nieraz przekraczający 5 mg/litr, stwierdzono w soku rzadkim, który w temperaturze 80°C przechodził przez całowwą rurkę do pobierania próbek. Ponieważ w soku przechodzącym przez rurkę ilość powstających azotanów była większa niż w głównym strumieniu soku idącego do wyparki, nasunęło się podejrzenie, że wzrost zawartości azotanów był spowodowany obecnością bakterii na wewnętrznej ścianie rurki do pobierania próbek.

W czarnym osadzie zeszkobanym z wnętrza rurki można było przez mikroskop stwierdzić obecność wielu pałeczkowatych bakterii. Bakterie te szybko rozmnażały się w czasie inkubacji w soku rzadkim w temperaturze 80°C po dodaniu 0,2% azotanu sodowego. Za pomocą przesiewów stosowanych co 12—24 godz. utrzymywano na tej pożywce aktywne kultury całymi tygodniami w temperaturze 80 i 81°C (temperaturę mierzono w samej pożywce umieszczonej w termostacie). Pewien wzrost zaobserwowano również w 81,5°C; w wyższych temperaturach ciągłego wzrostu nie udało się utrzymać.

Pomimo stosunkowo bardzo wysokiej temperatury wzrost stężenia azotanów wynosił w ciągu 12 godzin często do 200 mg N/litr. W temperaturach 80 do 81°C wytwarzanie kwasu mlekowego i dalsza redukcja azotanów zanikały całkowicie.

Wydaje się, że w samym soku rzadkim bakterie nie mają możliwości rozmnażania się, ponieważ przepływ soku jest za szybki, mogą natomiast powstać kolonie na wewnętrznych powierzchniach rur i naczyń. Duży stosunek powierzchni do objętości w rurce do brania próbek sprzyjał większemu wzrostowi zawartości azotanów w tej rurce niż w głównym przewodzie soku rzadkiego.

Zwalczanie bakterii redukujących azotany w aparacie dyfuzyjnym

W sokach oczyszczonych zwalczanie tych bakterii może być łatwe: unikanie zastoju soku i utrzymywanie w razie potrzeby temperatury ponad 82°C. W aparatach dyfuzyjnych nie da się zapobiec ich działaniu przez samo tylko podniesienie temperatury, ponieważ bakterie są aktywne nawet w temperaturach 80 do 81°C; konieczne jest więc sięgnięcie do środków chemicznych. Porównano więc działanie szeregu odczynników.

Jako źródłem aktywnych bakterii redukujących azotany posłużono się próbką soku z 5 przedziału dyfuzji RT. W próbie ustalono za pomocą wodorotlenku sodowego pH = 6,3, aby uniknąć hamującego wpływu niskiego pH. Zawartość azotanów zwiększono dodatkiem 0,1% azotanu sodowego. Próbki soku inkubowano w 65°C po dodaniu wody chlorowej, formaldehydu lub azydku sodowego, rozrobionych w małej ilości soku. Zmiany stężenia azotynów przedstawia tabela 13.

Tabela 13

Zapobieganie tworzeniu się azotynów

Odczynnik	Stężenie mg/litr	Czas inkubacji w godzinach			
		0	0,5	1,0	2,5
		zawartość azotynów mg N/litr			
Próba kontrolna	0	7,5	38,0	42,0	40,0
40-procentowy formaldehyd	400	9,0	23,0	24,0	25,0
40-procentowy formaldehyd	200	10,2	33,0	38,5	43,0
chlor	200	7,0	6,7	6,5	6,5
chlor	100	7,5	7,7	8,0	7,5
chlor	50	8,5	9,0	9,0	9,0
azydek sodowy	100	7,1	1,1	1,0	0,9
azydek sodowy	50	9,3	1,0	0,7	0,7

Azydek sodowy bardzo skutecznie hamował powstawanie azotynów i oprócz tego rozkładał większość azotynów obecnych w soku. Inna rzecz, że azydek sodowy jest trujący i użycie go w cukrowni byłoby prawdopodobnie niemożliwe.

Dodatki formaldehydu w ilości 200 i 400 mg/litr nie zapobiegały wzrostowi zawartości azotynów w ciągu pierwszych 30 minut, jakkolwiek dawka 400 mg/litr wywierała pewien skutek.

Chlor, przeciwnie, już w ilości 50 mg/litr powodował natychmiastowy skutek hamujący. Ciągłe dodawanie chloru w ilości 50 mg/litr mogłoby zapobiegać powstawaniu azotynów w zbiornikach soku dyfuzyjnego i cyrkulacyjnego, gdzie chlor można dawać bezpośrednio u źródła infekcji.

W samym aparacie dyfuzyjnym RT, w którym nie ma bezpośredniego dostępu do wnętrza, konieczne jest przenoszenie odczynników bakterio-bójczych od końców aparatu. Może je przenosić strumień krajanki lub strumień soku, jednak chlor reaguje bardzo szybko z jego składnikami. Nawet po dużej dawce chloru (400 mg/litr), zupełnie unieszkodliwiającej bakterie, zawartość chloru była po 15 minutach zbyt mała, aby sok oparł się ponownemu zakażeniu.

Wydaje się więc, że z powodu nadmiernej aktywności chemicznej chloru nie można pośrednio przenosić jego działania ochronnego do niedostępnych części aparatu dyfuzyjnego.

Ochronny wpływ formaldehydu niewiele zmniejsza się po dłuższym kontakcie z sokiem, a działanie bakteriostatyczne jest możliwe do wykrycia nawet po 18 godzinach. Uderzeniowa dawka formaldehydu jest więc najodpowiedniejszym sposobem zahamowania redukcji azotanów w soku.

Powstawanie azotynów jest wskaźnikiem strat cukru w czasie dyfuzji, ponieważ towarzyszy mu przemiana sacharozy na kwas mlekowy dokonywana przez *B. stearothermophilus*. Chociaż marnowanie się dwutlenku siarki zachodzi nawet przy małych zawartościach azotynów, wytrącanie się imidodwusulfonianów może się zdarzyć tylko przy anormalnie dużych stężeniach azotynów, trwających tak długo, że imidodwusulfoniany nagromadzą się w klarówce III rzutu. Nie czekając więc na pokazanie się imidodwusulfonianu potasowego w mączkach należy zawczasu oznaczyć zawartość azotynów w sokach i przedsięwziąć kroki zapobiegające stratom cukru i marnotrawstwu dwutlenku siarki.