

**DIE ONDERSOEK NA SPESIFIEKE BAKTERIEGROEPE IN DIE
FESES VAN GESELEKTEERDE PROEFPERSONE**

Deidré Fourie

B.Sc.

B.Sc (Honns.)

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die graad Magister Scientiae in die Departement Mikrobiologie aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Leier:

Dr. H.A. Esterhuysen

POTCHEFSTROOM

1991

INHOUDSOPGAWE

OPSOMMING

ABSTRACT

BEDANKINGS

HOOFSUK 1	1
Inleiding	1
1.1 Die normale mikroorganismes in die spysverteringskanaal	1
1.1.1 Intestinale gas	4
1.2 Metaanproduserende bakterieë (metanogene) in die spysverteringskanaal van mense	4
1.2.1 Sintese van metaan	7
1.2.2 Koënsieme van metanogene	8
1.2.2.1 Koënsiem F ₄₂₀	9
1.2.2.2 Koënsiem F ₄₃₀	10
1.2.2.3 Metanofuraan (CO ₂ reduksiefaktor)	11
1.2.2.4 Metanopterien	11
1.2.2.5 Koënsiem M (KoM)	12
1.2.2.6 Komponent B	12
1.2.3 Outotrofie by metanogene	14
1.2.4 Die sintese van metaan vanaf metielverbindinge en asetaat	15
1.2.5 Isolasië van metaanvormende bakterieë	16
1.3 Die voorkoms van laktobasille in die spysverteringskanaal van mense en diere	17
1.3.1 Homo- en heterofermentasië	19

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

1.4 Die teenwoordigheid van sulfaatreducerende bakterieë in die spysverteringskanaal van mense	21
DOELSTELLINGS	26
HOOFSTUK 2	27
Benodigdhede en Metodes	27
2.1 Proefpersone	27
2.2 Versameling en hantering van die fesesmonsters	27
2.2.1 Gemodifieërde verdunningsvloeistof	28
2.2.2 Redoksindikator	28
2.2.3 Reduseermiddel	29
2.3 Bereiding van verdunnings van die monsters	29
2.4 Tellings van verskillende bakteriegroepe	30
2.4.1 Totale aantal aërobe bakterieë	30
2.4.1.1 Rumenvloeistof	30
2.4.1.2 Anaërobe slykekstrak	31
2.4.2 Totale aantal anaërobe bakterieë	31
2.4.3 Bepaling van die totale aantal enterobakterieë	32
2.4.4 Totale aantal laktobasille	32
2.4.5 Totale aantal metaanvormende bakterieë	32
2.4.6 Bepaling van die totale aantal sulfaatreducerende bakterieë	33
2.5 Isolاسie en identifikasie van spesifieke bakteriegroepe	34
2.5.1 Die laktobasille	34

INHOUDSOPGAWE (vervolg)

2.5.1.1	Isolasie van die laktobasille	34
2.5.1.2	Identifikasie van die laktobasille	34
2.5.1.2.1	Suur- en gasvorming vanaf glukose	34
2.5.1.2.2	Vermoë om te groei by 45°C en 15°C	35
2.5.1.2.3	Suurvorming vanaf ribose	35
2.5.1.2.4	Suurvorming vanaf koolhidrate	35
2.5.1.2.5	Hidrolise van eskulien	36
2.5.1.2.6	Vorming van ammoniak vanaf arginien	36
2.5.1.2.7	Fruktose-6-P-fosfoketolase	36
2.5.2	Die metaanvormende bakterieë	36
2.5.2.1	Isolasie en bevestiging van metaanvormende bakterieë	36
2.5.3	Die sulfaatreducerende bakterieë	37
2.5.3.1	Isolasie van sulfaatreducerende bakterieë	37
	HOOFSTUK 3	38
	Resultate en bespreking	38
3.1	Totale tellings van die spesifieke bakteriegroepe	38
3.1.1	Resultate	38
3.1.1.1	Totale aantal aërobe bakterieë	38
3.1.1.2	Totale aantal anaërobe bakterieë	38
3.1.1.3	Totale aantal enterobakterieë	39
3.1.1.4	Totale aantal laktobasille	39

INHOUDSOPGAWWE (vervolg)

3.1.1.5	Totale aantal metaanvormende bakterieë	40
3.1.1.6	Totale aantal sulfaatreducerende bakterieë	41
3.1.1.7	Voorkoms van die verskillende bakteriegroepe	41
3.1.2	Bespreking	42
3.2	Die isolasie en identifikasie van die <i>Lactobacillus</i> -isolate	44
3.2.1	Resultate	44
3.2.1.1	Koloniemorfologie van die <i>Lactobacillus</i> -isolate	44
3.2.1.2	Fenotipiese eienskappe en identifikasie van die <i>Lactobacillus</i> -isolate	46
3.2.2	Bespreking	48
3.3	Die bevestiging van moontlike metaanvormende bakterieë	49
3.3.1	Resultate	49
3.3.1.1	Die bevestiging vir die teenwoordigheid van metaangas by die verskillende proefpersone, deur gaschromatografie	49
3.3.1.2	Die morfologiese karakter van die moontlike metaanvormende isolate	53
3.3.2	Bespreking	53
HOOFSTUK 4	55
Gevolgtrekking	55
BIBLIOGRAFIE	57

OPSOMMING

Mikroorganismes vervul 'n belangrike rol in die spysverteringskanaal van mense. Dié mikroorganismes is hoofsaaklik aërobe en anaërobe organismes. Hierdie studie was tot die isolasie en kweking van sekere bakteriegroepe wat in die spysverteringskanaal voorkom beperk.

Die feses van agt proefpersone is ondersoek vir die teenwoordigheid van die volgende bakteriegroepe, viz., laktobasille, metaanproduserende- en sulfaatreduserende bakterieë. Totale aërobe en anaërobe tellings, sowel as die aantal enterobakterieë is ook bepaal. Dié bakterieë is met behulp van verskillende isolasiemediums kwantitatief bepaal. Die laktobasille, metanogene en sulfaatreduserende bakterieë is verder met verskillende fenotipiese toetse geïdentifiseer en geklassifiseer. Kwantitatiewe analyses het getoon dat die gemiddelde samestelling van die bakteriese populasies by verskillende proefpersone verskil. Die totale persentasie van die anaërobes was 97,96%, terwyl slegs 2,04% aërobe en fakultatief anaërobe bakterieë was.

Vyftig *Lactobacillus*-isolate is by die proefpersone geïsoleer, waarvan 64% as *Lactobacillus plantarum*, 24% as *L. casei*, 8% as *L. acidophilus* en 4% as *L. salivarius* subspesie *salivarius* geïdentifiseer was.

Metaangas is by meeste van die proefpersone met gaschromatografiese analise bevestig. Anaërobe isolasie van metanogene is suksesvol in die laboratorium uitgevoer. Identifikasie van metanogene was beperk, maar dit wil voorkom asof al die isolate tot die genus *Methanobrevibacter* behoort. Dié organismes word gekenmerk deur die gebruik van asetaat as sellulêre koolstofbron.

Geen sulfaatreduserende bakterieë is vanuit die feses geïsoleer nie, wat bevestig dat metanogene en sulfaatreduserende bakterieë in dieselfde ekologiese nis vir beskikbare substrate kompeteer.

AN INVESTIGATION FOR THE PRESENCE OF SPECIFIC BACTERIAL GROUPS IN HUMAN FAECES.

ABSTRACT

Micro-organisms play an important role in the gastrointestinal tract of humans. These organisms are mainly aerobic and anaerobic bacteria. This study was limited to the isolation and cultivation of specific groups of bacteria in the human gastrointestinal tract.

Eight faecal samples were examined for the presence of the following bacteria, viz., lactobacilli, methane producing- and sulphate reducing bacteria. Total aerobic and anaerobic counts as well as the number of enterobacteria were determined. These bacteria were quantified employing different isolation media. The lactobacilli, methane producing- and sulphate reducing bacteria were identified and classified using different phenotypic tests. Quantitative analyses revealed that the composition of the bacterial populations differ from person to person. The total percentage anaerobes was 97,96%, while 2,04% were anaerobic and facultative anaerobic bacteria.

Of the fifty *Lactobacillus* isolates that were isolated, 64% were identified as *L. plantarum*, 24% as *L. casei*, 8% as *L. acidophilus* and 4% as *L. salivarius* subspecies *salivarius*. These organisms characteristically use acetate as cellular carbon source.

Gaschromatographic analyses were done on the methane producing bacteria to confirm the presence of methane. Methane was detected in most of the faecal samples. Anaerobic isolation of methane producing bacteria in the laboratory was successful. A limited number of methanogens was identified but it seems as if all the isolates belong to the genus *Methanobrevibacter*.

No sulphate reducing bacteria were isolated from the faecal samples which confirms that methanogens and sulphate reducing bacteria compete for available substrates in the same ecological niche.

BEDANKINGS

Hiermee spreek ek my opregte dank uit teenoor:

Dr. H. A. Esterhuysen onder wie se leiding en hulp hierdie studie uitgevoer en die verhandeling geskryf is.

Die Departement Mikrobiologie vir die fasiliteite wat tot my beskikking gestel is.

Die Navorsingsinstituut vir Vee- en Suiwelkunde vir fasiliteite wat tot my beskikking gestel is.

Mev. Anita Wessels vir die tik van die tabelle.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

1.1 DIE NORMALE MIKROÖRGANISMES IN DIE SPYSVERTERINGSKANAAL

Die normale mikrobiota van die spysverteringskanaal word gedefiniër as daardie mikroörganismes wat altyd in die spysverteringskanaal van gesonde persone voorkom (Schaechter *et al.*, 1989:177). Hierdie organismes is dus onskadelik vir die menslike liggaam, alhoewel sommige patogenies tydens sekere toestande kan optree (Pelczar *et al.*, 1986:673). Die meeste van hierdie mikroörganismes kom in assosiasies voor, terwyl die ander planktonies in die spysverteringskanaal is (Schaechter *et al.*, 1989:177).

Die spysverteringskanaal, met ander woorde, die plek waar voedsel verteer word, bestaan uit die maag, klein intestine en die groot intestine. Die maag tree as 'n grens op, wat die besetting van vreemde mikroörganismes verhoed as gevolg van die suurgehalte van die maagsappe (pH 2). Die klein intestine bestaan uit die duodenum, wat teenaan die maag geleë is, die jejunum en die ileum. In die duodenum is die omgewing suur en dieselfde bakterieë wat in die maag voorkom is ook hier teenwoordig. Die aantal bakterieë wissel tussen 10^3 - 10^6 bakterieë.g⁻¹ verteerde voedsel (Jawetz *et al.*, 1987:316). Vanaf die duodenum na die ileum raak die omgewing meer alkalies en groter getalle bakterieë word hier aangetref (10^5 - 10^8 bakterieë.g⁻¹ verteerde voedsel) (Brock & Madigan, 1988:396). In die groot intestine of kolon kom hoë getalle bakterieë voor (10^8 - 10^{10} bakterieë.g⁻¹ verteerde voedsel). As gevolg van die teenwoordigheid van 'n klein persentasie fakultatief anaërobe bakterieë *viz.*, *Escherichia*, *Proteus*, *Klebsiella* en *Enterobacter* in die kolon is die omgewing van die kolon streng anaëroob (Brock & Madigan, 1988:396). Die aantal anaërobes is dikwels as gevolg van die moeilike metodes om hulle te isoleer en te kweek, onderskat. Hierdie kweekingstegnieke is egter so verbeter dat verpligte anaërobe bakterieë nou in suiwer kulture in 'n laboratorium gekweek kan word (Brock & Madigan, 1988:396). In 'n gesonde volwasse persoon se kolon is 96-99% van die bakterieë anaëroob (Jawetz *et al.*, 1987:316).

Voorbeelde van anaërobe bakterieë wat in die kolon voorkom, is: *Bacteroides* (veral *B. fragilis*), *Fusobacterium*, anaërobe laktobasille, klostridia bv. *Clostridium perfringens*

(10^3 - 10^5 bakterieë.g⁻¹ feses) en anaërobe streptokokke bv. *Peptococcus* spp. (Goldin, 1986:368; Jawetz *et al.*, 1987:316). Een tot vier persent van die normale mikrobiiese bewoners van die kolon is aëroob en fakultatief anaëroob, viz., Gramnegatiewe kolivorme, enterokokke, asook sommige spesies van *Proteus*, *Pseudomonas*, laktobasille en *Candida* (Jawetz *et al.*, 1987:316). Protoesoë word ook as skadelose kommensaliste aangetref, bv. *Trichomonas hominis* en genera van *Entamoeba*, *Endolimax* en *Iodamoeba* (Pelczar *et al.*, 1986:673).

Die spysverteringskanaal van pasgebore babas is feitlik steriel. Mikrobes word egter gou saam met die voedsel ingeneem. Babas wat geborsvoed word, het groot getalle melksuurbakterieë in die kolon viz., laktobasille en streptokokke. By babas wat bottel drink is daar 'n groter verskeidenheid bakterieë, terwyl die melksuurbakterieë in die minderheid is (Jawetz *et al.*, 1987:316). Die rede waarom die mikrobiiese samestelling van hierdie twee ekologiese nisse verskil is egter nog onseker. Dit is wel bekend dat moedersmelk 'n disakkariedaminosuiker bevat wat die groei van *Bifidobacterium* bevoordeel. Hoe meer die eetgewoontes van die baba verander en meer vaste voedsel ingeneem word, verander die bakteriese samestelling van die kolon (Brock & Madigan, 1988:397).

Navorsing deur Mitsuoka en Hayakawa (1972:333) bewys dat ouderdom 'n rol in die bakteriese samestelling van persone speel. Die mikrobiota van volwassenes bly stabiel met die *Bacteroidaceae* as dominante biota. Bifidobakterieë en cantenabakterieë volg daarna met enterobakterieë, streptokokke en laktobasille as sekondêre biota. *Cantenabacterium* staan ook as *Eubacterium tortuosum* bekend (Sneath *et al.*, 1986:1372). Klostridia, stafilokokke en *Veillonellae* verteenwoordig die res van die biota.

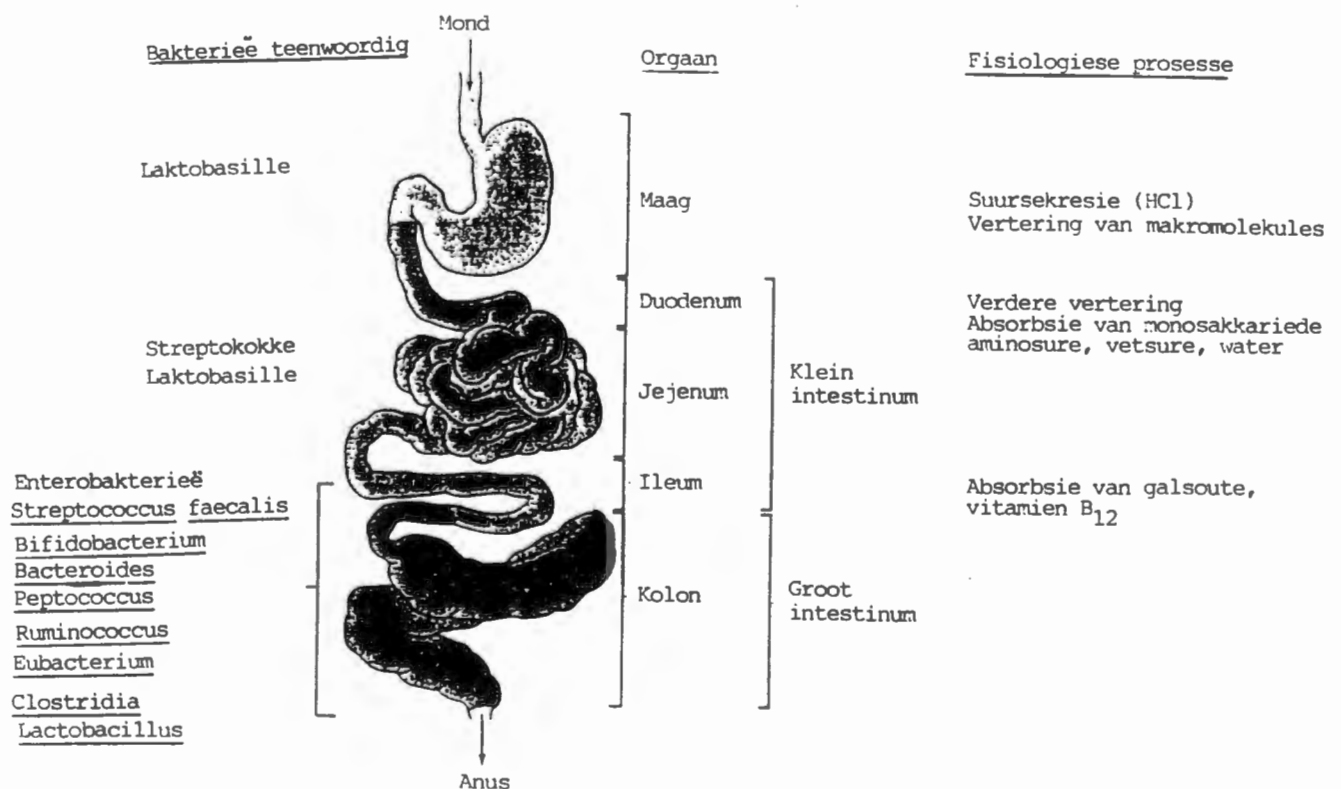
Na geboorte kom enterobakterieë, streptokokke en stafilokokke algemeen voor, terwyl die eersgenoemde twee groepe baie vinnig vermeerder. Met toenemende ouderdom verlaag die getal enterobakterieë, terwyl die getal streptokokke konstant bly (10^7 - 10^8 bakterieë.g⁻¹ feses). Die getal stafilokokke is baie hoër by babas as by ander ouderdomsgroepe. Vanaf ongeveer die vyfde dag na geboorte bereik bifidobakterieë hoë getalle wat min of meer tot volwassenheid konstant bly (Mitsuoka & Hayakawa, 1972:333).

Koornhof *et al.* (1979:338) wys daarop dat geen noemenswaardige veranderinge waargeneem kan word indien die dieet van 'n persoon verander nie. Faktore soos angst en stres, kan egter die bakteriese samestelling verander.

Soos wat die voedsel deur die spysverteringskanaal beweeg, meng die verteerde voedsel met water om feses te vorm. Een derde van die feses bestaan uit bakterieë (veral dooie bakterieë). In die plek van die bakterieë wat doodgaan of saam met die feses uitgeskei word, word nuwe bakterieë gevorm. Die kolon dien dus as 'n soort chemostaat. Dit neem ongeveer 24 uur vir die verteerde voedsel om deur die spysverteringskanaal te beweeg, terwyl die bakterieë een tot twee generasies per 24 uur ondergaan (Brock & Madigan, 1988:397). 'n Volwasse persoon ekskretreer ongeveer 3×10^{13} bakterieë daagliks.

Indien antibiotika ingeneem word, inhibeer dit die groei van die normale biota van die spysverteringskanaal, sodat daar feitlik 'n steriele toestand ontstaan. Die bakteriese samestelling verander dus heeltemal. Antibiotikumweerstandbiedende bakterieë, bv. *Staphylococcus*, *Proteus* en die gis *Candida* kom dan meesal voor, wat die normale funksies van die spysverteringskanaal kan verander en tot sekondêre infeksies kan lei (Brock & Madigan, 1988:397).

Figuur 1 toon 'n skematiese voorstelling van die spysverteringskanaal en die bakterieë wat daarin voorkom aan.



Figuur 1: 'n Skematiese voorstelling van die spysverteringskanaal en die bakterieë wat daarin voorkom (Brock & Madigan, 1988:398)

1.1.1 Intestinale gas

As gevolg van die teenwoordigheid van fermentatiewe en metaanproduserende bakterieë, word gas binne die spysverteringskanaal gevorm. Sommige moeilik verteerbare voedsels word deur fermentatiewe bakterieë gefermenteer, met die vorming van waterstofgas (H₂) en koolstofdiksied (CO₂). Die metaanproduserende bakterieë vorm dan metaan vanaf die CO₂ en H₂.

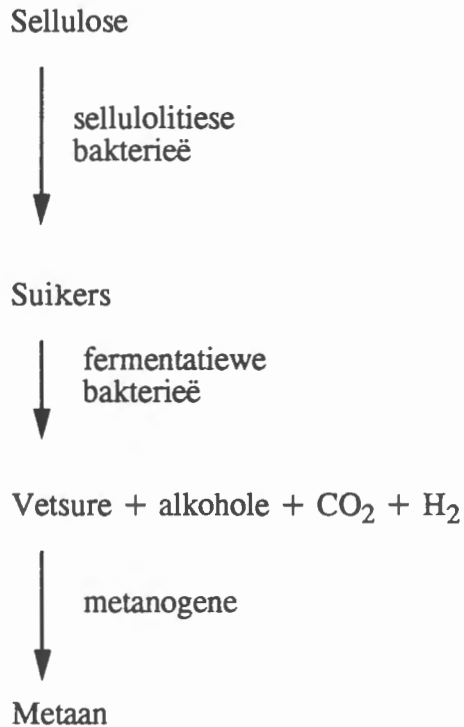


(Nottingham & Hungate, 1968:2178; Brock & Madigan, 1988:399)

Die meeste persone besit aktiewe metaanproduserende bakterieë in hulle spysverteringskanaal. Die oorsprong van hierdie bakterieë is egter onbekend. 'n Gedeelte van die intestinale gas wat deur persone vrygestel word, is vanaf ingeasemde lug afkomstig, terwyl die res, die resultaat van mikrobiëse aktiwiteit in die spysverteringskanaal is (Miller & Wolin, 1983:317; Allison & MacFarlane, 1988:1397; Brock & Madigan, 1988:399). Tomlin *et al.* (1991:665) het die vrystelling van intestinale gas by 10 proefpersone ondersoek. Hulle vind dat gedurende 'n 24 uur periode, 316ml volume waterstofgas, 68ml volume koolstofdiksied, 49ml volume metaan en 213ml volume nie-identifiseerbare gasse per proefpersoon vrygestel word.

1.2 METAANPRODUSERENDE BAKTERIEË (METANOGENE) IN DIE SPYSVERTERINGSKANAAL VAN MENSE

Die metanogene is 'n unieke groep prokariote wat metaan vorm as produk van anaërobe metabolisme (Mah & Smith, 1981:948). Alhoewel die vorming van metaan algemeen in die natuur voorkom, is die eienskappe van metanogene nog redelik onbekend en is dit moeilik om hierdie bakterieë in suiwerkulture te kweek (Wolfe, 1971:107). Die vorming van metaan in die spysverteringskanaal, is die resultaat van reaksies waarby ander groepe bakterieë betrokke is. Voedsel wat moeilik verteer bv. sellulose, word deur sellulolitiese bakterieë na sellobiose (glukose-glukose) en dan na glukose gedissimileer. Die glukose word dan deur fermentatiewe bakterieë gefermenteer na asetaat, propionaat, butiraat, waterstof en koolstofdiksied. Die metanogene vorm dan metaan vanaf die waterstof en koolstofdiksied. Die reaksie kan soos volg voorgestel word:



(Wolfe, 1971:108.)

Daar is egter ander metaanvormende bakterieë wat eenvoudige substrate soos mieresuur, metielamien, asetaat of metanol gebruik met die vorming van metaan (Brock & Madigan, 1988:774). Twintig persent van die metaan word geabsorbeer deur die bloed en deur die longe uitgeskei (Miller *et al.*, 1982:227).

Morfologies is daar verskillende metaanvormende bakterieë *viz.*, kort of lang basille, spirillums en kokke, asook verskillende rangskikkings van bogenoemde vorms in kettings en filamente. Gasvakuole wat voorkom by sekere metanosarkinas is die enigste ander morfologiese eienskap wat elektronmikroskopies waargeneem kan word. Byna al die metanogene besit twee unieke kofaktore nl. kofaktor 420 (F₄₂₀) en 2-merkaptotetanosulfoonsuur (koënsiem M of KoM). *Methanobrevibacter ruminantium* moet egter voorsien word van KoM as groeifaktor (Mah & Smith, 1981:948).

Die verwantskappe tussen 16S rRNA-opeenvolgings sowel as selwand- en lipiedsamestelling van metaanproduserende bakterieë en ander bakterieë het die gevolg dat die metanogene as argeobakterieë bekend staan (Jones *et al.*, 1987:153).

Die metaanproduserende bakterieë word verdeel in 10 genera, *viz.*, *Methanobacterium*, *Methanobrevibacter*, *Methanothermus*, *Methanococcus*, *Methanomicrobium*, *Methanogenium*, *Methanospirillum*, *Methanosarcina*, *Methanococcoides* en *Methanotherix* (Brock & Madigan, 1988:775). Volgens Mah en Smith (1981:949) word die metaanproduserende bakterieë wat in suiwer kolonies geïsoleer is, op grond van

hulle karakteristieke eienskappe, in sewe genera en dertien spesies verdeel (*vide* tabel 1).

Tabel 1: Metaanproduserende bakterieë geïsoleer in suiwer kulture (Mah & Smith, 1981:949)

Spesies	Habitat
<i>Methanobacterium formicicum</i> <i>bryantii</i> <i>thermoautotrophicum</i>	Rumen, verteeders Sedimente Verteeders, warmwaterbronne
<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>smithii</i> <i>arboriphilus</i>	Rumen Geaktiveerde slyk Bome, grond
<i>Methanomicrobium mobile</i>	Rumen
<i>Methanospirillum hungatei</i>	Verteeders, sedimente
<i>Methanogenium cariaci</i> <i>marisnigri</i>	Seewater Seewater
<i>Methanosarcina barkeri</i>	Verteeders, sedimente
<i>Methanococcus mazei</i> <i>vannielii</i> <i>voltae</i>	Geaktiveerde slyk Sedimente Sedimente

Methanobrevibacter ruminantium en *Methanobrevibacter smithii* is tot dusver die enigste metaanproduserende bakterieë wat uit menslike oorsprong geïsoleer is (Smith & Hungate, 1958:713; Mah & Smith, 1981:950; Miller *et al.*, 1982:227). Alle metanogene is verpligte anaërobes en benodig 'n oksidasie-reduksie potensiaal (Eh) van \pm -200mV of minder om te groei. Sommige kan egter aan lug blootgestel word sonder

dat hulle gedood word (Mah & Smith, 1981:950). In sekere habitatte kan die vorming van metaan deur nitraat geïnhibeer word as gevolg van verhoogde Eh waardes.

1.2.1 Sintese van metaan

Die vorming van metaan vind slegs plaas in streng anoksiese habitatte. Daar is nege verskillende substrate wat metanogene vir die sintese van metaan kan gebruik. Tabel 2 toon die dié nege substrate.

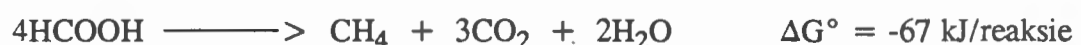
Tabel 2: Substrate wat gebruik word vir die vorming van metaan (Brock & Madigan, 1988:774).

CO ₂ - tipe substrate	
Koolstofdiksied Miersuur Koolstofmonoksied	CO ₂ HCOOH CO
Metielsubstrate	
Metanol Metielamien Dimetielamien Trimetielamien	CH ₃ OH CH ₃ NH ₃ ⁺ (CH ₃) ₂ NH ₂ ⁺ (CH ₃) ₃ NH ⁺
Asetaatbevattende substrate	
Asetaat	CH ₃ COOH

Die substrate word in groepe verdeel en die gebruik van al hierdie substrate het die vrystelling van ongebonde energie tot gevolg, wat vir ATP-sintese gebruik kan word (*vide* 1.2.4).

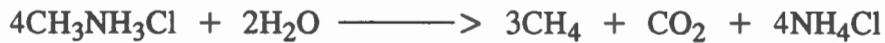
Die CO₂-substrate word soos volg gebruik:

(ΔG° = Vrystelling van die energie tydens die reaksie)



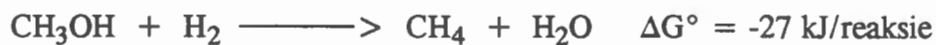


Die metielbevattende substrate word soos volg na metaan gereduseer:



$$\Delta G^\circ = -55 \text{ kJ/reaksie}$$

Tydens bogenoemde reaksies tree sommige van die substraatmolekules as elektronskenkers op en word na CO_2 geoksideer terwyl ander gereduseer word en dus as elektronontvangers dien. Waterstof kan ook as reduseermiddel optree. In die geval van metanol lyk die reaksie soos volg:



Die finale groep substrate is die asetaatbevattendes en word soos volg gebruik:



Slegs spesies van *Methanosarcina*, *Methanotherix*, *Methanobrevibacter* en *Methanogenium* kan asetaat gebruik vir die vorming van metaan (Mah & Smith, 1981:961; Brock & Madigan, 1988:774).

Indien die metaanproduseerders waterstof en koolstofdiksied vir die vorming van metaan gebruik, is hulle chemoorganotroof, waar CO_2 as koolstofbron sowel as elektronontvanger dien. Die vorming van metaan kan dus as 'n tipe anaërobe respirasie beskou word (Brock & Madigan, 1988:773). 'n Elektrontransportsisteem waarby sitochrome en kinone betrokke is, is afwesig by metanogene wat in die teenwoordigheid van H_2 en CO_2 groei. Die elektrontransportproses van die metanogene benodig dus verskillende elektrondraers as dié van ander anaërobe respirasieprosesse bv. nitraat- en sulfaatreduksie (Brock & Madigan, 1988:774). Unieke koënsieme by metanogene speel dus 'n belangrike rol tydens die elektrontransportsisteem.

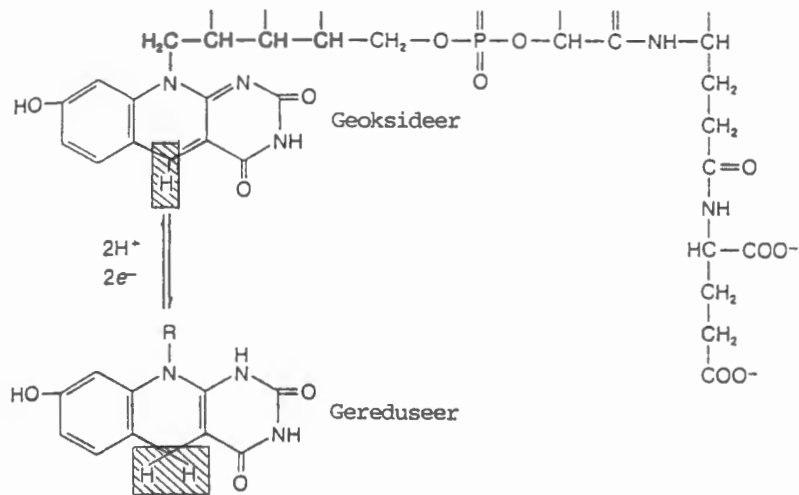
1.2.2 Koënsieme van metanogene

Die koënsieme van metanogene kom in baie groter persentasies as gewone koënsieme bv. NAD^+ en FMN wat in ander bakterieë voorkom, voor.

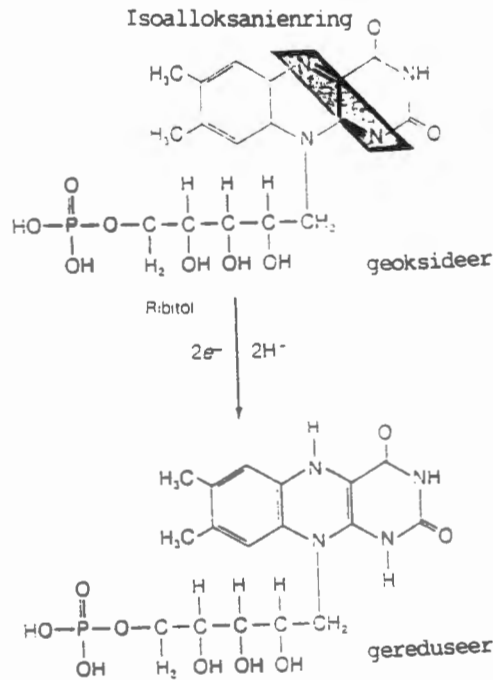
1.2.2.1 Koënsiem F₄₂₀

Koënsiem F₄₂₀ (*vide* figuur 2) is 'n derivaat van flavien en stem baie met die algemene struktuur van die flavien-koënsiem, FMN ooreen (*vide* figuur 3). By F₄₂₀ ontbreek daar egter een van die N-atome van die middelring, sowel as die metielgroepe op die benseenring. F₄₂₀ is 'n elektrondraer, wat by lae reduksiepotensiaal aktief is ($E_0 = -0,37$ Volt) en speel dieselfde rol in metanogene as dié van ferridoksien in ander anaërobe bakterieë. Die koënsiem reageer met ander koënsieme, bv. hidrogenase en NADP⁺ in metanogene en tree as 'n elektronskenker in die eerste twee stappe van CO₂-reduksie op.

Die geoksideerde vorm van F₄₂₀ absorbeer lig by 420nm en het 'n blougroen fluoresserende kleur. Die gereduseerde vorm van F₄₂₀ is kleurloos. Hierdie is 'n belangrike kenmerk in die aanvanklike identifikasie van metanogene. Koënsieme soortgelyk aan F₄₂₀ is in ander bakterieë soos sulfaatreducerende argeobakterieë en eubakterieë bv. *Streptomyces* en sommige sianobakterieë gevind, wat daarop dui dat hierdie koënsieme ook ander funksies kan hê (Jones *et al.*, 1987:154).



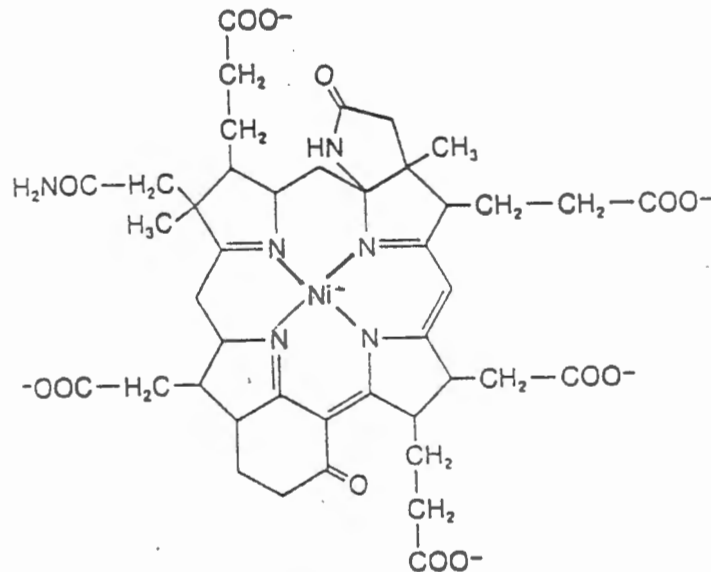
Figuur 2: Struktuur van koënsiem F₄₂₀ (Jones *et al.*, 1987:154)



Figuur 3: Struktuur van FMN (Brock & Madigan, 1988:130)

1.2.2.2 Koënsiem F₄₃₀

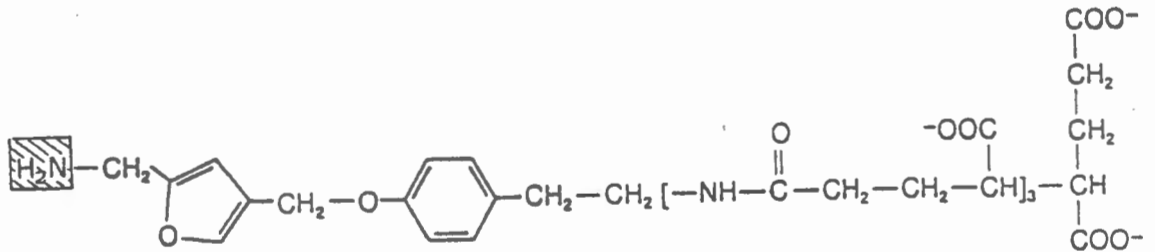
Dit is 'n geel, oplosbare, nikkelsbevattende tetrapirool (*vide* figuur 4), wat 'n rol in die laaste stap tydens metaansintese speel. Koënsiem F₄₃₀ is deel van die metielreduktasesisteam. Hierdie koënsiem absorbeer lig by 430nm, maar fluoesseer nie. Groeistimulasie van metanogene deur nikkels, kan met die teenwoordigheid van die F₄₃₀ koënsiem geassosieer word (Jones *et al.*, 1987:157; Brock & Madigan, 1988:776).



Figuur 4: Struktuur van koënsiem F₄₃₀ (Brock & Madigan, 1988:777)

1.2.2.3 Metanofuraan (CO₂-reduksiefaktor)

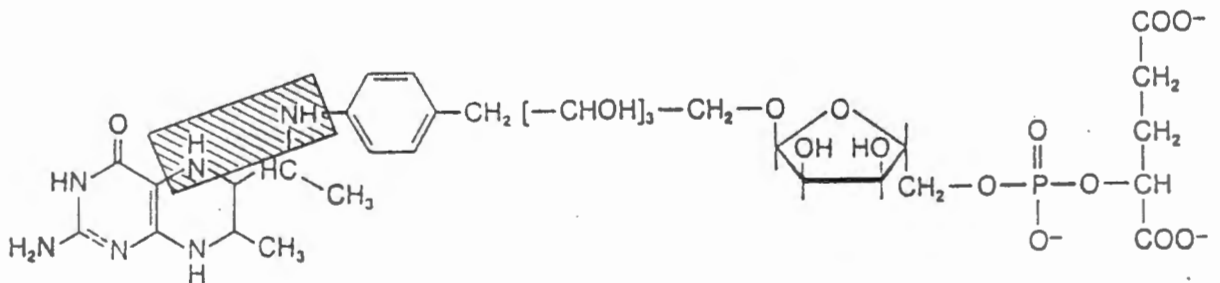
Metanofuraan besit 'n lae molekulêre massa en bestaan uit 'n molekule fenol, twee molekule glutamiensuur, 'n furaanring en 'n lang ketting dikarboksielvetsuur (*vide* figuur 5). Hierdie koënsiem speel 'n belangrike rol in die eerste stap van metaansintese, waar CO₂ na die formiel-vlak gereduseer word (Brock & Madigan, 1988:776). Tot dusver is metanofuraan slegs in metaanvormende bakterieë waargeneem en wissel dit tussen 0,5-2,5 mg.kg⁻¹ van die droë selmassa (Jones *et al.*, 1987:155).



Figuur 5: Struktuur van metanofuraan (Brock & Madigan, 1988:777)

1.2.2.4 Metanopterien

Hierdie koënsiem het 'n gesubstitueerde pterienring en besit 'n helder blou fluoesserende kleur (*vide* figuur 6). Metanopterien (MPT) absorbeer lig by 342nm en was vroeër bekend as koënsiem F₃₄₂. Die struktuur van metanopterien stem met dié van folienuur ooreen en dien as 'n C-1 draer tydens die reduksie van CO₂ na metaan. Die ingekleurde deel (*vide* figuur 6) is die N-atoom waaraan die C-1 kompleks bind tydens die reduksiestappe vanaf formiel (-CHO) na metiel (-CH₃) tydens metaansintese (Brock & Madigan, 1988:776). Die gereduseerde vorm van metanopterien nl. tetrahidrometanopterien (H₄MPT) is die aktiewe deel van hierdie koënsiem (Jones *et al.*, 1987:156).



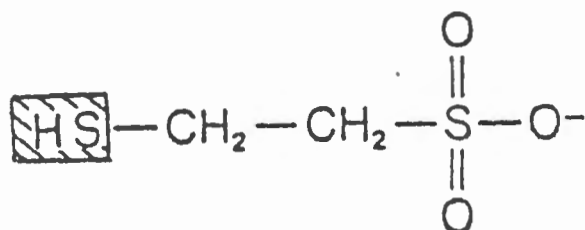
Figuur 6: Struktuur van metanopterien (Brock & Madigan, 1988:777)

1.2.2.5 Koënsiem M (KoM)

Koënsiem M (2-merkptoetanosulfoonsuur) (*vide* figuur 7) is die draer van die metielgroep, wat na metaan gereduseer word, deur middel van die metielreduktase-F₄₃₀-ensiem, tydens die finale stap van metaansintese:



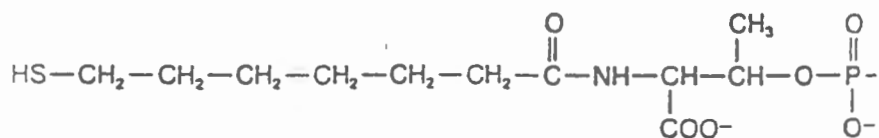
Methanobrevibacter ruminantium benodig KoM as groeifaktor en in hierdie geval word KoM as 'n vitamien beskou. Sommige metaanbakterieë skei KoM in die rumen af, wat dan deur *Methanobrevibacter ruminantium* gebruik word. Selfs in lae konsentrasies soos vyf nanomolaar (5×10^{-9} molaar) kan die byvoeging van KoM die groei van *M. ruminantium* stimuleer (Brock & Madigan, 1988:776,778).



Figuur 7: Die struktuur van koënsiem M (Brock & Madigan, 1988:777)

1.2.2.6 Komponent B

Hierdie koënsiem is betrokke by die finale stap van metaansintese, alhoewel sy presiese rol nog onbekend is. Komponent B is 'n gefosforileerde derivaat van die aminosuur, treonien en bevat 'n vetsuurketting met 'n terminale sulfidriëlgroep (SH-groep) (*vide* figuur 8). Die struktuur van komponent B stem met dié van die vitamien, pantoteensuur ooreen en kan optree as 'n elektronskenker in die metielreduktasesistiem. Dit kan egter nie as C-1 draer optree nie (Brock & Madigan, 1988:778).

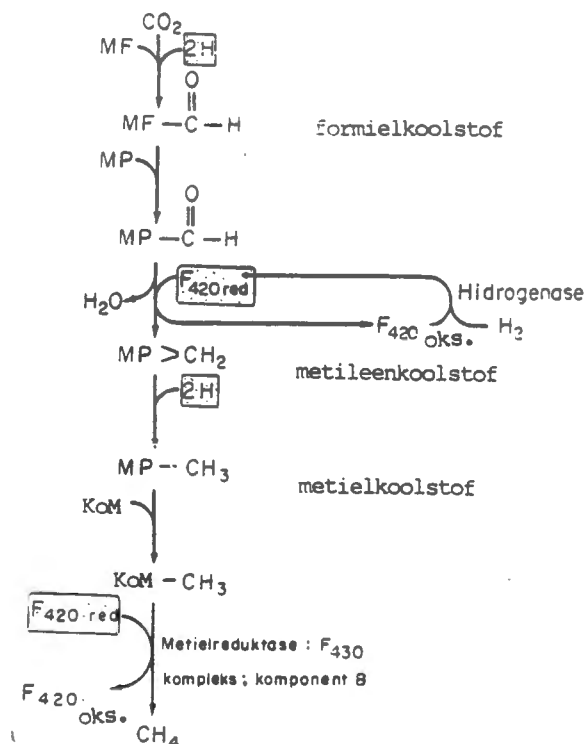


Figuur 8: Struktuur van komponent B (Brock & Madigan, 1988:777)

Behalwe vir bogenoemde koënsieme, besit die metanogene ook 'n groot aantal bekende koënsieme wat betrokke is by metabolisme, viz., tiamien, riboflavien, piridoksien, korrien, biotien, niasien en folienuur (Jones *et al.*, 1987:158,159).

Metaansintese kan as volg opgesom word, *vide* figuur 9:

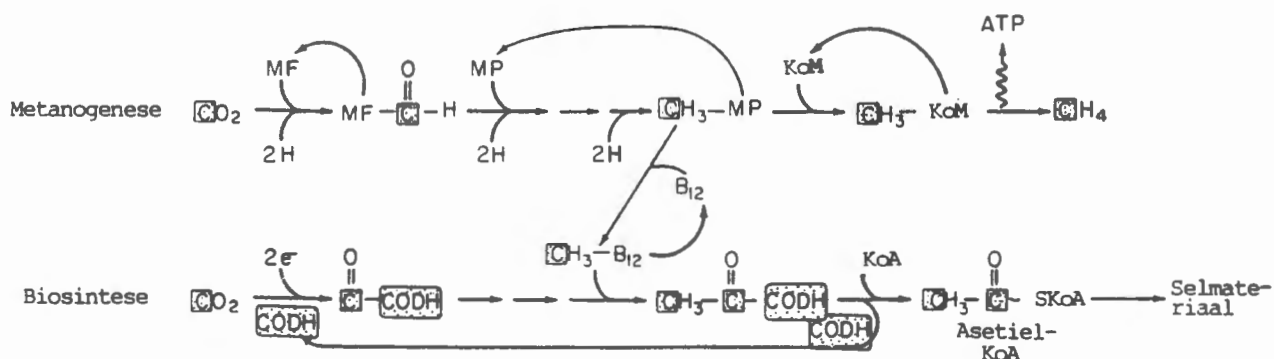
- CO₂ word geaktiveer deur metanofuraan en dan na die formielvlak gereduseer.
- Die formielgroep word vanaf metanofuraan na tetrahidrometanopterien verander. Daarna word dit na metileen en metiel in twee aparte stappe gedehidreer en gereduseer.
- Die metielgroep bind aan koënsiem M.
- Metielkoënsiem M word na metaan gereduseer deur die metielreduktasekompleks waarby F₄₃₀, komponent B en F₄₂₀ betrokke is.



Figuur 9: Sintese van metaan vanaf CO₂ (Brock & Madigan, 1988:778); MF = metanofuraan; MP = tetrahidrometanopterien; KoM = koënsiem M; Komp B = komponent B; F₄₂₀ = Koensiem F₄₂₀; F₄₃₀ = koënsiem F₄₃₀

1.2.3 Outotrofie by metanogene

Metanogene kan ook CO_2 assimileer wat in organiese verbindings resulteer, via die asetiël-koA-weg. Dié weg word deur asetaat- en sulfaatreduserende bakterieë gebruik. In teenstelling met ander anaërobes wat hierdie weg gebruik, integreer metanogene die biosintese en bioenergie weë, omdat die intermediêre produkte gedeel word (*vide* figuur 10).

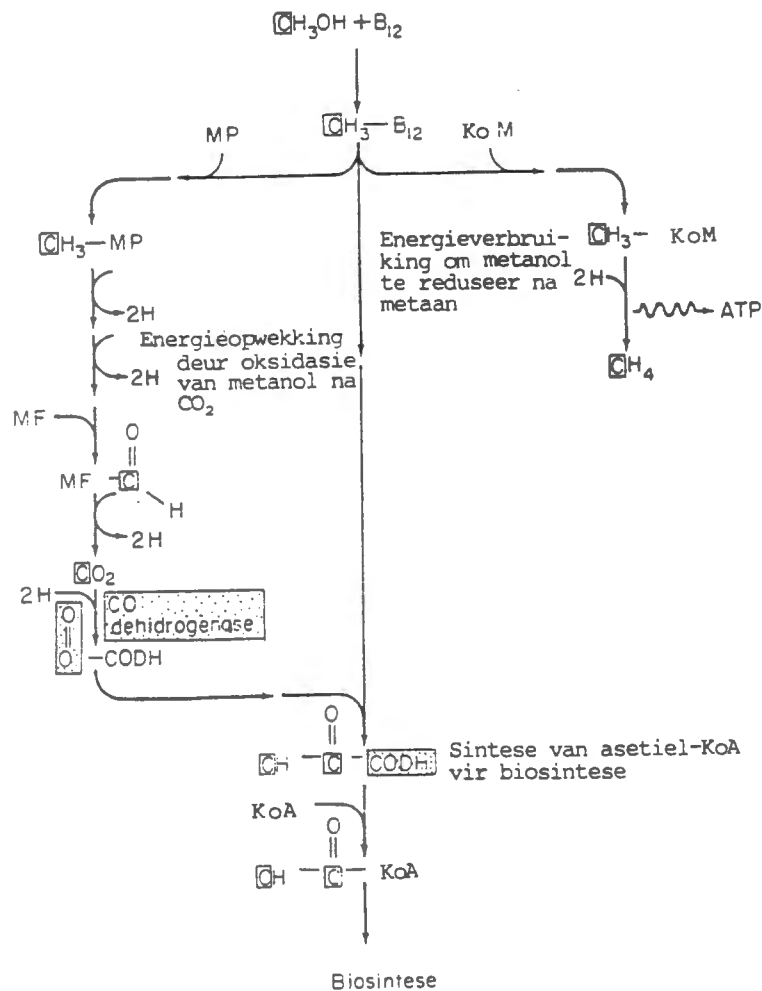


Figuur 10: 'n Skematiese voorstelling van hoe metanogene biosintese en metaansintese kombineer (Brock & Madigan, 1988:778); CODH = Koolstofmonoksieddehidrogenase; MF = metanofuraan; MP = tetrahidrometanopterien; KoM = koënsiem M; Komp B = komponent B

Metieltetrahidrometanopterien skenk 'n metielgroep aan 'n vitamien B_{12} -bevattende ensiem en vorm dan $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$. Die CH_3 -groep word aan die koolstofmonoksieddehidrogenase oorgedra (CO_2 gereduseer na CO) om asetiël-koA te vorm.

1.2.4 Die sintese van metaan vanaf metielverbindings en asetaat

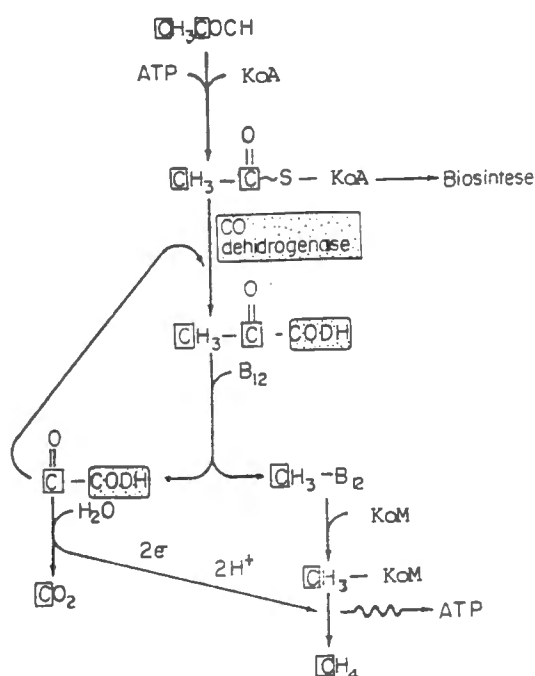
Die sintese van metaan vanaf metielverbindings is nog redelik onbekend, alhoewel dit wil voorkom asof reaksies van die asetiel-koA-weg hier van belang is. Die proses word voorgestel in figuur 11.



Figuur 11: Sintese van metaan vanaf metielverbindings (Brock & Madigan, 1988:779); MF = metanofuraan; MP = tetrahydrometanopterien; KoM = koënsiem M; CODH = Koolstofmonoksieddehidrogenase

Metielverbindings viz., metanol skenk metielgroepe aan 'n vitamien B_{12} om $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ te vorm. Die $\text{CH}_3\text{-B}_{12}$ skenk die metielgroep aan KoM om $\text{CH}_3\text{-KoM}$ te vorm. Metaan word gevorm as gevolg van die reduksie van elektrone. Hierdie elektrone word tydens oksidasie van metanol na CO_2 vrygestel (Brock & Madigan, 1988:780).

Groei van metanogene op asetaat hou direk verband met die asetiel-KoA-weg. Hierdie metanogene gebruik asetaat direk vir biosintese (*vide* figuur 12). Asetaat word geaktiveer na asetiel-koA wat met koolstofmonoksieddehidrogenase reageer. Die metielgroep van asetaat bind aan vitamien B₁₂ en vorm CH₃-B₁₂. Die metielgroep word nou oorgedra aan tetrahidrometanopterien en dan na koënsiem M om CH₃-KoM te vorm, wat dan metaan vorm.



Figuur 12: Sintese van metaan vanaf asetaat (Brock & Madigan, 1988:779); KoM = koënsiem M; CODH = Koolstofmonoksieddehidrogenase

1.2.5 Isolasië van metaanvormende bakterieë

Dié bakterieë word primêr as chemolitotrofe organismes beskou op grond van hulle vermoë om H₂ te oksideer (en CO₂ te reduseer) as elektronskenkers. Sommige metanogene wat H₂ as elektronskenker en CO₂ as koolstofbron gebruik staan as outotrofe organismes bekend. *Methanobrevibacter ruminantium* benodig egter asetaat as hoof energiebron en word eerder as 'n heterotroof geklassifiseer (Mah & Smith, 1981:951).

In hulle natuurlike habitat is die meeste metanogene afhanklik van ander organismes vir hulle voedingstowwe. Om die bakterieë te isoleer word 'n verskeidenheid

voedingstowwe dus by die isolasiemedium gevoeg om groei te verseker (groeifaktore). Ammoniak dien as primêre stikstofbron vir byna alle metanogene (Hendriksen & Ahring, 1991:241). Spesifieke groeifaktore word ook bygevoeg bv. spoorelemente, vitamieë, asetaat, aminosure en andere. Die byvoeging van gisekstrak stimuleer die groei van die meeste metanogene. Sulfied in die medium dien as swawelbron, alhoewel sommige organiese swawel gebruik (Mah & Smith, 1981:951).

Volgens Nottingham en Hungate (1968:2178) en Mah en Smith (1981:951) word vir die isolasie van metanogene uit die natuur, 'n ekstrak van die habitat by die medium gevoeg om groei te stimuleer (groeifaktore). Die pH van die isolasiemedium is ook belangrik. Die optimum pH wissel tussen 6,5 en 7,5, terwyl die meeste van hierdie bakterieë nie groei bokant pH 8 en onder pH 6 nie. Die optimum temperatuur is tussen 30°C en 40°C, dus mesofiele bakterieë. Maksimum metaansintese vind by $\pm 40^{\circ}\text{C}$ plaas.

1.3 DIE VOORKOMS VAN LAKTOBASILLE IN DIE SPYSVERTERINGSKANAAL VAN MENSE EN DIERE

Kort na geboorte is daar groot getalle verskillende organismes in die spysverteringskanaal van mense en diere. Hierdie bakterieë word vanaf die mond tot die rektum aangetref en is afkomstig vanaf die moeder se vaginale mikrobiota. Die voorkoms van hierdie organismes word deur faktore soos diëet, fisiologiese-, en immunologiese toestand van persone beïnvloed (Sharpe, 1981:1653).

Die mikrobiota van die spysverteringskanaal word deur suurvorming van die maagsappe, die inname van immunoglobulieë en ander beskermingsfaktore, wat teenwoordig is in die moedersmelk beheer, sodat ander bakterieë se getalle afneem en laktobasille begin domineer (Sharpe, 1981:1653). In die gesonde persoon ontstaan daar 'n simbiotiese verwantskap tussen laktobasille en die gasheer (Sharpe, 1981:1653).

Die persentasie laktobasille in die spysverteringskanaal is dikwels moeilik bepaalbaar as gevolg van die feit dat daar nie tussen laktobasille en bifidobakterieë onderskeid getref kan word nie. Volgens Sneath *et al.* (1986:1418) word bogenoemde groepe bakterieë as twee aparte genera behandel.

In die maag en klein intestine is die laktobasille die oorheersende groep bakterieë. Anaërobe bakterieë byvoorbeeld *Bacteroides* kom ook algemeen in die jejunum en

kolon voor, terwyl laktobasille ongeveer 0,07-1% van die totale bakteriese populasie uitmaak (Sharpe, 1981:1654). Die oorheersende laktobasille in die boonste gedeelte van die spysverteringskanaal by borsvoedbabas beskerm die babas teen diarree, wat voorkom indien patogene kolivorme in die spysverteringskanaal prolifereer. Laktobasille onderdruk die res van die bakterieë in die spysverteringskanaal waarskynlik deur melksuurvorming en deels deur inhiberingsisteme wat in rou melk teenwoordig is, insluitende die laktoperoksidasesisteme wat deur waterstofperoksiedproduserende laktobasille geaktiveer kan word (Sharpe, 1981:1654).

By babas skep monsterneming 'n probleem tydens studies van mikroörganismes van die spysverteringskanaal. Slegs fekale biota kan ondersoek word. Moedersmelk beskerm die baba teen kolivorme infeksies en die fekale biota bevat hoër getalle bifidobakterieë en kleiner getalle laktobasille. By babas wat bottel drink is die getal laktobasille baie hoër (Sharpe, 1981:1654). Dié getal laktobasille in die feses is egter nie verteenwoordigend van die laktobasille hoër op in die spysverteringskanaal nie. Alhoewel baie bekend is oor die bifidobakterieë in die feses van babas, is die laktobasille redelik onbekend. In 1975 het Mitsuoka *et al.* (1975:499) die laktobasille wat in die feses van 66 babas, 29 kinders, 42 volwassenes en 21 seniele persone teenwoordig is, ondersoek. By die babas vind hulle dat *Lactobacillus acidophilus*, *L. salivarius* en *L. fermenti*, die enigste laktobasille teenwoordig is. (Volgens Sneath *et al.* (1986:1232) word *L. fermenti* nie meer erken as spesie nie, en is na *L. fermentum* verander). By die kinders en volwassenes, sowel as die seniele persone kom *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*, *L. buchneri* en *L. lactis* voor. Bogenoemde navorsing toon ook aan dat die laktobasille verskil by van die babas wat ondersoek is as gevolg van die feit dat hierdie babas in verskillende klinieke was, en dat die samestelling van die laktobasille in die feses beïnvloed word deur die laktobasille wat met die mond ingeneem word (Mitsuoka *et al.*, 1975:499).

In die maag van 'n volwasse persoon is die pH 3 en laktobasille word hoofsaaklik saam met speeksel en voedsel ingeneem (Sharpe, 1981:1655). Slegs *L. acidophilus* word in maagsappe met 'n pH laer as pH 3 aangetref. In die boonste gedeelte van die duodenum kom lae getalle laktobasille voor, maar die getalle verhoog verder af in die klein intestineum.

In die groot intestineum of kolon kom laktobasille in baie lae getalle voor ($10^4 - 10^9$ laktobasille.g⁻¹ feses), en is hoofsaaklik *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius* en meer ongereeld *L. lactis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis* en *L. buchneri* (Sharpe, 1981:1655). Laasgenoemde vyf spesies is egter nie outochoon in die kolon nie.

Meeste van hierdie spesies is streng anaëroob en anaërobe kwekingstegnieke is dus hier noodsaaklik.

Lactobacillus ruminis, *L. rogosae*, *L. minutus* en *L. crispatus* is anaërobe laktobasille wat al geïsoleer is uit die spysverteringskanaal van mense en kan soms die dominante anaërobe bakterieë in die feses uitmaak (ongeveer 10^{10} bakterieë.g⁻¹ feses) (Sharpe, 1981:1165).

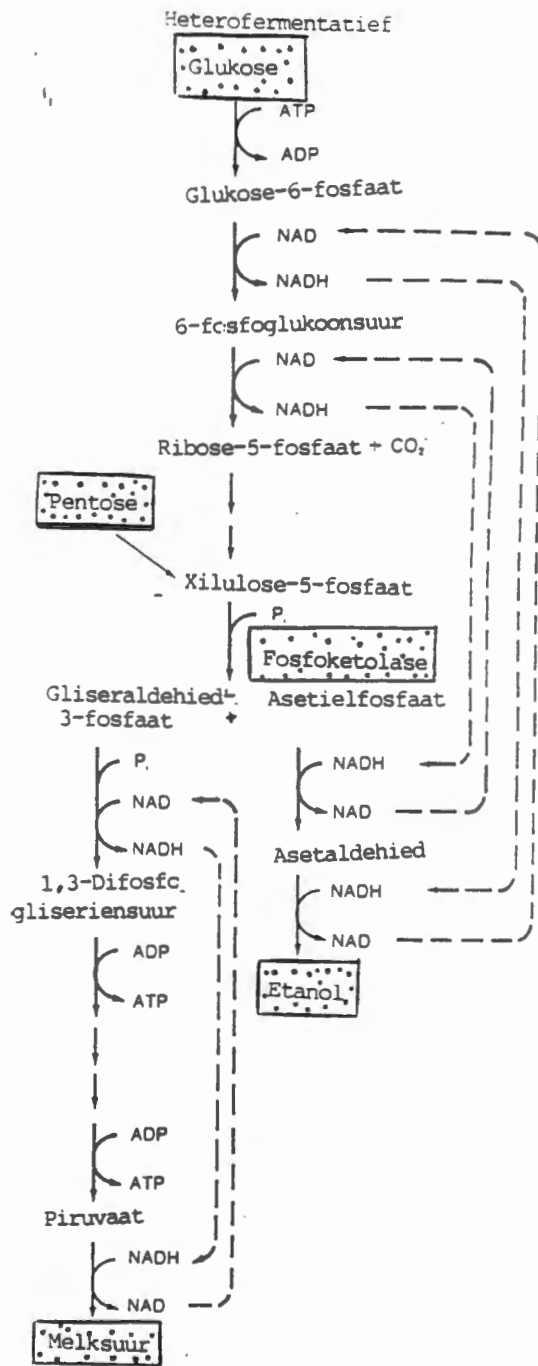
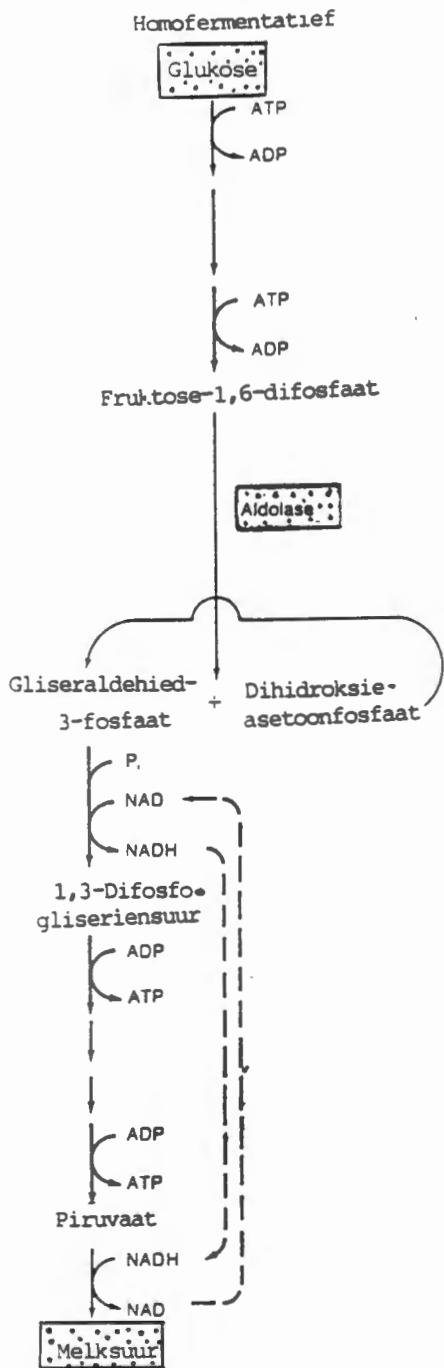
In die groot intestinum is slegs komplekse koolhidrate beskikbaar, wat afkomstig is vanaf ingeneemde voedsel. Laktobasille is dus afhanklik van ander organismes wat hierdie komplekse koolhidrate afbreek na eenvoudige verbindings. Die laktobasille gebruik dan laasgenoemde verbindings as energiebron.

Laktobasille is Grampositiewe, nie-beweeglike, nie-spoorvormende, katalase-negatiewe basille wat melksuur vanaf glukose vorm as primêre fermentasie produk (Sharpe, 1981:1664; Brock & Madigan, 1988:751). Hulle kan homofermentatief (vorm meer as 85% melksuur vanaf glukose) of heterofermentatief (vorm melksuur, CO₂, etanol en/of asynsuur vanaf glukose) wees (Sharpe, 1981:1664; Brock & Madigan, 1988:752). Die homofermenteerders word weer onderverdeel in die verpligte homofermentatiewe- en fakultatiewe heterofermentatiewe laktobasille (Sneath *et al.*, 1986:1218). Sommige heterofermentatiewe laktobasille kan egter as kokkobasille voorkom. Hulle besit nie porfiriene en sitochrome nie en voer nie elektrontransportfosforilasie uit nie. Die organismes kry dus energie slegs deur substraatvlakfosforilasie.

Al die laktobasille groei anaëroob, alhoewel die meeste nie sensitief vir suurstof is nie, en kan dus in die teenwoordigheid of afwesigheid van suurstof groei. Hulle is dus lugverdraagsame anaërobe bakterieë (Brock & Madigan, 1988:751). Sommige spesies kan suurstof opneem deur flavoproteïen-oksidasie-sisteme, met die vorming van H₂O₂. Katalase ensieme ontbreek egter by die meeste laktobasille en H₂O₂ word deur alternatiewe ensieme naamlik, peroksidase afgebreek. Adenosientrifosfaat (ATP) word nie gevorm tydens die flavoproteïen-oksidasie-reaksie nie, maar die oksidasiesisteme kan gebruik word vir heroksidase van NADH wat tydens fermentasie vorm (Brock & Madigan, 1988:751).

1.3.1 Homo- en Heterofermentasie

'n Belangrike verskil tussen die subgroepe van laktobasille, is die eindprodukte wat tydens fermentasie gevorm word (*vide* 1.3). Figuur 13 is 'n skematiese voorstelling van die fermentasie van glukose deur die homo- en heterofermenterende laktobasille.



Netto wins = 2 ATP

2 Melksuur/glukose molekules gefermenteer

Netto wins (1 melksuur + etanol

+1 CO₂)/glukose gefermenteer

Nuweprodukte (asynsuur, mieresuur, gliserol)

van alternatiewe wee

Figuur 13: Fermentasie van glukose deur homo- en heterofermentatiewe laktobasille (Brock & Madigan, 1988:752)

Die vorming van verskillende eindprodukte word teweeggebring deur die teenwoordigheid van die aldolase-ensiem wat 'n baie belangrike ensiem is tydens glikolise. Hierdie ensiem is afwesig by heterofermenteerders en dus kan fruktose-difosfaat nie na triosefosfaat afgebreek word nie. Glukose-6-fosfaat word geoksideer na 6-fosfoglukonaat wat dan na pentosefosfaat gedekarboksileer word. Laasgenoemde word na triosefosfaat en asetielfosfaat afgebreek deur die ensiem fosfoketolase. Die triosefosfaat word na melksuur omgesit met die vorming van een mol ATP. Asetielfosfaat ontvang elektrone vanaf NADH, en word na etanol verander, sonder die vorming van ATP (Brock & Madigan, 1988:752).

Heterofermenteerders vorm dus slegs een mol ATP vanaf glukose, terwyl homofermenteerders twee mol ATP vorm. Hierdie verskil in ATP-vorming kan waargeneem word deurdat homofermenteerders twee keer meer selmassa as heterofermenteerders produseer vanaf dieselfde hoeveelheid glukose (Brock & Madigan, 1988:752).

Die heterofermenterende laktobasille dekarboksileer 6-fosfoglukonaat en produseer CO₂ as eindproduk, terwyl die ander groep baie min of geen CO₂ vorm nie. Die vorming van CO₂ is dus 'n baie belangrike onderskeidingseienskap tussen die twee groepe. Sommige heterofermenteerders kan suurstof as elektronontvanger gebruik en flavoproteiene reduseer, wat as elektronskenkers optree. Die helfte van die NADH wat gevorm word tydens oksidasie van glukose na ribose, word oorgedra aan 'n flavien en dan aan suurstof. Asetielfosfaat kan omgesit word na asetaat in plaas van etanol en 'n addisionele ATP molekule kan gevorm word (Brock & Madigan, 1988:753).

1.4 SULFAATREDUSERENDE BAKTERIEË

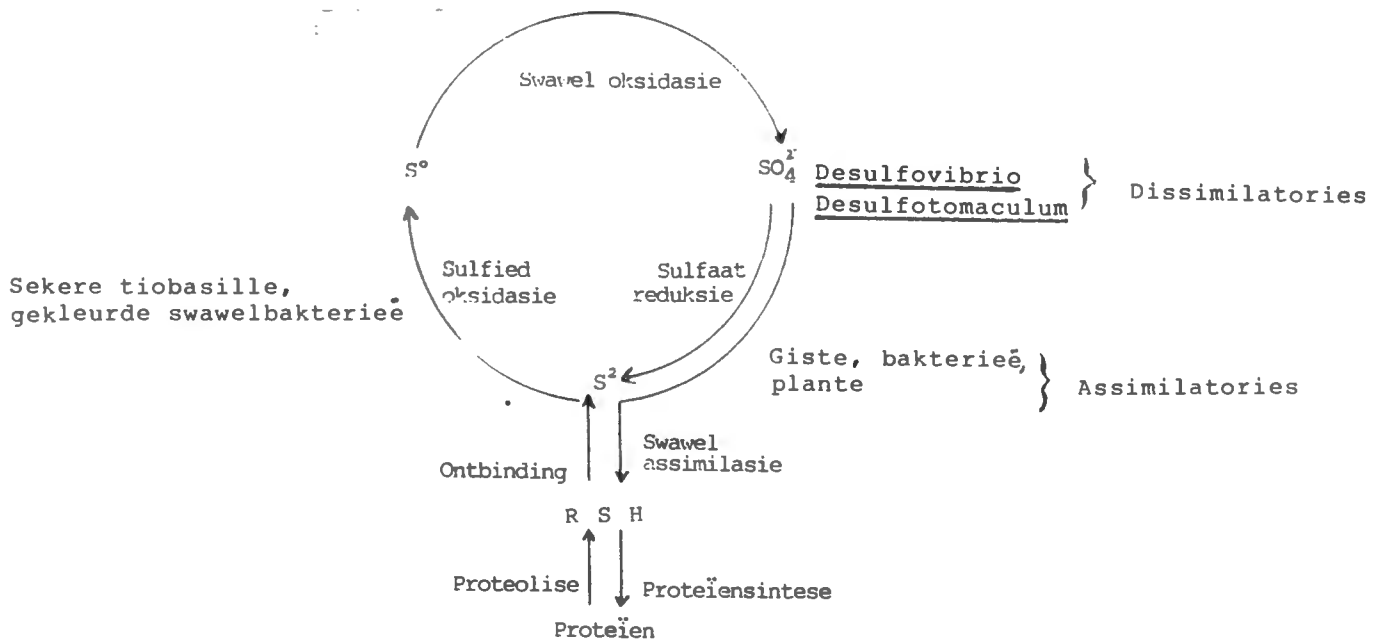
Swawel kom wyd verspreid in die natuur voor en is 'n noodsaaklike komponent van die biosfeer. Die swawel is hoofsaaklik in 'n geoksideerde toestand, soos sulfaat, bv. in grond, rotse, riviere en die see. Om die sulfate vir biologiese gebruik beskikbaar te stel, moet dit gereduseer word, met ander woorde, biologiese reduksie van sulfate moet plaasvind (Postgate, 1981:1).

In teenstelling met ander bakterieë en plante wat sulfaat benodig slegs vir die vorming van sulfaatbevattende selbestanddele (assimilatoriese sulfaatreduksie), gebruik dissimilatoriese sulfaatreduserende bakterieë, sulfaat hoofsaaklik as terminale elektronontvangers in hulle anaërobe oksidasie van organiese substrate. Hulle

produseer en akkumuleer dus 'n groot hoeveelheid sulfiede in hul habitat en dra tot mineraalneerleggings in die natuur by (Pfennig & Biebl, 1981:74; Pfennig *et al.*, 1981:926).

'n Lae konsentrasie van die gereduseerde sulfate word geassimileer deur mikroorganismes. Byna al die gereduseerde sulfate word aan die omgewing as sulfiedione vrygestel wat gehidroliseer word na waterstofsulfied (H_2S) (Postgate, 1981:2).

Sulfaatreduserende bakterieë groei relatief stadig in teenstelling met ander grond- en waterbewoners. Hulle besit egter die vermoë om vir lang tye te oorleef en raak aktief sodra toestande anaëroob raak (Postgate, 1981:3). Die biologiese swawelsiklus word kortliks weergegee in figuur 14.



Figuur 14: Biologiese swawelsiklus (Postgate, 1981:3); RSH = swawelbevattende aminosuur

Sulfaat (SO_4^{2-}) word gereduseer na sulfied (S^{2-}) deur dissimilatoriese sulfaatreducerende bakterieë. Hierdeur word substrate aan sulfiedoksiderende bakterieë verskaf, wat dit omvorm *via* elementêre swawel (S) terug na sulfaat. Tydens assimilatoriese sulfaatreduksie word swawel geïnkorporeer in swawelbevattende aminosure (RSH), wat deur plante opgeneem word. Die plante dien as voedselbron vir diere en die swawel, as sulfied, word in die siklus teruggeplaas tydens afbraak en verrotting van dooie diere deur bakterieë.

Sulfaatreducerende bakterieë kan hoofsaaklik in nege genera ingedeel word *viz.*, *Desulfuromonas*, *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfotomaculum*, *Desulfosarcina* en *Desulfonema* (Widdel & Pfennig, 1986:663). *Desulfovibrio* spesies is die mees bekende, waarskynlik oor die feit dat hierdie organisme maklik geïsoleer en gesuiwer kan word. Die taksonomie van sulfaatreducerende bakterieë is onbevredigend as gevolg van die feit dat vroeër jare onsuiwer kulture van sulfaatreducerende bakterieë geïdentifiseer is (Postgate, 1981:8). Suiwer kulture is egter vir 'n geruime tyd al verkry (Widdel & Pfennig, 1986:663).

Die organiese koolstofbronne en elektronskenkers wat sulfaatreducerende bakterieë gebruik is beperk. Melksuur, piruvaat, fumaraat, malaat, etanol en soms sitraat en glukose kan gebruik word met die vorming van asetaat en CO_2 as eindprodukte. Waterstof of mieresuur tesame met 'n koolstofbron, byvoorbeeld, asetaat plus bikarbonaat kan as elektronskenker vir groei optree (Pfennig *et al.*, 1981:926).

Op grond van hulle oksidatiewe en metaboliese kapasiteit kan nuwe sowel as bekende spesies, in twee klasse ingedeel word. Die eerste groep sluit die spesies wat lae vetsure, propionaat, melksuur en piruvaat met die vorming van asetaat metaboliseer, in. Die genera *Desulfovibrio* en *Desulfomonas* behoort aan hierdie groep. Die tweede groep bestaan uit die spesies wat slegs hoë vetsure, melksuur, asetaat, bensoaat, suksinaat of fumaraat volledig oksideer na CO_2 . *Desulfotomaculum* resorteer onder dié groep (Pfennig *et al.*, 1981:927).

Desulfosarcina, *Desulfonema*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter*, *Desulfotomaculum* en spesies van *Desulfovibrio* is uniek in die opsig dat hulle chemolitotroof groei met H_2 as elektronskenker, sulfaat as elektronontvanger en CO_2 as enigste koolstofbron (Brock & Madigan, 1988:713). Hulle gebruik die asetiel-KoA-weg vir die inkorporasie van CO_2 in selmateriaal. Sulfaatreducerende bakterieë van groep 2 doen die omgekeerde en vorm weer CO_2 vanaf asetaat en gebruik nie die sitroensuursiklus vir hierdie doel nie (Brock & Madigan, 1988:713). Sommige sulfaatreducerende bakterieë gebruik nitraat (NO_3) as elektronontvanger, waar die nitraat na ammoniak (NH_3) gereduseer word.

Ander spesies kan sekere organiese bestanddele gebruik vir die verkryging van energie deur middel van fermentasie in die algehele afwesigheid van sulfaat of ander terminale elektronontvangers. Piruvaat is die mees algemene organiese verbinding wat na asetaat, CO₂ en H₂ gefermenteer word. Fermentasie van melksuur en etanol lei tot onvoldoende energie en sulfaat is dus hier nodig. Die belangrikheid vir die teenwoordigheid van sulfaat word gedemonstreer tydens die groeisnelheid op piruvaat met of sonder sulfaat. Indien sulfaat teenwoordig is, is die groeitempo baie hoër as daarsonder (Brock & Madigan, 1988:713).

Sulfaatreducerende bakterieë bevat baie elektronoordragproteïene byvoorbeeld, sitochroom c₃, sitochroom b-tipes, ferrodoksiene, flavodoksiene en dehidrogenases. Die funksie van hierdie proteïene is egter nog onbekend (Brock & Madigan, 1988:713).

Die sintese van metaan in sekere habitate kom slegs voor indien die sulfaatkonsentrasies baie laag is. Dit dui daarop dat sulfaatreducerende bakterieë kompeteer met die metaanbakterieë vir die beskikbare elektronskenkende substrate, viz., waterstof en asetaat (Mountfort & Asher, 1981:252; Pfennig *et al.*, 1981:928; Gibson *et al.*, 1990:679). In sulke gevalle funksioneer die sulfaatreducerende bakterieë as terminale oksideerders tydens die anaërobe afbraak van organiese stowwe. Hierdie rol word deur die metaanvormende bakterieë oorgeneem as die sulfaatbron uitgeput raak (Pfennig *et al.*, 1981:928).

Die sulfaatreducerende bakterieë kom wyd verspreid in die natuur voor, veral in habitate wat anaëroob is as gevolg van die mikrobiese afbraak van organiese materiaal. Hierdie habitate viz., modder en sedimente van besoedelde mere, strome en riviere, sowel as riooldamme en slykverteerders, besit 'n aktiewe biologiese aktiwiteit en kan aan die reuk van waterstofsulfied en die swartwording van die omgewing uitgeken word (Pfennig *et al.*, 1981:927). Hierdie organismes is ook al uit die feses van mense en diere geïsoleer (Beerens & Romond, 1977:1770; Pfennig *et al.*, 1981:928). Tydens isolasie van sulfaatreduseerders is die swartwording van die isolasiemedium dus 'n aanduiding dat die bakterieë wel teenwoordig is.

Volgens Florin *et al.* (1991:766) bepaal die teenwoordigheid van beskikbare sulfaat wat in die dieet van persone voorkom, die aktiwiteit van sulfaatreducerende bakterieë in die spysverteringskanaal van mense. Verder is daar volgens bogenoemde navorsers geen data ten opsigte van die hoeveelheid sulfaat wat die kolon bereik gedurende die dieet, beskikbaar nie.

Gibson *et al.* (1988:103) het fekale monsters van twee verskillende populasies ondersoek vir die teenwoordigheid van hierdie bakterieë. Hulle het spesies geïsoleer wat asetaat, melksuur, propionaat, butiraat, H_2/CO_2 , suksinaat, piruvaat, valeraat, etanol en 'n mengsel van glutamaat, serien en alanien kan metaboliseer. *Desulfovibrio* was dominant, terwyl spesies van *Desulfotomaculum*, *Desulfobacter*, *Desulfomonas* en *Desulfobulbus* ook teenwoordig was. Die proefpersone se asem is ook getoets vir die teenwoordigheid van metaan. Slegs by persone waarvan die metaan baie laag of glad nie teenwoordig was nie, is sulfaatreducerende bakterieë geïsoleer, wat weereens daarop dui dat hierdie bakterieë vir substrate soos H_2 en asetaat kompeteer.

Baie min is bekend oor die rol van sulfaatreducerende bakterieë in die kolon en hulle belang in die fermentasieprosesse bly onbekend (Gibson *et al.*, 1988:103).

Volgens Beerens en Romond (1977:1770) is bevind dat 31% van 340 fesesmonsters, wat ondersoek is vir die teenwoordigheid van sulfaatreducerende bakterieë, $10^6 - 10^8$ sulfaatreducerende bakterieë.g⁻¹ feses bevat en 16% van die monsters het $10^8 - 10^{12}$ sulfaatreducerende bakterieë.g⁻¹ feses bevat. Dus het 47% van die monsters meer as 10^6 sulfaatreducerende bakterieë.g⁻¹ feses bevat.

DOELSTELLINGS

Die doel van hierdie studie was die volgende:

- Totale tellings van die aantal aërobe en anaërobe bakterieë sowel as enterobakterieë in die feses van geselekteerde proefpersone.
- Die isolasie en bevestiging van metaanvormende bakterieë uit die feses van geselekteerde proefpersone.
- Die isolasie en identifikasie van sulfaatreducerende bakterieë en laktobasille uit die feses van geselekteerde proefpersone.
- Die verwantskap tussen die teenwoordigheid van metaanvormende bakterieë en sulfaatreducerende bakterieë in feses te ondersoek.
- Bestaande metodes vir isolasie van hierdie organismes, aan te pas, om in 'n roetine laboratorium te kan uitvoer.

HOOFSTUK 2

BENODIGDHEDE EN METODEDES

2.1 PROEFPERSONE

Fesesmonsters van agt proefpersone met ouderdomme wat wissel tussen 22 en 65 jaar is in die studie gebruik. Sewe van die proefpersone was manlik, en een vroulik (*vide* tabel 3).

Tabel 3: Die ouderdom en geslag van die proefpersone

Proefpersoon	Ouderdom	Geslag
1.	65jr.	Manlik
2.	31jr.	Manlik
3.	56jr.	Manlik
4.	24jr.	Vroulik
5.	23jr.	Manlik
6.	24jr.	Manlik
7.	22jr.	Manlik
8.	24jr.	Manlik

2.2 VERSAMELING EN HANTERING VAN DIE FESESMONSTERS

'n Steriele depperstokkie en 'n geweegde McCartneybottel met verdunningsvloeistof (*vide* 2.2.1) is aan elke proefpersoon voorsien. 'n Vars fesesmonster is met behulp van die steriele depper in die McCartneybottel met verdunningsvloeistof geplaas en so gou soos moontlik na die laboratorium gebring. Nadat die monster ontvang is, is die bottel met 'n spesiale anaërobe gasmengsel gegas. Die gasmengsel het bestaan uit suurstofvrye 10,3% CO₂, 20,7% H₂ en 69,0% N₂. Die massa van die botteltjie is weer bepaal, om sodoende 'n verdunningsfaktor te bereken.

2.2.1 Gemodifiseerde verdunningsvloeistof (Mah & Smith, 1981:954-955)

K_2HPO_4	1.74g
KH_2PO_4	0.68g
NH_4Cl	1.00g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	0.50g
Natriumtioglikolaat	0.10g
Gisekstrak	0.01g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.005g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.005g
Ystersitraat	0.005g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.005g
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.006g
H_2O (d)	1000ml

Los die bestanddele in die water op. Voeg 1ml redoksindikator (*vide* 2.2.2) by om 'n finale konsentrasie van 0,0001% te gee. Die oplossing word voortdurend met die spesiale anaërobe gasmenseel (*vide* 2.2) gegas. Versprei die oplossing in 16ml hoeveelhede in wyebek McCartneybottels. Voorsien dié bottels van metaalskroefproppe wat met rubber uitgevoer is. 'n Klein gaatjie is in die metaalprop gemaak, en met behulp van 'n spuit is die vloeistof gegas (*vide* 2.2), totdat dit kleurloos was. Steriliseer by 121°C vir 15 minute.

Na sterilisasie is 2ml reduseermiddel (*vide* 2.2.3) met behulp van 'n steriele spuit bygevoeg. Die botteltjies met verdunningsvloeistof se massa is bepaal en by 4°C in die donker gebêre.

2.2.2 Redoksindikator (Esterhuysen, 1981:53)

Berei 100ml 0,01% resasuriëoplossing. Versprei 10ml hoeveelhede daarvan in gasge vulde (*vide* 2.2) McCartneybottels (14ml) wat van digsluitende rubberproppe voorsien is. Steriliseer by 121°C vir 15 minute. Bêre by 4°C.

2.2.3 Reduseermiddel (Esterhuysen, 1981:53)

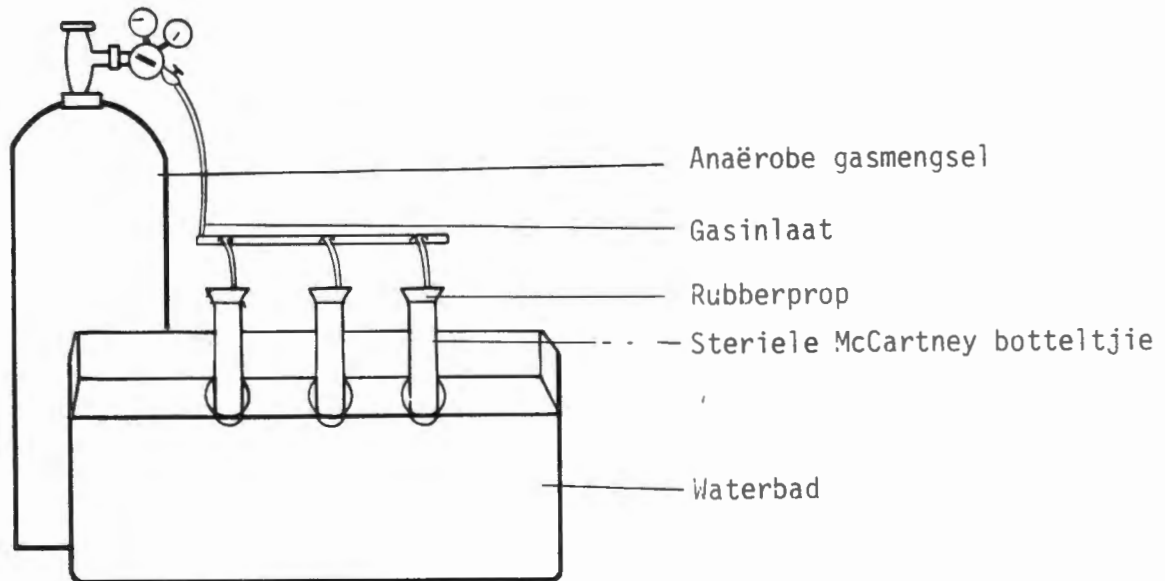
Kook 160ml 0,1N NaOH-oplossing vir een minuut en koel onder lopende kraanwater af. Plaas 2,5g sisteïenhidrochloried in 'n 200ml maatsilinder, wat van 'n digsluitende rubberprop voorsien is. Na afkoeling van die NaOH-oplossing, word dit by die sisteïenhidrochloried gevoeg en 'n gasmengsel bestaande uit N_2 , H_2 , en CO_2 (*vide* 2.2) word dadelik deur die oplossing geborrel. Nadat die sisteïenhidrochloried opgelos is, word die volume met voorafgekookte, afgekoelde gedistilleerde water, tot 200ml opgemaak. Daarna word 2,5g $Na_2S \cdot 9H_2O$ bygevoeg en word gas deur die mengsel geborrel, totdat die $Na_2S \cdot 9H_2O$ opgelos is. Versprei hierdie oplossing met behulp van 10ml steriele spuite in McCartneybotteltjies (14ml) wat van digsluitende rubberproppe voorsien is en vooraf met die gasmengsel gevul is. Steriliseer onmiddelik by $121^\circ C$ vir 15 minute. Die gesteriliseerde reduseermiddel word by $4^\circ C$ in die donker gebêre. Die oplossing moet nie toegelaat word om ouer as twee weke te word nie.

2.3 BEREIDING VAN VERDUNNINGS VAN DIE MONSTERS

Agt milliliter hoeveelhede verdunningswater (*vide* 2.2.1) is in McCartneybotteltjies versprei, terwyl dit voortdurend gegas (*vide* 2.2) is. Voorsien die botteltjies van digsluitende rubberproppe. Steriliseer by $121^\circ C$ vir 15 minute. Na sterilisasie is 1ml reduseermiddel (*vide* 2.2.3) met behulp van 'n steriele 1ml spuit bygevoeg, terwyl die botteltjie voortdurend gegas is (*vide* 2.2).

'n Reeks tienvoudige verdunnings (10^{-2} - 10^{-10}) was van elk van die voorafgeveegde fesesmonsters berei (*vide* 2.2) (*vide* figuur 15).

Nege McCartneybotteltjies met 9ml verdunningsvloeistof (*vide* 2.2.1) is elk van 'n steriele spuit, waardeur die gasmengsel (*vide* 2.2) voortdurend geborrel het, voorsien. Die fesesmonster is ook voortdurend gegas (*vide* 2.2). Een milliliter van die monster (*vide* 2.2) is met behulp van 'n steriele mikropipet onttrek en by die eerste botteltjie verdunningsvloeistof gevoeg, om 'n 10^{-2} verdunning te verkry. Berei *ut supra* tot 'n 10^{-10} verdunning. Die monster en elke verdunning is elke keer deeglik op 'n vortexmenger gemeng.



Figuur 15: Bereiding van verdunnings van 'n fesesmonster

2.4 TELLINGS VAN VERSKILLENDE BAKTERIEGROEPE

2.4.1 Totale aantal aërobe bakterieë

Na aanleiding van navorsing deur Nottingham en Hungate (1968:2178) en Mah en Smith (1981:951) is 2% voedingsagarplate wat met 10% rumenvloeistof (*vide* 2.4.1.1) en 10% anaërobe slykekstrak (*vide* 2.4.1.2) gesupplementeer is, berei. Die supplemente bevat groeifaktore wat deur die betrokke bakterieë benodig word (Nottingham & Hungate, 1968:2178; Mah & Smith, 1981:951). Die medium is by 121°C vir 15 minute gesteriliseer tensy anders vermeld.

Totale plaattellings was op bogenoemde agarplate berei, deur 0,1ml van elk van die verdunnings (*vide* 2.3) op die oppervlakte van die plate met 'n steriele glasspreier te versprei. Tellings van die kolonies is na inkubasie van 24 uur by 37°C onder aërobe toestande gedoen. Die aantal bakterieë.g⁻¹ feses is bereken.

2.4.1.1 Rumenvloeistof (Van Wyk, 1972:9)

Vyfhonderd milliliter rumenvloeistof is by 10 000 r.min.⁻¹ vir 10 minute gesentrifugeer. Die supernatant is deur Whatman no. 4 filtreerpapier gefiltreer.

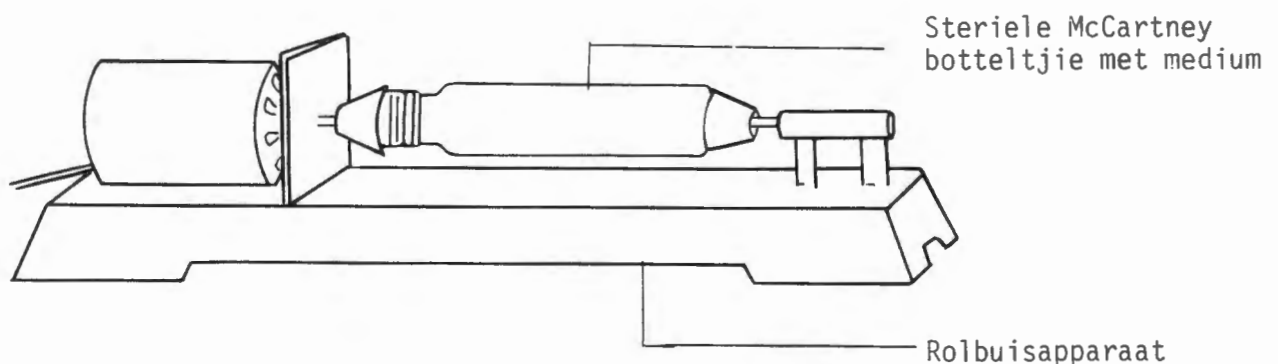
Daarna is die rumenekstrak by 121°C vir 15 minute gesteriliseer en by 4°C gebêre tot gebruik.

2.4.1.2 Anaërobe slykekstrak (Nottingham & Hungate, 1968:2178)

Verteerde slyk is vanaf 'n anaërobe slykverteerder by 'n rioolaanleg verkry. Die slyk is met 'n gelyke volume gedistilleerde water verdun. Die verdunde slyk is by 121°C vir 15 minute gesteriliseer. Na sterilisasie is die slyk laat staan om af te sak. Die supernatant is deur Whatman no. 4 filtreerpapier gefiltreer. Die filtraat (ekstrak) is weer by 121°C vir 15 minute gesteriliseer en by 4°C gebêre tot gebruik.

2.4.2 Totale aantal anaërobe bakterieë

Die rolbuistegniek van Hungate (1969:117) (*vide* figuur 16) vir die telling van verpligte anaërobe bakterieë is gevolg.



Figuur 16: Rolbuisapparaat

Voedingsagar (2%) met 10% rumenvloeistof (*vide* 2.4.1.1) en 10% anaërobe slykekstrak (*vide* 2.4.1.2) is met resasuriën (finale konsentrasie van 0,0001%) gesupplenteer (*vide* 2.2.2) en in 4ml hoeveelhede in McCartneybottels, wat van digsluitende rubberproppe voorsien is, versprei. Tydens die bereiding en verspreiding van die medium is 'n anaërobe gasmengsel (*vide* 2.2) voortdurend deur die medium

geborrel. Die medium is by 121°C vir 15 minute gesteriliseer. Na sterilisasie is 0,5ml reduseermiddel (*vide* 2.2.3) met behulp van 'n steriele spuit by die medium gevoeg, terwyl anaërobe gas voortdurend deurgeborrel het. Net voor gebruik is die agarmedium gesmelt en in 'n waterbad by 50°C geplaas.

'n Reeks verdunnings (*vide* 2.3) is vir elke fesesmonster berei. Rolbuistellings (10^{-3} - 10^{-10}) wat voortdurend gegas is, is van elke monster berei. Kolonietellings is na inkubasie by 37°C vir een week, gedoen (Costilow, 1981:75). Die rolbuis is onderstebo geïnkubeer, omdat vog wat in die rolbuis versamel het, tellings bemoeilik. Die aantal verpligte anaërobe bakterieë.g⁻¹ feses is bereken.

2.4.3 Bepaling van die totale aantal enterobakterieë

Gedehidreerde Endo-agar (Kat. no. 4044) (Merck, 1987:92) wat met 10% rumenvloeistof (*vide* 2.4.1.1) en 10% anaërobe slykekstrak (*vide* 2.4.1.2) gesupplementeer is, was gebruik. Spreiplate (10^{-2} tot 10^{-9}) is van elke fesesmonster berei (*vide* 2.4.1). Na inkubasie onder aërobe toestande by 37°C vir 48 uur, is die kolonies getel en die aantal enterobakterieë.g⁻¹ feses bereken.

2.4.4 Totale aantal laktobasille

MRS-medium (Kat. no. 10660) (Merck, 1987:121) was gebruik. Agarplate is berei en in 'n anaërobe fles, waardeur 'n gasmengsel (*vide* 2.2) vir 10 minute geborrel het, bewaar.

Spreiplate (10^{-2} - 10^{-9}) (*vide* 2.4.1) van elke fesesmonster is op die MRS-agarplate berei. Inkubasie in 'n anaërobe fles wat vir 10 minute met 'n gasmengsel (*vide* 2.2) gespoel is, het plaasgevind by 37°C vir 48 uur. Na inkubasie is die aantal laktobasille.g⁻¹ feses bereken.

2.4.5 Totale aantal metaanvormende bakterieë

Die rolbuistegniek van Hungate (1969:117) vir die telling van metaanvormende bakterieë is gevolg. 'n Gemodifiseerde medium van Baresi *et al.*, (1978:186) en Mah en Smith (1981:954) is soos volg opgemaak: NH₄Cl - 10,0g; K₂HPO₄.3H₂O - 4,0g; MgCl₂.6H₂O - 1,0g; kalsiumasetaat - 10,0g; mieresuur - 10,0g; gisekstrak - 2,0g; CaCO₃ - 10,0g; agar - 30,0g; (d) H₂O - 1000ml; slykekstrak - 10%; rumenvloeistof - 10%; resasurien - 0,0001%. Die medium is in 4ml hoeveelhede in McCartneybottels wat van digsluitende rubberproppe voorsien is, versprei. Tydens die bereiding en

verspreiding van die medium is 'n anaërobe gasmengsel (*vide* 2.2) voortdurend deur die medium geborrel. Die medium is by 121°C vir 15 minute gesteriliseer. Na sterilisasie is 0,5ml reduseermiddel (*vide* 2.2.3) met behulp van 'n steriele spuit by die medium gevoeg, terwyl anaërobe gas voortdurend deurgeborrel het. Net voor gebruik is die agarmedium gesmelt en in 'n waterbad by 50°C geplaas.

'n Reeks verdunnings (*vide* 2.3) is vir elke fesesmonster berei. Rolbuistellings (10^{-3} - 10^{-10}) wat voortdurend gegas is, is van elke monster berei. Kolonietellings is na inkubasie by 37°C vir een week gedoen (Costilow, 1981:75). Die rolbuis is onderstebo geïnkubeer, omdat vog wat in die rolbuis versamel het, tellings bemoeilik. Die moontlike aantal metaanvormende bakterieë.g⁻¹ feses is bereken.

2.4.6 Bepaling van die totale aantal sulfaatreducerende bakterieë

Die rolbuistegniek (*vide* 2.4.2) vir die telling van sulfaatreducerende bakterieë is gevolg. Gedehidreerde sulfaatreducerende API-agar (Kat. no. 5259) (Merck, 1987:149) met 10% rumenvloeistof (*vide* 2.4.1.1) en 10% anaërobe slykekstrak (*vide* 2.4.1.2) is in 4ml hoeveelhede in McCartneybottels wat van digsluitende rubberproppe voorsien is, versprei. Tydens die bereiding en verspreiding van die medium is die anaërobe gasmengsel (*vide* 2.2) voortdurend deur die medium geborrel. Die medium is by 121°C vir 15 minute gesteriliseer. Na sterilisasie is 0,5ml reduseermiddel (*vide* 2.2.3) met behulp van 'n steriele spuit by die medium gevoeg, terwyl anaërobe gas voortdurend deurgeborrel het. Net voor gebruik is die agarmedium gesmelt en in 'n waterbad by 50°C geplaas.

'n Reeks verdunnings (*vide* 2.3) is vir elke fesesmonster berei. Rolbuistellings (10^{-3} - 10^{-10}) wat voortdurend gegas is, is van elke monster berei. Kolonietellings is na inkubasie by 37°C vir een week gedoen (Costilow, 1981:75). Die rolbuis is onderstebo geïnkubeer, omdat vog wat in die rolbuis versamel het, tellings bemoeilik. Die aantal sulfaatreducerende bakterieë.g⁻¹ feses is bereken.

2.5 ISOLASIE EN IDENTIFIKASIE VAN SPESIFIEKE BAKTERIEGROEPE

2.5.1 Die laktobasille

2.5.1.1 Isolasië van laktobasille

Al die kolonies (*vide* 2.4.4) van die hoogste verdunning en 'n verteenwoordige getal kolonies van die tweede hoogste verdunning is vir die teenwoordigheid van die ensiem katalase getoets. Die toets is met 30% H₂O₂ op 'n voorwerpsglasie uitgevoer (Cowan & Steel, 1965:22; Harrigan & McCance, 1966:65). Al die katalase-negatiewe kolonies is herhaaldelik op MRS-agarplate (*vide* 2.4.4), wat anaëroob geïnkubeer is, uitgestryk (*vide* 2.4.4). 'n Gramkleuring is uitgevoer om aan te toon of die kulture suiwer is. Die gesuiwerde kolonies is weer as katalase-negatief bevestig. Al die veronderstelde laktobasil-isolate is geïnkuleer in MRS-sop (Kat. no. 10661) (Merck, 1987:121) wat met 0,02% sisteïenhydrochloried gesupplementeer is (Vorster, 1988:24).

2.5.1.2 Identifikasie van die laktobasille

Die volgende toetse vir die identifikasie van sommige *Lactobacillus* genera was gedoen om aan die kriteria van Sharpe (1981:1664) en Sneath *et al.* (1986:1208) te voldoen.

2.5.1.2.1 Suur- en gasvorming vanaf glukose (Sharpe, 1981:1665; Sneath *et al.*, 1986:1208; Vorster, 1988:25)

MRS-sop (*vide* 2.5.1.1) sonder natriumasetaat, wat met 0,02% sisteïenhydrochloried gesupplementeer is, is gebruik. 0,05% Chloorfenolrooi (w/v) (Cowan & Steel, 1965:110; Sneath *et al.*, 1986:1216) is as pH indikator gebruik. Die buise met medium is van Durham-buisies voorsien en by 121°C vir 15 minute gesteriliseer. Na inokulasie was die medium by 37°C vir 3 dae geïnkubeer. Die vorming van suur en akkumulasie van gas in die Durham-buis het aangetoon dat die toetsorganisme heterofermentatief is.

2.5.1.2.2 Vermoë om te groei by 45°C en 15°C (Sharpe, 1981:1665; Sneath *et al.*, 1986:1220)

Geïnkuleerde MRS-soppe (*vide* 2.5.1.1), wat met 0,02% sisteïenhydrochloried (Vorster, 1988:24) gesupplementeer was, is respektiewelik by 45°C en 15°C geïnkubeer vir 48 uur. Die teenwoordigheid van groei het aangedui op 'n positiewe reaksie.

2.5.1.2.3 Suurvorming vanaf ribose (Sharpe, 1981:1665; Sneath *et al.*, 1986:1216)

MRS-sop (*vide* 2.5.1.1) sonder glukose met 1% ribose (asepties bygevoeg na sterilisasie) en 0,05% chloorfenolrooi (w/v) as pH-indikator (Cowan & Steel, 1965:110), is geïnkuleer en by 37°C geïnkubeer vir 5 dae (Vorster, 1988:26). Die buise is daaglik vir suurvorming ondersoek.

2.5.1.2.4 Suurvorming vanaf koolhidrate (Sneath *et al.*, 1986:1216)

'n Basale medium wat uit MRS-sop (*vide* 2.5.1.1) sonder glukose en vleisekstrak, met 0,05% chloorfenolrooi (w/v) (Cowan & Steel, 1965:110; Sneath *et al.*, 1986:1216) bestaan, is gebruik. Verskillende koolhidraatmediums (pH 6,2 - 6,4) is voorberei deur 100ml basale medium met 1% koolhidraat, voor sterilisasie te supplementeer (Sneath *et al.*, 1986:1216). Die volledige medium is in 'n stoomdrukker by 121°C vir 15 minute gesteriliseer en dadelik na sterilisasie afgekoel.

Die verskillende koolhidraatmediums is onderskeidelik met die verskillende isolate geïnkuleer en by 37°C vir 5 dae geïnkubeer (Vorster, 1988:26). Die buise is daaglik vir suurvorming ondersoek. Die verskillende koolhidrate wat gebruik was, is:

- * arabinose
- * galaktose
- * laktose
- * maltose
- * mannitol
- * melibiose

- * melisitose
- * ribose
- * sellobiose

2.5.1.2.5 Hidrolise van eskulien (Sharpe, 1981:1668)

Die medium is volgens Cowan en Steel (1965:112) voorberei. Die geïnkuleerde medium is by 37°C vir 48 uur geïnkubeer. Die teenwoordigheid van 'n bruin kleur dui op 'n positiewe reaksie.

2.5.1.2.6 Vorming van ammoniak vanaf arginien (Sharpe, 1981:1669; Sneath *et al.*, 1986:1221)

Basale MRS-sop (*vide* 2.5.1.1) sonder diammoniumsitraat met 0,3% arginienmonohidrochloried is gebruik (Vorster, 1988:23). Die medium is geïnkuleer en by 37°C vir drie dae geïnkubeer. Na inkubasie is vir die teenwoordigheid van ammoniak met Nessler-reagens getoets (Seeley & Vandemark, 1962:103).

2.5.1.2.7 Fruktose-6-P fosfoketolase (Sneath *et al.*, 1986:1423)

Om te onderskei tussen laktobasille en bifidobakterieë, is die fruktose-6-P fosfoketolasetoets volgens Sneath *et al.* (1986:1423) uitgevoer.

2.5.2 Die metaanvormende bakterieë

2.5.2.1 Isolasië en bevestiging van metaanvormende bakterieë

Voordat kolonietellings van die metanogene (*vide* 2.4.5) gedoen is, is daar eers by die laagste verdunnings (10^{-6} - 10^{-8}) van al die monsters vir die teenwoordigheid van metaan, deur gaschromatografie getoets. 'n Pye Unicam gaschromatograaf is van 'n vlekvrystaalkolom (1,8m x 0,32cm lank) wat met Poropak N 80/100 gepak is, voorsien (Baresi *et al.*, 1978:187; Alltech Associates, 1982:35). Helium, teen 'n vloeitempo van 25ml.min⁻¹ is as draergas gebruik (Alltech Associates, 1982:35). Die inspuiter, detektor en kolom se temperatuur was 50°C (Alltech Associates, 1982:35). Gasmonsters (1,0ml) is met behulp van gasdigte spuite vanuit die laagste

verdunning ontrek en met die gaschromatograaf ontleed. Al die monsters wat metaannegatief was, is uitgegooi.

As gevolg van die groot hoeveelhede vog wat in die verdunningsbotteltjies versamel het, kon slegs by sekere rolbuis kolonietellings gedoen word. Die res van die rolbuis kon nie tellings van gemaak word nie, omdat al die kolonies afgespoel was. Hierdie rolbuis het wel metaangas gehad.

Al die metaanpositiewe monsters is daarna in 'n anaërobe kabinet, op die gemodifiseerde agarplaatmedium uitgeplaat vir die isolasie van metanogene (*vide* 2.4.5) en in die kabinet by 37°C geïnkubeer.

Die anaërobe kabinet bestaan uit 'n lugdigte eenheid van vinielplastiek. Lug word deur middel van 'n vakuumpomp verwyder, wat dan met 'n gasmengsel van 65% stikstof, 5% waterstof en 30% koolstofdiksied vervang word. Die gasmengsel vloei oor 'n palladiumkatalis. Die kabinet is ook van 'n inkubator voorsien. Sodra bakteriese groei op die agarplate voorgekom het, is van die kolonies in gemodifiseerde metaansopmedium (*vide* 2.4.5) geïnkuleer en in die anaërobe kabinet geïnkubeer. Na 5 weke is daar weer vir die vorming van metaan met behulp van die gaschromatograaf ondersoek. Die metaannegatiewe monsters is uitgegooi.

Gramkleurings is van al die metaanpositiewe monsters gemaak om die morfologie sowel as die Gramreaksie te bepaal. Geen verdere identifikasie van hierdie groep bakterieë is gedoen nie.

2.5.3 Die sulfaatreducerende bakterieë

2.5.3.1 Isolasie van sulfaatreducerende bakterieë

Geen swart kolonies het na inkubasie van die rolbuis (*vide* 2.4.6) gevorm nie. Geen sulfaatreducerende bakterieë was dus in die fesesmonsters teenwoordig nie.

HOOFSTUK 3

RESULTATE EN BESPREKING

3.1 TOTALE TELLINGS VAN DIE SPESIFIEKE BAKTERIEGROEPE

3.1.1 Resultate

3.1.1.1 Totale aantal aërobe bakterieë

Die gemiddelde plaattellings (*vide* 2.4.1) van die lewenskragtige aërobe bakterieë van die verskillende proefpersone word in tabel 4 gegee.

Tabel 4: Totale agarplaattellings van die lewenskragtige aërobe bakterieë.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings (x 10 ⁶ .g ⁻¹ feses)
1	16,7
2	4,4
3	5,3
4	4,6
5	9,4
6	0,3
7	0,5
8	30,2

3.1.1.2 Totale aantal anaërobe bakterieë

Die gemiddelde totale rolbuistellings (*vide* 2.4.2) van die lewenskragtige anaërobe bakterieë van die verskillende proefpersone word in tabel 5 gegee.

Tabel 5: Totale rolbuistellings van die anaërobe lewenskragtige bakterieë.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings (x 10⁷.g⁻¹ feses)
1	44,9
2	9,0
3	91,3
4	48,4
5	177,0
6	392,0
7	0,9
8	417,0

3.1.1.3 Totale aantal enterobakterieë

Die gemiddelde totale agarplaattellings (*vide* 2.4.3) van die lewenskragtige enterobakterieë van die verskillende proefpersone word in tabel 6 gegee.

Tabel 6: Totale agarplaattellings van die lewenskragtige enterobakterieë.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings (x 10⁵.g⁻¹ feses)
1	65,1
2	5,3
3	7,9
4	9,2
5	7,5
6	1,7
7	11,1
8	21,1

3.1.1.4 Totale aantal laktobasille

Die gemiddelde totale agarplaattellings (*vide* 2.4.4) van die lewenskragtige laktobasille van die verskillende proefpersone word in tabel 7 gegee.

Tabel 7: Totale agarplaattellings van die lewenskragtige laktobasille.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings (x 10⁶.g⁻¹ feses)
1	2,7
2	6,1
3	3,7
4	20,4
5	1,3
6	2,1
7	1,4
8	0,4

3.1.1.5 Totale aantal metaanvormende bakterieë

Die gemiddelde totale rolbuistellings (*vide* 2.4.5) van die lewenskragtige metaanvormende bakterieë van die verskillende proefpersone word in tabel 8 gegee.

Tabel 8: Totale rolbuistellings van die lewenskragtige metaanvormende bakterieë.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings (x 10⁵.g⁻¹ feses)
1	7,4
2	75,5
3	12,3
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0

3.1.1.6 Totale aantal sulfaatreducerende bakterieë

Die gemiddelde totale rolbuistellings (*vide* 2.4.6) van die lewenskragtige sulfaatreducerende bakterieë van die verskillende proefpersone word in tabel 9 gegee.

Tabel 9: Totale rolbuistellings van die lewenskragtige sulfaatreducerende bakterieë.g⁻¹ feses

Proefpersoon	Gemiddelde totale tellings.g ⁻¹ feses
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0

3.1.1.7 Voorkoms van die verskillende bakteriegroepe

Die voorkoms van die verskillende bakteriegroepe (as %) by elke proefpersoon word in tabel 10 gegee.

Tabel 10: Voorkoms van die verskillende bakteriegroepe by die proefpersone

Bakteriegroepe (%)	Proefpersoon								Gem. (%)
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Aërobe bakterieë	3,59	4,66	0,58	0,94	0,53	0,008	5,26	0,72	2,04
Anaërobe bakterieë	96,41	95,34	99,42	99,06	99,47	99,99	94,74	99,28	97,96
Enterobakterieë	1,40	0,56	0,09	0,19	0,04	0,004	11,68	0,05	1,75
Laktobasille	0,58	6,46	0,39	4,18	0,07	0,05	14,74	0,01	3,31
Metanogene	0,16	7,99	0,13	0	0	0	0	0	2,76
Sulfaatreduseerders	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3.1.2 Bespreking

Afgesien van probleme met sekere kwantifiseringstegnieke tydens die ondersoek van die intestinale mikrobiota, moet daar volgens Koornhof *et al.* (1979:335) ook ander probleme in aggeneem word, *viz.*,

- die aard en seleksie van fesesmonsters,
- versameling en vervoer van die monsters,
- geskikte mediums en kultuurtegnieke in die laboratorium,
- isolering van voldoende getal kolonies wat die groot verskeidenheid tipes mikroörganismes in die feses verteenwoordig.

Navorsingsresultate toon dat daar verskillende menings is oor die aantal en tipes, asook die faktore wat die mikrobiële samestelling van feses beïnvloed.

Mitsuoka en Hayakawa (1972:333) vind dat spesies van *Bacteriodes* die dominante mikrobiële biota in feses van volwassenes is. Bifidobakterieë en *Eubacterium tortuosum* is naas dominant, terwyl enterobakterieë, streptokokke, laktobasille, klostridia en stafilokokke die res van die totale mikrobiële samestelling verteenwoordig. Moore en Holdeman (1974:966) vind dat 20% van die fekale biota van mense deur spesies van *Bacteriodes* verteenwoordig word. Volgens Koornof *et al.* (1979:335) word laer tellings van *Bacteriodes* en bifidobakterieë by swart Suid-Afrikaners as by swart Noord-Amerikaners aangetref. Navorsing deur Benno *et al.* (1989:1103) wys daarop dat veranderinge in die mikrobiële biota van mense deur die inname van hoë veseldieet vertraag word. Die aantal bifidobakterieë word veral hierdeur beïnvloed.

Volgens Brock en Madigan (1988:396) is die omgewing van die kolon streng anaëroob, dus sal hoë getalle anaërobe bakterieë, in die omgewing van 10^8 - 10^{10} bakterieë.g⁻¹ feses, in die kolon voorkom. Die tellings van die totale aantal anaërobe bakterieë wat geïsoleer is uit die feses van die proefpersone tydens hierdie studie, stem goed hiermee ooreen. Die gemiddelde persentasie anaërobe bakterieë wat geïsoleer is, is 97,96%. Dit vergelyk goed met Jawetz *et al.* (1987:316) wat beweer dat in 'n gesonde volwasse persoon se kolon 96-99% van die bakterieë anaëroob is.

Die oksidasie-reduksie potensiaal (Eh) van 'n organisme is 'n belangrike eienskap wat bepaal of 'n organisme aëroob of anaëroob groei. Die Eh is dus die vermoë van 'n organisme om 'n elektron op te neem of af te gee, met ander woorde om gereduseer

of geoksideer te word. In roetine laboratoriummediums is opgeloste suurstof vir die styging van die Eh verantwoordelik. Hierdie positiewe Eh inhibeer die groei van verpligte anaërobe organismes. Die meerderheid anaërobe bakterieë word by 'n Eh van -100 mV geïnhibeer, terwyl ander slegs by 'n Eh van -330 mV sal groei. Die teoretiese konsentrasie suurstof by hierdie Eh is 1.48×10^{-66} molekules.liter⁻¹. Dit is dus belangrik by anaërobe bakterieë om die Eh-waardes van die medium laag te hou om anaërobe toestande te skep en nie slegs net die verwydering van suurstof nie. Reduseermiddels word by media gevoeg om die Eh-vlakke van die media sodoende te verlaag vir die anaërobe bakterieë om te groei (American Society for Microbiology, 1981:73). In hierdie studie is sisteïenhydrochloried gebruik as reduseermiddel.

Die gemiddelde persentasie aërobe bakterieë wat vanaf die agt proefpersone geïsoleer was, is 2,04% (*vide* tabel 9). Hierdie bakterieë sluit egter fakultatief anaërobe bakterieë in, vanweë hulle vermoë om in die kolon, wat 'n anaërobe omgewing is, te oorleef. Volgens Jawetz *et al.* (1987:316) is 1-4% van die normale mikrobiese bewoners van die kolon aëroob en fakultatief anaëroob.

Mata *et al.* (1969:601) beweer dat die teenwoordigheid van sekere groepe bakterieë (enterobakterieë, enterokokke en mikroaërofiële laktobasille) in die intestinale kanaal meer afhanklik is van die tipe voedsel wat ingeneem word asook sekere omgewingsfaktore wat dit kan beïnvloed.

Die persentasie enterobakterieë wat tydens die studie geïsoleer was, is baie laag (1,75%) (*vide* tabel 9). Mitsuoka en Hayakawa, (1972:333) wys daarop dat die aantal enterobakterieë met toenemende ouderdom verlaag. Die gemiddelde telling van die aantal enterobakterieë was $16,11 \times 10^5$ enterobakterieë.g⁻¹ feses (*vide* tabel 5). Volgens Goldin (1986:369) wissel die aantal enterobakterieë in die spysverteringskanaal tussen 10^4 en 10^{10} enterobakterieë.g⁻¹ feses.

Die gemiddelde persentasie laktobasille van die proefpersone was 3,31% (*vide* tabel 9). Volgens Sharpe (1981:1654) maak die laktobasille slegs 0,7-1% van die totale mikrobiese populasie van die kolon uit. Mitsuoka en Ohno (1977:236) wys daarop dat tydens sekere toestande die aantal laktobasille dominant in feses kan wees. Die laktobasil-persentasie van proefpersone 2, 4 en 7 was hoër as die ander persone s'n, wat dan bydra tot die hoë persentasie laktobasille (*vide* tabel 9).

Alhoewel metaangas by meeste van proefpersone teenwoordig was, is die gemiddelde persentasie metaanvormende bakterieë wat geïsoleer was, baie laag (2,76%) (*vide* tabel 9). Tellings kon egter nie by al die proefpersone gedoen word nie vanweë die feit dat vog in die botteltjies versamel het en al die kolonies afgespoel het. Die

gemiddelde tellings van die metanogene van proefpersone 1, 2 en 3 was $3,17 \times 10^6$ metanogene.g⁻¹ feses (*vide* tabel 7). Nottingham en Hungate (1968:2178) vind dat tellings van metanogene wissel tussen 2×10^6 - 2×10^9 metanogene.g⁻¹ feses. Goldin (1986:369) vind dat die aantal metanogene in die spysverteringskanaal tussen 10^6 en 10^{10} metanogene.g⁻¹ feses wissel. Ondersoeke wat deur Miller en Wolin (1983:318) gedoen is vir die teenwoordigheid van metanogene in feses, vind dat by twee verskillende proefpersone, die aantal metanogene wissel tussen 0,6% en 7,1%.

Geen sulfaatreducerende bakterieë is uit die feses van die proefpersone geïsoleer nie (*vide* tabel 8). Metaanvormende bakterieë is wel geïsoleer en dit wil voorkom asof die metanogene die beskikbare substrate soos waterstof en asetaat in die spysverteringskanaal gebruik om te groei en terselfdertyd die sulfaatreducerende bakterieë se groei onderdruk. Die resultate stem ooreen met resultate van ander navorsers (Mountford & Asher, 1981:252; Pfennig *et al.*, 1981:928; Gibson *et al.*, 1990:679) wat beweer dat metanogene en sulfaatreducerende bakterieë kompeteer vir beskikbare substrate.

Volgens hierdie studie is die persentasie laktobasille, enterobakterieë en metanogene slegs 'n klein persentasie (7,82%) van die totale persentasie bakterieë wat in feses voorkom (*vide* tabel 9). Die res, naamlik 92,18% is ongeïdentifiseerde bakteriese groepe wat aërobes en anaërobes insluit.

3.2 DIE ISOLASIE EN IDENTIFIKASIE VAN DIE *LACTOBACILLUS*-ISOLATE

3.2.1 Resultate

3.2.1.1 Koloniemorfologie van die *Lactobacillus*-isolate

Die eienskappe van die koloniemorfologie wat gebruik was vir hierdie fisiologiese bakteriegroep vir verdere ondersoek, word in tabel 10 gegee.

Tabel 10: Koloniemorfologie van die verskillende isolate in die *Lactobacillus*-groep

Isolaat- nommer	Vorm van kolonie	Verhe- wendheid	Rand	Oppervlak voorkoms	Optiese eienskappe	Pigment
L1	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L2	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L3	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L4	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L5	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L6	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L7	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L8	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L9	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L10	Ro	Op	Ror	Gl	On	Rm
L11	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L12	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L13	Ro	Pl	Ro	Gl	On	Wt
L14	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L15	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L16	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L17	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L18	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L19	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L20	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L21	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L22	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L23	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L24	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L25	Pl	Op	Ro	Gl	On	Rm
L26	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L27	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L28	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L29	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L30	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm

Tabel 10: (vervolg)

Isolaat- nommer	Vorm van kolonie	Verhe- wendheid	Rand	Oppervlak voorkoms	Optiese eienskappe	Pigment
L31	Ro	Op	Onr	Gl	On	Rm
L32	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L33	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L34	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L35	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L36	Ro	Op	Ro	Gl	On	WT
L37	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L38	Ro	Op	Ro	Gl	On	Wt
L39	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L40	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L41	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L42	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L43	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L44	Pl	Op	Ro	Gl	On	Rm
L45	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L46	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L47	Pl	Op	Ro	Gl	On	Rm
L48	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L49	Ro	Op	Ro	Gl	On	Rm
L50	Pl	Op	Ro	Gl	On	Rm

Die simbole wat gebruik is:

Ro = Rond; Op = Opgehewe; Gl = glad; On = Ondeursigtig; Rm = Roomkleurig; Wt = Wit; Pl = Plat; Onr = Onreëlmatig.

3.2.1.2 Fenotipiese eienskappe en identifikasie van die *Lactobacillus*-isolate

Deur die aanwending van die fenotipiese toetse (*vide* 2.5.1.1) is gevind dat al die isolate as Grampositiewe, katalase-negatiewe basille beskryf kan word. Fruktose-6-fosfaat-fosfoketolase (*vide* 2.5.1.2.7) was afwesig by al die isolate. Al die isolate het ook glukose gefermenteer (*vide* 2.5.1.2.1) sonder die produksie van gas (*vide* 2.5.1.2.1).

Met inagneming van bogenoemde toetse is al die isolate as verpligte homofermenterende- of fakultatief heterofermenterende laktobasille geklassifiseer (Sneath *et al.*, 1986:1218) (*vide* tabel 12).

Tabel 12: Klassifikasie van die isolate as verpligte homofermenteerders of as fakultatiewe heterofermenteerders

Isolaatnommer	Tipe laktobasil
L1 - L12, L17 - L22 en L25 - L50	Fakultatiewe heterofermentatiewe laktobasille
L13 - L16, L23 en L24	Verpligte homofermentatiewe laktobasille

Die ander fenotipiese eienskappe (*vide* 2.5.1.2.2; 2.5.1.2.3; 2.5.1.2.4; 2.5.1.2.5 en 2.5.1.2.6) van die verskillende genera van die laktobasil-isolate word in tabel 13 gegee.

Tabel 13: Die fenotipiese eienskappe van die verskillende laktobasil-isolate

Isolaatnommer	Groei by		Hidrolise v. eskulien	NH ₃ vanaf Argintien	CO ₂ vanaf glukonaat	Arabinose	Galaktose	Laktose	Fermentasie van					Seltobiose	Ribose
	15°C	45°C							Mal-tose	Man-nitol	Meli-biose	Melisitose			
L1 - L9, L26 - L34, L39 - L41, L43 - L50	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
L10 - L12, L17 - L19, L25, L35 - L38, L42	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	
L13 - L16	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	
L23, L24	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Die simbole wat gebruik is:

+ = positiewe reaksie

- = negatiewe reaksie

Die genera van die *Lactobacillus*-isolate wat vanuit die proefpersone geïsoleer was word in tabel 13 gegee.

Tabel 13: Genera van die *Lactobacillus*-isolate geïsoleer vanuit die proefpersone

Isolaatnommer	Genus en spesie
L1 - L9, L20 - L22, L26 - L34, L39 - L41, L43 - L50	<i>Lactobacillus plantarum</i>
L10 - L12, L17 - L19 L25, L35 - L38, L42	<i>Lactobacillus casei</i>
L13 - L16	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
L23, L24	<i>Lactobacillus salivarius</i> subspesie <i>salivarius</i>

3.2.2 Bespreking

Die genus *Lactobacillus* kan volgens Sneath *et al.* (1986:1209) soos volg gedefinieer word:

Grampositiewe, nie-spoorvormende basille wat katalase-negatief is, gewoonlik nie-beweeglik, besit 'n fermentatiewe metabolisme met komplekse voedingsvereistes en is meestal mikroaërofiel.

Van die 50 isolate wat in hierdie studie as spesies van *Lactobacillus* geïsoleer en geïdentifiseer was, is 80% as fakultatiewe heterofermentatiewes en 12% as verpligte homofermentatiewe laktobasille geklassifiseer (*vide* tabel 11). Van hierdie 50 isolate was 64% as *Lactobacillus plantarum*, 24% as *L. casei*, 8% as *L. acidophilus* en 4% as *L. salivarius* subspesie *salivarius* geïdentifiseer.

Volgens Mitsuoka en Hayakawa (1972:333); Mitsuoka *et al.* (1975:449); Salyers *et al.* (1977:529); Sharpe (1981:1665) en Benno *et al.* (1989:1100) is meeste van die bogenoemde spesies al uit feses geïsoleer. *Lactobacillus acidophilus*, *L. fermentum* en *L. salivarius* is meestal die dominante spesies, met *L. plantarum* en *L. leichmanni* wat somtyds oorheersend kan voorkom (Sharpe, 1981:1665). *Lactobacillus*

leichmanni is volgens Sneath *et al.* (1986 : 1219) na *L. delbrueckii* subspesie *lactis* verander.

Sneath *et al.* (1986:1215) beweer dat *Lactobacillus acidophilus* 'n voordelige effek op mens- en dier gesondheid kan uitoefen. Industrieel word die organisme vir die produksie van farmaseutiese preperate gebruik wat vir die herstel van die normale intestinale mikrobiota na 'n siekte of na die gebruik van antibiotika aangewend word. Navorsing deur Sharpe *et al.* (1973:281) toon aan dat *L. plantarum*, *L. acidophilus* en somtyds *L. salivarius* met subakute bakteriese endokardites, sistemiese septisemie en absesse geassosieer kan word.

Kultuur- en fisiologiese eienskappe van die genus *Bifidobacterium* stem grootliks met ander genera *viz.*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* en *Lactobacillus* ooreen (Sharpe, 1981:1664; Sneath *et al.*, 1986:1423). Volgens Scardovi (1981:1955) en Sneath *et al.* (1986:1423) is die aanwending van die fruktose-6-fosfaat-fosfoketolase-toets die mees direkte en betroubare metode om tussen bogenoemde genera te onderskei. Hierdie ketolase-ensiem is egter die sleutel-ensiem van die bifidobakteriese se heksose metabolisme. Baie anaërobe fruktose-6-fosfaat-fosfoketolase-negatiewe bakterieë soos laktobasille stem morfologies met bifidobakterieë ooreen (Scardovi, 1981:1955).

'n Probleem wat tydens hierdie studie ontstaan het, is dat die isolate baie vinnig afgesterf het. Sneath *et al.* (1986:1216) wys egter daarop dat sommige spesies van *Lactobacillus* baie vinnig kan afsterf. Met die byvoeging van 0,02% sisteien hidrochloried (*vide* 2.5.1.1) in die isolasie- en identifikaasiediums, het die isolate langer oorleef. Meeste isolate het egter ook beter in sopmediums as op agarmediums gegroei.

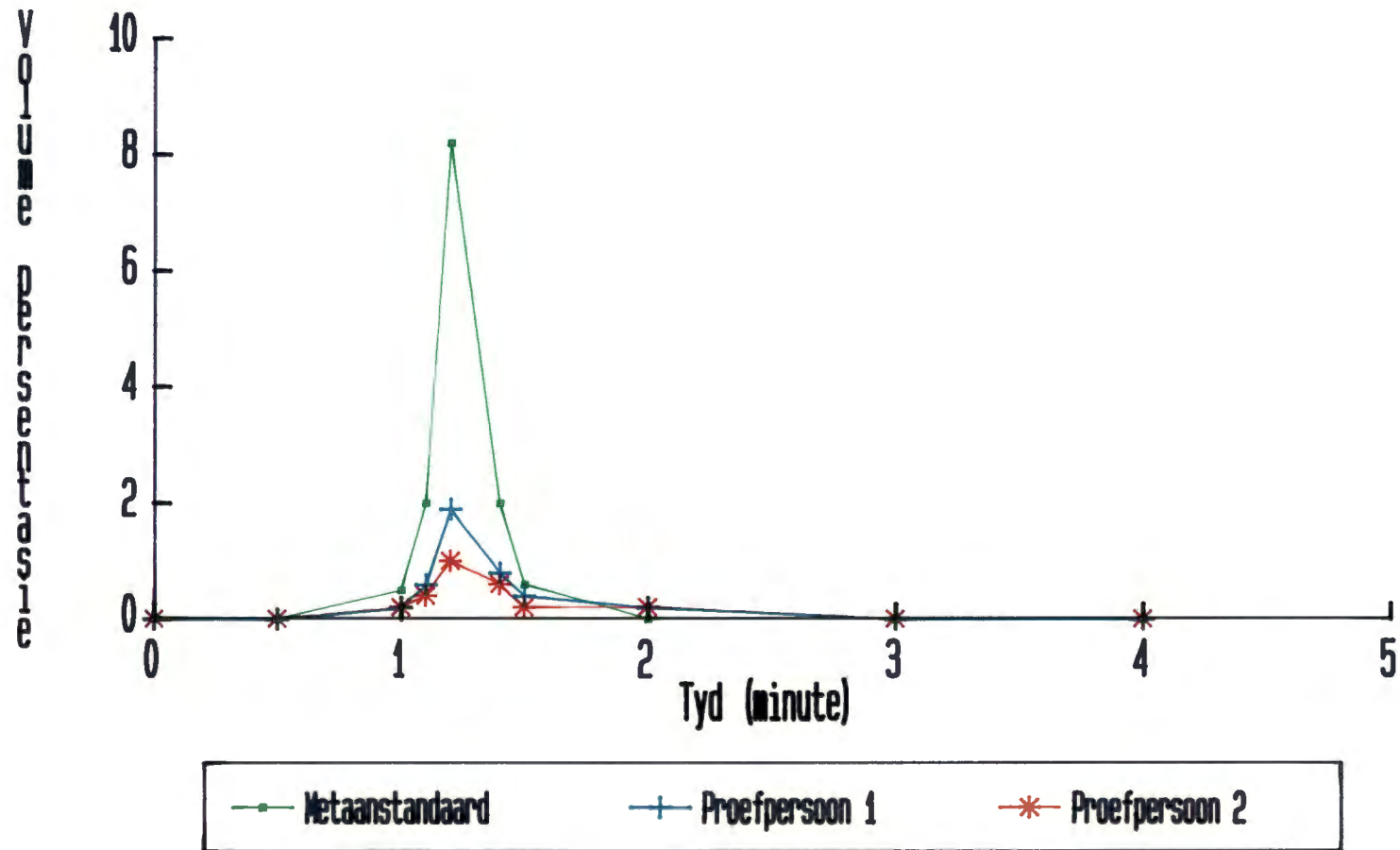
3.3 DIE BEVESTIGING VAN MOONTLIKE METAANVORMENDE BAKTERIEË

3.3.1 Resultate

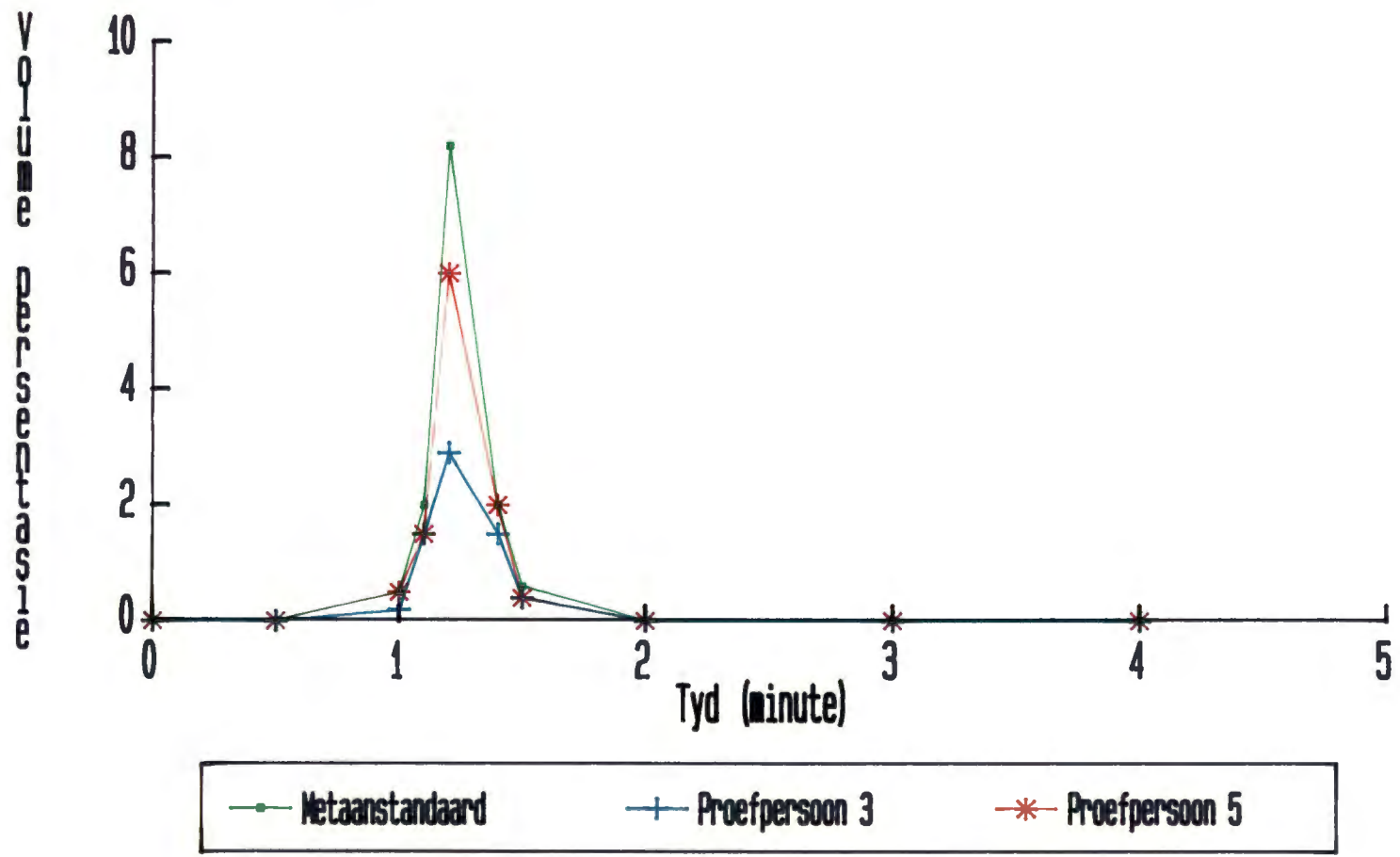
3.3.1.1 Die bevestiging vir die teenwoordigheid van metaangas by die verskillende proefpersone, deur gaschromatografie

Figure 17 - 19 toon die gaschromatografiese analise vir die teenwoordigheid van metaan by die proefpersone aan. By al die proefpersone, behalwe by proefpersone 4 en 8 was metaangas teenwoordig.

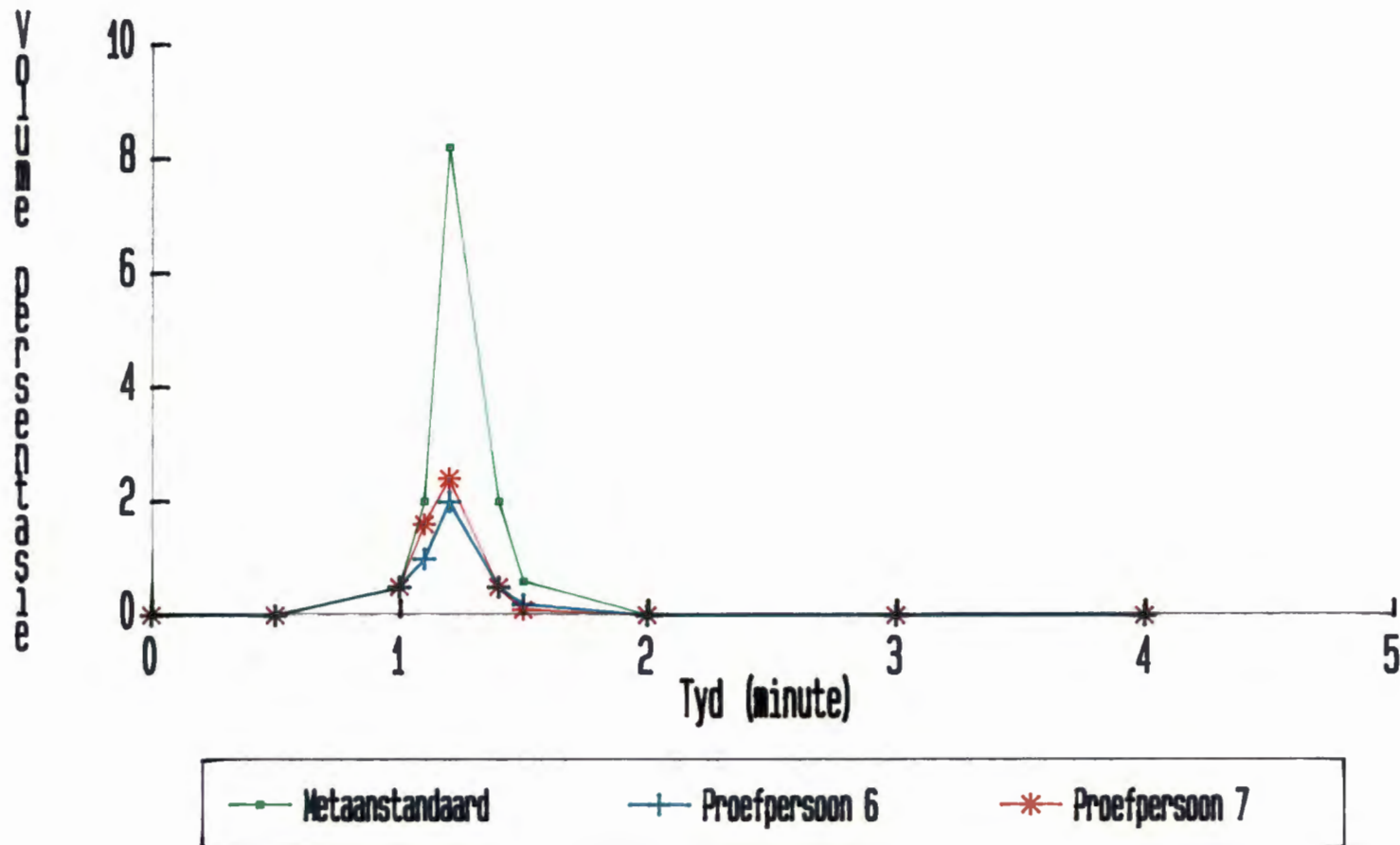
Figuur 17: Gaschromatografiese analise vir die teenwoordigheid van metaan in proefpersone 1 en 2



Figuur 18: Gaschromatografiese analise vir die teenwoordigheid van metaan in proefpersone 3 en 5



Figuur 19: Gaschromatografiese analise vir die teenwoordigheid van metaan in proefpersone 6 en 7



3.3.1.2 Die morfologiese karakter van die moontlike metaanvormende isolate

Tabel 16 toon die morfologie sowel as die Gramreaksie van die moontlike metaanvormende isolate aan.

Tabel 16: Die morfologie en Gramreaksie van moontlike metaanvormende isolate

Proefpersoon	Isolaatnommer	Gramreaksie
1	M1	Grampositiewe kort basille tot kokko-basille
2	M2	Grampositiewe kokkobasille
3	M3	Grampositiewe kort basille tot kokko-basille
5	M5	Grampositiewe kort basille tot kokko-basille
6	M6	Grampositiewe kokko-basille
7	M7	Grampositiewe kokko-basille

Geen verdere identifikasie is gedoen nie.

3.3.2 Bespreking

Die metaanproduserende argeobakterieë is lank reeds van ander mikroörganismes onderskei deurdat dit die enigste bakterieë is wat metaan (CH₄) as hoof kataboliese produk produseer (Staley *et al.*, 1989:2173).

Op grond van filogenetiese data word die groep bakterieë in drie hoofafdelings verdeel, *viz.*, *Methanobacteriales*, *Methanococcales* en *Methanomicrobiales* (Staley *et al.*, 1989:2173). Slegs spesie van die afdelings *Methanobacteriales* en *Methanomicrobiales* word in die intestinale kanaal van mense aangetref (Staley *et al.*, 1989:2174,2185,2191). Spesies van die afdeling *Methanococcales* word in habitate met 'n hoër soutkonsentrasie aangetref.

Die absolute anaërobe toestande tydens die isolasie en kweking van die metanogene kan nie oorbeklemtoon word nie. Die gebruik van 'n anaërobe kabinet (*vide* 2.5.2) het grotendeels gehelp om hierdie probleme tydens die studie te oorkom. Die byvoeging van slykekstrak en rumenvloeistof by die isolasiemedium (*vide* 2.4.5) het aan al die spesifieke groeifaktore van die metanogene voldoen (Staley *et al.*, 1989:2175).

Alhoewel daar by proefpersone 5,6 en 7 geen tellings van moontlike metanogene gedoen kon word nie (*vide* 3.1.1.5, tabel 7), is daar wel met gaschromatografiese analises, metaan by hierdie monsters waargeneem (*vide* 3.3.1.1). Die konsentrasie metaan by die verskillende verdunningskulture van die proefpersone het baie gewissel. Volgens Tabel 7 (*vide* 3.1.1.5) was by proefpersoon 2 die mees moontlike aantal metanogene teenwoordig ($75,5 \times 10^5$ bakterieë.g⁻¹ feses). Met die gaschromatografiese analises is die hoogste konsentrasie metaan waargeneem. Die aanwending van gaschromatografie is 'n baie vinnige en doeltreffende metode vir die aanvanklike moontlike teenwoordigheid van metanogene in fesesmonsters. Al nadeel is die hoeveelheid metaan wat geproduseer moet word vir gerieflike analises (Nottingham & Hungate, 1968:2178). Die probleem kan gedeeltelik oorbrug word deur baie lang inkubasieperiodes (tussen 20 en 30 dae) toe te laat.

Volgens Staley *et al.* (1989:2173) word hierdie fisiologiese groep bakterieë hoofsaaklik op grond van hulle morfologiese en sekere fisiologiese eienskappe tot op genusvlak geïdentifiseer. Meer gevorderde tegnieke viz., DNA\DNA-homologie, rRNA-homologie en RNA-opeenvolgings word gebruik om tussen die verskillende spesies te differensieër. Dit blyk dat al die moontlike metaanproduserende isolate wat tydens hierdie studie van die verskillende proefpersone geïsoleer was, tot die genus *Methanobrevibacter* behoort (Staley *et al.*, 1989:2178). Die morfologie van die isolate het gewissel van Grampositiewe kort basille tot kokko-basille (*vide* 3.3.1.1, tabel 16). Spesies van hierdie genus is ook van die uitsonderings wat asetaat as hoofbron vir sellulêre koolstof benodig (Staley *et al.*, 1989:2178, *vide* 2.4.5).

Smith en Hungate (1958:713), Mah en Smith (1981:950), Miller *et al.* (1982:227) en Staley *et al.* (1989:2178) beweer dat *Methanobrevibacter ruminantium* en *Methanobrevibacter smithii* tot dusver die enigste metaanproduserende bakterieë wat uit feses van mense geïsoleer is.

Geen sulfaatreduserende bakterieë was uit die verskillende proefpersone geïsoleer nie (*vide* 3.1.1.6, Tabel 8). Die resultate stem ooreen met die van ander navorsers wat beweer dat daar kompetisie tussen dië groep bakterieë en metanogene bestaan Beerens & Romond, 1977:1770; Oremland & Polcin, 1982:2170; Gibson *et al.*, 1988:103). Volgens Gibson *et al.* (1988:103) kan moontlike diëet- of gasheergeproduseerde faktore òf metanogene òf sulfaatreduserende bakterieë inhibeer, om sodoende die een groep in 'n ekologiese nis te bevoordeel.

HOOFSTUK 4

GEVOLGTREKKING

Die volgende gevolgtrekkings kan vanuit die resultate gemaak word:

4.1 Die vervoer en hantering van die fesesmonsters, sowel as die metodes vir die isolasie van spesifieke bakteriegroepe uit fesesmonsters is suksesvol toegepas. Tydens die isolasie van anaërobe bakterieë is anaërobe toestande deurgaans gehandhaaf. Sisteïenhidrochloried wat as reduseermiddel by die verskillende mediums gebruik is, het die oksidasie-reduksie potensiaal voldoende verlaag sodat hierdie bakterieë wel kon groei. Die mediums waarby resasurien gevoeg is, het deurgaans kleurloos gebly wat daarop dui dat die toestande wel anaëroob was. Resasurien kan as 'n geskikte anaërobe indikator gebruik word. Die anaërobe tegnieke wat tydens die studie gebruik is, kan met gemak en sukses in 'n gewone roetine laboratorium uitgevoer word.

4.2 Tellings van die verskillende bakteriegroepe is suksesvol uitgevoer. Van al die isolate was 97,96% anaërobe bakterieë, terwyl 2,04% aërobe bakterieë was. Die mediums en tegnieke wat gebruik is vir die tellings was voldoende.

4.3 Die byvoeging van rumenvloeistof sowel as slykekstrak by isolasiemediums van die spesifieke anaërobe bakteriegroepe is absoluut noodsaaklik. Hiermee voldoen die medium dadelik aan die spesifieke groeifaktore wat die bakterië vereis.

4.4 'n Hoë persentasie laktobasille is tydens hierdie studie vanuit proefpersone geïsoleer (3,31%). Van die 50 isolate wat geïsoleer was, is 64% as *Lactobacillus plantarum*, 24% as *L. casei*, 8% as *L. acidophilus* en 4% as *L. salivarius* subspesie *salivarius* geïdentifiseer. Dit was opvallend dat *Lactobacillus fermentum* afwesig was by al die proefpersone. Die isolasiemedium en die gebruik van 'n anaërobe fles kan met sukses vir die isolasie van die genus *Lactobacillus* aangewend word. Met die identifikasie van hierdie groep bakterieë was die gebruik van sopmediums in plaas van agarmediums baie meer suksesvol.

4.5 As gevolg van die morfologiese ooreenkomste tussen laktobasille en bifidobakterieë is dit noodsaaklik dat spesifieke onderskeidingstoetse gedoen moet word. Die aanwending van

die fruktose-6-fosfaat-fosfoketolase-toets is die vinnigste en mees direkte toets wat vir hierdie doel aangewend kan word.

4.6 Metaangas is waargeneem by byna al die monsters. Dit wil dus voorkom asof metaan by die meeste gesonde persone gevorm word. Die aanwending van gaschromatografiese analises vir die teenwoordigheid van metaan is 'n vinnige toets wat tydens primêre isoleringstegnieke van moontlike metanogene aangewend word. Anaërobe isolasietegnieke vir metaanvormende bakterieë is wel in 'n gewone roetinelaboratorium moontlik, alhoewel die toestande vir die identifikasie van die bakterieë baie gevorderd is. Die beskikbaarheid van 'n moderne anaërobe kabinet is noodsaaklik vir identifikasieprosedures. Volgens die Gramkleuring en morfologie blyk dit asof die bakterieë tot die genus *Methanobrevibacter* behoort.

4.7 Geen sulfaatreducerende bakterieë is geïsoleer nie. Die isolasietegnieke is egter voldoende, omdat anaërobe toestande deurgaans gehandhaaf is. Metanogene is geïsoleer vanuit die meeste fesesmonsters wat verklaar hoekom geen sulfaatreducerende bakterieë teenwoordig is nie, omdat hierdie twee groepe bakterieë kompeteer vir beskikbare substrate.

BIBLIOGRAFIE

ALLISON, C. & McFARLANE, G.T. 1988. Effect of nitrate on methane production and fermentation by slurries of human faecal bacteria. *Journal of general microbiology*, 134 : 1397-1405.

ALLTECH ASSOCIATES. 1982. Chromatography. Cat. no. 45. England. 336p.

BARESI, L., MAH, R.A., WARD, D.M. & KAPLAN, I.R. 1978. Methanogenesis from acetate: enrichment studies. *Applied and environmental microbiology*, 36 : 186-197.

BENNO, Y., ENDO, K., MIZUTANI, T., NAMBA, Y., KOMORI, T. & MITSUOKA, T. 1989. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. *Applied and environmental microbiology*, 55 : 1100-1105.

BEERENS, H. & ROMOND, C. 1977. Sulfate reducing anaerobic bacteria in human feces. *American journal of clinical nutrition*, 30 : 1770-1776.

BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. 1988. Biology of microorganisms. 5th ed. Englewood Cliffs, N.J. : Prentice-Hall. 835p.

COSTILOW, R.N. 1981. Biophysical factors in growth. (In Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. & Phillips, G.B. eds. Manual of methods for general bacteriology. Washington : American society for microbiology. p.66-78.)

COWAN, S.T. & STEEL, K.J. 1965. Manual for the identification of medical bacteria. Cambridge : University Press. 217p.

EDWARDS, T. & McBRIDE, B.C. 1975. New method for the isolation and identification of methanogenic bacteria. *Applied microbiology*, 29 : 540-545.

ESTERHUYSEN, H.A. 1981. Metodes vir die isolasie van fototrofe bakterieë. 62p. (Verhandeling (MSc.) - PU vir CHO.)

FLORIN, T., NEALE, G., GIBSON, G.R., CRISTL, S.U. & CUMMINGS, J.H. 1991. Metabolism of dietary sulphate- absorption and excretion in humans. *Gut*, 32 : 766-773.

GIBSON, G.R., MACFARLANE, G.T. & CUMMINGS, J.H. 1988. Occurrence of sulphate-reducing bacteria in human faeces and the relationship of dissimilatory sulphate reduction to methanogenesis in the large gut. *Journal of applied bacteriology*, 65 : 103-111.

GIBSON, G.R., CUMMINGS, J.H., MACFARLANE, G.T., ALLISON, C., SEGAL, I., VORSTER, H.H. & WALKER, A.R.P. 1990. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*, 31 : 679-683.

GOLDIN, B.R. 1986. In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annual reviews on microbiology*, 40 : 367-369.

HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E. 1966. Laboratory methods in microbiology. London : Academic Press. 362p.

HENDRIKSEN, H.V. & AHRING, B.K. 1991. Effects of ammonia on growth and morphology of thermophilic hydrogen - oxidizing methanogenic bacteria. *FEMS microbiology ecology*, 85 : 241-246.

HUNGATE, R.E. 1969. A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. (In Norris, J.R. & Ribbons, D.W., eds. Methods in microbiology. Vol.2. New York : Academic Press. p.117-132.)

JAWETZ, E., MELNICK, J.L. & ADELBERG, E.A. 1987. Review of medical microbiology. 17th ed. Connecticut : Appleton & Lange. 595p.

JONES, W.J., NAGLE, D.P. & WHITMAN, W.B. 1987. Methanogens and the diversity of archaeobacteria. *Microbial reviews*, 51 : 135-177.

KOORNHOF, H.J., RICHARDSON, D.M., WALL, D.M. & MOORE, W.E.C. 1979. Fecal bacteria in South African rural blacks and other population groups. *Israel journal of medical science*, 15 : 335-340.

MAH, R.A. & SMITH, M.R. 1981. The methanogenic bacteria. (In Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., eds. The procaryotes : a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 1. Berlin : Springer-Verlag. p.948-977.)

MATA, L.J., CARRILLO, C. & VILLATORA, E. 1969. Fecal microflora in healthy persons in a preindustrial region. *Applied microbiology*, 17 : 596-602.

MERCK, E. 1987. Culture media handbook. Darmstadt : Merck. 215p.

MILLER, T.L., WOLIN, M.J., CONWAY de MACARIO, E. & MACARIO, A.J.L. 1982. Isolation of *Methanobrevibacter smithii* from human feces. *Applied and environmental microbiology*, 43 : 227-232.

MILLER, T.L. & WOLIN, M.J. 1983. Stability of *Methanobacterium smithii* populations in the microbial flora excreted from the human large bowel. *Applied and environmental microbiology*, 45 : 317-318.

MITSUOKA, T. & HAYAKAWA, K. 1972. Die faecalflora bei menschen : I. Mitteilung : die zusammensetzung der faecal-flora der verschiedenen altersgruppen. *Zentralblatt für bakteriologie und hygiene*, 223 : 333-342.

MITSUOKA, T., HAYAKAWA, K. & KIMURA, N. 1975. Die faecalflora bei menschen : III. Mitteilung : die zusammen-setzung der laktobazillenflora der verschiedenen altersgruppen. *Zentralblatt für bakteriologie und hygiene*, 232 : 499-511.

MITSUOKA, T. & OHNO, K. 1977. Fecal flora of man. V. Communication : the fluctuations of the fecal flora of the healthy adult. *Zentralblatt für bakteriologie und hygiene*, 238 : 228-236.

MOORE, W.E.C. & HOLDEMAN, L.V. 1974. Human fecal flora : the normal flora of 20 Japanese-Hawaiins. *Applied microbiology*, 27 : 961-979.

- MOUNTFORT, D.O. & ASHER, R.A. 1981. Role of sulfate reduction versus methanogenesis in terminal carbon flow in polluted intertidal sediment of Waimea Inlet, Nelson, New Zealand. *Applied and environmental microbiology*, 42 : 252-258.
- NOTTINGHAM, P.M. & HUNGATE, R.E. 1968. Isolation of methanogenic bacteria from feces of man. *Journal of bacteriology*, 96 : 2178-2179.
- OREMLAND, R.S. & POLCIN, S. 1982. Methanogenesis and sulfate reduction: competitive and non-competitive substrates in estuarine sediments. *Applied and environmental microbiology*, 44 : 2170-2176.
- PELCZAR, M.J., CHAN, E.C.S. & KRIEG, N.R. 1986. Microbiology. 5th ed. New York : McGraw-Hill. 918p.
- PFENNIG, N. & BIEBL, H. 1981. The dissimilatory sulfur-reducing bacteria. (In Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., *reds.* The procaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 1. Berlin : Springer-Verlag. p.941-947.)
- PFENNIG, N., WIDDEL, F. & TRÜPER, H.G. 1981. The dissimilatory sulfate-reducing bacteria. (In Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., *reds.* The procaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 1. Berlin : Springer-Verlag. p.926-940.)
- POSTGATE, J.R. 1981. The sulfate-reducing bacteria. Cambridge : University Press. 151p.
- SCHAECHTER, M., MEDOFF, G. & SCHLESSINGER, D., *reds.* 1989. Mechanisms of microbial disease. Baltimore : Williams & Wilkins. 844p.
- SALYERS, A.A., WEST, S.E.H., VERCELLOTTI, J.R. & WILKENS, T.D. 1977. Fermentation of mucins and plant polysaccharide by anaerobic bacteria from the human colon. *Applied and environmental microbiology*, 34 : 529-533.

SCARDOVI, V. 1981. The genus *Bifidobacterium*. (In Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., eds. The procaryotes : a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 2. Berlin : Springer-Verlag. p.1951-1961.)

SEELEY, H.W. & VANDEMARK, P.J. 1962. Microbes in action. San Francisco : Freeman. 225p.

SHARPE, M.E. 1981. The genus *Lactobacillus*. (In Starr, M.P., Stolp, H., Trüper, H.G., Balows, A. & Schlegel, H.G., eds. The procaryotes : a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 2. Berlin : Springer-Verlag. p.1653-1679.)

SHARPE, M.E., HILL, L.R. & LAPAGE, S.P. 1973. Pathogenic lactobacilli. *Journal of medical microbiology*, 6 : 281-286.

SKERMAN, V.B.D. 1959. A guide to the identification of genera of bacteria. Baltimore : Williams & Wilkins. 217p.

SMITH, P.H. & HUNGATE, R.E. 1958. Isolation and characterization of *Methanobacterium ruminantium*. *Journal of bacteriology*, 75 : 713-718.

SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G., eds. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Baltimore : Williams & Wilkins. 1599p.

STALEY, J.T., BRYANT, M.P., PFENNIG, N. & HOLT, J.G., eds. 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol.3. Baltimore : Williams & Wilkins. 2298p.

TOMLIN, J., LOWIS, C. & READ, N.W. 1991. Investigation of normal flatus production in healthy volunteers. *Gut*, 32 : 665-669.

VAN WYK, L. 1972. Ammonifiserende bakterieë in skaap-rumen. 100p. (Verhandeling (M.Sc) - Universiteit van Pretoria.)

VORSTER, S.M. 1988. Isolasië en karakterisering van termofiele laktobasille antagonistes teen ingewands-patogene. 103p. (Verhandeling (MSc) - Universiteit van Pretoria.)

WIDDEL, F. & PFENNIG, N. 1986. Dissimilatory sulfate- or sulfur-reducing bacteria. (In Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. & Holt, J.G., *reds.* Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 2. Baltimore : Williams & Wilkins. p.663 - 679.)

WILLIS, A.T. 1977. Anaerobic bacteriology : clinical and laboratory practice. 3rd ed. London : Butterworths. 205p.

WOLFE, R.S. 1971. Microbial formation of methane. *Advances in microbial physiology*, 6 : 107-145.