

Částečná mikrobiální denitrifikace při zvýšené teplotě

PARTIAL MICROBIAL DENITRIFICATION AT ELEVATED TEMPERATURE

Błaszczyc Ilona – Politechnika Łódzka, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Łódź, Polsko

Denitrifikace znamená přeměnu dusičnanu či dusitanu na plynné oxidy, jako je oxid dusnatý (NO) a oxid dusný (N₂O), které lze dále redukovat na molekulární dusík (N₂) (1, 2).

Celková denitrifikace je definována jako redukce dusičnanů (dusitanů) na molekulární dusík (3). Proces probíhá za přísně anaerobních podmínek. Částečná denitrifikace zahrnuje redukci dusičnanu na dusitan nebo na amoniak a probíhá za relativně anaerobních podmínek, tj. za přítomnosti malého množství kyslíku (4).

Schopnost provádět denitrifikaci má mnoho různých druhů bakterií a některých hub. Jsou přítomny v půdních mikroorganismech, z nichž bakterie *Bacillus* sp. a *Pseudomonas* sp. jsou největší skupinou. Denitrifikátory jsou většinou fakultativní anaeroby, které mohou během dýchání používat NO₃⁻ místo kyslíku jako akceptor elektronů, aby se vyrovnaly s prostředím s nízkým obsahem kyslíku nebo anaerobními podmínkami (5).

Při postupné redukci NO₃⁻ na N₂ jsou enzymy katalyzujícími reakce nitrátreduktáza, dusitanreduktáza, oxid dusnatý reduktáza, oxid dusný reduktáza (2). Když jsou denitrifikační bakterie v anaerobních podmínkách, reduktázy jsou dereprimovány za 40 minut až 3 hodiny (1).

Bylo zjištěno, že za účelem syntézy nitrátreduktázy je vhodnější postupné vyčerpání molekulárního kyslíku nebo poskytnutí určitého malého množství kyslíku na konstantní úrovni spíše než rychlý přechod do anaerobních podmínek (1). Při provádění experimentu v dávkových podmínkách dojde k postupnému vyčerpání molekulárního kyslíku v prostředí.

Rychlost procesu denitrifikace je úzce závislá na hodnotě pH prostředí, modelového nebo skutečného, ve kterém jsou denitrifikátory přítomny. Rychlost tohoto procesu se zvyšuje se zvyšující se hodnotou pH mezi 7,00 a 8,00 (6). Obecně platí, že jak snížení hodnoty pH prostředí, tak zvýšení koncentrace O₂ v něm, vede ke snížení rychlosti celkové denitrifikace (1).

Literární prameny ukazují na významnou teplotní závislost rychlosti denitrifikace ve studiích prováděných s půdou. Maximální rychlosti procesu denitrifikace bylo dosaženo v teplotním rozsahu 60–75 °C (7). Z přehledu literatury přitom vyplývá, že vliv zvýšené teploty z 50 na 70 °C na průběh denitrifikace byl prozkoumán mnohem méně než vliv nižší teploty od 10 do 35 °C. HOLLAS A KLAUSHOFER (8) navíc ukázali, že daný kmen může vyjadřovat různou schopnost redukovat dusičnany na dusitany v závislosti na teplotě.

Proces denitrifikace probíhá v široké škále prostředí, která hostí mikroorganismy schopné redukovat dusičnany nebo dusitany (9). Proces denitrifikace může nastat během skladování

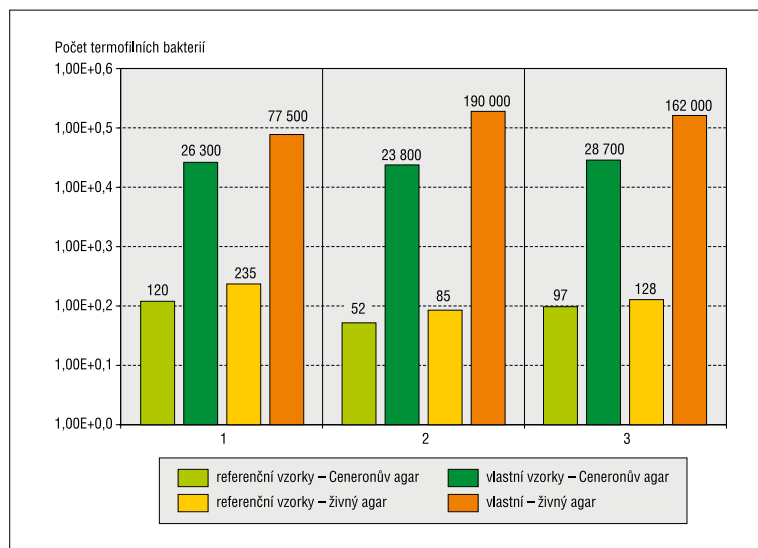
a zpracování potravin, což je v literatuře uváděno méně často. Například NABRZYSKI ET AL. (10) zjistili zvýšení obsahu dusitanů z 0,41 mg·kg⁻¹ na 108,80 mg·kg⁻¹ po 24 hodinách skladování čerstvé mrkvové šťávy při 18–20 °C. Autoři (10) také ukázali, že teplota v rozmezí 70–75 °C vedla k inaktivaci enzymů redukcujících dusičnany a enzymů odpovědných za další přeměny dusitanů.

K mikrobiální přeměně dusičnanu na dusitan může dojít také při výrobě cukru z cukrové řepy a zejména při procesu extrakce sacharosy. Přítomnost dusitanu v surové šťávě získané extrakcí sacharosy z cukrové řepy není žádoucí. Dusitan může reagovat s oxidem siřičitým za vzniku kyseliny imidodisulfonové (11), která reakcí s draslíkem vytváří těžko rozpustnou sůl – imidodisulfonát draselný (12). Tato sloučenina může zhoršit kvalitu hotového produktu, protože může kokrystalizovat, což významně zvyšuje množství popela. Dusitany mohou přecházet do vedlejších produktů procesu výroby cukru, jako je melasa, která se používá v krmných produktech a při destilaci.

Proces extrakce sacharosy z řízku se provádí při zvýšené teplotě, a proto je rozumné studovat vliv tepelné úpravy na mikroflóru přirozeně se vyskytující na povrchu cukrové řepy. Zdrojem mikroorganismů vstupujících do procesu extrakce na povrchu cukrové řepy je půda, ve které roste.



Obr. 1. Počet termofilních bakterií ve směsi inkubované při 60 °C



Dobré rozpoznání vlivu zvýšené teploty používané při zpracování potravin na termofilní mikroorganismy obývající zpracované rostlinné suroviny, např. v kontextu jejich schopnosti přeměnit dusičnan na dusitan, je základem pro rozhodování o opatřeních inhibovat jejich nepříznivou aktivitu.

Mikrobiální denitrifikace probíhající při extrakci sacharosy z cukrové řepy ji negativně ovlivňuje. Na druhou stranu však lze vliv částečné denitrifikace využít pro hodnocení mikrobiologického stavu obsahu extraktoru. V procesu výroby cukru může být obsah dusitanů v surové šťávě odebrané z extraktoru za průmyslových podmínek jedním z parametrů zvolených pro řízení extrakčního procesu v souvislosti s mikrobiální aktivitou. Obsah dusitanů 0,001–0,002 % je považován za příznak významné kontaminace surové šťávy v extraktoru (13).

V literatuře chybí popis korelace mezi mikrobiálním stavem prostředí obsahujícího přirozenou mikroflóru sídlící na povrchu cukrové řepy a obsahem dusitanů vyplývajícím z mikrobiální redukce dusičnanů při zvýšené teplotě. Výsledky laboratorních analýz budou z hlediska této korelace užitečné mimo jiné pro interpretaci údajů o obsahu dusitanů v surové šťávě, odebrané při extrakci sacharosy v průmyslových podmínkách.

Na základě literární rešerše bylo zjištěno, že studie zabývající se částečnou denitrifikací za zvýšené teploty, prováděné mikroorganismy obývajících rostlinné suroviny pro výrobu potravin, jsou ve výrazné menšině. Mikroflóra přítomná na povrchu cukrové řepy, určené ke zpracování, má významný vliv na způsob provádění jednotlivých fází technologického procesu a na kvalitu vyrobeného cukru. Data získaná během laboratorních studií mohou přispět k optimalizaci podmínek jednotkového procesu.

Cílem laboratorní studie bylo zjistit mikrobiální účinnost přeměny dusičnanu na dusitan, při zvýšené teplotě v rozmezí 50–70 °C, v důsledku aktivity termofilních mikroorganismů pocházejících z povrchu cukrové řepy.

Materiál a metody

Výzkumný materiál sestával z cukrové řepy sklizené z pole ve středním Polsku, která byla poté skladována v chladírenských podmínkách při 6 °C. Pro testování byla surovina rozdrcena a poté

smíchána se sterilní destilovanou vodou v hmotnostním poměru 2 : 3. Pro každý jednotlivý experiment byly připraveny čtyři vzorky: dva jako referenční vzorky a dva vlastní vzorky. Vzorky byly poté inkubovány při 50 °C, 60 °C nebo 70 °C za statických podmínek. Tepelná inkubace směsi byla prováděna s omezeným množstvím kyslíku.

Referenční vzorky byly inkubovány po dobu jedné hodiny, zatímco vlastní vzorky byly inkubovány po dobu čtyř hodin při nastavené teplotě. Po stanovené době tepelné inkubace byla směs ochlazena a poté z ní byla slita šťáva. Surová šťáva získaná v laboratorních podmínkách byla podrobena mikrobiologickému rozboru stanovením počtu termofilních bakterií, hodnoty pH a obsahu dusitanů.

Pro stanovení celkového počtu termofilních bakterií byly použity dva typy mikrobiologických médií: Cameronův agar (médium č. 1) a živný agar (médium č. 2). Cameronovo médium sestávalo z peptonu K, glukosy, bromokresolpurpuru a agaru. Živné agarové médium naproti tomu obsahovalo: pepton, masový

extrakt, agar. Test sestával z kvantitativní kultivace za použití Kochovy plotnové metody. Misky (plotny) byly inkubovány po dobu 48 h při 55 °C. Experimentální výsledky byly uvedeny jako jednotky tvořící kolonie (CFU) na mililitr analyzovaného média.

Obsah dusitanů v odebrané surové šťávě byl stanoven pomocí Griess-Romijova činidla sestávajícího z α -naftylaminu, kyseliny sulfanilové a kyseliny vinné. Na základě zbarvení šťávy v přítomnosti činidla Griess-Romija byl obsah dusitanů odečten z tabulky přiložené k analytické metodě (14). Nejnižší obsah dusitanů, který lze stanovit pomocí činidla Griess-Romija, je 0,16 mg·l⁻¹. Metoda umožňuje velmi rychle získat výsledek obsahu dusitanů, ale tuto hodnotu lze určit pouze přibližně.

Výsledky a diskuse

Laboratorní studie diskutované v tomto článku i vlastní procesní fáze, jako je extrakce sacharosy z cukrové řepy, zahrnují aktivitu směsi mikroorganismů s různým stupněm citlivosti na tepelné podmínky. Mikroorganismy přítomné v médiu připraveném v laboratorních podmínkách byly vystaveny různým teplotám v rozmezí 50–70 °C. Na základě morfologických charakteristik kolonií pěstovaných na mikrobiologickém médiu bylo zjištěno, že převládající termofilní mikroflóra přítomná v připravené směsi a schopná růstu na použitém médiu se mění spolu se změnou teploty použité pro inkubaci. Termofilní mikroorganismy patřící k různým druhům, jako jsou produkující nebo neprodukující kyseliny, se množí ve studovaném teplotním rozsahu. V závislosti na mikroflóře, která ve směsi dominuje, se mění zjitelné účinky jejích aktivit, jako jsou přeměny dusičnanů. V průmyslových podmínkách je médium také vystaveno časově proměnlivé teplotě, aby se znovu zahřálo na optimální teplotu pro konkrétní fázi procesu, a poté se na této teplotě udržuje po určitou dobu.

Do směsi byly vneseny termofilní bakterie spolu s tkání drcené cukrové řepy. Počáteční množství termofilních bakterií přítomných v testovaném prostředí a pěstovaných na použitém mikrobiologickém médiu se pohybovalo od 5,20 × 10¹ CFU·ml⁻¹ do 3,27 × 10² CFU·ml⁻¹. Počáteční hodnota pH připravené směsi byla v rozmezí 6,40–6,49, po čtyřhodinové tepelné regulaci pak 6,47–6,25.

Po 240 minutách inkubace (50–70 °C) směsi v experimentálních laboratorních podmínkách se téměř vždy v různé míře zvýšil počet termofilních bakterií. Uchovávání směsi napečené řepy s destilovanou vodou umožnilo množení půdních termofilních bakterií, zvláště intenzivně při 50–60 °C. Výsledky nárůstu jejich počtu jsou uvedeny na obr. 1. až 3.

Když byla směs nakrájené cukrové řepy a destilované vody tepelně inkubována při 60 °C, došlo k výraznému nárůstu počtu termofilních bakterií bez ohledu na použité mikrobiální médium, Cameronův nebo živný agar. Pro teplotu 60 °C byl experiment třikrát opakován. Počet termofilních bakterií přítomných v testovaném systému (směsi) po 4h inkubaci při 60 °C se pohyboval od $2,38 \times 10^4$ do $1,9 \times 10^5$ CFU·ml⁻¹.

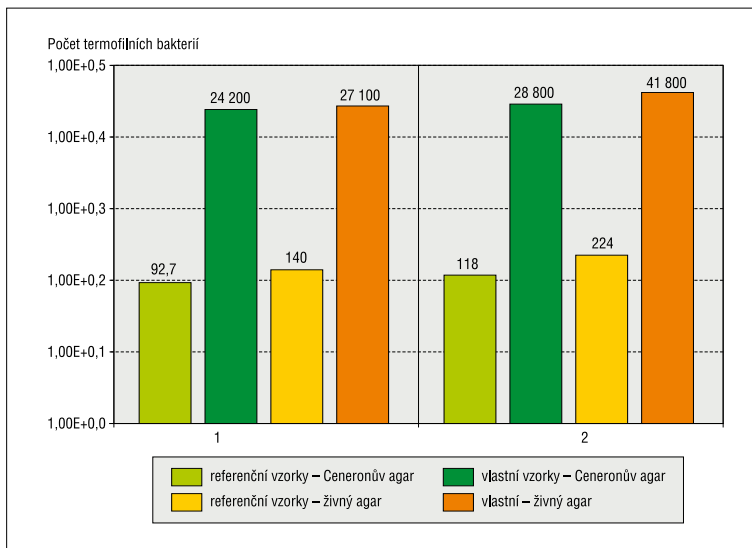
V konečném bodě měření pro 60 °C byl v živném agaru vždy nalezen vyšší počet termofilních bakterií schopných růstu než v Cameronově agaru (obr. 1.). Mezi všemi analyzovanými variantami byly nejvyšší hladiny termofilních bakterií získány v místě konečného měření právě pro 60 °C a se živným agarem (obr. 1. až 3.). Počet termofilních bakterií rostoucích na živném agaru byl $1,62–1,90 \times 10^5$ CFU·ml⁻¹. Při hodnocení mikrobiálního stavu prostředí na přítomnost termofilních bakterií, zejména v procesu extrakce sacharosy z cukrové řepy, je rozumné použít různá růstová média, jako je Cameron a živný agar.

Počet bakterií získaný ve studii (60 °C) ukazuje na koexistenci termofilních mikroorganismů přítomných ve směsi drcené cukrové řepy a destilované vody. Na základě vyhodnocení morfologie pěstovaných kolonií lze usoudit, že mikroorganismy pěstované v různých médiích (Cameronův či živný agar) představovaly různé druhy. Rozdíly mezi vyrostlými koloniemi vyplývající z použití různých mikrobiologických médií, ale zároveň jejich morfologická homogenita na dané misce, byly zvláště patrné u vzorků vyocovaných po delší inkubaci směsi při 60 a 70 °C. Obecně byla pro tyto tepelné podmínky pozorována jasná dominance termofilních bakterií dvou druhů v populaci studovaného prostředí, které se množily současně.

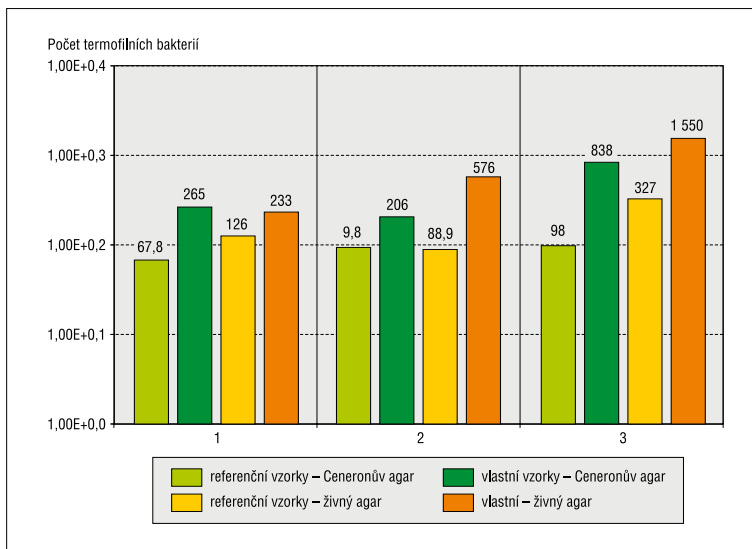
Při stanovení celkového počtu termofilních bakterií v potravinách se často používá Cameronovo médium. Na základě získaných výsledků lze usoudit, že v některých případech je rozumné hodnotit mikrobiální stav prostředí z hlediska počtu termofilních bakterií pomocí mikrobiologických médií různého chemického složení. To umožňuje lépe rozpoznat mikrobiologický stav suroviny, meziproductu nebo hotového výrobku při zpracování potravin. Na podporu tohoto tvrzení lze zvláště uvést dvě replikace provedené pro 60 °C, tj. druhé a třetí (obr. 1.). Rozdíl v počtu termofilních bakterií v konečném bodě měření dosáhl mezi použitými mikrobiálními médii téměř jednoho řádu. Počet termofilních bakterií ve směsi po čtyřech hodinách inkubace byl $2,38 \times 10^4$ CFU·ml⁻¹ v médiu Cameron a $1,90 \times 10^5$ CFU·ml⁻¹ v živném agaru (opakování 2).

Autoři publikací se zabývají identifikací mikroorganismů kolonizujících cukr jako hotový produkt a vedlejšími produkty vzniklými při jeho výrobě, jako jsou vyslazené řízky a melasa (15) a také identifikací mikroorganismů izolovaných ze surové šťávy (16). Ze surové šťávy bylo izolováno mnoho kmenů bakterií

Obr. 2. Počet termofilních bakterií ve směsi inkubované při 50 °C



Obr. 3. Počet termofilních bakterií ve směsi inkubované při 70 °C



patřících do rodu *Bacillus*, včetně *Lysinibacillus sphaericus*, *Geobacillus thermode-nitrificans* (16) a *Bacillus coagulans*, *Geobacillus stearothermophilus* (8). Chybí však údaje o interakcích mezi termofilními mikroorganismy za zvýšených teplot při extrakci sacharosy z cukrové řepy.

V případě studií prováděných při 60 °C bylo důsledkem významné změny v počtu termofilních bakterií dramatické zvýšení koncentrace dusitanu ve směsi na úroveň v rozmezí asi 32–82 mg·l⁻¹. Takto vysoký obsah dusitanů byl získán za průmyslových podmínek. EMERSTORFER ET AL. (17) uvedli obsah dusitanů asi 70 mg·l⁻¹ ve šťávě z vařáku při provádění extrakce bez dezinfekčního prostředku.

Akumulace dusitanů v prostředí na úrovních 32–82 mg·l⁻¹ může naznačovat zvýšení počtu termofilních bakterií o dva až tři řády. Žádný dusitan nebyl zaznamenán ve slepých vzorcích na základě barvy šťávy v přítomnosti činidla Griess-Romija. Vysoká koncentrace dusitanů ve směsi získané při 60 °C byla největším zvýšením množství těchto iontů, které bylo během popsáných experimentů zaznamenáno. Nárůst počtu termofilních bakterií

v rozmezí dvou až tří řádů tedy může mít za následek výrazné zvýšení obsahu dusitanů.

Snížení inkubační teploty na 50 °C mělo významný vliv na změnu průběhu mikrobiální částečné denitrifikace probíhající ve studovaném systému (směsi). Když byla směs tepelně inkubována při 50 °C tak počet termofilních bakterií v místě konečného měření vzrostl nejméně o dva řády, ve srovnání s počáteční úrovní, bez ohledu na použité mikrobiologické médium (obr. 2.). Při inkubaci směsi při 50 °C po dobu čtyř hodin se počet termofilních bakterií nikdy nezvýšil o tři řády, jako když byla směs tepelně inkubována při 60 °C.

Udržování směsi při 50 °C vedlo k významné změně v počtu termofilních bakterií. Avšak při této nejnižší teplotě použité ve studii, navzdory významnému zvýšení počtu termofilních bakterií, když byla směs udržována, směs nevykazovala tak významný nárůst koncentrace dusitanů jako při tepelné inkubaci při 60 °C. Koncentrace dusitanů v testovacím médiu vzrostla pouze na hodnotu asi 1,62 mg·l⁻¹ po čtyřech hodinách inkubace. V žádném z analyzovaných případů nebyl v místě počátečního měření zaznamenán žádný dusitan. Výrazné zvýšení počtu termofilních bakterií ve směsi drcené cukrové řepy s destilovanou vodou, při tepelné regulaci na 50 °C, proto mělo za následek prakticky zanedbatelnou změnu jejího obsahu dusitanů.

Vezmeme-li v úvahu konečné body měření pro 50 a 60 °C, rozdíl v obsahu dusitanů ve směsi byl kolosální. Použití nižší teploty vedlo k inhibici přeměny dusičnanu na dusitan prováděné termofilními půdními bakteriemi přítomnými v testované směsi. Vizuální hodnocení kolonií vyrostlých v médiu Cameron, naočkovanych ze vzorků po prodloužené tepelné inkubaci (50 °C), odhalilo nárůst jiných mikroorganismů ve srovnání s plotnami nasazenými po inkubaci směsi při 60 °C. Byly provedeny dva nepřímé testy na množství dusitanů, zatímco směs byla udržována při zvýšené teplotě. V mezitestech stanovené množství dusitanů nepřesáhlo konečnou získanou hodnotu dusitanů. Na základě výsledků mezitestů lze vyloučit výskyt totální denitrifikace během inkubace směsi. Denitrifikační aktivita půdních termofilních bakterií byla úzce závislá na teplotě. Během inkubace směsi při 50 °C s omezeným množstvím kyslíku došlo k proliferaci zejména mikroorganismů nevykazující schopnost provádět částečnou denitrifikaci.

Na základě získaných výsledků počtu termofilních bakterií a obsahu dusitanů ve směsi po její dlouhodobé inkubaci lze usoudit, že hodnocení mikrobiologického stavu obsahu extraktoru při procesu extrakce sacharosy z cukrové řepy nelze založit pouze na kontrole jediného parametru vyplývajícího z biochemické aktivity mikroorganismů, kterým je dusitan. S přihlédnutím k obsahu dusitanů je dokonce možné učinit mylný závěr o mikrobiologickém stavu obsahu extraktoru, protože stanovení malého množství dusitanů nemusí nutně znamenat konstantní počet termofilních bakterií. Úroveň koncentrace dusitanů navíc ukazuje na aktivitu termofilních denitrifikátorů v průběhu extrakčního procesu, nejen v samotném extraktoru. V průmyslové praxi závisí obsah dusitanů v surové šťávě na aktivitě denitrifikátorů za daných podmínek, obsahu těchto iontů v řízcích a ve vodě z lisu buničiny přiváděné do extraktoru. Nižší inkubační teplota použitá pro testovanou směs může souviset s podmínkami konkrétní fáze vlastního technologického procesu, např. ohřev prostředí na optimální teplotu, snížení teploty mezi jednotlivými fázemi nebo prostoje v procesu.

Nejvyšší teplota použitá ve studii k inkubaci nakrájené cukrové řepy s destilovanou vodou byla 70 °C. Pokud s inkubací

směsi při 70 °C byl opakován třikrát (obr. 3.). Při této teplotě v žádném případě nedosáhl nárůst počtu termofilních bakterií řádu jednoho řádu. Ojedinele se vyskytly i případy, kdy při delší inkubaci směsi připravené z drcené cukrové řepy a destilované vody zůstal počet termofilních bakterií prakticky nezměněn. Například počet termofilních bakterií byl zpočátku 1,26 × 10² CFU·ml⁻¹ (70 °C, opakování 1, živný agar) nebo 9,38 × 10¹ CFU·ml⁻¹ (70 °C, opakování 2, Cameronův agar). Po 240 min tepelné inkubace směsi byly stanoveny podobné počty termofilních bakterií na 2,33 × 10² CFU·ml⁻¹ a 2,06 × 10² CFU·ml⁻¹. Použití vyšší teploty evidentně snížilo proliferaci termofilních bakterií z povrchu cukrové řepy. Změna obsahu dusitanů během inkubačního procesu směsi byla opět malá. Po čtyřech hodinách inkubace byly stanoveny koncentrace dusitanů v rozmezí 0,33–1,66 mg·l⁻¹.

Při procesu extrakce sacharosy z kvalitní cukrové řepy v extraktoru se obvykle používá teplota blízká 70 °C. Teplota při provádění extrakčního procesu může být snížena v případě zpracování řepy zhoršené kvality. Na základě získaných výsledků lze usoudit, že v případě teplomilných bakterií pocházejících přímo z půdy teplota 70 °C inhibuje jejich množení.

Při analýze korelace mezi počtem termofilních bakterií a obsahem dusitanů ve směsi je nutné vzít v úvahu dostupnost molekulárního kyslíku, jehož nedostatek je jedním z faktorů určujících výskyt částečné denitrifikace. Za podmínek omezeného molekulárního kyslíku při 50 a 70 °C došlo k inhibici mikrobiální částečné denitrifikace prováděné půdními termofilními bakteriemi.

Závěr

Na základě experimentů došlo k významnému nárůstu počtu termofilních bakterií (o dva až tři řády), přítomných ve směsi drcené cukrové řepy s destilovanou vodou, po čtyřech hodinách inkubace při teplotě 50–60 °C s použitím dvou růstových médií (Cameronův agar nebo živný agar). S ohledem na celý testovaný teplotní rozsah (50–70 °C) převyšoval počet termofilních bakterií v místě konečného měření v různé míře převyšoval původní počet. Obecně platí, že teplota 70 °C inhibuje proliferaci termofilních bakterií z povrchu cukrové řepy.

Optimální teplota pro množení termofilních bakterií je v širším rozmezí (50–60 °C) než optimální teplota (60 °C) pro přeměnu dusičnanu na dusitan v prostředí s omezeným množstvím kyslíku.

Výrazné zvýšení počtu termofilních mikroorganismů při 50 °C neovlivnilo zvýšení koncentrace dusitanů v testovaném prostředí. Účinnost mikrobiální přeměny dusičnanu na dusitan závisí na zvýšené hodnotě teploty. Studie zjistila, že optimální teplota pro uskutečnění výše uvedené transformace je 60 °C. Teplota o 10 °C nižší nebo vyšší způsobila inhibici redukce dusičnanů. Pokud je teplota v extraktoru 70 °C, a to je doporučená teplota, může být inhibována přeměna dusičnanů na dusitany, ke které dochází v důsledku mikroorganismů přicházejících přímo z půdy.

Byla zjištěna existence symbiózy mezi různými druhy půdních termofilních bakterií ve směsi drcené cukrové řepy a destilované vody, udržované při zvýšené teplotě a rostoucí na Cameronově nebo živném agaru.

Výsledky korelační analýzy mezi mikrobiálním stavem testovaného prostředí a obsahem dusitanů v něm jsou užitečné pro ověření implementačních parametrů procesu extrakce sacharosy a množstvím dusitanů, přítomných v surové šťávě.

Souhrn

Cílem laboratorní studie bylo zjistit mikrobiální účinnost přeměny dusičnanu na dusitan, při zvýšené teplotě v rozmezí 50–70 °C, v důsledku aktivity termofilních mikroorganismů pocházejících z povrchu cukrové řepy.

Za podmínek omezeného molekulárního kyslíku při 50 a 70 °C dochází k inhibici mikrobiální částečné denitrifikace, prováděné půdními termofilními bakteriemi. Optimální teplota pro množení termofilních bakterií je v širším rozmezí (50–60 °C) než je optimální teplota (60 °C) pro přeměnu dusičnanu na dusitan v prostředí s omezeným množstvím kyslíku. Na základě získaných výsledků lze usoudit, že u teplomilných bakterií pocházejících přímo z půdy teplota 70 °C brzdí jejich množení.

Byla zjištěna existence symbiózy mezi různými druhy půdních termofilních bakterií ve směsi drčené cukrové řepy a destilované vody, udržované při zvýšené teplotě, rostoucí na Cameronově nebo živném agaru. Při hodnocení mikrobiálního stavu prostředí na přítomnost termofilních bakterií, zejména v procesu extrakce sacharosy z cukrové řepy, je rozumné použít různá růstová média, jako je Cameronovo a živné médium.

Klíčová slova: mikrobiální denitrifikace, termofilní bakterie, extrakce sacharosy.

Literatura

- KNOWLES, R.: Denitrification. *Microbiol. Rev.*, 46, 1982 (1), s. 43–70.
- OLAYA-ABRIL, A. ET. AL.: Exploring the denitrification proteome of *Paracoccus denitrificans* PD1222. *Front. Microbiol.*, 2018, 29:9:1137. eCollection. doi: 10.3389/fmicb.2018.01137.
- MARKS, W. R. ET. AL.: Complete denitrification of nitrate and nitrite to N₂ gas by samarium(II) iodide. *CbemComm.*, 56, 2020 (77), s. 11441–11444.
- PAŠMIŃKA, I.: *Microbiological transformation of soil nitrogen*. Publisher LAP LAMBERT Academic Publishing, 2019.
- BESCHKOV, V. ET. AL.: Bacterial denitrification of waste water stimulated by constant electric field. *Biochem. Eng. J.*, 17, 2004 (2), s. 141–145.
- MÜLLER, M. M.; SUNDMAN, V.; SKUJINŠ, J.: Denitrification in low pH spodosols and peats determined with the acetylene inhibition method. *Appl. Environ. Microbiol.*, 40, 1980 (2), s. 235–239.
- KEENEY, D. R.; FILLERY, I. R.; MARX, G. P.: Effect of temperature on the gaseous nitrogen products of denitrification in a silt loam soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 43, 1979 (6), s. 1124–1128.
- HOLLAUS, F.; KLAUSHOFER, H.: Identification of hyperthermophilic obligate anaerobic bacteria from extraction juices of beet sugar factories. *Int. Sugar. J.*, 75, 1973 (897), s. 271–275.
- TORRENTÓ, C. ET. AL.: Denitrification of groundwater with pyrite and *Thiobacillus denitrificans*. *Cbem. Geol.*, 278, 2010 (1–2), s. 80–91.
- NABRZYSKI, M.; GAJEWSKA, R.; BOSSY, G.: Changes of the levels of nitrates and nitrites in vegetables and vegetable products and vitamin C in white sauerkraut. *Annals of the National Institute of Hygiene*, 40, 1989 (3), s. 198–207 (in Polish).
- VAN DER POEL, P. W.; SCHIWECK, H.; SCHWARTZ, T.: *Sugar Technology: beet and cane sugar manufacture*. Berlin: Verlag Dr. A. Bartens, 1998.
- MAGNE, V.; MATHLOUTHI, M.; ROBILAND, B.: Determination of some organic acids and inorganic anions in beet sugar by ionic HPLC. *Food Chem.*, 61, 1998 (4), s. 449–453.
- KOSTIČOVÁ, M.; GÜLLOVÁ, L.; DANDÁR, A.: Evaluation of analytical methods of microbial activity during sucrose extraction from sugar beet. *Food Sci. Technol. Qual. Supp.*, 11 2004 (3), s. 137–147.
- BUTWIŁOWICZ, A.: *Analytical methods of production control in sugar factories*. Warsaw: SGGW Development Foundation, 1997 (in Polish).
- KOWALSKA, M.; MAŁCZAK, E.: Identification of microorganisms occurred in sugar, molasses and pressed and dried sugar beet pulp. *Adv. Sci. Technol. Agric. Food Ind.*, 71, 2016 (4), s. 46–58 (in Polish).
- MANACHINI, P. L. ET. AL.: *Bacillus thermodenitrificans* sp. nov., nom. rev. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 2000 (3), s. 1331–1337.
- EMERSTORFER, F. ET. AL.: Investigation of nitrite pathways in sugar beet extraction. *Sugar Ind.*, 139, 2014 (10), s. 626–635.

Obr. 4. Bakteriální kolonie narostlé na plotně s živnou půdou



Błaszczyk I.: Partial Microbial Denitrification at Elevated Temperature

The aim of the laboratory study was to determine the microbial efficiency of the conversion of nitrate (V) to nitrate (III) at elevated temperature ranging from 50 to 70 °C as a result of the activity of thermophilic microorganisms derived from the surface of sugar beet. Under conditions of limited molecular oxygen at 50 and 70 °C, inhibition of microbial partial denitrification occurs caused by soil-derived thermophilic bacteria. The optimal temperature for the proliferation of thermophilic bacteria is within a wider range (50–60 °C) than the optimal temperature (60 °C) for the conversion of nitrate (V) to nitrate (III) in an oxygen-limited environment. Based on the results obtained, it can be concluded that in the case of thermophilic bacteria originating directly from the soil, the temperature of 70 °C inhibits their proliferation.

Symbiosis was found to exist between different species of soil-derived thermophilic bacteria in a mixture of shredded sugar beet and distilled water maintained at elevated temperature growing on Cameron or broth agar. When evaluating the microbial state of the environment for the presence of thermophilic bacteria, especially in the process of sucrose extraction from sugar beet, it is reasonable to use different growth media, such as Cameron and broth media.

Key words: microbial denitrification, thermophilic bacteria, sucrose extraction.

Kontaktní adresa – Contact address:

Dr Inž. Ilona Błaszczyk, Lodz University of Technology, Department of Sugar Industry and Food Safety Management, Wólczarnańska 171/173, 90-530 Łódź, Poland, e-mail: ilona.blaszczyk@p.lodz.pl