

'N TAKSONOMIESE STUDIE VAN DIE AËROBE CHEMOËRGANOTROFE BAKTERIEË WAT IN DIE
VERKOELINGSISTEME VAN NYWERHEDE VOORKOM.

ANNA MARIA DE WAAL, Hons. B.Sc.

Verhandeling goedgekeur as gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die
graad Magister Scientiae in Mikrobiologie in die Fakulteit Natuurwetenskappe
van die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Leier : Dr. P.A.J. Brand.

Potchefstroom

1988

VOORWOORD

Ek wil graag vir AEK(UKOR) bedank vir die besondere visie om die probleem van korrosie op so 'n basiese wyse aan te pak.

Die volgende persone verdien besondere dank :

Mnr. S.J. van Rensburg, Dr. C.R. Lötze, Mnr. S. Kruger, Mej. A.R. Engelbrecht en Mev. L. Wijnmalen.

Dan wil ek ook groot dank uitspreek teenoor Dr.P.A.J. Brand vir sy besondere hulp en leiding gedurende die studie.

Dankie ook aan my ouers en my man vir hul morele ondersteuning. Daaronder sou dit baie moeilik gegaan het.

Aan die Hemelse Vader kom al die eer toe vir die groot voorreg om hierdie studie te kon uitvoer en insig daarin te verkry.

'N TAKSONOMIESE STUDIE VAN DIE AËROBE CHEMOÛRGANOTROFE BAKTERIEË WAT IN DIE VERKOELINGSISTEME VAN NYWERHEDE VOORKOM

Anna Maria de Waal

OPSOMMING

Die studie is uitgevoer op die planktoniese bakteriese populasies wat in die verkoelingsisteme van nywerhede voorkom, meer spesifiek die verpligte aërobe en die fakultatief anaërobe bakterieë. Die verkoelingsisteme wat bestudeer is, was 'n koeltring, 'n kondenseerder en twee sproeiers wat hitte-uitruiling en korrosie probleme ondervind het.

'n Verskeidenheid genera en spesies is geïsoleer en geïdentifiseer waarvan *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* en *Xanthomonas* spesies die meeste voorgekom het. Daar is ook die volgende genera geïsoleer: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Kingella*, *Listeria*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Plesiomonas* en *Xenorhabdus*. Van die volgende genusse het slegs enkele voorgekom: *Actinobacillus*, *Brochothrix*, *Cardiobacterium*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Zoogloea* en *Zymomonas*.

Verkoelingswateragar is gebruik vir die primêre isolasie van die kulture. Sekondêre isolasie en suiwing is uitgevoer op geaktiveerde slykekstrak-agar, aangesien hierdie medium meer gereedlik beskikbaar was gedurende die ondersoek. Standaard fenotipiese toetse is gebruik om die isolate te identifiseer volgens die literatuur. Isolate is geïdentifiseer tot op spesievlak.

'n Groot aantal potensiële slymvormende Gram-negatiewe bakterieë is geïsoleer asook endosporvormende Gram-positiewe basille wat aanleiding kan gee tot mikrobiologiese neerslae en dus biofilmvorming. Hierdie toestande kan uiteindelik aanleiding gee tot anaërobe omgewings wat gunstig is vir die sulfaatreduserende bakterieë en ook ander korrosieveroorsakende bakterieë. Al hierdie bakterieë tesame, kan dus uiteindelik die korrosie van die metaalstruktuur van verkoelingsisteme van nywerhede veroorsaak of die metaal verswak indien daar nie betyds aandag aan geskenk word nie.

Korrosie is 'n komplekse verskynsel en daar is selde slegs 'n enkele meganisme of spesie by betrokke.

A TAXONOMIC STUDY OF THE AEROBIC CHEMOORGANOTROPHIC BACTERIA IN THE COOLING WATER SYSTEMS OF INDUSTRIES

Anna Maria de Waal

SUMMARY

This study was conducted on the planktonic populations present in industrial cooling water systems, and more specifically the obligate aerobic and facultative anaerobic bacteria. The systems studied were a cooling tower, a condenser and two sprinklers, which experienced heat-exchange and corrosion problems.

Various genera and species were isolated and identified. *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Flavobacterium* and *Xanthomonas* species were dominant. The following genera were also isolated: *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Kingella*, *Listeria*, *Moraxella*, *Pasteurella*, *Plesiomonas* and *Xenorhabdus*. Only a few of the following genera were isolated: *Actinobacillus*, *Brochothrix*, *Cardiobacterium*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Zoogloea* and *Zymomonas*.

Cooling-water agar was used as primary isolation medium for the cultures. Secondary isolation and purification were done on activated sludge extract agar. This was done because of the more readily availability of this medium during the study. Standard phenotypic tests were done to identify the bacteria according to the literature. Isolates were identified to species level.

A great number of potential slimeforming Gram-negative bacteria were isolated, as well as endospore-forming Gram-positive bacteria that could lead to microbial deposits and also biofilm formation. These conditions may lead to anaerobic environments and favour conditions for sulfate reducing bacteria and other corrosion causing bacteria. Together these bacteria may cause corrosion and weakening of the metal structure if left unattended.

Corrosion is a complex phenomenon and seldom involve only one mechanism or a single species.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1.	INLEIDING	1
1.1.	<u>Verkoelingsisteme</u>	1
1.1.1.	Koeltoring	1
1.1.2.	Kondenseerder	3
1.1.3.	Sproeier	4
1.2.	<u>Probleme met verkoelingsisteme</u>	5
1.2.1.	Korrosie	6
1.2.1.1.	Chemiese korrosie	6
1.2.1.2.	Mikrobiologiese korrosie	8
1.2.1.2.1.	Bakterieë	9
1.2.1.2.1.1.	Sulfaatreduserende bakterieë	10
1.2.1.2.1.2.	Swaeloksiderende bakterieë	12
1.2.1.2.1.3.	Ysterbakterieë (Ysteroksideerders)	13
1.2.1.2.1.4.	Ander bakterieë	14
1.2.1.2.1.5.	Swamme	15
1.2.1.2.1.6.	Blou-groenbakterieë en alge	16
1.3.	<u>Biofilms</u>	17
1.3.1.	Mikroorganismes betrokke by biofilmvorming	19
1.3.2.	Fases van bakteriese aanhegting	21
1.3.3.	Probleme wat kan ontstaan as gevolg van biofilms	22
1.4.	<u>Die voorkoms van <i>Legionella</i> in verkoelingsisteme</u>	23
1.5.	<u>Metodes vir die bestudering van mikroorganismes in verkoelingsisteme</u>	25
1.5.1.	Bestudering van biofilm	25
1.5.2.	Bestudering van mikroorganismes	28
1.6.	<u>Bakteriese taksonomie</u>	30
1.6.1.	Nomenklatuur	30
1.7.	<u>Identifikasie van bakterieë</u>	31
1.7.1.	Identifikasie skemas	31
1.7.2.	Behoeftes vir gestandaardiseerde toetsmetodes	31

Inhoud(vervolg)

1.7.3.	Belang vir die definieering van positiewe en negatiewe reaksies	32
1.7.4.	Suiwer kulture	32
1.7.5.	Benaderinge vir die identifikasie van 'n isolaat	33
1.3.	<u>Probleemstelling vir die studie</u>	34
1.9.	<u>Doelstelling en doelwitte van hierdie studie</u>	35
HOOFSTUK 2	METODES EN BENODIGDHEDE	36
2.1.	<u>Monsterneming</u>	36
2.2.	<u>Primêre kweking en isolasie</u>	36
2.3.	<u>Sekondêre kweking en suiwing</u>	36
2.4.	<u>Morfologiese ondersoek</u>	37
2.4.1.	Ligmikroskopiese ondersoeke	37
2.4.1.1.	Gramkleuringsreaksie	37
2.4.1.2.	Endospoorkleuring	37
2.4.1.3.	Negatiewe kleuring	37
2.4.1.4.	Suurvastekleuring	37
2.4.1.5.	Flagellumkleuring	37
2.4.2.	Elektronmikroskopiese ondersoek	38
2.5.	<u>Primêre onderskeidingstoetse</u>	38
2.5.1.	Katalase	38
2.5.2.	Oksidase	38
2.5.3.	Respirasie-Fermentasie(RF) toets	38
2.5.4.	Pigmentvorming	38
2.5.5.	Anaërobe groeitoets	39
2.5.6.	Beweeglikheid	39
2.6.	<u>Sekondêre toetse vir die identifisering van die isolate</u>	39

Inhoud(vervolg)

2.6.1.	Groeitoetse by verskillende temperature en pH-waardes	39
2.6.2.	Slymerige groei op glukose-GSE-agar	40
2.6.3.	Hidrolise van kasefen	40
2.6.4.	Groei in die teenwoordigheid van KCN	40
2.6.5.	Groei op MacConkey-agar	40
2.6.6.	Glukosesop: anaëroob	40
2.6.7.	NaCl-verdraagsaamheid	40
2.6.8.	Groei op stikstofvrye medium	40
2.6.9.	Groei op alkaliese en suur stikstofvrye-medium	41
2.6.10.	Fluoesserende pigment	41
2.6.11.	Skedes- en kapselkleuring	41
2.6.12.	Sensitiwiteit vir penisillien	41
2.6.13.	Hemolise op bloedagar	41
2.6.14.	Koagulase	41
2.6.15.	Gelatienvervloeiing	41
2.6.16.	Sitraat	42
2.6.17.	RF-medium nommer 1	42
2.6.18.	Koolstofverbruiktoets	42
2.6.19.	Fermentasie van suikers	42
2.6.20.	Metielrooi(MR) en Voges Proskauer(VP) toetse	42
2.6.21.	Dekarboksilases	42
2.6.22.	Indoolproduksie-	43
2.6.23.	Hidrolise van stysel	43
2.6.24.	Hidrolise van sellulose	43
2.6.25.	Hidrolise van hippuraat	43
2.6.26.	Tween 80 hidrolise	43
2.6.27.	Produksie van lesitinase	
2.6.28.	Hidrolise van eskulien	43
2.6.29.	Oksidasie van etanol	44
2.6.30.	Oksidasie van laktaat na CO ₂	44
2.6.31.	Teenwoordigheid en akkumulاسie van poli-β-hidroksibutiraat	44
2.6.32.	Ammoniumglukose medium	44
2.6.33.	Produksie van urease	44
2.6.34.	Nitraatreduksie en denitrifikasie	44

Inhoud(vervolg)

2.6.35.	Fenielalaniendeaminasie	45
2.6.36.	Produksie van fosfatase	45
2.6.37.	Triptofaandeaminasie	45
2.6.38.	Produksie van H ₂ S vanaf driesuikerysteragar(DSY)	45
2.6.39.	H ₂ S-produksie in sistefenbevattende medium	45
HOOFSTUK 3	RESULTATE	46
3.1.	<u>Verklaring van simbole gebruik in tabelle</u>	46
3.2.	<u>Kulture: Desember 1984</u>	
3.2.1.	Kultuurkenmerke van kulture Desember 1984	47
3.2.2.	Fenotipiese kenmerke van isolate ontvang in Desember 1984	48
3.2.3.	Identifikasie van die kulture ontvang in Desember 1984	49
3.2.4.	Opmerking	49
3.3.	<u>Kulture: Mei tot Augustus 1985</u>	50
3.3.1.	Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe tot Gram-varieerbare endospoorvormende aërobe basille	50
3.3.2.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe tot Gram-varieerbare endospoorvormende aërobe basille	52
3.3.3.	Identifikasie van die Mei-Augustus 1985 kulture	55
3.3.4.	Opmerkings	55
3.3.5.	Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille	56
3.3.6.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille	58
3.3.7.	Identifikasie van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille	61
3.3.8.	Opmerkings	62
3.3.9.	Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe kokke	64
3.3.10.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe kokke	64
3.3.11.	Identifikasie van die Gram-positiewe kokke	65
3.3.12.	Opmerkings	65
3.3.13.	Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	66

Inhoud(vervolg)

3.3.14.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	69
3.3.15.	Identifikasie van die Gram-negatiewe geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	77
3.3.16.	Opmerkings	79
3.3.17.	Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	81
3.3.18.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	82
3.3.19.	Identifikasie van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	86
3.3.20.	Opmerkings	87
3.3.21.	Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille	88
3.3.22.	Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille	90
3.3.23.	Identifikasie van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille	94
3.3.24.	Opmerkings	95
3.4.	<u>Opsomming van die chemiese analise van 'n beperkte aantal verkoelingsisteme by AEK(UKOR)</u>	97
HOOFSTUK 4	BESPREKING	98
4.1.	<u>Kulture ontvang</u>	98
4.2.	<u>Resultaat bespreking</u>	98
4.2.1.	Identifikasie	98
4.2.2.	Kulture Desember 1984	99
4.2.3.	Gram-positiewe endosporvormende aërobe basille	99
4.2.4.	Gram-positiewe kokke	100
4.2.5.	Gram-negatiewe aërobe respirerende basille en kokkobasille	101
4.2.6.	Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille	101
4.2.7.	Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille	102

Inhoud (vervolg)

4.3.	<u>Vergelyking van die aantal genera wat uit verkoelings-</u> <u>water geïsoleer is</u>	103
4.4.	<u>Bespreking</u>	104
4.6.	<u>Gevolgtrekking</u>	107
	BIBLIOGRAFIE	109

HOOFSTUK 1.

INLEIDING.

1.1. Verkoelingsisteme.

In talle nywerhede word verkoelingstelsels gebruik om hitte-uitruiling te bewerkstellig. Water is een van die verkoelingsmediums wat baie algemeen gebruik word. Water word gewoonlik hergesirkuleer in die verkoelingsstelsel. Met hersirkulasie in die stelsel kan daar dikwels probleme ontstaan, nl. chemies, biologies (mikrobies) en in enkele gevalle 'n kombinasie van die twee (Lutey, 1980:2).

Twee tipes bakterieë kom in water en verkoelingswater voor, nl. planktoniese bakterieë (vrylewend) en sessiele bakterieë (biofilms op vaste oppervlakke) (Costerton en Geesey, 1979:7,8; Costerton *et al.*, 1987:441).

Daar is in hierdie ondersoek hoofsaaklik gebruik gemaak van drie verskillende verkoelingsisteme, nl. 'n koeltoring, kondenseerder en sproeiers. Hier volg nou 'n kort beskrywing van hoe elke stelsel funksioneer.

1.1.1. Koeltoring.

Koeltorings word ontwerp om water te verkoel asook om ongewenste hitte, of hitte wat nie benodig word nie, aan die atmosfeer vry te stel. Koeltorings is gewoonlik geleë op dakke van geboue wat deur die koeltoring bedien word as deel van die lugversorgingsstelsel (Kurtz *et al.*, 1982:370). Warm water vanaf die gebou se hitte-uitruilergaan die toring binne naby die bo-punt van die toring en word neergesproei oor die spatspote wat gewoonlik van hout of plastiek gemaak is (Kurtz *et al.*, 1982:370). Kyk skematiese voorstelling, Fig. 1.

Soos die druppels in die toring afbeweeg, verdamp dit gedeeltelik en verkoel die oorblywende water. Die verkoelde water versamel aan die onderpunt van die toring en word gesirkuleer deur 'n pypleiding na die hitte-uitstraler. Om maksimum verkoeling te bereik word lug opgesuig deur die druppels met behulp van 'n waaier. Ongeveer 1% van die hergesirkuleerde water gaan verlore deur verdamping en veroorsaak dat anorganiese- en organiese materiaal in die stelsel gekonsentreer word. Om hierdie ophoping te verminder, word die water aanhoudend gedreineer of gebloeï vanaf die onderpunt van die toring. 'n Klein hoeveelheid ($\approx 0,1\%$) ontsnap in die vorm van klein druppels

wat 'n sproei vorm. Hierdie sproei sal enige mikroorganismes en onsuiverhede wat teenwoordig is, bevat. Al hierdie waterverliese word aangevul deur die byvoeging van vars water (Kurtz *et al.*, 1982:371).

In hierdie komplekse stelsels kan enige omgewingstoestande voorkom wat gewoonlik geskik kan wees vir die groei van alge, protosoë en bakterieë, in 'n verskeidenheid simbiotiese verwantskappe. Die neerlegging van soute, afbraak van oorblyfsels en die produksie van slym deur die mikrobies vermindert die doeltreffendheid van die stelsel. Praktiese bepalings moet dus hiervoor in berekening gebring word vir die ontwerp, ligging en instandhouding van die verkoelingswatertoring, om dit te voorkom of om hierdie faktore tot die minimum te beperk (Kurtz *et al.*, 1982:371).

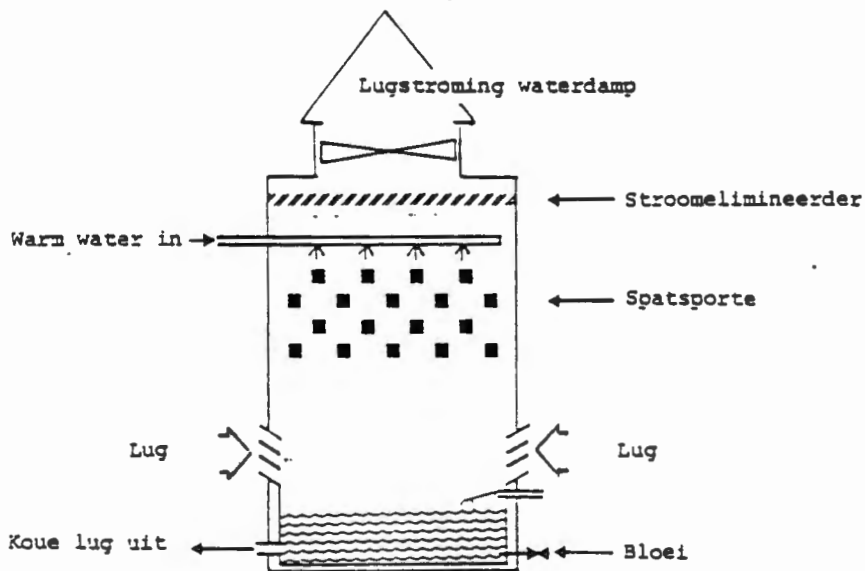


Fig. 1. Skematiese voorstelling van 'n koeltoring.

1.1.2. Kondenseerder.

Die hoof versperring vir hitteoordrag vanaf 'n kondenserende waterdamp na 'n koel vaste oppervlak is die vloeistoffilm wat gevorm word op die oppervlak van die verkoelingsstelsel. Hierdie film neem in deursnee toe, totdat die gravitasie-aksie of vloeistofweerstand dit induseer om langs die oppervlak te vloei. Die gebalanseerde deursnee van die film, en gevolglik die termiese weerstand, hang af van die kondensasiesnelheid, die kragte wat op die film inwerk, die weerstand om langs die oppervlak te vloei, die geaardheid van hierdie vloei (laminêre en turbulente vloei) en die hoeveelheid oppervlakwater aan die bokant van die vloeiende film (Fraas en Ozisik, 1965: 204).

Die belangrikste faktor wat die hitte oordragkoëffisiënt van die dampgrootte beïnvloed, is die geaardheid en gemiddelde deursnee van die vloeistoffilm wat kondenseer (Fraas en Ozisik, 1965:204) (Kyk Fig. 2).

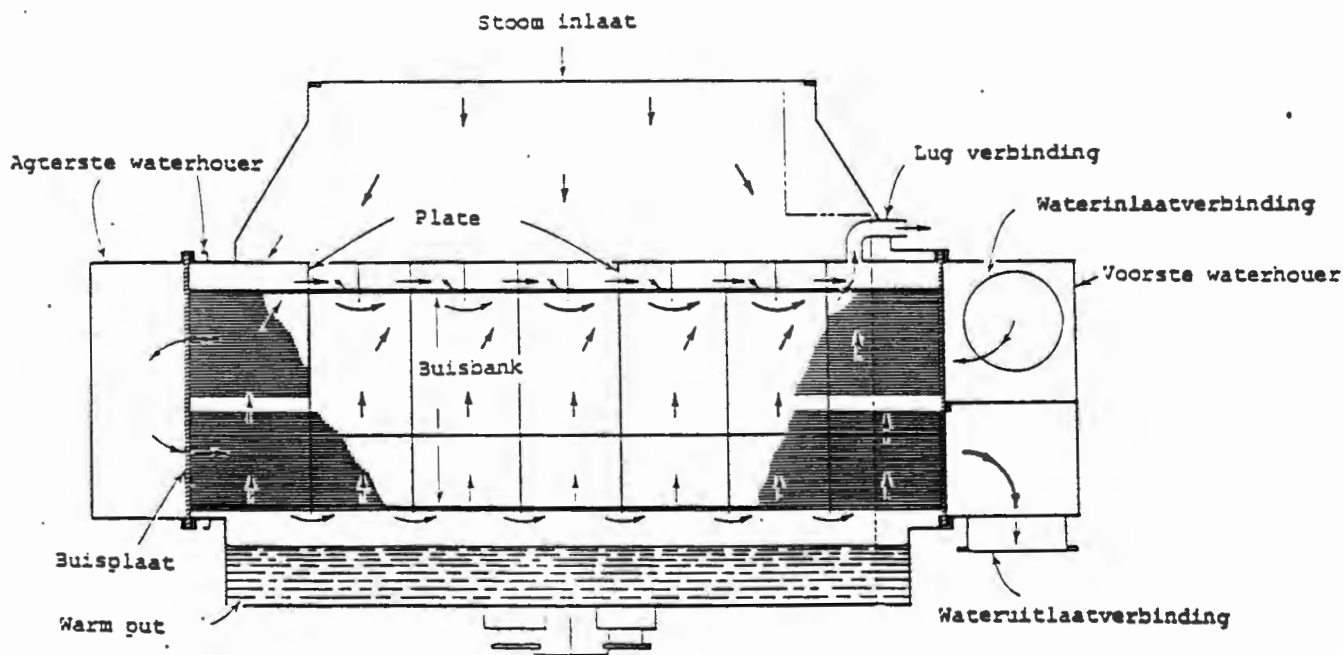


Fig. 2. Diagrammatiese voorstelling van 'n kondenseerder.

1.1.3. Sproeiers.

Die eenvoudigste soort koeltoring is slegs 'n klein watersproeidam wat omring word deur wande wat inwaartse hortjies besit. In hierdie soort koeltoring verander die lugrigting soos dit deur die louvers beweeg. Die gesuspendeerde waterdruppels val op die louvers, spat uitmekaar en dreineer terug na die onderpunt van die toring (Fraas en Ozisik, 1965:242).

Beide die waterdampbenodigdhede en die kapasiteit van die koeltoring kan verbeter word deur die verskaffing van horisontale oppervlakke in die koeltoring om die gemiddelde snelheid van die vallende druppels te verlaag en om die tyd wat die druppel blootgestel is aan die verkoelde lugstroom te verhoog soos dit deur die toring val. 'n Ander voordeel van hierdie benadering is dat dit 'n teenstroom moontlik maak en dus 'n laer temperatuur in die uitgaande waterstroom veroorsaak. Laasgenoemde voordeel kan plaasvind deurdat lae-druk watersproeiers aan die bokant van die toring geplaas word sodat die lug die sisteem horisontaal binne gaan en dit vertikaal verlaat. Nog 'n eienskap van hierdie rangskikking is dat die opwaartse vertikale beweging van die lug die snelheid waarmee die waterdruppel val, vertraag en dit verhoog die effektiewe oppervlakte area vir enige gegewe watersnelheid. In hierdie soort koeltoring word daar na die oppervlakke binne die toring verwys as pakwerk en laasgenoemde is gewoonlik verspreid sodat die waterdruppels slegs 'n paar meter kan val voordat dit die oppervlakke tref (Fraas en Ozisik, 1965:242) (Kyk Fig. 3.).

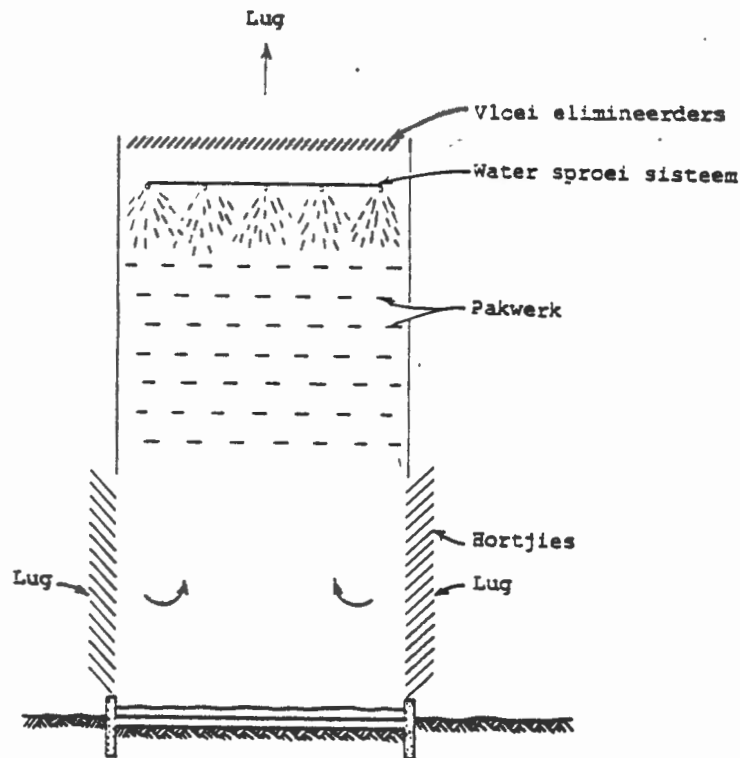


Fig. 3. Diagrammatiese voorstelling van 'n sproeier.

1.2. Probleme met verkoelingsisteme.

'n Algemene chemiese probleem is skaalvorming. Hierdie skaal bestaan gewoonlik uit die neerslaan en aanpak van sout (Lutey, 1980:2). 'n Ander chemiese-fisiese-biologiese probleem, is korrosie. Korrosieprobleme in verkoelingswater ontstaan as gevolg van opgeloste vaste stowwe, opgeloste suurstof, kontaminante, oneffektiewe chemiese inhibeerders of foutiewe beheer van pH. Daar is dikwels vinnige en ernstige korrosie wat nie gekeer kan word nie, selfs al word chemiese inhibeerders gebruik. Hierdie korrosie mag ook deur mikroorganismes veroorsaak word (Obuekwe *et al.*, 1981: 766). Organismes wat gewoonlik in verkoelingswater gevind word, sluit die volgende in: swamme, alge en bakterieë (Iverson, 1987:7).

1.2.1, Korrosie.

Mikrobiologiese korrosie word die afgelope 50 jaar erken deur ingenieurs en wetenskaplikes. Korrosie geassosieer met die olie- en papiernywerhede is baie algemeen bekend, maar is egter eers die afgelope dekade as 'n ernstige probleem ondervind deur chemiese industrieë (Tatnall, 1981:32).

Mikrobiiese korrosie kan gedefinieer word as die degenerasie of korrosie van metale wat veroorsaak word deur die aktiwiteite van mikroorganismes. Die veld van ondersoek, volgens die bogenoemde definisie, is dus interdissiplinêr en navorsers benodig 'n kennis van mikrobiologie as toevoeging tot korrosiewetenskap. Die aantal navorsers op hierdie gebied, dwarsdeur die wêreld, het beperk gebly. 'n Verdere belemmering was 'n gebrek aan algemene bewustheid van die betekenis van die probleem. Die organismes wat hoofsaaklik betrokke is en ook primêr bestudeer word in verband met mikrobiiese korrosie, is die sulfaatreduserende bakterieë. Hierdie organismes is streng anaëroob, moeilik om te kweek, te isoleer en te tel. Al hierdie faktore het ook bygedra as 'n addisionele belemmering vir diegene wat geïnteresseerd was om in die mikrobiologiese korrosieveld te werk. Verder is artikels in hierdie veld wêreldwyd versprei en in baie onbekende joernale gepubliseer (Iverson, 1987:1).

Gedurende die afgelope paar jare het die situasie begin verander en word korrosienavorsing baie aangemoedig deur talle groepe (Iverson, 1987:1).

1.2.1.1. Chemiese korrosie.

Korrosie van metale, hoofsaaklik yster, is dikwels bekend as 'n roesproses. Roes is egter net 'n term wat verwys na die korrosieprodukt van yster of ysteralloeie wat hoofsaaklik bestaan uit ysteroksiede. Die korrosie van nie-ystermetale word gewoonlik vergesel met die vorming van die onderskeie oksied wat kan varieer vanaf blou-groen of rooi(koper) na wit(sink) (Uhlig, 1967:286). Korrosie word ook gedefinieer as die chemiese of elektrochemiese reaksies op 'n metaal deur sy omgewing. Degenerasie van metale as gevolg van fisiese oorsaak soos bv. verwerking en erodering, of van nie-metale, bv. plastiek of hout, word nie by hierdie definisie ingesluit nie (Iverson, 1987: 5).

Basiese oorsaak van korrosie is die natuurlike onstabiliteit van metale in

hul suiwer vorm. Metale neig om terug te keer na hul natuurlike vorm deur die proses van korrosie as gevolg van vrye energie veranderinge. Die korrosieprodukte kan los films of baie dun, stewig gehegde, beskermende films vorm, wat die snelheid van korrosie vertraag (Iverson, 1987:5).

Korrosie is hoofsaaklik 'n elektrochemiese proses. Die basiese proses van korrosie sluit dus die vloei van elektrisiteit in tussen sekere gebiede van 'n metaaloppervlakte deur 'n oplossing wat die vermoë besit om 'n elektriese stroom te gelei (Uhlig, 1967:21; Hamilton, 1985:196). Korrosie kan ook onder gebruikstoestande in byna neutrale omgewings gefinisieer word deur die vorming van elektrolitiese selle. Dit kan veroorsaak word deur verskille in die elektriese potensiaal of verskillende metale wat in elektriese kontak is, of verskille in potensiaal tussen verskillende punte op dieselfde metaaloppervlak (Iverson, 1987:6).

Wanneer 'n metaaloppervlak bedek is met 'n neerslag, sal die neerslag wat in kontak is met die water toeganklik wees vir suurstof, terwyl die gedeelte onder die neerslag afgeskerm sal wees. Hierdie toestand resulteer in 'n korrosiesel met die vorming van metaalione in die anodegebied onder die neerslag wat aanleiding gee tot putvorming. Die elektrone vloei na die metaaloppervlak buite die neerslag om suurstof te reduceer (katodiese reaksie) en hidroksielione te vorm. Hierdie tipe sel word na verwys as 'n konsentrasiesel (Fig. 4) en is hoofsaaklik betrokke by mikrobiële korrosie. Spleetkorrosie is baie dieselfde as putkorrosie. Spleetkorrosie vind plaas binne-in splete en ander afgeskermdede gebiede waar 'n stagnante oplossing teenwoordig is, terwyl putvorming gewoonlik op 'n gelyke metaaloppervlakte plaasvind as gevolg van die vashegting van mikroorganismes op 'n metaaloppervlakte (Iverson, 1987:6).

'n Aanduiding vir die korrosiwiteit van water kan verkry word deur na die volgende op te let: totale aantal bakterieë; tipe en aantal van die verskillende soorte bakterieë wat voorkom; redokspotensiaal; temperatuur; soutgehalte; konsentrasie van organiese materiaal; konsentrasie van sulfiede en ammonium-ione saam met ander opgeloste ione (Iverson, 1987:27).

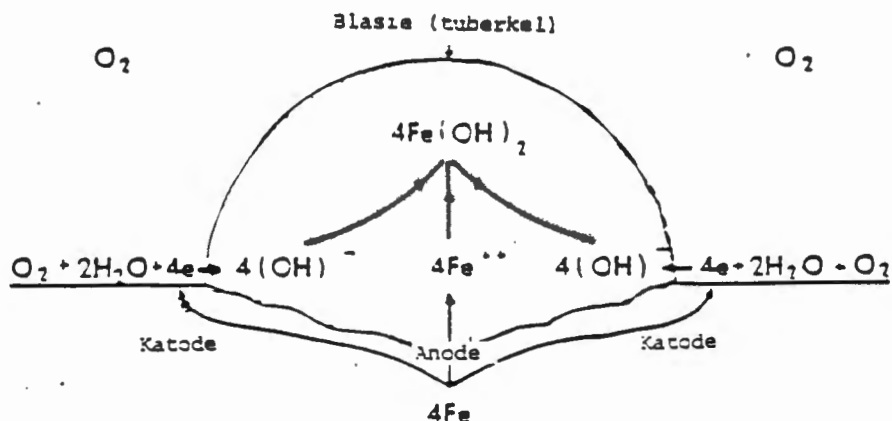


Fig.4: Suurstofkonsentrasiesel.

1.2.1.2. Mikrobiologiese korrosie.

Mikrobiologiese korrosie kan potensieel in enige omgewing plaasvind waar mikroorganismes groei. Baie korrosieveroorsakende mikroorganismes het beperkte omgewings waarin hulle kan groei. Alhoewel, as een soort korrosieveroorsakende mikroorganisme nie in 'n spesifieke omgewing kan groei nie, sal daar heel moontlik 'n ander tipe of soort wees wat wel daar sal kan groei (Lutey, 1980:2). Vorige navorsing toon aan dat korrosieveroorsakende mikroorganismes wyd verspreid voorkom in omgewings en die vermoë besit om korrosie te veroorsaak in baie sisteme wanneer daar nie inhiberende prosedures gebruik word nie (Lutey, 1980:2).

Mikrobiologiese korrosie word tipies gekombineer met chemiese korrosie, skaalvorming en ander mikrobiologiese slymmassas. Vasstelling deur eenvoudige waarnemings is moeilik. Hier volg nou 'n paar waarnemings wat gebruik kan word by die herkenning, bevestiging en voorkoming van mikrobiologiese korrosie: putkorrosie eerder as laterale korrosie; teenwoordigheid van mikrobiologiese slymmassas; waterstofsulfied in die anaërobe sisteme; ysterhidroksied in die aërobe sisteme; groot populasies bakterieë en swamme; temperature onder 65°C ; pH is nie 'n betroubare indikator nie, maar die meeste mikrobiologiese korrosie geskied in pH grense van 4,0 tot 9,0; daar is egter uitsonderings. Wanneer daar verskeie van hierdie verskynsels waargeneem word,

kan aanvaar word dat daar mikrobiologiese korrosie plaasgevind het (Lutey, 1980:3).

Om enigszins 'n effek op die korrosieproses van metale te hê, moet mikroorganismes in staat wees om relatiewe noue kontak met die metaaloppervlakte te handhaaf. Daar is verskeie redes vir die aanhegting en groei van mikroorganismes op metaaloppervlaktes. Dit hang af van die spesifieke groei behoeftes van die individuele organisme en die toestande in die spesifieke omgewing wat bestudeer word. Die effek wat hierdie organisme op die oppervlakte van metale kan uitoefen, is nie slegs fisiese teenwoordigheid nie, maar ook hul metaboliese aktiwiteite, bv. die vorming van 'n biofilmlaag op die metaaloppervlakte voorkom die vrye diffusie van gasse en ione na en weg vanaf die oppervlakte. Dit lei tot die vorming van konsentrasieselle wat die begin van korrosie kan wees. Die metaboliese aktiwiteite van organismes in 'n film wat skade kan veroorsaak, is die volgende: verbruik van suurstof om anaërobe gebiede te vorm; die produksie van organiese- of minerale sure; produksie van H_2S , beide vanaf anorganiese sulfate (deur sulfaatreducerende bakterieë) en die afbreek van swaelbevattende aminosure; verwydering van beskermende films (bv. korrosieprodukte soos ysteroksiede) wat die metaaloppervlakte blootstel aan aanhoudende korrosie; depolarisasie van katodiese gebiede deur die verwydering van die stowwe wat polarisasie veroorsaak, bv. H_2 (Pope *et al.*, 1982:43).

Die mikroorganismes wat geassosieer word met korrosie sluit baie genera en spesies in. Hulle kan verdeel word in drie groepe, nl. bakterieë, swamme en alge. Dit is duidelik bevestig deur laboratorium- en veldwerk dat die meeste van hierdie organismes 'n definitiewe rol speel in die korrosieproses (Puckorius, 1978:171; Tatnall, 1981:32; Iverson, 1987:7).

1.2.1.2.1. Bakterieë.

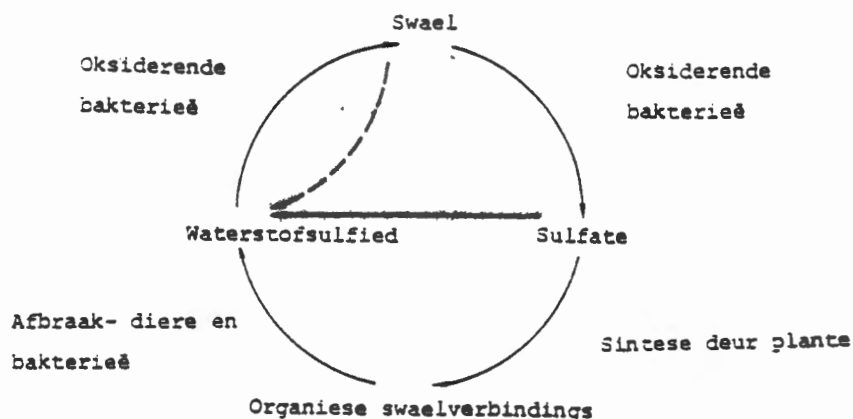
Die belangrikste bakterieë wat 'n rol speel in die korrosieproses is die wat betrokke is in die swaelsiklus. Dit sluit die oksideerders sowel as die reduseerders van swael in. Van hierdie twee groepe is die sulfaatreducerende bakterieë (SRB) die betekenisvolste bakterieë in die mikrobiologiese korrosieproses (Hamilton, 1985:199; Iverson, 1987:7).

1.2.1.7.1. Sulfaatreducerende bakterieë.

Die sulfaatreducerende bakterieë (SRB) is 'n groep streng anaërobe bakterieë wat taksonomies 'n groot diversiteit besit, maar fisiologies en ekologies dieselfde is. Hulle kan egter vir lang periodes in die teenwoordigheid van suurstof oorlewe. Hulle word onderskei deur hul vermoë om sulfaat as die terminale elektronakseptor te gebruik en te reduseer na sulfiede (sulfaat-reduksie) (Hamilton, 1985:202). 'n Paar onlangs geïsoleerde spesies, nl. *Desulfuromonas acetoxidans* gebruik swaël in plaas van sulfate as elektronakseptor. Organismes in die genus *Desulfovibrio* is Gram-negatiewe, nie-spoorvormende, spiraalvormig of geboë basille (Krieg en Holt, 1984:666). Hulle word meer dikwels aangetref in anaërobe korrosie in laboratorium- en veldstudies as enige ander genus van SRB. Tot onlangs was hierdie genus en die spoorvormende genus, *Desulfotomaculum*, aanvaar as die enigste twee genera van SRB (Iverson, 1987:7).

Na aanleiding van die werk van Widdel en Pfenning (Krieg en Holt, 1984:663) is sewe adisionele genera van SRB herken. Dit sluit in: *Desulfuromonas*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* en *Desulfonema*. Die mees ongewone eienskap van hierdie bakterieë, behalwe hul morfologiese verskille, is die groot verskeidenheid koolstofbronne wat hulle kan gebruik. Beskikbare koolstofbronne vir *Desulfovibrio* en *Desulfotomaculum* is beperk tot laktaat, piruvaat en malaat, terwyl die nuwe genera CO₂ en vetsure vanaf asetaat en stearaat kan gebruik (Taylor en Parkes, 1983:3303; Iverson, 1987:8). Hul metabolisme hang hoofsaaklik af van die sulfaatmolekuul wat gebruik word as primêre oksidasie-middel vir hul organiese behoeftes. In hul anaërobe oksidasie word die sulfaatmolekuul gereduseer na water en sulfied, wat die hoof oorsaak is van die probleme wat SRB aktiwiteit veroorsaak. Onder anaërobe toestande sal die vry sulfied gehidroliseer word en H₂S vorm, wat korrosief is (Arnold, 1985:20). Waterstofsulfied is suuragtig en werk aanvallend op metale in, veral sagte staal, maar ook vlek-vrye staal en koperalloeie (Puckorius, 1978:172). H₂S tot op die vlak van 15-20% is by baie geleenthede gevind onder die biofilm wat aanleiding gee tot korrosie van die metaaloppervlakte.

Die hele swaelsiklus kan soos volg voorgestel word:



(Booth, 1971:13).

Die meeste metale word deur 'n kombinasie van lae pH, sulfiede en reduserende toestande aangetas. Nikkel- en nikkelbasisalloeie toon baie putjies onder bogenoemde toestande. Hierdie korrosie word dikwels geïdentifiseer deur konsentriese riefels wat in die putte vorm (Puckorius, 1978:172). In hersirkulerende verkoelingsisteme kan korrosie as gevolg van die SRB teen 'n vinnige tempo plaasvind. Binnedringing van die metaal is afhanklik van die graad van kontaminasie en die snelheid van groei (Puckorius, 1978:172).

Anaërobe korrosie van yster, as gevolg van SRB aktiwiteit, toon twee hoof eienskappe, nl. die korrosie neig om putvorming aan te neem en die putte is kenmerkend graffietagtig omdat die yster verwyder is, wat dan slegs die koolstofgeraamte van die metaal agterlaat. Ander eienskappe wat kan help met die bevestiging van die teenwoordigheid van SRB is konsentriese ringe rondom die putgedeelte, swart FeS-neerslag onder lae slym en modder waar die putvorming plaasgevind het en die reuk van H_2S vanaf onlangs verskuifde neerslae (Arnold, 1985:20).

Die korrosiemeganisme op yster deur SRB is kompleks, maar kan deur een of meer van die volgende maniere verklaar word: H_2S is 'n baie suurvormende korrosiewe gas. Wanneer dit in oplossing is, kan 'n direkte aanval deur H_2S teen 'n vinnige tempo plaasvind. Vanaf die direkte aanval op skoon me-

taal, sal ystersulfied geproduseer word. Dit lyk asof dit opsigself korrosie eienskappe besit. Bakteriële dehidrogenase depolariseer yster katodies. Dit blyk die mees waarskynlike metode van korrosie deur SRB te wees. As 'n resultaat van hierdie depolarisering sal ysteroksied gevorm word (Arnold, 1985:20).

Onder anaërobe toestande sal die opgeloste suurstof teenwoordig in die water die depolariserende film van waterstof verwyder en dus die korrosieproses begunstig. Onder gunstige toestande en deur die ensiem, hidrogenase, is SRB instaat om hierdie waterstof te verskuif en te verwyder vir sulfaatreduksie. Ystersulfiede en ysteroksiede is 'n byproduk in hierdie reaksie en kenmerkende knoppies van ysteroksied kan vorm rondom die putgedeelte. Die vorming van knoppies of blasies help ook om 'n anaërobe omgewing te verkry by die putgedeeltes (Arnold, 1985:21).

Uit bogenoemde kan afgelei word dat die presiese meganisme en volledige toestand vir die rol van SRB in korrosie van yster nog baie vaag is. Nogtans is dit duidelik dat die komplekse proses 'n gevolg is van 'n aantal onderling verwante faktore wat kan varieer in relatiewe belang van geval tot geval. Die bakterieë reduceer sulfate ensiematies. In hierdie geval is hulle aktief in baie media, insluitende afvalwater van verskeie industrieë, grond en waterbodems van opgaartenks (Crombie *et al.*, 1980:504).

1.2.1.2.2. Swaeloksiderende bakterieë.

Die belangrikste en effektiëste suur wat deur mikroörganismes geproduseer word, is swael suur wat deur die swaeloksiderende bakterieë gevorm word. Hoofsaaklik ressorteer hierdie asidofiele aërobe chemolitotrofe bakterieë in die genus *Thiobacillus*. Hierdie genus is Gram-negatiewe beweeglike organismes wat swael suur produseer vanaf anorganiese swael- en gereduseerde swaelverbindings. *Thiobacillus thiooxidans* en *Thiobacillus concretivorus* is die mees algemene organismes waarna in die literatuur verwys word, wat geassosieer word met korrosie, tesame met *Thiobacillus ferreoxidans* wat swael oksideer asook Fe^{2+} oksideer na Fe^{3+} (Iverson, 1987:8).

Sulfiedproduserende bakterieë veroorsaak gelokaliseerde putvorming en resulteer in toerusting wat binne 60-70 dae nie meer effektië funksioneer nie. Dit neem meer as 90 dae van intensiewe aandag om die situasie te herstel.

Chloor, 'n nie-oksideerende biosied word hiervoor gebruik (Puckorius,1978:174).

1.2.1.2.3. Ysterbakterieë (Ysteroksideerders).

'n Derde groep organismes, die aërobe ysterbakterieë, word geassosieer met biologiese korrosie. Hierdie slymvormers en filamentagtige organismes is veral betrokke by hitte-uitruilers en watersisteenkorrosie (Wakerley,1979:657).

'n *Siderocapsa* spesie word na verwys as die gekapselde ysterbakterieë wat beskryf word as 'n aërobe kok of kort basil wat omsluit word deur 'n slymagtige kapsel wat tipies hoë konsentrasies ysteroksied bevat. Die ysteroksied is 'n byproduk van sy metabolisme van ystersubstrate (Lutey,1980:2). Twee ander tipes wat ingesluit word, is die gesteelde bakterieë in die genus *Gallionella* en die filamentagtige bakterieë in die genusse *Sphaerotilus*, *Crenothrix*, *Leptothrix* en *Lieskeella*. Laasgenoemde twee tipes is beide chemolitotroof en verkry energie vanaf die oksidasie van Fe^{2+} na Fe^{3+} ione. Dit resulteer in 'n neerslag van ysterhidroksied (Iverson,1987:9). Hierdie ysterhidroksiedneerslae skerm ook die metaaloppervlakte teen chemiese inhibeerders af en bevorder korrosie deur 'n konsentrasieselmeganisme. Aangesien die organisme die ysterione verwyder vanaf die gebied van korrosie, word die reaksie versnel (Puckorius,1978:172).

Hierdie ysterbakterieë word geassosieer met die vorming van knoppies (harde neerslae van ysteroksied) in waterpype (Iverson,1987:9). Gebiede waar bakterieë gedeponeer is, het die potensiaal van die yster verlaag sodat 'n primêre mikro-differensiële belugtingsel op die pypoppervlakte ontstaan. Die omvang van die biologiese aktiwiteit in die stimulering van die korrosie van yster was beperk, omdat groei van ysterbakterieë 'n gemiddelde toename in korrosie van 10% toon (Lee *et al.*, 1980:636). Dit veroorsaak nie net vorming van differensiële belugtingselle nie, maar mag lei tot die uiteindelijke blokkering van pype. SRB kan in hierdie suurstofverlaagde omgewing groei en verdere korrosie veroorsaak (Wakerley,1979:659).

Filamentagtige ysterbakterieë word geassosieer met hemisferiese blasies in vlekvrystaaltoerusting(Tatnall,1981:34(b)). *Gallionella* word ook geassosieer met die korrosie van vlekvrystaal, veral naby of by sweislasse, waar biofilms ryk is aan beide yster en mangaan(Tatnall,1981:34).

SRB word altyd geassosieer met korrosie van vlekvrige staal, gewoonlik in assosiasie met *Gallionella* spesies of organismes soos *Pseudomonas* spesies en *Sphaerotilus* spesies. Daar word gedink dat slymproduserende bakterieë, insluitend aërobe bakterieë en ysterbakterieë, die suurstof uitput en toestande vorm vir klassieke spleetkorrosie en dat die SRB die vlekvrige staal korrodeer deur een van verskeie meganismes (Iverson, 1987:22).

Ysterdeponerende bakterieë kan maklik beheer word met chloor en verskeie nie-oksiderende biosiede soos kwanternêre ammoniumverbindings (Puckorius, 1978:174).

1.2.1.2.4. Ander bakterieë.

Tesame met die SRB, swaeloksiderende- en ysterbakterieë het bakterieë in die genus *Pseudomonas* en verwante organismes ook 'n verband met korrosie gevalle. 'n *Pseudomonas* ras, *Pseudomonas* isolaat nommer 200 (Obuekwe *et al.*, 1981:773) wat geïsoleer is vanuit 'n gekorrodeerde pypstels, is gevind wat die yster reduceer na oplosbare yster en sodoende word 'n al groter oppervlakte aan korrosie omgewing blootgestel. *Pseudomonas* spesies is die mees oorheersende bakterieë in industriële wateromgewings, tesame met verskeie ander slymvormende bakterieë, waar hul primêre rol blyk te wees om metaaloppervlaktes te koloniseer en daardeur 'n suurstofvrige omgewing te skep wat SRB huisves. Alle soorte mikroörganismes wat die vermoë besit om te koloniseer, kan beskou word as potensiële korrosie organismes (Iverson, 1987:9). Koperweerstandbiedende bakterieë, nl. *Pseudomonas* spesies, *Micrococcus* spesie en *Corynebacterium* spesie, is geïsoleer vanaf gelatienagtige neerslae op die wande van koperalloeikondenseerderbuise wat in kontak was met seewater. Schiffrin en De Sanchez (1985:22) het gevind dat net die koperweerstandbiedende, biofilmvormende *Pseudomonas* spesies instaat was om korrosie te veroorsaak. *Cladosporium* spesies, *Pseudomonas* spesies en *Desulfovibrio* spesies is geïsoleer vanaf aluminiumkorrosieoppervlakte. Magnesiumkorrosie word veroorsaak deur *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* spesies en *Cladosporium resinae*, terwyl nikkelkorrosie veroorsaak word deur *Methanobacterium thermoautotrophicum*, verskeie *Clostridium* spesies en *Acetobacterium woodii* (Iverson, 1987:26).

'n Verskeidenheid van hidrogenas: positiewe, fotosinterende en nie-fotosinterende bakterieë is getoets vir hul korrosie effek deur die katodiese depolarisasietegniek en deur die bepaling van ysterverlies gevolg deur die vorming van roes. Slegs 'n geringe invloed is waargeneem. In hierdie studies is eg-

ter aangetoon dat verskeie chemoorganotrofe bakterieë, wat H_2 en CO_2 vorm, asook sure, 'n belangrike rol speel gedurende korrosie van yster. Moreau en Brousou (1972:845) het chemoorganotrofe aërobe en fakultatief anaërobe bakterieë geklassifiseer in vier groepe, gebaseer op hul proteolitiese-, nitraatredusering- en karbonaatafbraak eienskappe wat aanleiding gee tot die korrosie van koper en nikkell. Sommige groepe inhibeer korrosie en ander veroorsaak beperkte of intensiewe korrosie (Iverson, 1987:9).

Nitrifiserende bakterieë, of suurproduserende bakterieë word dikwels gevind in verkoelingswatersisteme en produseer NO_2^- -sure vanaf ammoniak. Wanneer hulle teenwoordig is in verkoelingsisteme, gebruik hierdie organismes ammoniak vanaf die atmosfeer of vanaf lekplekke in toerusting. Gewoonlik veroorsaak ammoniak 'n styging in pH, in teenstelling met wanneer hierdie organismes teenwoordig is, veroorsaak hulle 'n daling in pH as gevolg van die produksie van NO_2^- -sure. Dit resulteer in korrosie van metale wat beskadig word deur lae pH-toestande; hoofsaaklik matige staal, maar ook koper en aluminium. Hul teenwoordigheid kan bepaal word deur spesiale mikrobiologiese toetse wat nie normaalweg gebruik word vir roetine toetsing van verkoelingsisteme nie. Chloorbehandeling is baie geskik vir kontrolering van hierdie organismes (Puckorius, 1978:174).

1.2.1.2.5. Swamme.

Swamme sluit giste en skimmels in wat mikroskopiese lewensvorme groter as bakterieë is. In verkoelingswater resulteer swamme in slym. Swamgroei word gevind op verkoelingstoringhout en wande wat aan stroom blootgestel word, asook in hitteuitruilers. 'n *Penicillium* spesie is gevind wat houtverwering in koelings veroorsaak (Puckorius, 1978:171).

Swamme is nie direk korrosief teenoor metale in verkoelingsisteme nie. Die neerslae wat hierdie organismes produseer laat egter differensiële korrosieselle ontwikkel wat korrosie veroorsaak en inmeng met die werking van korrosie inhibeerders deurdat dit die metaaloppervlakke afskerm vanaf die inhibeerder (Puckorius, 1978:171). Korrosie deur organiese sure is hoofsaaklik die gevolg van swamaktiwiteite, alhoewel daar ook korrosiegevalle gerapporteer is waar bakterieë, wat organiese suur produseer, verantwoordelik was vir korrosie (Iverson, 1987:17).

Vanuit 'n biologiese oogpunt is een van die mees betekenisvolle swamme *Cladosporium resinae* wat betrokke is by die korrosie van aluminium: waaruit brandstoftanks van supersoniese vliegtuie gemaak is. Hierdie organismes groei in die water-brandstofskeidingsvlak op die bodem van die brandstoftank, gebruik komponente van die brandstof (C_3-C_6 alkane) en anorganiese eenhede, opgelos in die water, vir voedingstowwe. Die swam wat soos 'n mat op die metaaloppervlakte groei, wat tot nadeel van die primêre voedingstowwe beskikbaar in die sisteem is, sal onvermydelik aanleiding gee tot die moontlikheid van suurstof of voedingstof konsentrasieselle en mikrobiiese konsortium, waar ander organismes op die metaboliese produkte van die primêre koloniserende spesies groei (Hamilton, 1985:198). Daar is ook in supersoniese vliegtuie se brandstoftanks 'n albinomutante ras van *Aspergillus fumigatus* gevind, wat aangetoon is om 'n primêre korrosieveroorsaker te wees as gevolg van sy vermoë om by hoë temperatuur in die tank te groei (Iverson, 1987:9).

Copenhagen (1950:137) het gerapporteer dat 'n *Cerostomella* spesie korrosie van staal- en aluminiumonderdele, wat nog in hul oorspronklike verpakking was, veroorsaak het. Die korrosie van koper, aluminium en staal is gedemonstreer deur gebruik te maak van vyf suurproduserende swam spesies, nl. *Aspergillus niger*, *Aspergillus amstelodami*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium brevicompactum* en *Paecilomyces varioti* (Iverson, 1987:10).

1.2.1.2.6. Blou-groenbakterieë en alge.

Blou-groenbakterieë en alge is relatiewe groot organismes. Hulle is gewoonlik blou, blou-groen of groen gekleur deur die teenwoordigheid van chlorofil. Sonlig is dus nodig vir groei. Blou-groenbakterieë en alge veroorsaak algemeen slymerige neerslae in koeltorings waar sonlig en water teenwoordig is. Neerslae van dooie alge verskaf voedsel vir bakterieë en swamme, omdat dit optree as 'n filter om ander organismes te vang (Puckorius, 1978:171).

Blou-groenbakterieë en alge is belangrike biofilmvormende organismes alhoewel daar relatief min verslae van direkte korrosie deur hierdie groep is, blyk hulle om die potensiaal te hê vir die indusering van korrosie as gevolg van hul rol in produksie van suurstof, korrosiewe organiese suur en voedingstowwe vir ander korrosiewe mikroorganismes, asook hul rol in slymvorming. Korrosie van verskeie soorte sweisstale en 304 vlekvrige staalmonsters is gerapporteer wat veroorsaak is deur twee soorte spesies van blou-groen bakterieë, nl. *Nostoc parmelioides* en *Anabaena sphaerica*, en 'n spesie rooi alge, nl. *Gracillasia*.

(Iverson, 1987 : 10). Katodiese polarisasiestudies op drie rasse van hidrogenase positiewe *Chlorophyta* en *Cyanobacteria* het aangetoon dat die organismes instaat is om katodiese waterstof te verbruik (Mara en Williams, 1971:895). Onder matte, wat bestaan uit 'n *Oscillatoria* spesie, kolonievormende diatome en 'n *Enteromorpha* spesie het die pH-waardes gestyg tot hoë waardes wat neig om die korrosietempo te verminder. In gebiede waar daar verrotting van die mat was, het die pH gedaal, moontlik as gevolg van die produksie van korrosiewe organiese sure wat diffirensiële pH korrosieselle veroorsaak. Toestande kan ook so geskep word wat gunstig is vir die groei van SRB(Iverson, 1987:10).

Beheer van blou-groenbakterieë en alge kan effektief wees deur die koeltoring se dakke te bedek sodat die sonlig nie die toringwater kan bereik nie, of behandeling met chemikalieë soos chloor, kwaterneë ammoniumverbindings en koper-soute kan gebruik word (Puckorius,1978:171).

Daar kan dus afgelei word dat korrosie in die algemeen en mikrobiologiese korrosie in die besonder, 'n komplekse verskynsel is en selde, indien ooit, slegs 'n enkele meganisme of spesie betrek.

1.3. Biofilms.

Bakterieë heg stewig aan omtrent enige oppervlak in 'n wateromgewing(Costerton *et al.*, 1987:437). Direkte ondersoek van bakterieë in industriële watersisteme het aangetoon dat hulle aangepas het om op dieselfde manier te groei in dik aangehegte biofilms wat predominant is in natuurlike watersisteme. Net soos in die natuurlike watersisteme groei hierdie bakterieë in 'n gestruktureerde sisteem waarin anaërobe korrosie veroorsakende bakterieë afgeskerm word vanaf suurstof en antibakteriese faktore deur die dik biofilm wat daaroor lê, waarvan die selle suurstof gebruik en die eksopolisakkariedmatriks optree as 'n loonuitruiler om die penetrasie van geëlaaide molekules te beperk (Costerton en Lashen, 1984:13). Die bakterieë heg deur middel van 'n matriks van polimere, hoofsaaklik polisakkariede, wat uitsteek vanaf die oppervlakte en vanaf 'n massa deurmekaar vesels wat glikokaliks genoem word. Bakteriese glikokaliks is daardie polisakkaried bevattende strukture van bakteriese oorsprong wat buite die integrale element van die buitemembraan van Gram-negatiewe selle en die peptidoglikaan van Gram-positiewe selle lê(Costerton *et al.*, 1981:300). Glikokaliks

bestaan uit veselagtige polisakkariede of bolvormige glikoprotefene. Die oppervlak van wilde bakteriese stamme, wat instaat is om te oorlewe en te groei in kompeterende omgewings, bestaan uit hierdie molekule en die piliën subeenheid van pili wat lank genoeg is om die verste buite oppervlak van die bakteriese sel te bereik (Costerton *et al.*, 1981:300)..

Die vashegting wat deur die glikokaliks bewerkstellig word, bepaal spesifieke lokalisasies van bakterieë in talle wateromgewings. Die selle groei en reproduseer op die oppervlak en verhoog die biomassa en geassosieerde materiaal. Die hele aanhegting word biofilm genoem (Characklis *et al.*, 1982:1207). Die vorming van primêre films en biofilmlae word beïnvloed deur seewater, temperatuur, lig, voedingstowwe beskikbaar, biota in die waterkolom beskikbaar vir kolonisasie, substraat en blootstellingtyd (Marzalek *et al.*, 1979:987). 'n Hoë pH in die groeimedium voorkom omtrent heeltemal die voorkoms van primêre polisakkariede in voorbereiding van natuurlike aangehegde bakterieë, wat deur netvormige sekondêre polisakkaried omring word en nie vasklewing benadeel nie.

In teenstelling met natuurlike aangehegde bakterieë, was biofilms omring met primêre polisakkariede (Fletcher en Floodgate, 1973:325). Hoë temperatuur verlaag die aantal bakterieë wat vasheg, relatief met kultuurdigtheid, maar beïnvloed nie die voorkoms van die klewerige stof nie (Fletcher en Floodgate, 1973:325).

By biofilms wat ontwikkel op die oppervlakke wat blootgestel is aan vloeistofvloei, is die netto resultaat verskeie fisiese-, chemiese- en biologiese prosesse wat die volgende insluit, nl. vervoer en adsorpsie van organiese molekule na die oppervlak; vervoer van mikrobiese selle; mikroorganismes wat aan die oppervlak vasheg; mikrobiese transformasies op die oppervlak resulteer in die produksie van biofilms en die gedeeltelike losmaking van die biofilm deur vloeispanning (Trulear en Characklis, 1982:1288). Die snelheid van biofilm produksie hang af van die voedingstowwe in die film, gevolg deur hul sintese in die aangehegde biomassa. Voeding- of suurstofuitputting in die onderste lae van die biofilm kan die algehele produksieproses betekenisvol beperk (Trulear en Characklis, 1982: 288). Bevuilende biofilm ontwikkel binne 'n vloeisisteam in 'n S-vormige patroon. Drie fases is teenwoordig, nl. biofilmvorming; eksponensiële akkumulاسie, en 'n platofase. Die aanvanklike biofilmvormende fase eindig wanneer die wrywing en hitte oordragweerstand begin toeneem. Die effek van biofilm op beide wrywing en hitte oordragweerstand word eers ernstig in die laaste twee fases van ontwikkeling (Bryers en Characklis, 1981:483).

Biofilms dien 'n voordelige doel in natuurlike omgewings en in sommige sisteme. Biofilms is bv. verantwoordelik vir die verwydering van organiese en anorganiese kontaminante vanaf natuurlike strome en in afvalwaterbehandelingsprosesse. Die term biobevuiling word egter algemeen gebruik waar biofilms ongewens is (Characklis en Cooksey, 1983:94). Organismes heg aan oppervlakke hoofsaaklik omdat hulle die vermoë besit om dit te doen (Costerton *et al.* 1978:86; Geesey, 1982:9). Ekstrasellulêre polimere word deur hierdie organismes geproduseer. Hierdie polimere omhul die organismes en verskaf beskerming teen sterk kragte en toksiese stowwe in die water. Die lopende water verskaf 'n voorraad voedingstowwe aan die organismes en verwyder hulle toksiese metaboliese eindprodukte (Richardson, 1982:103).

Verskeie tipes besoedelings en kombinasies daarvan mag voorkom, nl. kristalagtige presipitasiebesoedeling, korrosiebesoedeling, spesifieke besoedelings, chemiesereaksiebesoedelings en biologiese besoedelings of biobesoedeling. Bio-besoedeling ontstaan as gevolg van die ontwikkeling van 'n biofilm, bestaande uit mikroorganismes en hul produkte (mikrobiële besoedeling), neerslag en groei van makroorganismes soos bv. makro-alge (Characklis en Cooksey, 1983:94). Mikrobiële besoedeling ondersteun dikwels ander soorte besoedeling. Mikrobiële besoedeling sal bv. die skadelike effek van sedimentasie verhoog. Biofilms kan blykbaar presipitasieprosesse beïnvloed. Mikrobiële besoedeling veroorsaak altyd makrobiële besoedeling, alhoewel dit nie 'n noodsaaklike voorvereiste hoef te wees nie (Characklis en Cooksey, 1983:94).

1.3.1. Mikroorganismes betrokke by biofilmvorming.

Die vorming van biofilms op oppervlakke is universiële bakteriële strategie vir oorlewing en posisionering met verhouding tot die beskikbare voedingstowwe. Bakteriële populasies in hierdie beskermende manier van groei, produseer planktoniese selle met 'n baie verlaagde kans vir oorlewing. Hierdie losgeraakte selle kan oppervlakke koloniseer of mag groot planktoniese populasies vorm in daardie skaars omgewings waar voedingstowwe baie is en bakteriële antagonistiese min is (Costerton en Lashen, 1984:13).

Bakteriële korrosie word eintlik veroorsaak deur sessiële anaërobe bakterieë wat onder 'n dik biofilm lewe wat bestaan uit aërobe en fakultatief anaërobe bakterieë vasgevang in 'n veselagtige anioniese ioon uitruil gebied wat die penetrasie van gelaaiete molekule beperk. Naakte planktoniese organismes in suiwer kulture is daarom nie verteenwoordigend van die bakterieë wat eintlik

die korrosie veroorsaak in industriële sisteme nie. Planktoniese organismes verteenwoordig slegs daardie klein gedeelte van die aktiewe sessiele populasie van korrosie veroorsakende bakterieë wat los gekom het vanaf die biofilm. Die predominante populasie in liniêre vloeï industriële sisteme groei binne aangehegde biofilms (Costerton en Lashen, 1984:13).

Filamentbakterieë is bekend om in te meng met die deurbeweeg van water in hoogs besoedelde vloeisisteme. Verder is filamentbakterieë ook waargeneem in besoedelde hitte-uitruilsisteme. Die energieverliese geassosieer met besoedelende biofilms is nie verklaar deur spesifieke mikrobiële komponente nie (McCoy *et al.*, 1981:910).

Die lengte van filamentagtige selle is gewoonlik lank genoeg om verby die klewerige onderlaag in die vloeistof uit te steek. Biofilms wat nie filamentagtige bakterieë bevat het nie, is baie dun (gewoonlik een sel dik) en is minder as die kritiese dikte benodig vir die opsporing van 'n vloeistof wrywings weerstand (McCoy *et al.*, 1981:910). Filamentagtige bakteriese selle is waargeneem in besoedelende biofilms vanuit 'n wye verskeidenheid bronne. Waarnemings van relatief onversteurde biofilms tesame met die bepaling van 'n standaard besoedelings-parameter, verskaf getuinis dat filamentagtige bakteriese selle direk betrokke is by die energie verlies prosesse geassosieer met biofilms (McCoy *et al.*, 1981:910).

Bakteriese selwande is buigbaar en merkwaardig aanpasbaar met die selle se groei omgewing, dit wil sê dat selle geïsoleer vanuit sekere gebiede verskil van die wat op kweek-bodems *in vitro* gekweek word. Die sessiele selle het dus meer aktiewe reproduksie en algemene metabolisme terwyl planktoniese selle fenotipies toe vertrou is tot beweeglikheid en die kolonisasie van nuwe oppervlakke (Costerton *et al.*, 1987:435).

Mikroorganismes wat uit biofilms geïsoleer is sluit filamentagtige blou-groenbakterieë en groen alge in sowel as ander bakterieë. Hierdie bakterieë het bestaan uit die volgende genusse: *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Gallionella*, *Sphaerotilus*, *Arthrobacter*, *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes* en *Agrobacterium* (Iverson, 1987:14; LeChevallier *et al.*, 1987:2714). Swamme soos bv. *Aspergillus* spesies en *Cladosporium* spesies het ook voorgekom. (Pugh, 1982:9; Iverson, 1987:14). *Micrococcus* en *Corynebacterium* is ook in kombinasie met *Pseudomonas* gevind in kondenseerderbuise wat gekontamineerde see-

water gebruik as verkoelingsmedium. Die kombinasie van bakteriese kontaminante asook anaërobe toestande kan 'n baie ideale omgewing skep vir korrosie (Schiffrin en De Sanchez, 1985:31).

1.3.2. Fases van bakteriese aanhegting.

'n Vaste oppervlakte wat in kontak is met water sal later bedek raak met organiese voedingstowwe wat bakteriese groei kan bevorder en uiteindelik lei tot die vorming van primêre biofilms (Schiffrin en De Sanchez, 1985:31).

Oppervlakke in wateromgewings is baie aantreklik vanuit 'n bakteriese oogpunt, omdat beide anorganiese en organiese voedingstowwe op hierdie oppervlak gekonsentreer kan word (Zobell, 1943:39) en waarnemings het getoon dat bakterieë voorkeur verleen aan hierdie oppervlakke. Eerstens word die oppervlakke aangepas omdat voedingstowwe vir bakterieë geabsorbeer word vanuit die vloeistof en dan gekonsentreer word op die oppervlak. Daarna trek die oppervlak self die bakterieë aan. Chemotaktiese en beweeglike bakterieë migreer na oppervlakareas wat hoë konsentrasies voedingstowwe besit. Daarna volg die aanhegtingsproses wat aan die begin omkeerbaar is en dan onomkeerbaar word (Marshall *et al.*, 1971:338). Die resulterende laag organismes bestaan hoofsaaklik uit bakteriese populasies. Later sal sekondêre organismes aanheg aan die primêre laag. Hierdie sekondêre organismes (ander bakterieë of makrokopiese organismes) groei bo-op die primêre laag en kan dus daarop oorlewe (Richardson, 1982:103). Wanneer hulle vasgeheg is, produseer die bakterieë groot hoeveelhede eksopolisakkaried glikokaliks polimere (Fletcher en Floodgate, 1973:325; Costerton *et al.*, 1981:299). Selverdeling verskaf dogterselle wat bind binne die glikokaliksmatriks en inisieer die ontwikkeling van aangehegde mikrokolonies. Die uiteindelige produksie van 'n aaneenlopende biofilm op die gekoloniseerde oppervlak is 'n funksie van selverdeling binne in mikrokolonies en nuut aangehegde bakterieë vanaf die planktoniese fase. Uiteindelik bestaan die biofilm uit enkele selle en mikrokolonies van dogterselle wat alles ingebed is in hoogs gehidreerde, predominante anioniese matriks van bakteriese eksopolimere en aangehegde makrokolonies. Soos wat die bakteriese biofilm geleidelik die gekoloniseerde oppervlak oortrek, heg nuut aangehegde bakterieë aan die biofilm. Verskille in die tempo van kolonisasie van verskeie oppervlakke verdwyn gewoonlik in lang termyn kolonisasie eksperimente (Costerton *et al.*, 1987:436). Fases en maniere van aanhegting deur verskillende soorte mikroorganismes is bestudeer, nl. diatome (Cooksey, 1981:1378) en *Pseudomonas aeruginosa* (Stanley, 1983:1493).

1.3.3. Probleme wat kan ontstaan as gevolg van biofilms.

In die natuur lewe die mikrobies gewoonlik in ewewig met mekaar, maar wanneer ongewone toestande soos stagnering voorkom, sal sommige organismes, wat beter aangepas is vir hierdie omstandighede, hulle ten koste van die ander vermeerder. Dit lei tot probleme. Wanneer stagnasie voorkom sal die opgeloste vaste stowwe in die water toeneem. Die opgeloste stowwe sal of meer gekonsentreerd word of neerslaan wanneer hul konsentrasie hul oplosbaarheid oorskrei (Pugh, 1982:8).

Daar kan dan enige van die volgende plaasvind, nl. besoedeling met mikrobiese groei wat in uiterste gevalle blokkering van pyplyne en waterweë sal veroorsaak asook die watervloei beperk (Characklis *et al.*, 1982:1207). In hitte-uitruilers, afvalwater vervoersisteme en sekondêre olie herstel operasies, was bakteriese biofilms die oorsaak van energieverlies en materiaalverwering (McCoy *et al.*, 1981:910). Berekeninge toon dat self geringe besoedeling van hitte-uitruileroppervlakke termiese veranderinge beïnvloed en die proses onekonomies maak (Aftring en Taylor, 1979:734).

Slym, wat gevorm word deur bakterieë, bestaan hoofsaaklik uit water en polysakkariede. Dit kan as 'n isoleerder optree en daarom kan dit nie hitte oor hitteuitruiloppervlakke oordra nie. Slym kan ook klei aantrek, asook sand, wat verkoelingsisteme se buise en ander toerusting verstop (Richardson, 1982:103). Aanpaksels kan gevorm word in baie dele van 'n koeltoring. Indien die toring se bo-punt onbedek is en oop is vir sonlig, kan alge aan die toringwande vasheg en begin groei. Indien hierdie organismes nie beheer word nie, kan hulle uiteindelik die verspreidingsopening van die toring verstop en dus inmeng met druppelvorming. Dit resulteer dan in minder doeltreffende hitteverwydering. Alge kan ook voedingstowwe verskaf vir bakterieë en 'n verlaagde suurstofkonsentrasie op die metaaloppervlakke veroorsaak en sodoende SRB se groei aanhelp en uiteindelik korrosie (Richardson, 1982:104).

Little *et al.* (1986:533) het gerapporteer dat 'n bepaalbare korrosie potensiaal ontwikkel tussen 'n ongekoloniseerde metaaloppervlak en 'n metaalagtige oppervlak wat deur bakterieë gekoloniseer is. Bakterieë georganiseer in gestruktureerde konsortium beset ontwikkelende korrosie putte en lokale pH verskille tot groter as 1,5 eenhede kan voorkom in onderste gebiede van biofilms wat op metaaloppervlakke groei. Bakteriese korrosie is dus 'n aktiwiteit van

gestruktureerde bakteriese biofilm waarin fisio-chemiese verskille tussen aangrensende loki op die metaaloppervlak ontstaan en gehandhaaf word deur dif-firensiële metaalbinding en metaboliese aktiwiteite totdat diep korrosie putte ontstaan (Costerton en Lashen, 1984:13).

Die invloed van biofilms op korrosie is bepaal deur die aktiwiteite van die anodiese en katodiese ligging. Sommige van die maniere waarop biofilms die korrosieproses mag beïnvloed, sluit die volgende in, nl. die produksie van ekstracellulêre polimeereenhede deur biofilms is noodsaaklike poliëlektroliet-materiaal. Gevolglik kan hulle dien as 'n elektronpoel by die katode; dif-firensiële konsentrasieselle kan vorm as gevolg van biofilms; suurproduksie in biofilms, veral anaërobe omgewings, kan korrosie aanhelp; SRB mag korrosie beïnvloed deur depolarisering van die katode of deur ander prosesse as gevolg van sulfiedproduksie; biofilms mag dien as 'n molekulêre sif wat die ionbeweeglikheid naby die metaaloppervlakke kan verander (Characklis en Cooksey, 1983:131).

'n Ekologiese ondersoek van die hele watersistiem is 'n noodsaaklike eerste stap in die beheer van bakteriese probleme in industrieë. Besoedende korrosie en verstopping is albei betrokke by biofilms, maar is tradisionele monitor prosedures en versamel slegs die klein planktoniese populasies wat onderbroke gestort word vanaf hierdie aangehegde gemeenskappe. Behandeling met tradisionele konsentrasies biosiede dood hierdie planktoniese organismes en toon tekens van sukses, maar los die biofilm populasies onaangeraak (Costerton en Lashen, 1984:13).

Die belangrike rol van biofilm en aangehegde organismes op korrosieprosesse is onlangs eers gedefinieer. Meer navorsing hieroor is nodig voordat 'n meer fundamentele en bruikbare teorie ontwikkel kan word (Characklis en Cooksey, 1983:131).

1.4. Die voorkoms van Legionella in verkoelingsisteme.

Legionella pneumophila is 'n Gram-negatiewe, nie-suurvaste, nie-spoorvormende beweeglike bakterie met spesifieke groeigewoontes. Slegs 'n paar fenotipiese toetse word gebruik vir die identifikasie van *L. pneumophila* omdat die mees algemene bakteriologiese medium nie hul groei ondersteun nie (Orrison *et al.*, 1981:109).

Omgewingswaarnemings in London en die VSA toon aan dat *L.pneumophila* wyd verspreid in die natuur voorkom. Dit het voorgekom in modder, riviere, mere en ander natuurlike versamelplekke van water (Fliermans *et al.*, 1979:1239) en dit is ook duidelik dat die bakterieë teenwoordig is in mensgemaakte waterstelsels. Die bakterie het ook voorgekom in huishoudelike water en hersirkulerende verkoelingswaterstelsels (Morris *et al.*, 1979:664; Cordes *et al.*, 1981:195; Tobin *et al.*, 1981:515). Die belangrikheid van een as 'n bron van *L.pneumophila* besmetting is nie bekend nie, maar die algemene voorkoms van die bakterieë in die verkoelingswaterstelsels maak dit 'n belangrike potensiële bron. Daar is ook endemiese getules vanuit die VSA dat hierdie stelsels die oorsaak was van uitbrake van Legioensiekte (Dondero *et al.*, 1980:365; Band *et al.*, 1981:2404). Die infeksie is verkry deur die inaseming van die aërosol wat veroorsaak word deur koeltorings of kondenseerders (Kurtz *et al.*, 1982:370).

L.pneumophila kan ook groei deur gebruik te maak van die ekstrasellulêre produkte van sommige alge (Soracco *et al.*, 1983:109). Hierdie waarnemings toon aan dat die temperatuur, pH en voedingsbehoefte van *L.pneumophila* nie so streng of beperk is as wat waargeneem is toe dit op komplekse medium gekweek is nie. Die assosiasie tussen *L.pneumophila* en sekere blou-groen bakterieë, *Fischerella* spesie (Fliermans *et al.*, 1981:9) kan 'n verklaring verskaf vir die wydverspreide voorkoms van die bakterieë in die natuur en mensgemaakte habitate (Tison *et al.*, 1980:456). Kurtz *et al.* (1982:379) het ook hierdie verwantskap ondersoek, maar kon geen bevestiging daarvoor kry nie.

Betekenisvolle assosiasies is gevind tussen *Legionella*-infeksie en die konsentrasies van chloriede, totale opgeloste vaste stowwe en verhoogde pH. Die opbou van bogenoemde faktore toon aan dat indien die sisteem gereeld gebloei word en met vars water vervang word, kan dit 'n belangrike rol speel in die vermindering van die opbou van *L.pneumophila* in hersirkulerende verkoelingswatersisteme (Kurtz *et al.*, 1982:380).

Dit is gevind dat vry chloor by konsentrasies van 3,3 en 6,6 mg.l⁻¹ *L.pneumophila* vinnig inaktiveer. Hierdie relatiewe hoë konsentrasies was tipies van die wat in koeltorings gebruik word. Dit word vermoed dat die hoeveelheid residuele chloor wat aanbeveel word vir standaard watersuiwering nie genoegsaam is om *L.pneumophila* te dood wanneer die bakterieë in groot getalle teenwoordig is nie (Kuchta *et al.*, 1983:1134; Fliermans en Harvey, 1984:1307).

'n Belangrike beginsel het met Fliermans *et al.* (1982:908) se ondersoek na vore gekom, nl. dat dit nie sinvol sal wees om te probeer om *L.pneumophila* geheel en al uit die sisteem te verwyder nie. Die bakterieë is deel van die natuurlike watergemeenskap en kan tot 10% van die totale bakteriese populasie uitmaak. Daar moet dus 'n aanvaarbare vlak verkry word waarby 'n sisteem wat *L.pneumophila* en ander patogene mikroorganismes bevat op 'n veilige manier beheer word.

Beide die hoeveelheid aanvullende water en die digtheid van *L.pneumophila* in die waterbron mag die vlak bepaal waarby die bakterieë in verkoelingswatersisteme voorkom. Watermonsters wat 10^8 tot 10^9 *L.pneumophila.l*⁻¹ bevat is gevaarlik (Fliermans *et al.*, 1982:908).

1.5. Metodes vir die bestudering van mikroorganismes in verkoelingsisteme.

1.5.1.. Bestudering van biofilm.

Daar is metodes beskikbaar om die vooruitgang van biofilm prosesse te monitor en kan as volg geklassifiseer word: direkte bepaling van die hoeveelheid biofilm; indirekte bepaling van die hoeveelheid biofilm: spesifieke biofilmsamestelling; indirekte bepaling van die hoeveelheid mikrobiese aktiwiteit in die biofilm; indirekte bepaling van die hoeveelheid biofilm: effekte van biofilm oordrageienskappe (Characklis *et al.*, 1982:1207).

Metodes om biofilm te bepaal sluit in direkte waarneming, met 'n lig- of elektronmikroskoop (Fletcher en Floodgate, 1973:325; Geesey *et al.*, 1977; Kinner *et al.*, 1983:1659), en indirekte waarneming, nl. notering van die druk in 'n pyp of die tempo van hitte-oordrag oor 'n oppervlak. Indirekte metodes werk die beste in kommersiële gevalle (Richardson, 1982:104). Toets eenhede is beskikbaar om die bakteriese vlakke in hersirkulerende water te bepaal. Alhoewel die aangehegde populasies uit baie groot getalle kan bestaan, kan die sessiele (permanent vasgehegde) organismes nie deur die toetseenheid getel word nie (Richardson, 1982:103).

Tegniese is ontwikkel vir die identifisering van mikroorganismes binne-in 'n biofilm. Dit sluit in die identifikasie van lipiedeienskappe (unieke vetsuurprofiel) van swamme, alge en bakterieë, insluitende SRB (Taylor en Parkes, 1983: 3303). 'n Fluoresserensie teenliggaamtegniek word ook ingesluit (Pope *et al.*, 1982:43). Tegniese is ook ontwikkel vir die bepaling van die reaktiwiteit van mi-

kroörganismes, veral sulfaatreduseerders (Hamilton, 1985:15).

Die bestudering van biofilm benodig ingewikkelde ontwerpe., beide vir die biofilm en ook vir die bestudering van die uitwerking veroorsaak deur mikrobiëse biofilms. Metodes vir die bepaling van biofilm massa as 'n funksie van tyd en reguleringsfaktor word ook benodig. Die ontwerp van hierdie voorwerpe en metodes hang af van die doel of mikpunt van die biofilmstudie. Die reaktor wat deur Pedersen (1982:6) beskryf word, is ontwerp vir die bestudering van die faktore wat biofilmontwikkeling reguleer onder vloeitoestande wat voorkom in elektrochemiese konsentrasieselle.

Miller en Bott (1982:539) het 'n studie gemaak op beide van industrie en 'n laboratorium om sommige faktore se uitwerking op die vorming, groei en verwydering van biologiese films te ondersoek wat direk op die hitte-uitruiloppervlakke, wat in kontak met die verkoelingswater is, voorkom. Die invloed van temperatuur, beskikbare voedingstowwe en oppervlakmateriale op filmvorming is ondersoek. 'n Suiwer kultuur van *Pseudomonas fluorescens* is gebruik om biologiese films te kweek in die laboratorium onder identiese hidrodinamiese toestande, maar by verskillende temperature. Die invloed van voedingstoflading, onder dieselfde hidrodinamiese toestande, is in die laboratorium bestudeer asook biofilmafbreking. Toetsapparate is gekonstrueer om die vorming van industriële biofilm onder verskillende toestande in 'n industriële eenheid (koeltoring) te moniteer. Die laboratoriumapparaat se gebruik word volledig deur Miller en Bott (1982:539) bespreek.

Schiffriener. De Sanchez (1985:37) beklemtoon die probleem met biofilmontledings, nl. dat om die interaksie van lewende organismes en materiale eksperimenteel te ondersoek, moeilik is, omdat die gedrag van die metaal bepaal sal word deur die tipe oppervlakkolonisasie wat teenwoordig is, asook die presiese toestande wat gedurig in die verkoelingsstelsel heers. Daarby word die probleem bemoëlik as gevolg van die probleme met aërobe bakteriese kontaminasies wat kan aanleiding gee tot die vinnige aktivering van SRB wanneer lokale anaërobe toestande ontwikkel.

Die Robbins toestel is ontwerp deur McCoy *et al.* (1981:910) en McCoy en Costerton (1982:1490) om sessiele biofilm bakteriese populasies asepties te kan versamel. Hierdie toestel (Fig. 5) het goeie data verskaf oor biofilmontwikkeling, in laboratoriumsisteme sowel as industriële water wat gesirkuleer word, te bestudeer. Deur gebruik te maak van hierdie toestel om sessiele

bakteriese populasies te herwin, sonder om die biofilm te versteur, was hulle in staat om die aanvangsgebeure van die kolonisasie van metale deur bakterieë, die opeenvolgende ontwikkeling van die dik biofilms (± 250 selle en 1 mm in deursnee), waarvan die oppervlak organismes dikwels verleng om lang filamente te vorm, wat wrywings weerstand veroorsaak, te bestudeer (Costerton en Lashen, 1984:13).

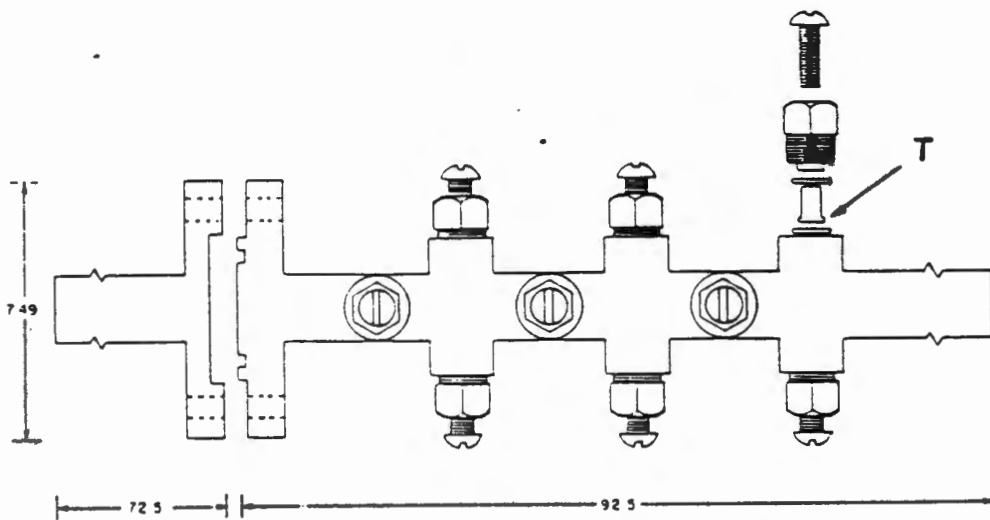


Fig. 5. Skematiese voorstelling van die Robbins toestel.

T is verwyderbare toetsoppervlak ($0,5\text{ cm}^2$) wat blootgestel is aan sirkulerende vloeistof. Alle afmetings is in sentimeters.

1.5.2. Bestudering van mikroorganismes.

Die meeste navorsers het gebruik gemaak van die standaard agarmetode vir plaat-tellings. Kurtz *et al.* (1982:371) het die metode onveranderd gebruik, terwyl Dunstall en Schwarz (1983:1847) die agar met 'n verskeidenheid van voedingstowwe, uit kondenseerderwater verkry, verryk het. Lee *et al.* (1980:637) het die standaard metode gebruik, maar met verlengde inkubasie tyd (sewe dae) en 'n laer groeitemperatuur, 20-25°C. 'n Aantal isolate, vanaf plaattellingmedium, is gekies om as suiwer kulture gekweek te word. Baie isolate kon egter nie as suiwer kulture gekweek word nie, omdat hulle nie op die medium wat gebruik is, kon groei nie. 'n Aantal ander kweekmediums is daarna ondersoek (Lee *et al.*, 1980:640).

Die isolate is volgens standaard identifikasie-metodes ondersoek, maar omdat baie van die isolate geen reaksie na 48 uur by 35°C getoon het nie, kon geen definitiewe identifikasies gemaak word nie. Die volgende groepe mikroorganismes is ondersoek met behulp van selektief-verrykte medium, nl. ysterpresipi-terende organismes, nitrifiseerders en denitrifiseerders, stikstofbinders, swaeloksideerders en SRB (Lee *et al.*, 1980:640). Hulle het ook met behulp van skandeerelektronmikroskopie waterneerslae van bakterieë en ander mikro-organismes waargeneem. Alhoewel die skandeerelektronmikroskoop hulle instaat gestel het om die mikroorganismes in die waterneerslae te ondersoek, bly dit nogtans moeilik om die effek van biologiese aktiwiteit, wat die korrosiepro-ses mag beïnvloed, te ondersoek en te bepaal, as gevolg van die dinamiese na-tuur van die omgewing in die waterneerslae (Lee *et al.*, 1980:636).

Die maksimum herwinning van bakterieë vanuit die water benodig lang tydperke van inkubasie by kamertemperatuur en 'n lae voedingsagarinhoud. Vir hierdie behoeftes is M-5 agar deur Victoreen (1984:88) gebruik. Die agar bestaan uit 3g triptoon-glukose-gis-agar, 12g agar en 200g ysterglukonaat opgelos in 1 l gedistilleerde water.

Schiffrin en De Sanchez (1985:32) het monsters met steriele deppers geneem vanaf oppervlakke op die binnewande van kondenseerderbuis wat bedek was met 'n gela-tienagtige neerslag. Hulle het 'n medium ontwikkel vir die kweking van marine bakterieë. Vir isolasie is dieselfde medium aangevul met 2% agar, gebruik. Vir die isolasie en suiwing van die gemengde kulture is standaard bakterio-logiese tegnieke gebruik. Die volgende identifikasietoetse is op die suiwer

kulture uitgevoer: Gram-kleuring, oksidasie-fermentasie, beweeglikheid, katalase, gelatienervloeiing, spoorvorming, pigmentvorming en morfologie. Die bakterie spesies wat hulle geïdentifiseer het, het aan *Pseudomonas*, *Micrococcus* en *Corynebacterium* behoort.

Die teenwoordigheid van ysteroksiderende bakterieë en die SRB op die korrosieplek, kan ondersoek word deur gebruik te maak van spesifieke mikroskopiese ondersoektegnieke. Om anaërobe bakterieë waar te neem moet die blasie wat gevorm is versigtig verwyder word vanaf die metaaloppervlak. Dit moenie toegelaat word om te droog nie. 'n Klein druppel van die swart vloeistof wat in die holte van die blasie voorkom, of in die korrosieput self, word oorgedra in 'n hangdruppelkultuur. Hierdie druppel word direk, sonder enige fiksering of kleuring, by 900-1 000 maal vergroting ondersoek deur gebruik te maak van donkerveld- of fasekontrasmikroskopie (Lutey, 1980:3). Jones (1983:306) verskaf mediummetode waarvolgens ysterreducerende bakterieë geïsoleer kan word. Die ysteroksiderende aërobe bakterieë kan waargeneem word deur 'n klein hoeveelheid van die oppervlak aan die buitekant van die blasie te neem (Lutey, 1980:3). Die oorblyfsels kan versigtig met behulp van 'n wasbottel afgespoel word. Die bakterieë kan nou op 'n voorwerpsplaatjie direk onder die donkerveld- of fasekontrasmikroskoop ondersoek word.

Die isolering en kweking van korrosieveroorsakende bakterieë kan gedoen word deur selektiewe medium te gebruik. Die gebruik van totale plaattelling is nie geskik vir die herkenning van mikrobiologiese korrosie nie. Daar bestaan nie 'n algemene ooreenkoms oor wat as hoë tellings beskou word nie. Aangesien ysteroksiderende bakterieë filamentagtig, gekapsel of sessiel is, kan dit enige bekende verdunningstegniek bemoeilik. Direkte mikroskopiese ondersoek, soos hierbo beskryf, is meer betroubaar vir die bepaling van ysteroksiderende bakterieë as kwekingstegnieke (Lutey, 1980:4).

Die gebruik van selektiewe medium is 'n praktiese metode vir die bepaling van *Desulfovibrio* spesies. Die proses sluit in die kweking van die swart vloeistof onder die blasies, of in slymmassas en ander neerslae, op 'n medium onder anaërobe toestande vir 2-7 dae. Die bakteriese groei kan waargeneem word deur die produksie van swart ystersulfied in die kultuur (Lutey, 1980:4).

1.6. Bakteriese taksonomie.

Klassifikasie, nomenklatuur en identifikasie is die drie verskillende, maar onderling verwante afdelings van taksonomie. Klassifikasie is die rangskikking van organismes in taksonomiese groepe (taksons) op grond van ooreenkomste en verwantskappe. Nomenklatuur is die toekenning van name aan taksonomiese groepe in ooreenstemming met internasionale reëls. Identifikasie is die proses waar vasgestel word dat 'n nuwe isolaat in 'n bestaande of genoemde takson behoort (Krieg en Holt, 1984:1). Daar bestaan 'n groot verskeidenheid prokariotiese organismes en ook 'n groot diversiteit in tipes. Dit is dus noodsaaklik om hierdie verskeidenheid te rangskik, of te klassifiseer, in groepe gegrond op hul ooreenkomste. Klassifikasie van organismes benodig kennis van hul eienskappe. Vir prokariote kan dit bereik word deur bepaling van biochemiese, fisiologiese, genetiese en morfologiese kenmerke (Krieg en Holt, 1984:1).

Die proses van klassifikasie kan gebruik word vir reeds bestaande en benaamde taksons of ook vir nuut beskryfde organismes. Indien die organismes nuut is en dus nie as 'n bestaande takson geïdentifiseer kan word nie, word hulle benaam in ooreenstemming met die reëls van nomenklatuur en dan geplaas in 'n geskikte posisie in die bestaande klassifikasiesisteem (Krieg en Holt, 1984:1).

Verskeie vlakke van rangskikking word in die Ryk *Procaryotae* aangetref. Daar bestaan ook informele benaminge wat bestaan uit algemeen beskrywende name. Hierdie name het nie 'n amptelike plek in die nomenklatuur nie. Voorbeelde van hierdie groepe is spirogete, sulfaat- en swaelreducerende bakterieë, metaanoksiderende bakterieë, ens. (Krieg en Holt, 1984:1).

1.6.1. Nomenklatuur.

Klassifikasie moet begryp en verstaan kan word. Om dit suksesvol te doen, moet die sisteem inligting verskaf en maklik bereikbaar en betekenisvol wees vir buitestaanders (Cowan, 1981:133). Daar bestaan dus internasionale kodes van nomenklatuur waarvolgens enige bakterie geïdentifiseer en benaam moet word (Krieg en Holt, 1984:19).

Daar is verskeie benaderings wat in taksonomie gevolg kan word, nl. numeries (Krieg en Holt, 1984:5), geneties (Krieg en Holt, 1984:12), serologies (Krieg

en Holt(1984:15), chemotaksonomies (Krieg en Holt,1984:16) en die klassieke waar van fenotipiese kenmerke gebruik gemaak word (vgl. 1.7.). Baie min laboratoriums in die Republiek van Suid-Afrika is egter toegegerus om van die meer gesofistikeerde metodes in die taksonomie aan te wend.

1.7. Identifikasie van bakterieë.

1.7.1. Identifikasieskemas.

Identifikasieskemas is nie klassifikasieskemas nie, alhoewel daar 'n ooreenkoms mag wees. Identifikasie word gegrond op een of meer eienskappe, of 'n patroon van eienskappe wat al die lede van die groep besit en wat ander groepe nie het nie. Die eienskappe wat gebruik word is dikwels nie die wat betrokke was in die klassifikasie van die groepe nie, bv. die klassifisering mag gegrond wees op 'n DNA- of DNA-hibridisasie en die identifikasie mag weer plaasvind op grond van fenotipiese eienskappe wat goed ooreenstem met die genetiese eienskappe. Oor die algemeen moet die eienskappe wat gekies word vir identifikasie maklik bepaalbaar wees, terwyl dié vir klassifikasie soms moeilik bepaalbaar is. Die eienskappe moet ook so min as moontlik in getal wees, terwyl klassifikasie 'n groot aantal eienskappe insluit. Hierdie ideale kenmerke van 'n identifikasieskema mag nie altyd moontlik wees nie, veral nie met genera of spesies wat nie geskik is om gekarakteriseer te word deur tradisionele fenotipiese toetse nie. In hierdie gevalle sal daar van relatief moeilike prosedures gebruik gemaak moet word om 'n akkurate identifikasie te te maak (Krieg en Holt,1984:24).

Serologiese reaksies, wat gewoonlik net beperkte waarde het vir klassifikasie, het groot waarde in identifikasie. Baie van hierdie toetse is eenvoudig en kan vinnig uitgevoer word en is baie spesifiek. Hulle word gewoonlik aangewend om fenotipiese eienskappe te bevestig (Krieg en Holt,1984:24). Ongelukkig het serologiese toetse 'n beperkte toepassing wanneer organismes uit natuurlike habitate of kunsmatige habitate soos verkoelingswater geïsoleer word. Met baie genera en spesies kan identifikasie nie net op 'n paar toetse gevestig wees nie, maar eerder op 'n patroon wat verkry word deur die toepassing van 'n verskeidenheid toetse (Krieg en Holt,1984:24).

1.7.2. Behoeftte vir gestandaardiseerde toetsmetodes.

'n Probleem in die opstel van identifikasiesisteme is dat die resultate van

karakteriseringstoetse kan varieer, afhangende van die grootte van die inkulum, temperatuur van inkubasie, ens. Die toetse stem ook nie onderling ooreen in die verskillende laboratoriums nie. Die blinde aanvaarding van 'n identifikasiesisteem, sonder verwysing na spesifieke toestande waaronder gewerk is om die skema op te stel, kan probleme veroorsaak. Die ideaal is om hierdie toestande te standaardiseer, maar dit is moeilik bereikbaar, veral internasionaal. Dit is dus raadsaam om stamme in te sluit waarvan die identifikasie definitief bepaal is om seker te maak dat die sisteem geldig is vir die toestande in die spesifieke eie laboratorium (Krieg en Holt, 1984:24). Ongelukkig is dit nie altyd moontlik om bekende stamme te gebruik nie.

1.7.3. Belang van die definiëring van positiewe en negatiewe reaksies.

Sommige toetse kan gebaseer wees op plasmied- of faagoorgedraagde eienskappe. Hierdie eienskappe kan hoogs muteerbaar wees en daarom onbetroubaar vir identifikasiedoeleindes. Selfs vir onmuteerbare eienskappe kan sekere toetse nie geskik wees vir identifikasiedoeleindes nie, omdat hulle nie goeie herhaalbare resultate kan gee nie. Die ideaal is dat 'n toets herhaalbare resultate moet gee wat duidelik positief of negatief is. Eintlik bestaan daar nie so 'n toets nie. Die Gram-reaksie van 'n organisme kan Gram-varieerbaar wees, die teenwoordigheid van endospore in 'n stam wat slegs 'n paar spore vorm kan moeilik bepaalbaar wees, ens. 'n Definisie van wat 'n positiewe en negatiewe reaksie verteenwoordig is belangrik om 'n toets bruikbaar te maak vir 'n identifikasiesisteem (Krieg en Holt, 1984:24).

1.7.4. Suiwer kulture.

Alhoewel enkele bakterieë so duidelik morfologies uitsonderlik is dat 'n identifikasie gemaak kan word sonder isolasie, is suiwer kulture altyd 'n noodsaaklikheid voordat 'n poging aangewend kan word om 'n organisme te identifiseer. Dit is belangrik om te beseef dat 'n enkele kolonie vanaf 'n plaat nie noodwendig suiwerheid verseker nie. Dit is veral so indien selektiewe medium gebruik word. Lewende, maar nie-groeiende kontaminante, kan dikwels teenwoordig wees in of naby 'n kolonie en kan voorkom as 'n subkultuur saam met die organisme. Dit is om hierdie rede dat nie-selektiewe medium verkies word vir finale suiwering, omdat op hierdie medium kontaminante tot sigbare kolonies kan ontwikkel. Selfs met nie-selektiewe medium moet goed geïsoleerde kolonies nie te gou geïsoleer word nie, omdat sommige kontaminante stadig kan groei en eers

sigbaar op die plaat sal wees na 'n paar dae. 'n Ander probleem wat voorkom by bakterieë wat ekstrasellulêre slym vorm of wat as 'n netwerk van kettings of filamente groei, is dat kontaminante dikwels ferm ingebed of vasgevang word en dus moeilik is om te isoleer (Krieg en Holt, 1984:25).

Kolonies wat vanaf 'n suiwer kultuur op 'n vaste medium uitgestryk is lyk gewoonlik anders. Daar kan egter uitsonderings wees as gevolg van tydelike fenotipiese variasie (Krieg en Holt, 1984:25). 'n Ander kriterium vir suiwerheid is morfologie. Organismes vanaf 'n suiwer kultuur besit gewoonlik 'n hoë graad van morfologiese ooreenstemming in kleurings of nat preparate. Weereens is daar uitsonderings wat afhang van die ouderdom van die kultuur, die medium gebruik en die groei toestand (Krieg en Holt, 1984:25).

1.7.5. Benaderinge vir die identifikasie van 'n isolaat.

Die opskrifte van die verskillende hoofstukke van Krieg en Holt (1984) en Sneath *et al.* (1986) toon die hoof kategorieë aan van die *Procarvotas* en is 'n goeie beginpunt vir identifikasie. Die kategorieë lê klem op fenotipiese eienskappe soos Gram-kleuringsreaksie, morfologie en algemene voedingstipes. Dit is daarom belangrik om te bepaal of die nuwe isolaat chemolitotroof, fototroof of chemoorganotroof is. Lewende selle moet ondersoek word met behulp van fasekontrasmikroskopie en gefikseerde preparate deur Gram-kleurings met dieligmikroskoop te ondersoek. Ander kleurings kan gebruik word indien dit nodig blyk te wees, bv. negatiewe kleurings, suurvaste kleurings, endospoor-kleurings, ens. Indien ander uitstaande morfologiese kenmerke soos bv. endospoorproduksie, skedes, ens. sigbaar is, kan verdere stappe vir identifikasie gebruik word om hierdie groepe se eienskappe te bevestig. Beweeglikheid en die tipe beweging, bv. swerm of glydende beweging kan help met die beperking van die moontlikhede. Dit is dikwels noodsaaklik dat nie net ná beweeglikheid gekyk word nie, maar ook na die voorkoms van flagellums. Algemene groei eienskappe, bv. pigmentasie, slymerige groei, ens. kan ook waardevolle leidrade verskaf vir die identifikasie. Die oorsprong of plek van isolasie kan ook help om die veld van moontlikhede te verklein (Krieg en Holt, 1984:25).

Die suurstofbehoefte van die isolate, verplig aëroob, verplig anaëroob, fakultatief anaëroob of mikro-aërofiel, is dikwels van groot belang in identifikasie. Verder is dit belangrik om die isolaat se vermoë om glukose en ander suikers te gebruik te bepaal en of die tipe metabolisme respiratief of

fermentatief is en of die suikers enigszins gekataboliseer is. Bo alles moet algemene aanvoeling gebruik word met elke stap waar die moontlikhede vermindert word vir addisionele toetse wat nog gedoen moet word. Daar moet 'n rede wees vir elke toets, in teenstelling met 'n haalgeweerbenedering waar baie toetse gebruik word, maar min inligting verskaf word van die spesifieke isolaat wat ondersoek word. Indien die kategorie waaraan die isolaat behoort duidelik afgebaken word, moet die spesifieke toetse uitgevoer word wat aangegee word vir daardie kategorie (Krieg en Holt, 1984:24).

Die volgende opsomming is nuttig vir identifikasie:

- Maak seker dat die isolaat 'n suiwer kultuur is;
- Werk vanaf 'n wye kategorie af na 'n kleiner, meer spesifieke kategorie van organismes;
- Gebruik al die inligting beskikbaar om die moontlikhede te verklein;
- Gebruik algemene aanvoeling, vir die vak, met elke stap;
- Gebruik die minimum aantal toetse om die identifikasie te maak;
- Vergelyk die isolate met verwysingstamme van die spesifieke takson om te verseker dat die identifikasieskema wat gebruik is, geldig is onder die toestande wat in die laboratorium gebruik word.

Wanneer die isolaat nie geïdentifiseer kan word nie, gaan weer bogenoemde stappe deur. Die mees algemene foute word gemaak met die vorm van die selle, Gramkleuringsreaksies en beweeglikheid (besit van flagellums). In die meeste gevalle is daar min probleme om isolate in 'n genus te plaas, maar plasing in spesie of subspezie vereis 'n meer gespesialiseerde verwysingslaboratorium (Krieg en Holt, 1984:25).

Dit is egter moontlik dat 'n nuwe genus of spesie geïsoleer is, maar voordat 'n nuwe takson beskryf of benaam word, moet seker gemaak word dat dit werklik 'n nuwe takson is en nie net die resultaat van 'n onakkurate identifikasie nie (Krieg en Holt, 1984:25).

1.8. Probleemstelling vir die studie.

Die AEK(UKOR) het uitgebreide verkoelingsisteme in bedryf. Teen die einde van 1983 het hulle met die Departement Mikrobiologie, PU vir CHO, Potchefstroom kontak gemaak om met die gesamentlike studie van die bakterieë in die verkoelingsisteme te begin. Op daardie stadium is besluit om 'n taksonomiese

studie te onderneem van die aërobe chemoorganotrofe planktoniese bakterieë wat in die verkoelingswater voorkom. Hierdie studie het goed ingepas by die kundigheid van die Departement. Dit is reeds aangetoon in 1.5.2. dat bakterieë sover meesal op voedingsagar gekweek word. Daar is besluit om van hierdie gebruik weg te beweeg.

1.9. Doelstelling en doelwitte van hierdie studie.

Die doelstelling is die taksonomiese studie van aërobe chemoorganotrofe bakterieë wat in verkoelingswater voorkom.

Om die doelstelling te verwesenlik is besluit dat AEK(UKOR) behulpsaam sou wees om die volgende doelwitte te bereik:

- 1) 'n Kwantitatiewe kweking van bakterieë wat in geselekteerde verkoelingsstelsels voorkom. Hulle het die bakterieë gekweek op voedingsagar en verkoelingswateragar. Lg. het bestaan uit verkoelingswater uit die stelsels waarby 2% agar gevoeg is. Hierdie medium het baie hoër tellings gelewer.
- 2) Primêre isolasie van geselekteerde kolonies vir die voorbereiding van hierdie studie. 'n Verteenwoordigende aantal kolonies is geselekteer volgens koloniemorfologie en getal en op verkoelingswateragar gesuiwer. Hierdie suiwer kolonies is dan op skuinsbodems na Potchefstroom vervoer. Die studie is toe op Potchefstroom voortgesit waar die volgende doelwitte behaal moes word:
- 3) Sekondêre suiwing en toetsing vir suiwerheid van die geselekteerde kolonies op geaktiveerde slykekstragar, aangesien verkoelingswater hier nie beskikbaar was nie.
- 4) Identifikasie van die suiwer kulture tot op die genusvlak volgens fenotipiese kenmerke.

HOOFSTUK 2.

METODES EN BENODIGHEDE.

2.1. Monsterneming.

Monsters van verkoelingswater is steriel uit vier verskillende verkoelingssteme wat tekens van mikrobiologiese korrosie getoon het, geneem. Die vier sisteme is soos volg genommer: A1, A22, B4 en X. A1 is 'n koeltoring, A22 'n kondenseerder en B4 en X is sproeiërs.

By drie geleentheid is reinkulture van die AEK ontvang:

Desember 1984, 18 kulture; Mei 1985, 112 kulture; Augustus 1985, 70 kulture.

2.2. Primêre kweking, isolasie en suiwing.

In die AEK-laboratorium is daar 'n reeks tienvoudige verdunnings van elke monster gemaak, asook spreiplate van elke verdunning (Harrigan en McCance, 1966:22,24). Die spreiplate is verkoelingswater plus agar waar daar i.p.v. gedistilleerde water gelyke volumes verkoelingswater van elke verkoelingssteeem geneem is. Die pH was dieselfde as die van die steeem (pH wissel tussen 8,1 tot 10,7; vergelyk met 3.4 onder resultate). Die aanpassing was nodig omdat daar baie meer en 'n groter verskeidenheid bakterieë geïsoleer kon word as wat die geval met voedingsagar was. Verder is die habitat gesimuleer.

Die plate is vir 96 uur gefinkubeer by 25°C. Al die verskillende kolonies wat waargeneem word, is afgetel en uitgestryk vir suiwing (Harrigan en McCance, 1966:20), op verkoelingswateragarplate. Volgens koloniemorfologie en getal is aftellings gedoen. Indien daar baie van een soort kolonie voorkom, word daar vir elke vyf kolonies wat voorkom, een afgetel en uitgestryk vir suiwing. Sodra enkel kolonies verkry is, is dit afgetel op skuinsbodems wat bestaan het uit halfsterkte Pseudomonas F-agar (Oxoid) plus verkoelingswater.

2.3. Sekondêre kweking en suiwing.

Die primêre isolasie en suiwing van kulture het by die AEK plaasgevind (kyk 2.2). Aangesien daar nie verkoelingswater in die laboratorium te Potchefstroom beskikbaar was nie, is daar geëksperimenteer met verskillende soorte agarplate om 'n sekondêre isolasiemedium te verkry. Dit is gevind dat die kulture goed groei op geaktiveerde slykekstrakagar (Prakasam en Dondero, 1967:461). Daar is dan verder van geaktiveerde slykekstrakagar (GSE) gebruik gemaak i.p.v. verkoelingswateragar om

sekondêre suiwering te bewerkstellig. Inkubasie is by 20°C gedoen. Sodra enkel kolonies verkry is, is hulle op GSE-agarskuinsbodems afgetel. Verdere ondersoek is gedoen vanaf subkulture wat hiervanaf voorberei is.

2.4. Morfologiese ondersoek.

2.4.1. Ligmikroskopiese ondersoek.

2.4.1.1 Gram-kleuringsreaksie.

Smere en Gram-kleurings is berei op jong kulture soos beskryf deur Harrigan en McCance (1966:8). Dit is onder die mikroskoop ondersoek en bepaal of die kulture Gram-positief, Gram-negatief of Gram-varieerbaar is. Die morfologie van die selle is genoteer. Daar is by alle kleurings opgelet na vakuole.

2.4.1.2 Endospoorkleuring.

Endospoorkleuring volgens die Schaeffer en Fultonmetode (Cowan, 1981:163-164) is op 48-96 uur oue kulture uitgevoer. Die smere is ondersoek vir die volgende kenmerke: die voorkoms van endospore, vorm (sferies, ovaalvormig, en staafvormig), rangskikking ten opsigte van die sel en grootte (kleiner of groter as die sel, effens geswolle).

2.4.1.3 Negatiewe kleuring.

Negatiewe kleuring is volgens Fleming se nigrosien metode (Cruikshank *et al.* 1970:646-647) uitgevoer. Hier is veral gelet op die vorme van die selle. Die grootte van die selle is ook op die smere bepaal deur mikrometrie.

2.4.1.4 Suurvastekleuring.

Suurvastekleuring is uitgevoer volgens Ziehl-Neelsen se metode (Cowan, 1981:163). Die resultate is dan geneem.

2.4.1.5 Flagellumkleuring.

Flagellumkleuring is uitgevoer met behulp van Leifson se metode (Cruikshank *et al.*, 1970:661-662). Die voorkoms en rangskikking van die flagellums is bepaal.

2.4.2. Elektronmikroskopiese ondersoek.

Na 'n inkubasie periode van 96 uur is die suiwer kulture geneem vir elektronmikroskopiese ondersoek. Negatiewe kleuring met 0,5% uranielasetaatoplossing is uitgevoer (Hayat,1972:112). Daar is veral opgelet na die teenwoordigheid, aantal en rangskikking van die flagellums. Daar is ook waargeneem vir skedes by flagellums, die teenwoordigheid van fimbriae en die teenwoordigheid van enige endospore (Hayat,1972:101).

2.5. Primêre onderskeidingstoetse.

Alle suiwer kulture is aan die volgende primêre fenotipiese toetse onderwerp:

2.5.1. Katalase.

Die katalase toets is uitgevoer soos beskryf in Harrigan en McCance (1966:65). Dit is genoteer as positief (+) of negatief (-). Die kulture is by 25°C vir 48 uur geïnkubeer.

2.5.2. Oksidase.

Na 48 uur inkubasie by 25°C is die oksidase toets gedoen volgens Kovac se metode (Harrigan en McCance,1966:65).

2.5.3. Respirasie-Fermentasie (RF) toets.

Die Hugh en Leifson se RF-medium (ook bekend as oksidasie-fermentasie medium) is opgemaak volgens Cowan (1981:146), maar die basale medium is vervang met GSE. Daar is ook van twee verskillende indikatore gebruik gemaak, naamlik Broomkresolpers(BKP), pH6,0 en Fenolrooi(FR), pH7,4. Die kulture is vir sewe dae by 25°C geïnkubeer. Dit is twee keer per dag ondersoek. Suurvorming is genoteer as respiratief of fermentatief (Cowan,1981:28)..

2.5.4. Pigmentvorming.

Pigmentvorming is op die primêre medium en sekondêre medium getoets, asook op enige ander plate wat gebruik is. Verder is die kulture op Pseudomonas F- en Pseudomonas P-plate uitgestryk. Die plate is geïnkubeer totdat sigbare groei plaasgevind het en daarna is die plate vir twee dae op die bank gelaat voordat

pigmentvorming genoteer is (Cowan, 1981:40).

2.5.5. Anaërobe groeitoets.

Die isolate is volgens die templaattmetode (Clowes en Hayes, 1968:229) op GSE-agar uitgestryk en dan in 'n anaërobe fles geplaas. Die prosedure is verder gevolg soos beskryf in Harrigan en McCance (1966:48,49). Inkubasie is by 25°C vir vier dae uitgevoer. 'n Kultuur van die verpligte aërobe organisme, *Pseudomonas aeruginosa*, is ook telkens ingesluit. Indien hierdie organisme gegroei het, is die toets herhaal.

2.5.6. Beweeglikheid.

Beweeglikheidsmedium (Cowan, 1981:152) is gebruik om beweeglikheid aan te toon. Die basale medium is egter met GSE vervang. Resultate is gelees na vier dae inkubasie by 25°C. Hierdie resultate is gekontroleer met die resultate verkry by die elektronmikroskopiese ondersoek (flagellums) en 'n hangdruppelkultuur (Cowan, 1981:27) en flagellumkleuring (kyk 2.4.1.5.).

2.6. Sekondêre toetse vir die identifisering van die isolate.

Die kulture is aan sekondêre toetse onderwerp soos benodig. Hierdie toetse is geselekteer soos vir die groepe gegee volgens Krieg en Holt (1984) en Sneath *et al.* (1986). Deur die hele ondersoek is die basale medium vervang met GSE, die inkubasie tyd was 96 uur en die temperatuur 25°C, tensy anders vermeld.

2.6.1. Groeitoetse by verskillende temperature en pH-waardes.

Verskillende groeitoetse is by verskillende temperature en 'n verskeidenheid pH-waardes uitgevoer. Alle medium was voorberei volgens Cowan (1981:294), maar die basale medium is vervang met GSE.

Die volgende groeitoetse is uitgevoer:

GSE-sop pH3,6 by 37°C; GSE-agar pH4,4 by 25°C; GSE-agar pH5,5 by 25°C; GSE-agar pH6,0 by 60°C; GSE-agar pH6,5 by 25°C en 60°C; GSE-agar pH 7,0 by 12°C, 30°C, 35°C, 37°C, 42°C en 65°C.

2.6.2. Slymerige groei op glukose-GSE-agar.

Sekondêre isolasie medium (GSE-agar) plus 5% glukose is gebruik. Die isolate word uitgestreep en toegelaat om goed te groei (ongeveer 96 uur) by 25°C. Hulle word dan ondersoek vir slymerige groei (groot glinsterende kolonies) (Krieg en Holt, 1984:235). Daarna is hulle met 'n inokuleernaald opgetel om te kyk of hulle taai is. 'n Kultuur van *Rhizobium* is ingesluit as 'n positiewe kontrole (Krieg en Holt, 1984:239).

2.6.3. Hidrolise van kaseien.

Melkagarplate (Cowan, 1981:149) is gebruik om te kyk of die isolate kaseien kan hidroliseer na 'n inkubasietyd van 96 uur by 25°C.

2.6.4. Groei in die teenwoordigheid van KCN.

Groei in die teenwoordigheid van KCN is uitgevoer volgens Cowan (1981:37,51).

2.6.5. Groei op MacConkey-agar.

Groei op MacConkey-agar is bepaal na 96 uur inkubasie by 25°C (Cowan, 1981:18, 145, 147).

2.6.6. Glukosesop: anaëroob.

Glukosesop is geïnokuleer met isolate en onder anaërobe toestande geïnkubeer vir 96 uur by 25°C (Cowan, 1981:150). Daar is gelet vir glukose fermentasie en ook vir groei in glukosesop onder anaërobe toestande.

2.6.7. NaCl-verdraagsaamheid.

Die medium volgens Gerhardt *et al.* (1981:121) is gebruik om die bakterieë se vermoë te toets om in die teenwoordigheid van 2,5% NaCl, te groei.

2.6.8. Groei op Stikstofvrye medium.

Gebruik stikstofvrye medium (Gerhardt *et al.*, 1981:437) om te toets vir opvallende slymerige kolonies. Kulture van *Azotobacter* is ingesluit as positiewe kontroles op hierdie medium sowel as op die volgende twee mediums: stikstofvrye mannitolmedium (vgl. 2.6.9.).

2.6.9. Groei op alkaliese en suur stikstofvrye medium.

Die isolate is op stikstofvrye mannitolmedium (alkalies en suur) (Norris, 1959:239-243; Seeley en Vandemark, 1962:447) uitgestryk volgens d'e templaatsmetode (Clowes en Hayes, 1968:229). Indien groei voorkom word daar vanaf die oorspronklike kulture weer op die medium uitgestryk. Indien daar nou opvallende slymerige groei voorkom kan die isolate potensieel stikstof bind.

2.6.10. Fluoresserende pigment.

Die produksie van fluoresserende pigmente is getoets volgens Gerhardt *et al.*, (1981:415). Kyk ook 2.5.4.

2.6.11. Skedes-en kapselkleurings.

Farquhar en Boyle (1971:604) se metode is gevolg om te bepaal of skedes en kapsels rondom die bakteriese selle voorkom. Dit is verder bevestig met elektronmikroskopie.

2.6.12. Sensitiwiteit vir penisillien.

Die isolate is getoets vir $1,0 \text{ IU.ml}^{-1}$ penisilliensensitiwiteit soos beskryf in Cruickshank *et al.* (1970:900) en ook in Harrigan en McCance (1966:207).

2.6.13. Hemolise op bloedagar.

Hemolise op bloedagarplate (Cowan, 1981:143) is gelees soos beskryf in Cowan (1981:35,53).

2.6.14. Koagulase.

Koagulase van menslike bloedplasma is getoets soos beskryf deur Cowan (1981:171) vanaf jong skuinsbodems.

2.6.15. Gelatienvervloeing.

Die vermoë van bakterieë om voedinggelatien te vervloei, is ook getoets (Cowan, 1981:150,173).

2.6.16. Sitraat.

Koser se sitraatmedium (Harrigan en McCance, 1966:61) word gebruik om vas te stel of sitraat as die enigste koolstofbron gebruik kan word. Die medium is met 'n inokuleernaald geïnokuleer en vir 96 uur by 25°C geïnkubeer.

2.6.17. RF-medium nommer 1.

Toets vir die respiratiewe en fermentatiewe afbraak van koolhidrate is gedoen op RF-medium nommer 1 by moontlike *Bacillus* spesies (Buchanan en Gibbons, 1974:532). Die basale medium is met GSE vervang en die inkubasie tyd was 96 uur by 25°C.

2.6.18. Koolstofverbruiktoets.

Abbott *et al.* (1973:787) se basale medium is gebruik en daar is vir die volgende koolhidrate se verbruik getoets: etanol, mannitol, glukose, asetaat, maltose, dulsitol, en *l*-arabinose. Die medium is vir 96 uur geïnkubeer by 25°C.

2.6.19. Fermentasie van suikers.

Die fermentasie van suikers is bepaal met behulp van suur- en gasvorming. Die basale medium is soos beskryf in Harrigan en McCance (1966:58,59). Die volgende suikers is by die basale medium ingesluit: glukose, mannitol, trehalose, lesitinase, xilose, raffinose, sellobiose en sukrose. Die geïnokuleerde medium is vir 96 uur by 25°C geïnkubeer en daarna is die resultate geneem.

2.6.20. Metielrooi (MR) en Voges Proskauer (VP) toetse.

Hierdie toetse is uitgevoer soos beskryf in Cowan (1981:29,37,148,175,169).

2.6.21. Dekarboksilases.

Möller se dekarboksilase-toets en medium is gebruik vir dekarboksilasie van lisien en ornitien en dihidrolase van arginien (Harrigan en McCance, 1966:206 en 292). Elke toets is van 'n kontrole toets in basale medium vergesel. Die

geïnkuleerde medium is vir 96 uur by 25°C geïnkubeer en die resultate is geneem.

2.6.22. Indoolproduksie.

Die produksie van indool vanaf triptofaan is uitgevoer soos beskryf in Harrigan en McCance (1966:53). Kovac se reagens is gebruik om die resultate te lees.

2.6.23. Hidrolise van stysel.

Styselagarplate (Cowan,1981:179) is gebruik. Resultate word gelees met behulp van Gram se jodiumoplossing (Cowan,1981:179).

2.6.24. Hidrolise van sellulose.

Selluloseagar (Harrigan en McCance,1966:269,270) is gebruik om hidrolise van sellulose aan te toon.

2.6.25. Hidrolise van hippuraat.

Hidrolise van hippuraat is getoets soos beskryf deur Cowan (1981:151,174).

2.6.26. Tween 80 hidrolise.

Die hidrolise van Tween 80 is getoets soos uiteengesit deur Cowan (1981:168, 180).

2.6.27. Produksie van lesitinase.

Lesitinase produksie word getoets op vaste medium wat eiergeel bevat (Cruickshank *et al.*, 1970:839,840).

2.6.28. Hidrolise van eskulien.

Die vermoë om eskulien te hidroliseer is uitgevoer soos beskryf deur Harrigan en McCance (1966:153,276).

2.6.29. Oksidasie van etanol.

Die isolate is getoets vir die oksidasie van etanol na asynsuur in 'n medium met 'n neutrale pH of 'n suur pH (Skerman, 1969:672 vir neutrale pH en Starr *et al.*, 1981:777 vir suur pH).

2.6.30. Oksidasie van laktaat na CO₂.

Frateur 1950 se laktaatoksidase medium is gebruik (Starr *et al.*, 1981:777).

2.6.31. Teenwoordigheid en akkumulase van poli- β -hidroksibutiraat.

Palleroni en Doudoroff medium (Krieg en Holt, 1984:158) is gebruik om te toets vir die akkumulase van poli- β -hidroksibutiraat. Indien die isolate nie op die medium kon groei nie, is hulle gekweek op serumvoedingsagar-skuinsbodems wat met 0,5% DL- β -hidroksibutiraat verryk is. Doen ook kleurings vir lipied(poli- β -hidroksibutiraat) volgens Burdon se metode (Gerhardt *et al.*, 1981:30).

2.6.32. Ammoniumglukose medium.

Toets vir die groei van die isolate op ammoniumglukose medium volgen Gerhardt *et al.* (1981:125).

2.6.33. Produksie van urease.

Die vermoë om urease te produseer is in 'n ureummedium getoets soos beskryf deur Harrigan en McCance (1966:56).

2.6.34. Nitraatreduksie en denitrifikasie.

Nitratpeptonwater (Harrigan en McCance, 1966:293) is gebruik om te toets vir nitraatreduksie (Harrigan en McCance, 1966:56, 157). Aangesien 'n Durhambuisie ingesluit is, kan daar ook getoets word vir stikstofgasvorming (denitrifikasie).

2.6.35. Fenielalaniendeaminasie.

Die fenielalaniendeaminasietoets is uitgevoer volgens Gerhardt, *et al.* (1981:421).

2.6.36. Produksie van fosfatase.

Metode 1 van Gerhardt, *et al.*, (1981:421) is gebruik om te bepaal of 'n organisme fosfatase vorm.

2.6.37. Triptofaandeaminasie.

Triptofaanmedium volgens Gerhardt, *et al.* (1981:139) is gebruik om triptofaandeaminasie aan te toon.

2.6.38. Produksie van H₂S vanaf driesuikerysteragar (DSY).

DSY-agar (Cowan, 1981:154) is gebruik om H₂S-produksie waar te neem volgens metode 1 (Cowan, 1981:174).

2.6.39. H₂S-produksie in sisteienbevattende medium.

H₂S-produksie in sisteienbevattende medium word getoets soos beskryf deur Gerhardt, *et al.*, (1981:416).

HOOFSTUK 3.

RESULTATE

3.1 Verklaring van simbole gebruik in tabelle.

+	Positief ten op sigte van spesifieke toets
(+)	Vertraag of min positief ten op sigte van die spesifieke toets
-	Negatief ten op sigte van die toets
R	Respiratief
F	Fermentatief
A	Alkalies
S	Suur
G	Gasvorming
g	Min gas gevorm
α	alfa
β	beta
γ	gamma
BKP	Broomkresolpersindikator .
FR	Fenolrooiindikator
DSY	Driesuikerysteragar
V-sop	Voedingsop
V/A	Voedingsagar
GSE	Geaktiveerde slyk ekstrak
RF nr 1	Bacillus RF-medium nommer 1
MR	Metielrooi toets
VP	Voges-Proskauer toets
RF	Respirasie-fermentasie-toets (Oksidasie-fermentasie)
Temp	Temperatuur
TOVS	Totale opgeloste vaste stowwe
Susp	In suspensie
Alk	Alkaliniteit
Gelei	Geleiding
U	Versameling vanaf verkoelingsisteme wat in Desember 1984 ontvang is en as 'n loodsopname gedoen is
A1	Koeltoring
A22	Kondenseerder
B4	Sproeier
X	Sproeier

3.2. Kulture: Desember 1984.

3.2.1. Kultuurkenmerke van kulture Desember 1984.

Die kulture wat in Desember 1984 ontvang is se kultuurkenmerke verskyn in Tabel 1.

Tabel 1. Kultuurkenmerke van kulture Desember 1984.

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Falcellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
U1	-	monotrieg	-	kort basil	roomwit
U4	-	monotrieg	-	kort basil	wit
U2	-	monotrieg	-	kort, dik basil	room-ligbruin
U5a	-	monotrieg	-	kort basil	wit
U10	-	monotrieg	-	kort basil	room-ligbruin
U5c	-	atrieg	-	kort basil	room
U5b	-	atrieg	-	kort basil	roomwit
U6	-	atrieg	-	kort basil	roomwit
U7	-	atrieg	-	kort basil	deurskynend
U3	+	atrieg	sentraal, ovaal	kort basil	roomwit

3.2.2. Fenotipiese kenmerke van isolate ontvang in Desember 1984.

Hierdie kenmerke word gegee in Tabel 2.

Tabel 2. Fenotipiese kenmerke van kulture Desember 1984.

Kultuurnummer	U1	U4	U2	U5a	U10	U5c	U5b	U6	U7	U3
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF: Glukose:	BKP	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	FR	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Groei: Stikstofvryemedium: alkalie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 4,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 5,5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S in sistefenmedium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Laktaatoksidase na CO ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fermentasie:	Laktose	A	S	SA	S	-	-	A	-	-
	Glukose	-	S	S	S	-	-	-	-	-
	Mannitol	A	A	A	A	S	A	A	S	S
H ₂ S produksie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease produksie	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
Indool	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dekarboksilasie:	Arginien	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	Lisien	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ornitien	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Triptofaandeaminasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NO ₃ → NO ₂	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Produksie van NH ₄	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
N ₂ -vorming	g	g	g	G	-	G	-	g	g	g
Kasefen hidrolise	+	+	+	-						
Koolstofverbruik toetse:	Etanol	+	(+)	+	-					
	Mannitol	+	+	-						
	Glukose	+	+	+						
	Asetaat	-	-	-						
	Dulsitol	-	-	-						
	Maltose	+	+	-						
Sitraat	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hemolise: Bloedagar						γ	α	α	α	γ
DSY-agar						-	SS-	SS-	SS-	
RF nr.1						-	S	S	S	

3.2.3. Identifikasie van die kulture ontvang in Desember 1984.

Met behulp van die onderskeie reaksies (vgl. Tabel 1 en 2) is die bakterieë soos volg geïdentifiseer:

U1, U4	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
U2	<i>Pseudomonas mendocina</i>
U5a, U10	<i>Pseudomonas thomasi</i>
U5c	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
U5b, U6	<i>Pasteurella haemolytica</i>
U7	<i>Pasteurella ureae</i>
U3	<i>Bacillus coagulans</i>

3.2.4. Opmerking.

Hierdie kulture is geïdentifiseer volgens die fenotipiese toetse uit die opsomming van Krieg en Holt (1984:140) vir aërobe respirerende basille tot kokobasille. Die Gram-positiewe basil, spoorvormend, is geïdentifiseer volgens die fenotipiese toetse beskryf deur Wolf en Barker(1968:93-109) en Sneath *et al.* (1986:1122).

Let op dat al die Gram-negatiewe basille respiratief is, asook katalase en oksidase produseer (vgl. Tabel 2). Alle *Pseudomonas* spesies is monotrig behalwe U5c wat atrieg is. Die *Pasteurella* spesies was atrieg (vgl. Tabel 1).

3.3. Kulture: Mei tot Augustus 1985.

Hierdie kulture word ingedeel in groepe, gebaseer op hulle Gram-kleuring, spoor-kleuring en RF-reaksies. Alle bakterieë wat Gram-varieerbaar gekleur het, word as Gram-positief aangetoon.

3.3.1. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe, tot Gram-varieerbare endospoor-vormende aërobe basille.

Kultuurkenmerke van hierdie bakterieë verskyn in Tabel 3.

Tabel 3. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe tot Gram-varieerbare endospoor-vormende aërobe basille.

Kultuur-nommer	Gram-reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment-vorming
A1/10	+	lofotrieg	terminaal, ovaal kleiner as sel	lang basille	room
A1/13	+	lofotrieg	terminaal, ovaal kleiner as sel	lang basille	room
A1/18	+	atrieg	terminaal, ovaal kleiner as sel	basille	room
A1/12	+	atrieg	subterminaal, kleiner as sel	basille	room
A1/15c	+	atrieg	subterminaal, kleiner as sel	kort, dik basille	room
A1/16b	+	atrieg	subterminaal, kleiner as sel	basille	room
A1/29	+	lofotrieg	subterminaal, kleiner as sel	basille	room
A1/17c	+	monotrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	lang basille	room
A1/53	+	monotrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	lang basille	oranje
A22/9a	+	atrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	strepto-basille	room
A22/45a	+	atrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	dik strepto-basille	room
A22/50	+	monotrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	basille	wit
A22/51a	+	atrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	strepto-basille	room

Tabel 3--vervolg.

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Neagtiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
A22/21	+	atrieg	sentraal, ovaal kleiner as sel	basille	room
A22/40b	+	atrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	strepto- basille	room
A22/51b	+	atrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	lang strepto- basille	room
A22/1	+	lofotrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	basille	deurskynende bruin
A22/2	+	monotrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	basille	room
A22/40a	+	atrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	strepto- basille	roombruin
A22/54c	+	atrieg	subterminaal ovaal, kleiner as sel	strepto- basille	room
A22/48b	+	atrieg	subterminaal ovaal, kleiner as sel	basille	room
A22/30	+	atrieg	sentraal, ovaal, kleiner as sel	basille	room
B4/18	+	monotrieg	subterminaal tot terminaal, ovaal, kleiner as sel	basille	room
B4/26	+	atrieg	subterminaal ovaal, kleiner as sel	basille	room
B4/31	+	monotrieg	terminaal, ovaal, kleiner as sel	basille	room
B4/7	+	lofotrieg	sentraal, ovaal, kleiner as sel	basille	room
B4/38	+	monotrieg	sentraal, ovaal, kleiner as sel	lang basille	room
B4/17a	+	atrieg	subterminaal, ovaal, kleiner as sel	strepto- basille	room

3.3.3. Identifikasie van die Mei-Augustus 1985 kulture.

Met behulp van die onderskeie fenotipiese toetse en kultuurkenmerke (vgl. Tabel 3 en 4) is die Gram-positiewe tot Gram-varieerbare endosporvormende aërobe basille soos volg geïdentifiseer:

A1/10 *Bacillus licheniformis*
A1/13 *Bacillus licheniformis*
A1/18 *Bacillus licheniformis*
A1/12 *Bacillus coagulans*
A1/15c *Bacillus coagulans*
A1/16b *Bacillus subtilis*
A1/29 *Bacillus cereus*
A1/17c *Bacillus coagulans*
A1/53 *Bacillus lentus*

A22/9a *Bacillus firmus*
A22/45a *Bacillus firmus*
A22/50 *Bacillus firmus*
A22/51a *Bacillus firmus*
A22/21a *Bacillus coagulans*
A22/40b *Bacillus coagulans*
A22/51b *Bacillus coagulans*
A22/1 *Bacillus licheniformis*
A22/2 *Bacillus licheniformis*
A22/40a *Bacillus megaterium*
A22/54c *Bacillus megaterium*
A22/48b *Bacillus lentus*
A22/30 *Bacillus cereus*

B4/18 *Bacillus coagulans*
B4/26 *Bacillus coagulans*
B4/31 *Bacillus coagulans*
B4/7 *Bacillus cereus*
B4/38 *Bacillus lentus*
B4/17a *Bacillus firmus*

3.3.4. Ogmerkings.

Hierdie isolate is onderwerp aan die fenotipiese toetse soos beskryf deur Wolf en Barker (1968:93-109); Buchanan en Gibbons (1974:480); Cowan (1974: 46, 49-72); Brock (1979:697-699) en Sneath *et al.* (1986:1122, 1123, 1128 en 1129).

3.3.5. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille.

Die kultuurkenmerke van die groep organismes volg in Tabel 5.

Tabel 5. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
A1/15a	+	monotrieg	-	kokkobasille	room
A1/33c	+	atrieg	-	basille	room
A1/34	+	atrieg	-	streptobasille	room
A1/51	+	monotrieg	-	basille	oranje
A1/33a	+	atrieg	-	kort strepto- basille	lig oranje
A1/8	+	monotrieg	-	streptobasille	room
A1/30	+	atrieg	-	streptobasille	oranje
A1/31	+	atrieg	-	streptobasille	oranje
A22/13	+	monotrieg	-	streptobasille	room
A22/19	+	monotrieg	-	basille	room
A22/28	+	monotrieg	-	kort basille	room
A22/34	+	monotrieg	-	kort dik strep- tobasille	room
A22/38	+	lofotrieg	-	streptobasille	room
A22/47b	+	monotrieg	-	basille	room
A22/31	+	monotrieg	-	basille	deurskynend
A22/20	+	monotrieg	-	basille	room
A22/15	+	monotrieg	-	basille	room
A22/29	+	monotrieg	-	kokkobasille	deurskynend room
A22/24	+	atrieg	-	kort basille	room
X10	+	monotrieg	-	kort dik basille	deurskynend
X8	+	monotrieg	-	kort dik basille	room
X13	+	monotrieg	-	kort dik basille	room
X4	+	monotrieg	-	kort basille	room
X18	+	monotrieg	-	kort basille	room
X14	+	monotrieg	-	kort dik basille	room

Tabel 5 vervolg

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
B4/12	+	monotrieg	-	basille	room
B4/22	+	atrieg	-	lang basille	room
B4/25	+	monotrieg	-	kort dik strep- tobasille	room
B4/11	+	monotrieg	-	basille	room
B4/17b	+	atrieg	-	kokkobasille	room
B4/10	+	monotrieg	-	kort dik basille	room
B4/15	+	monotrieg	-	kokkobasille	lig oranje

3.3.6. Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille.

Hierdie bakterieë se fenotipiese kenmerke word in Tabel 6 saamgevat.

Tabel 6. Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille.

Kultuurnommer	A1/15a	A1/33c	A1/34	A1/51	A1/33a	A1/8	A1/30	A1/31	A22/13	A22/19
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	(+)	+	+	-	-	+	-	-	(+)	+
RF: Glukose: BKP	A	R	R	R	R	F	F	F	F	F
FR	A	R	R	R	R	F	F	F	F	F
Groei: anaëroob	-	-	-	-	-	(+)	+	+		
Glukose fermentasie	S	S	S	S	S	-	S	S		
Glukosesop: anaëroob	-	-	-	-	-	S	S	S	S	S
Sitraat							+	+		-
Indool						-	(+)	+	(+)	(+)
Suurvaste kleuring	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellulose hidrolise	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaseien hidrolise	-	+	+	-	-	+	-	-	+	+
Stysel hidrolise	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Ureum	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
MR-reaksie	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-
VP-reaksie	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Gelatien	-	-	-	-	-	+	-	-		
Groei: 35°C							-	-		
NO ₃ → NO ₂							-	-		

Tabel 6 vervolg

Kultuurnummer	A22/26	A22/34	A22/38	A22/47b	A22/31	A22/20	A22/15	A22/29	A22/24
Katalase	+	+	+	+	(+)	+	(+)	+	+
Oksidase	+	+	+	(+)	+	+	-	-	+
RF: Glukose: BKP	R	R	R	R	R	R	F	F	F
FR	R	R	R	R	R	R	F	F	F
Glukosesop: anaëroob	S	S	-	-	A	S	S	S	S
Groei: anaëroob			-	-			+	+	
Glukose fermentasie			S	-			S	S	
Sitraat verbruik	-	-			+	-	-	+	-
Indool	+	(+)			-	(+)	+	+	(+)
Suurvaste kleuring	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellulose hidrolise	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaseïen hidrolise	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Stysel hidrolise	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Ureum	-	+	-	-	-	-	-	-	-
MR-reaksie	+	+	+	+	+	-	+	+	-
VP-reaksie	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Gelatien			-	-			-	-	
Groei: 35°C									
NO ₃ → NO ₂							-	-	

Tabel 6 vervolg

Kultuurnummer	X10	X8	X13	X4	X18	X14	B4/12	B4/22	B4/25	B4/11	B4/17	B4/10	B4/15
Katalase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oksidase	+	+	-	-	-	-	(+)	-	-	(+)	+	+	+
RF: Glukose: BKP	R	R	R	F	F	F	F	F	R	R	R	A	R
FR	R	R	R	F	F	F	F	F	R	R	R	A	R
Glukosesop: anaëroob	A	A	A	S	S	S	S	S	S	S	-	A	A
Groei: anaëroob				+		+				-	-		
Glukose fermentasie						S				S	S		
Sitraat	-	-	-	-	-	-		-		-		-	-
Indool	(+)	(+)	(+)	+	-	+	+	(+)	(+)	(+)		(+)	-
Suurvaste kleuring	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sellulose hidrolise	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kaseïen hidrolise	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
Stysel hidrolise	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Ureum	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-
MR-reaksie	-	(+)	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-
VP-reaksie	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Gelatien						-				+	-		
Groei: 35°C													
NO ₃ → NO ₂						-							

3.3.7. Identifikasie van die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobs basille.
basille.

Volgens kultuurkenmerke en fenotipiese kenmerke word die bakterieë in Tabel 5 en 6 as volg geïdentifiseer:

A1/15a	<i>Bacillus coagulans</i>
A1/33c	<i>Bacillus coagulans</i>
A1/34	<i>Bacillus coagulans</i>
A1/51	<i>Bacillus popilliae</i>
A1/33a	<i>Bacillus lentimorbus</i>
A1/8	<i>Bacillus coagulans</i>
A1/30	<i>Brochothrix thermosphacta</i>
A1/31	<i>Brochotrix thermosphacta</i>
A22/13	<i>Bacillus larvae</i>
A22/19	<i>Bacillus larvae</i>
A22/28	<i>Bacillus larvae</i>
A22/34	<i>Bacillus larvae</i>
A22/38	<i>Bacillus coagulans</i>
A22/47b	<i>Bacillus coagulans</i>
A22/31	<i>Bacillus sphaericus</i>
A22/20	<i>Listeria monocytogenes</i>
A22/15	<i>Listeria innocua</i>
A22/29	<i>Listeria innocua</i>
A22/24	<i>Microbacterium lacticum</i>
X10	<i>Bacillus sphaericus</i>
X8	<i>Arthrobacter simplex</i>
X13	<i>Arthrobacter simplex</i>
X4	<i>Listeria monocytogenes</i>
X18	<i>Listeria monocytogenes</i>
X14	<i>Listeria innocua</i>
B4/12	<i>Bacillus larvae</i>
B4/22	<i>Bacillus larvae</i>
B4/25	<i>Bacillus larvae</i>
B4/11	<i>Bacillus coagulans</i>
B4/17b	<i>Bacillus firmus</i>
B4/10	<i>Bacillus brevis</i>
B4/15	<i>Arthrobacter simplex</i>

3.3.8. Opmerkings.

Van hierdie 32 kulture kon 12 kulture redelik maklik geïdentifiseer word. Ses isolate kon as *Listeria* spesies geïdentifiseer word, nl. *L.monocytogenes* (3) en *L.innocua* (3) (Buchanan en Gibbons, 1974:593; Starr *et al.*, 1981:1684; Sneath *et al.*, 1986:1241). *Arthrobacter simplex* (3) kan ook geïdentifiseer word en het 'n tipiese basil-kok-siklus ondergaan (Buchanan en Gibbons, 1974: 618,631; Starr *et al.*, 1981:1851,1891; Sneath *et al.*, 1986:1262,1255). *Brochothrix thermosphacta* (2) en *Microbacterium lacticum* is geïdentifiseer volgens Starr *et al.* (1981:1865) en Sneath *et al.* (1986:1253,1320).

Hierteenoor kon 20 isolate uiters moeilik geïdentifiseer word. Deur vergelyking met bestaande Gram-positiewe bakterieë kan aangetoon word onder water genera hulle nie kan ressorteer nie. *Lactobacillus* (Buchanan en Gibbons, 1974:576; Starr *et al.*, 1981:1653; Sneath *et al.*, 1986:1208) is verpligte anaërobe bakterieë en die kulture was aëroob. *Corynebacterium* (Buchanan en Gibbons, 1974:602; Starr *et al.*, 1981:1829; Sneath *et al.*, 1986:1263); *Brevibacterium* (Buchanan en Gibbons, 1974:625; Starr *et al.*, 1981:1851; Sneath *et al.*, 1986:1306,1307); *Curtobacterium* (Starr *et al.*, 1981:1860; Sneath *et al.*, 1986:1313); *Rothia* (Buchanan en Gibbons, 1974:679; Starr *et al.*, 1981:1936; Sneath *et al.*, 1986:1263); *Aureobacterium* (Sneath *et al.*, 1986:1323) en *Caseobacter* (Sneath *et al.*, 1986:1318) toon tipiese coryneforme morfologie. In teenstelling hiermee was die 20 isolate almal kort Gram-positiewe basille, wat eenvormig gekleur het, selfs in ou kulture. Hierdie kulture het nooit 'n basil-kok-siklus vertoon nie, gevolglik kon hulle nie as *Arthrobacter* en *Kurthia* (Buchanan en Gibbons, 1974:618,631; Starr *et al.*, 1981:1851,1891; Sneath *et al.*, 1986:1255, 1262,1267) geklassifiseer word nie. Die isolate het nie suurvas gekleur nie en was onvertak, gevolglik was hulle nie *Nocardia* nie (Buchanan en Gibbons, 1974:726; Starr *et al.*, 1981:2016; Sneath *et al.*, 1986:1458). Hulle het nie suurvas gekleur nie en kon dus nie onder die genus *Mycobacterium* ressorteer nie (Buchanan en Gibbons, 1974:681,682; Starr *et al.*, 1981:1967; Sneath *et al.*, 1986:1436). Die isolate was onvertak en het geen konidiums of atrospore gevorm nie en dus was hulle nie *Streptomyces* (Buchanan en Gibbons, 1974:748; Starr *et al.*, 1981:2028) of *Actinomyces* nie (Buchanan en Gibbons, 1974:659; Starr *et al.*, 1981:1936; Sneath *et al.*, 1986:1263).

Die isolate het geen sellulolitiese aktiwiteit getoon nie en kon daarom nie as *Cellulomonas* geklassifiseer word nie (Buchanan en Gibbons, 1974:631; Starr *et al.*, 1981:1858; Sneath *et al.*, 1986:1263). Aangesien die kulture by 37°C

kon groei, vinnig gegroei het en nie sistefen vereis het vir groei nie, was hulle ook nie spesies van *Remibacterium* nie (Sneath *et al.*, 1986:12553). Hulle kon ook nie as *Caryophanon* geïdentifiseer word nie, aangesien die organisme veelsellig is (Sneath *et al.*, 1986:1259).

Die isolate het ook nie kenmerke van die volgende genera besit nie: *Microbacterium* (Starr *et al.*, 1981:1865; Sneath *et al.*, 1986:1320); *Listeria* (Buchanan en Gibbons, 1974:593; Starr *et al.*, 1981:1684; Sneath *et al.*, 1986:1208); *Erysipelothrix* (Buchanan en Gibbons, 1974:597; Starr *et al.*, 1981:1696; Sneath *et al.*, 1986:1208); *Propionibacterium* (Buchanan en Gibbons, 1974:633; Starr *et al.*, 1981:1894; Sneath *et al.*, 1986:1263); *Eubacterium* (Buchanan en Gibbons, 1974:641; Starr *et al.*, 1981:1903; Sneath *et al.*, 1986:1264); *Arachnia* (Buchanan en Gibbons, 1974:659; Starr *et al.*, 1981:1936; Sneath *et al.*, 1986:1263); *Bifidobacterium* (Buchanan en Gibbons, 1974:659; Starr *et al.*, 1981:1949; Sneath *et al.*, 1986:1264); *Brochothrix* (Starr *et al.*, 1981:1868; Sneath *et al.*, 1986:1208); *Oerskovia* (Starr *et al.*, 1981:221; Sneath *et al.*, 1986:1263); *Agromyces* (Sneath *et al.*, 1986:1263); *Arcanobacterium* (Sneath *et al.*, 1986:1263); *Acetobacterium* (Sneath *et al.*, 1986:1264); *Butyrivibrio* (Sneath *et al.*, 1986:1264); *Thermoanaerobacter* (Sneath *et al.*, 1986:1264) en *Lachnospira* (Sneath *et al.*, 1986:1264).

Die enigste afleiding wat dus gemaak kan word, is dat dit *Bacillus* spesies was wat hulle vermoë tot endospoorvorming verloor het. Met die TEM is waargeneem dat hulle dieselfde rangskikking van flagellums gehad het, nl. polêr en subpolêr as die *Bacillus* spesies (vgl.3.2.4.). Die isolate is toe onderwerp aan dieselfde fenotipiese toetse as vir *Bacillus* spesies (vgl.3.3.4.).

Die Gram-positiewe isolate wat by 65°C gegroei het kon nie *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus schlegelii* of *Bacillus stearothermophilus* wees nie, aangesien hulle nie instaat is om by temperature laer as 50°C (*B. acidocaldarius* en *B. schlegelii*) en 40°C (*B. stearothermophilus*) te kon groei nie (Sneath *et al.*, 1986:1122, 1123). Die kulture in hierdie studie is almal by temperature onder 30°C geïsoleer en dus kon A1/17c, wat instaat was om by 65°C te groei, nie as een van bg. geïdentifiseer word nie, maar wel as *Bacillus coagulans*.

3.3.9. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe kokke.

Die kultuurkenmerke volg in Tabel 7.

Tabel 7. Kultuurkenmerke van die Gram-positiewe kokke.

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoorkleuring: posisie en vorm	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
A1/50a	+	atrieg	-	diplo-,stafilo- kokke	geel
A1/17a	+	atrieg	-	stafilokokke	geel
A22/56	+	atrieg	-	diplo- en stafi- lokokke	wit

3.3.10. Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe kokke.

Hierdie kulture se fenotipiese kenmerke word in Tabel 8 gegee.

Tabel 8. Fenotipiese kenmerke van die Gram-positiewe kokke.

Kultuurnommer	A1/50a	A1/17a	A22/56
Katalase	+	+	+
Oksidase	(+)	(+)	-
RF: Glukose: <u>BKP</u>	R	-	F
FR	R	R	F
Groei: aëroob	+	+	+
Groei: anaëroob	-	-	+
VP-reaksie	-	-	+
Fermentasie: <u>Glukose</u>	-	S	S
Mannitol	-	-	S
Arginienhidrolise	-	-	+
Koagulase	-	-	+
Gelatien			+
Fosfatase			+

3.3.11. Identifikasie van die Gram-positiewe kokke.

Die bakterieë in Tabel 7 en 8 word geïdentifiseer as:

A1/50a	<i>Micrococcus luteus</i>
A1/17a	<i>Micrococcus varians</i>
A22/56	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.3.12. Opmerkings.

Daar is slegs drie Gram-positiewe kokke geïsoleer en die identifikasie is gedoen volgens Sneath *et al.* (1986:999) se samevatting vir die eienskappe van genera van die Gram-positiewe kokke. Die kokke is verder onderwerp aan die verskillende fenotipiese toetse soos verkry in Sneath *et al.* (1986:1000-1035). Daar is veral opgelet na anaërobe en fakultatief anaërobe groei, VP-reaksie, glukose fermentasie, arginienhidrolise, koagulasie van serum, gelatienvervloeiing sowel as fosfatase. Pigmentvorming en morfologie was baie belangrik.

3.3.13. Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe geflaggelleerde aërobe respire-
rende basille tot kokkobasille.

Kultuurkenmerke word in Tabel 9 gegee.

Tabel 9. Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe geflaggelleerde aërobe respire-
rende basille tot kokkobasille.

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoor- kleuring	Negatiewe kleuring: selvorm	Pigment- vorming
A1/20	-	monotrieg	-	klein fyn basille	room-ligbruin
A1/25	-	monotrieg	-	kort dik basille	room-deurskynend
A1/27	-	lofotrieg	-	klein basille	donker bruin- pers
A1/34a	-	monotrieg	-	lang basille	room
A1/44	-	monotrieg	-	lang basille	ligbruin
A1/41	-	monotrieg	-	lang fyn basille	oranje
A1/45	-	monotrieg	-	lang fyn basille	deurskynend oranje
A1/9	-	monotrieg	-	kort basille	diffundeerbare groen
A1/28	-	monotrieg	-	lang basille	room-bruin
A1/43	-	monotrieg	-	lang fyn basille	oranje
A1/22	-	monotrieg	-	basille	deurskynend
A1/11	-	monotrieg	-	lang fyn basille	room
A1/14	-	monotrieg	-	kort basille	room
A22/10	-	monotrieg	-	lang basille	diffundeerbare bruin
A22/25	-	monotrieg	-	lang basille	ligbruindeurskynend
A22/27	-	monotrieg	-	kort vet basille	deurskynend
A22/36	-	monotrieg	-	kort basille	ligbruin
A22/54	-	monotrieg	-	basille	deurskynend room
A22/5	-	monotrieg	-	basille	deurskynend room
A22/43	-	monotrieg	-	lang fyn basille	ligbruin
A22/52	-	monotrieg	-	kort dik basille	room
A22/8	-	monotrieg	-	lang fyn basille	lig-bruin room
A22/12	-	monotrieg	-	lang fyn basille	diffundeerbare bruin
A22/26	-	monotrieg	-	fyn basille	deurskynend
A22/39	-	monotrieg	-	lang fyn basille	geel-oranje
A22/14	-	monotrieg	-	kort fyn basille	room
A22/46	-	monotrieg	-	kort fyn basille	room

Tabel 9 vervolg

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoor- kleuring	Negatiewe. kleuring: selyorm	Pigment- vorming
A22/6	-	monotrieg	-	kort basille	diffundeerbare groen
A22/3	-	monotrieg	-	fyn basille	deurskynend
A22/16	-	monotrieg	-	lang fyn basille	room
A22/53	-	monotrieg	-	basille	room
A22/18	-	monotrieg	-	kort fyn basille	deurskynend
A22/35	-	monotrieg	-	basille	oranje
A22/37	-	monotrieg	-	kort basille	deurskynend
X2	-	monotrieg	-	kort basille	room-ligbruin
X9	-	monotrieg	-	lang fyn basille	room-oranje
X12	-	monotrieg	-	kokkobasille	room-ligbruin
X17	-	monotrieg	-	basille	deurskynend-room
X16a	-	monotrieg	-	lang fyn basille	geelbruin
X16b	-	monotrieg	-	lang fyn basille	geelbruin
X1	-	monotrieg	-	kort basille	room
X15	-	monotrieg	-	kort basille	room
X3	-	monotrieg	-	kort basille	room
X19	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/6	-	monotrieg	-	lang fyn basille	ligte roombruin
B4/9	-	monotrieg	-	kort basille	ligte roombruin
B4/30	-	monotrieg	-	kort basille	oranje-bruin
B4/43	-	monotrieg	-	basille	room-ligbruin
B4/49	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/51	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/27	-	monotrieg	-	kort fyn basille	ligte roombruin
B4/29	-	monotrieg	-	kort basille	ligbruin
B4/33	-	monotrieg	-	basille	room
B4/34	-	monotrieg	-	basille	deurskynend
B4/41	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/13	-	monotrieg	-	kort basille	deurskynend wit
B4/21	-	monotrieg	-	basille	ligte roombruin
B4/36	-	monotrieg	-	basille	ligte roombruin
B4/47	-	monotrieg	-	basille	ligte roombruin

Tabel 9 vervolg

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flaggellums: rangskikking	Spoor- kleuring	Negatiewe kleuring selvorm	Pigment- vorming
B4/23	-	monotrieg	-	lang basille	room
B4/37	-	monotrieg	-	basille	ligte roombruin
B4/2	-	monotrieg	-	lang basille	deurskynend room
B4/4	-	monotrieg	-	kort basille	deurskynend room
B4/45	-	monotrieg	-	basille	room-ligbruin
B4/52	-	monotrieg	-	kort basille	room-ligbruin
B4/48	-	monotrieg	-	kort basille	room-ligbruin
B4/1	-	monotrieg	-	lang basille	ligbruin-room
B4/8	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/14	-	monotrieg	-	kort basille	ligte roombruin
B4/24	-	monotrieg	-	lang fyn basille	ligte roombruin
B4/40	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/46	-	monotrieg	-	basille	ligte geelbruin
B4/39	-	monotrieg	-	kort basille	room
B4/19	-	monotrieg	-	lang fyn basille	deurskynend

Tabel 10-vervolg

Kultuurnummer	A1/43	A1/22	A1/11	A1/14	A22/10	A22/25	A22/27	A22/36
Katalase	+	+	-	+	+	-	+	+
Oksidase	+	+	-	-	+	+	+	+
RF: Glukose: BKP	-	R	R	-	R	A	R	R
FR	-	R	R	-	R	A	R	R
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidasie	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstraselulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	-	-	+	+	-	-	-	+
Fluoreserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	+			-	-	-	-	-
AKkumuleer poli- β - hidroksibutiraat	+	+			(+)	+	(+)	(+)
Glukose verbruik	+	+	-		+	+	+	+
Arginiendihidrolase		+			+	+	+	
Gelatien	+	-			+	+	+	+
Denitrifikasie	-	-			-	-	-	-

Tabel 10-vervolg

Kultuurnommer	A22/54	A22/5	A22/43	A22/52	A22/8	A22/12	A22/26	A22/39
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	+	+	+	+	+	(+)	+	+
RF: Glukose BKP	R	R	R	R	R	R	R	R
FR	R	R	R	R	R	R	R	R
Vorm slym op stikstogvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstraselulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	+	-	-	-	(+)	-	+	+
Fluoreserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	-	+	+	+				+
Akkumuleer poli- β - hidroksibutiraat	(+)	-	-	-	(+)	+	(+)	(+)
Glukose verbruik	+	(+)	(+)	+	(+)	+	-	+
Arginiendihidrolase						+		
Gelatien	+				+	-	-	+
Denitrifikasie	-					-	+	-

Tabel 10-vervolg

Kultuurnummer	A22/14	A22/46	A22/6	A22/3	A22/16	A22/53	A22/18	A22/35
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	+	+	+	+	(+)	+	-	-
RF: Glukose BKP	R	R	R	R	-	A	R	R
FR	R	R	R	R	-	A	R	R
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstracellulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	(+)	+	+	+	(+)	-	+	-
Fluoreserende pigment	-	+	+	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	-			-		-	-	-
Akkumuleer poli- β - hidroksibutiraat	+	-	-	-	-	-		
Glukose verbruik	+	+	+		-	+		
Arginiendihidrolase	+	+			+	+		
Gelatien	+	+	+					
Denitrifikasie	-							

Tabel 10-vervolg

Kultuurnummer	A22/37	X2	X9	X12	X17	X16a	X16b	X1	X15	X3	X19	B4/6
Katalase	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-
Oksidase		+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
RF: Glukose BKP	R	R	R	A	R	R	R	R	R	R	R	A
FR	R	R	R	A	R	R	R	R	R	R	R	A
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstraselulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	+	-	-	(+)	-	+	+	+	(+)	(+)	-	-
Fluoreserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	-					+	+		-			-
Akkumuleer poli- β -hidroksibutiraat		-	-	-	-	+	(+)	-	-	+		-
Glukose verbruik		-	-	-	-	+	+	-	(+)	+	-	+
Arginiendihidrolase				+	+				+	-		+
Gelatien						+	+			-		
Denitrifikasie						-	-			-		

Tabel 10 vervolg

Kultuurnummer	B4/9	B4/30	B4/43	B4/49	B4/51	B4/27	B4/29	B4/33	B4/34
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF: Glukose BKP	A	R	A	A	A	R	-	R	R
FR	-	R	R	R	A	R	-	R	R
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstrasellulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	-	-	-	-	+	-	-	(+)	-
Fluoresserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Akkumuleer poli- β - hidroksibutiraat	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Glukose verbruik	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Arginiendihidrolase	+	-				+	+		
Gelatien						+	+	+	
Denitrifikasie						-	-		-

Tabel 10 vervolg

Kultuurnummer	B4/41	B4/13	B4/21	B4/36	B4/47	B4/23	B4/37	B4/2	B4/4	B4/45
Katalase	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
RF: Glukose										
BKP	A	A	R	R	A	A	R	A	A	R
FR	A	A	R	R	A	A	R	A	A	R
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstraselulêre slym op GSE + 5% Glikose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	(+)	-	(+)	-	-	(+)	-	-	+	-
Fluoreserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	-									(+)
Akkumuleer poli- β - hidroksibutiraat	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Glukose verbruik	+	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)
Arginiendihidrolase		+	+	+		+	+	+	+	
Gelatien	+							-	-	+
Denitrifikasie	-							-	-	-

Tabel 10 vervolg

Kultuurnummer	B4/52	B4/48	B4/1	B4/8	B4/14	B4/24	B4/40	B4/46	B4/39	B4/19
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Oksidase	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
RF: Glukose BKP	R	A	A	-	R	R	A	A	R	-
FR	R	R	A	-	R	R	R	R	R	-
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Etanoloksidasie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Vorm ekstrasellulêre slym op GSE + 5% Glukose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: pH 3,6	+	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	-
Fluoresserende pigment	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Stysel hidrolise	+	(+)					+	-	+	
Akkumuleer poli- β -hidroksibutiraat	(+)	-	+							+
Glukose verbruik	+	+	+	-	-	-				+
Arginiendihidrolase			+							+
Gelatien.	+		-							+
Denitrifikasie	-		-							+

3.3.15. Identifikasie van die Gram-negatiewe geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Die bakterieë is soos volg geïdentifiseer (vgl. Tabel 9 en 10):

A1/20	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A1/25	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A1/27	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A1/34a	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A1/44	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A1/41	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A1/45	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A1/9	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A1/28	<i>Pseudomonas mendocina</i>
A1/43	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
A1/22	<i>Pseudomonas delafieldii</i>
A1/11	<i>Xanthomonas ampelina</i>
A1/14	<i>Xanthomonas albilineans</i>
A22/10	<i>Pseudomonas facilis</i>
A22/25	<i>Pseudomonas facilis</i>
A22/27	<i>Pseudomonas facilis</i>
A22/36	<i>Pseudomonas facilis</i>
A22/54	<i>Pseudomonas facilis</i>
A22/5	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A22/43	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A22/52	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
A22/8	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
A22/12	<i>Pseudomonas delafieldii</i>
A22/26	<i>Pseudomonas pickettii</i>
A22/39	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
A22/14	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
A22/46	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A22/6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
A22/3	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A22/16	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
A22/53	<i>Pseudomonas mendocina</i>
A22/18	<i>Xanthomonas ampelina</i>
A22/35	<i>Xanthomonas ampelina</i>

A22/37	<i>Xanthomonas albilineans</i>
X2	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
X9	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
X12	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
X17	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
X16a	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
X16b	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
X1	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
X15	<i>Pseudomonas mendocina</i>
X3	<i>Pseudomonas delafieldii</i>
X19	<i>Xanthomonas ampelina</i>
B4/6	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/9	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/30	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/43	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/49	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/51	<i>Pseudomonas mendocina</i>
B4/27	<i>Pseudomonas facilis</i>
B4/29	<i>Pseudomonas facilis</i>
B4/33	<i>Pseudomonas facilis</i>
B4/34	<i>Pseudomonas facilis</i>
B4/41	<i>Pseudomonas facilis</i>
B4/13	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
B4/21	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
B4/36	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
B4/47	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>
B4/23	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
B4/37	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>
B4/2	<i>Pseudomonas diminuta</i>
B4/4	<i>Pseudomonas diminuta</i>
B4/45	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
B4/52	<i>Pseudomonas saccharophila</i>
B4/48	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
B4/1	<i>Pseudomonas delafieldii</i>
B4/8	<i>Xanthomonas ampelina</i>
B4/14	<i>Xanthomonas ampelina</i>
B4/24	<i>Xanthomonas ampelina</i>
B4/40	<i>Xanthomonas ampelina</i>

- B4/46 .. *Xanthomonas ampelina*
B4/39 *Xanthomonas axonopodis*.
B4/19 *Zoogloea ramigera*

3.3.16. Comerkinge.

Die kenmerke van hierdie groep is in Tabel 9 en 10 gegee. Die verpligte aërobe respirerende chemoorganotrofe Gram-negatiewe basille, wat polêr geflagelleerd is, katalase en gewoonlik oksidase vorm, kon in die Gram-negatiewe aërobe groep, wat deur Krieg en Holt (1984:140) beskryf is, geplaas word. Geselekteerde fenotipiese toetse uit die opsomming van Krieg en Holt (1984:140) is op al hierdie kulture uitgevoer. Die groep wat deur Krieg en Holt (1984:140) beskryf is, bestaan uit die volgende families: *Pseudomonadaceae*, *Azotobacteraceae*, *Rhizobiaceae* en *Neisseriaceae*.

Die *Azotobacteraceae* (Krieg en Holt, 1984:219) kon van die ander families onderskei word op grond van hulle vermoë om op stikstofvrye medium te groei (kyk Tabel 10). Slegs bakterieë wat opvallende groot gladde slymerige kolonies op hierdie medium vorm, kon oorweeg word vir die familie *Azotobacteraceae* (Krieg en Holt, 1984:226). Kulture van *Azotobacter chroococcum* en *A. vinelandii* is op hierdie medium as positiewe kontrole uitgestryk. Geen isolaat uit die verkoelingswater het die tipiese groei vertoon nie, gevolglik kon hulle nie onder die *Azotobacteraceae* val nie. Indien 'n kultuur dit wel kon doen, sou die isolaat instaat wees om vry stikstof te bind (Starr *et al.*, 1981: 782, 788). Dit sou dan bevestig word deur asetileen-reduksie aan te wend wat 'n aanduiding is van die teenwoordigheid van die nitrogenase ensiem (Burris, 1974:9-33).

Rhizobiaceae produseer groot hoeveelhede slym op medium wat koolhidrate bevat (Krieg en Holt, 1984:239). 'n Kultuur van *Rhizobium* is saam met die isolaat op hierdie medium uitgestryk as 'n positiewe kontrole. Geen kultuur kon soos die *Rhizobium*-kontrole slym vorm nie. Nie 'n enkele isolaat kon dus onder die *Rhizobiaceae* ressorteer nie.

Die families *Pseudomonadaceae* en *Neisseriaceae* kan van mekaar onderskei word deur alle isolaat met die TEM te ondersoek vir die teenwoordigheid van flagellums. Eg. familie is polêr geflagelleerd, terwyl lg. familie ongeflagelleerd

is (Krieg en Holt, 1984:140,141,288). Die isolate kon dus as genera van die *Pseudomonadaceae* (kyk 3.3.15.) en *Neisseriaceae* (kyk 3.3.15.) geïdentifiseer word.

Die genera van die *Pseudomonadaceae* kon geïdentifiseer word volgens die kenmerke wat deur Krieg en Holt (1984:141,142, 199) aangegee word. Geselekteerde toetse uit die beskrywing van Krieg en Holt (1984:159-210,214-219) is hiervoor aangewend. Sommige van hierdie toetse is in 2.6. beskryf, terwyl ander uitgevoer is volgens Krieg en Holt (1984:159-210,214-219).

Die genera van die *Neisseriaceae* is volgens Krieg en Holt (1984:290-309) geïdentifiseer. Die toetse wat aangewend is, is beskryf in 2.6.

3.3.17. Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Die kultuurkenmerke word in Tabel 11 gegee.

Tabel 11. Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Kultuur-nommer	Gram-reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoor-kleuring	Negatiewe kleuring selvorm	Pigment-vorming
A1/19a	-	atrieg	-	fyn basille	deurskynend
A1/52	-	atrieg	-	kort fyn basille	deurskynend
A1/24	-	atrieg	-	kort basille	roomwit
A1/17c	-	atrieg	-	kort fyn basille	deurskynend
A1/21a	-	atrieg	-	fyn basille	deurskynend
A1/50b	-	atrieg	-	kort fyn basille	room
A22/49b	-	atrieg	-	kort basille	deurskynend
A22/49c	-	atrieg	-	kort fyn basille	deurskynend
A22/44	-	atrieg	-	lang fyn basille	lig roombruin
A22/51c	-	atrieg	-	kort fyn basille	lig roombruin
A22/7	-	atrieg	-	kort basille	lig roombruin
A22/4	-	atrieg	-	basille	oranje
A22/22	-	atrieg	-	basille	oranje
A22/48a	-	atrieg	-	kort fyn basille	lig roombruin
A22/23	-	atrieg	-	basille	oranje
A22/41	-	atrieg	-	lang fyn basille	lig roombruin
A22/42	-	atrieg	-	lang fyn basille	lig roombruin
A22/47a	-	atrieg	-	fyn basille	room
A22/45b	-	atrieg	-	kort fyn basille	lig bruinoranje
A22/55a	-	atrieg	-	kort fyn basille	room
A22/49a	-	atrieg	-	kort fyn basille	deurskynend
X5	-	atrieg	-	lang fyn basille	lig roombruin
X11	-	atrieg	-	kort basille	room
B4/5	-	atrieg	-	kort fyn basille	room
B4/50	-	atrieg	-	basille	deurskynend
B4/20	-	atrieg	-	lang fyn basille	deurskynend

3.3.18. Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Die fenotipiese kenmerke van hierdie kulture word in Tabel 12 weer gegee.

Tabel 12. Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Kultuurnommer	A1/19a	A1/52	A1/24	A1/17c	A1/21a	A1/50b	A22/49b
Katalase	+	+	+	-	-	-	+
Oksidase	+	(+)	-	+	+	+	+
RF: Glukose BKP	R	R	R	R	R	R	R
FR	R	R	R	R	R	R	R
Nitraatreduksie			-	+	+	+	-
Gas vanaf nitriet	-	-	-	-	-	-	-
Indool	-	-		-	-	-	-
Penisillien sensitief	-	-					-
Fermentasie: Xilose	-	-					-
Raffinose	-	-					-
Sellobiose	-	-					-
Mannitol	-	-		-			-
Sukrose	-	-					-
Eskulienhidrolise	-	-					-
Ureum	-	-					+
Grœei: Minerale medium +asetaat+ ammoniumsoute							
Fenielalaniendeaminasie	-						
Vervloei gekoaguleerde serum							
Vorm slym op Stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 12 vervolg

Kultuurnommer	A22/44	A22/51c	A22/7	A22/4	A22/22	A22/48a	A22/23
Katalase	+	+	++	+	+	+	+
Oksidase	+	+	+	+	+	+	+
RF: Glukose BKP	R	R	R	F	R	R	R
FR	R	R	R	R	R	R	R
Nitraatreduksie			-			-	(+)
Gas vanaf nitriet	-	-	-	-	-	-	-
Indool	-	-	-	-	-	-	-
Penisillien sensitief	-	-	-	+	+	+	+
Fermentasie: Xilose	A-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	A-	-	-	-	-	-	-
Sellobiose	A-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	A	-	-	-	-	-	-
Sukrose	A	-	-				
Eskulien hidrolise	-	-	+				
Ureum	-	-	+	+	+	-	-
Groei: Minerale medium + asetaat + Ammoniumsout				-	-		
Fenielalaniendeaminasie				+	+	-	-
Vervloei gekoaguleerde serum						-	-
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 12 vervolg

Kultuurnommer	A22/42	A22/47a	A22/45b	A22/55	A22/49a	A22/41	A22/49c
Katalase	+	+	-	-	-	+	+
Oksidase	-	-	+	-	+	-	+
RF: Glukose BKP	R	A	A	A	R	R	R
FR	R	A	-	A	R	R	R
Nitraatreduksie			-	-	+		
Gas vanaf nitriet			-	-	-		-
Indool			-	-	-		-
Penisillien sensitief							-
Fermentasie: Xilose							-
Raffinose							-
Sellobiose							-
Mannitol	A	-	-	-	-	-	--
Sukrose							-
Eskulien hidrolise							-
Ureum							+
Groei: Minerale medium + asetaat + ammoniumsoute							
Fenielalaniendeaminasie							
Vervloei gekoaguleerde serum							
Vorm slym op stikstofvrye medium	-	-	-	-	-	-	-

Tabel 12 vervolg

Kultuurnommer	X5	X11	B4/5	B4/50	B4/20
Katalase	+	-	+	+	+
Oksidase	-	-	+	++	+
PF: Glukose BKP	R	A	R	R	R
FR	R	A	R	R	R
Nitraatreduksie		+	-		
Gas vanaf nitriet.		-	-	-	-
Indool		-	-	-	-
Penisillien sensitief			-	-	+
Fermentasie: Xilose			-	-	-
Raffinose			-	-	-
Sellobiose			-	-	-
Mannitol	AG	A	-	-	-
Sukrose			-	-	
Eskulien hidrolise			-	-	
Ureum			+	-	+
Groei: Minerale medium + asetaat + ammoniumsoute					-
Fenielalaniendeaminasie					+
Vervloei gekoaguleerde serum					
Vorm slym op. Stikstofvrye medium	-	-	-	-	-

3.3.19. Identifikasie van die Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

Volgens die resultate in Tabel 11 en 12 is die bakterieë soos volg geïdentifiseer:

A1/19a	<i>Flavobacterium breve</i>
A1/52	<i>Flavobacterium breve</i>
A1/24	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
A1/17c	<i>Kingella denitrificans</i>
A1/21a	<i>Kingella denitrificans</i>
A1/50b	<i>Kingella denitrificans</i>
A22/49b	<i>Flavobacterium adorum</i>
A22/49c	<i>Flavobacterium adorum</i>
A22/44	<i>Flavobacterium breve</i>
A22/51c	<i>Flavobacterium breve</i>
A22/7	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>
A22/4	<i>Moraxella (Moraxella) phenylpyruvica</i>
A22/22	<i>Moraxella (Moraxella) phenylpyruvica</i>
A22/48a	<i>Moraxella (Moraxella) atlantae</i>
A22/23	<i>Moraxella (Moraxella) nonliquefaciens</i>
A22/41	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
A22/42	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
A22/47a	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
A22/45b	<i>Kingella kingae</i>
A22/55a	<i>Kingella kingae</i>
A22/49a	<i>Kingella denitrificans</i>
X5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
X11	<i>Kingella denitrificans</i>
B4/5	<i>Flavobacterium adorum</i>
B4/50	<i>Flavobacterium breve</i>
B4/20	<i>Moraxella (Moraxella) phenylpyruvica</i>

3.3.20. Oopmerkings.

Hierdie Gram-negatiëwe aërobe respirerende basille tot kokkobasille het onder die familie *Neisseriaceae* geval en is geïdentifiseer na aanleiding van die verskillende fenotipiese toetse soos gegee deur Krieg en Holt (1984:288-361).

Die bakterieë is eerstens onderskei van die ander Gram-negatiëwe aërobe respirerende basille tot kokkobasille deurdat hierdie groep nie flagellums besit het nie en onbeweeglik was (vgl. Tabel 11 en 12).

Katalase reaksie was belangrik en het die *Kingella* spesies van die res onderskei deurdat hulle katalase negatief was. *Kingella denitrificans* kan nitraat reduseer, terwyl *Kingella kingae* nie daartoe instaat was nie. Laasgenoemde het geen gas van nitriete gevorm of indool geproduseer nie.

Die katalase positiewe groep bakterieë is verder van mekaar geskei deur middel van die oksidase reaksie. *Acinetobacter calcoaceticus* (wat bestaan uit 7 fenotipiese groepe) was oksidase negatief en kon so van die res onderskei word. Oksidase positiewe bakterieë is verder verdeel in basilvormig en kokkobasille. Almal was basilvormig en is getoets vir $1,0 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$ penisilliënsensitiwiteit (Krieg en Holt, 1984:356). Die basille wat sensitief was hiervoor is verder aan die volgende toetse onderwerp: groei op minerale medium met asetaat en ammoniumsoute (nie een was hiertoe instaat nie), fenielalaniëndeaminase en urease produksie. *Moraxella (M) phenylpyruvica* was positief t.o.v. lg. twee fenotipiese toetse. *Moraxella (M) nonliquefaciens* en *Moraxella (M) atlantae* is getoets vir hul vermoë om gekoaguleerde serum te vervloei, waartoe nie een instaat was nie. *M. nonliquefaciens* kon egter nitraat reduseer terwyl *M. atlantae* nie kon nie. Beide hierdie bakterieë was nie hemolities nie.

Flavobacterium meningosepticum, *Flavobacterium adoratum* en *Flavobacterium breve* was nie sensitief teenoor penisillien ($1,0 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$) nie, het nie suur (aëroob) vanaf xilose, raffinose, sellobiose of sukrose gevorm nie. *F. meningosepticum* was egter eskulien hidrolise positief en kon nie nitraat reduseer nie. *F. adoratum* en *F. breve* was eskulien hidrolise negatief. *F. adoratum* kon urease produseer terwyl *F. breve* nie daartoe instaat was nie.

3.3.21. Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille.

Hierdie kenmerke volg in Tabel 13.

Tabel 13 Kultuurkenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille.

Kultuur-nommer	Gram-reaksie	Flagellums: rangskikking	Spoor-kleuring	Negatiewe kleuring selvorm	Pigment-vorming
A1/7	-	atrieg	-	lang basille	roomwit
A1/26	-	monotrieg	-	lang basille	room
A1/38	-	monotrieg	-	basille	room
A1/4	-	atrieg	-	lang basille	roomwit
A1/32	-	atrieg	-	basille	roomwit
A1/1	-	atrieg	-	basille	roomwit
A1/39	-	peritrieg	-	basille	room
A1/42	-	atrieg	-	basille	room
A1/3	-	atrieg	-	basille	roomwit
A1/6	-	monotrieg	-	basille	ligroom-bruin
A1/40a	-	monotrieg	-	basille	ligroom-bruin
A1/23	-	monotrieg	-	basille	room
A1/36	-	monotrieg	-	basille	room
A1/37	-	monotrieg	-	basille	room
A1/5	-	monotrieg	-	kort basille	ligroom-bruin
A1/40b	-	monotrieg	-	kort basille	ligroom-bruin
A1/48	-	monotrieg	-	kort basille	room
A1/49	-	monotrieg	-	kort basille	room
A1/2	-	monotrieg	-	kort basille	oranje-bruin
A1/46	-	monotrieg	-	basille	room
A1/35	-	monotrieg	-	basille	oranje
A1/47	-	monotrieg	-	kort basille	room
A22/11	-	atrieg	-	kort basille	room
A22/32	-	atrieg	-	basille	oranje
A22/33	-	monotrieg	-	kort basille	oranje
A22/17	-	atrieg	-	basille	oranje-bruin
X7	-	monotrieg	-	kort basille	room
X6	-	monotrieg	-	kort basille	room

Tabel 13 vervolg

Kultuur- nommer	Gram- reaksie	Flagellums rangskikking	Spoor- kleuring	Negatiewe kleuring selvorm	Pigmentasie
B4/3	-	atrieg	-	basille	room
B4/35	-	monotrieg	-	basille	room
B4/44	-	monotrieg	-	basille	room
B4/16	-	monotrieg	-	kort basille	deurskynend- room
B4/28	-	monotrieg	-	basille	room
B4/32	-	monotrieg	-	basille	room

3.3.22. Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille.

Hierdie bakterieë se fenotipiese kenmerke word in Tabel 14. weergegee.

Tabel 14. Fenotipiese kenmerke van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille.

Kultuurnommer	A1/7	A1/26	A1/38	A1/4	A1/32	A1/1	A1/39	A1/42	A1/3
Katalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oksidase	-	-	-	-	-	-	-	+	-
RF: Glukose BKP	F	F	F	F	F	F	F	F	F
FR	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Kapsels teenwoordig	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Verplig halofiel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagellums met skede	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: 37°C									
Verbruik: L-Arabinose									
Fermentasie: Glukose	S	S	S	S	S	S	SG	S	SG
Sukrose	-	-	-	S	S	S	S	S	-
Mannitol	-	S	S	S	S	S	-	-	-
Laktose	-	-	-	S	S	S	-	S	
Dekarboksilasie: Ornitien	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lisien	-	-	-	+	+	-	-	-	-
Arginien	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Kaseien hidrolise									
DSY-reaksie	SS-	S--	SS-	SS-	SS-	SS-	SSG-		SS-
Ureum	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Indool	-	-	+	+	+	+	-	-	-
Sitraat	-	-	-	+	+	-	-	-	-
VP-reaksie	-	-	-	+	+	-	+	-	
MR-reaksie	-	-	-	+	+	+	+		

Tabel 14 vervolg

Kultuurnummer	A22/17	X7	X6	B4/3	B4/35	B4/44	B4/16	B4/28	B4/32
Katalase	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Oksidase	+	+	+	+	-	-	+	+	+
RF: Glukose BKP	F	F	F	F	F	F	F	F	F
FR	F	F	F	F	F	F	F	F	F
Kapsels teenwoordig	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2$	-			+		+			
Verplig halofiel	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flagellums met skede	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Groei: 37°C		+	+				+	+	+
Verbruik: L-Arabinose		+	-				-	-	-
Fermentasie: Glukose	A	S	S	S	S	S	S	S	S
Sukrose			-	-	-	-	-	-	-
Mannitol			-	-	S	-	-	-	-
Laktose	-			-	-	-			
Dekarboksilasie: Ornitien				+	-	+			
Lisien				-	-	+			
Arginien				-	-	-			
Kaseien hidrolise		+	-				+	+	+
DSY-reaksie					SS-	SS-			
Ureum	-			+	+	+			
Indool	-			+	-	-			
Sitraat				-	-	-			
VP-reaksie					(+)	-			
MR-reaksie					-	+			

3.3.23. Identifikasie van die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille.

Die bakterieë in Tabel 13 en 14 word soos volg geïdentifiseer:

A1/7	<i>Xenorhabdus luminescens</i>
A1/26	<i>Xenorhabdus luminescens</i>
A1/38	<i>Xenorhabdus luminescens</i>
A1/4	<i>Klebsiella oxytoca</i>
A1/32	<i>Klebsiella oxytoca</i>
A1/1	<i>Escherichia adecarboxylata</i>
A1/39	<i>Proteus myxofaciens</i>
A1/42	<i>Actinobacillus suis</i>
A1/3	<i>Zymomonas mobilis</i>
A1/6	<i>Aeromonas sobria</i>
A1/40a	<i>Aeromonas sobria</i>
A1/23	<i>Aeromonas sobria</i>
A1/36	<i>Aeromonas sobria</i>
A1/37	<i>Aeromonas sobria</i>
A1/5	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A1/40b	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A1/48	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A1/49	<i>Aeromonas hydrophila</i>
A1/2	<i>Aeromonas caviae</i>
A1/46	<i>Aeromonas salmonicida</i>
A1/35	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
A1/47	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
A22/11	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
A22/32	<i>Cardiobacterium hominis</i>
A22/33	<i>Aeromonas caviae</i>
A22/17	<i>Cardiobacterium hominis</i>
X7	<i>Aeromonas caviae</i>
X6	<i>Plesiomonas shigelloides</i>

B4/3	<i>Pasteurella pneumotropica</i>
B4/35	<i>Xenorhabdus nematophilus</i>
B4/44	<i>Eafnia alvei</i>
B4/16	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
B4/28	<i>Plesiomonas shigelloides</i>
B4/32	<i>Plesiomonas shigelloides</i>

3.3.24. Opmerkings.

Hierdie groep basille val onder Afdeling 5, nl. die fakultatief anaërobe Gram-negatiewe basille. Hulle is geïdentifiseer deur gebruik te maak van die verskillende Tabelle en fenotipiese toetse wat gebruik : deur Krieg en Holt (1984 : 408-600) aangegee word.

Aeromonas en *Plesiomonas* spesies het onder die *Vibrioniaceae* geressorteer en is geïdentifiseer deur gebruik te maak van die volgende fenotipiese toetse: flagellums met skedes het nie voorgekom nie en natrium was ook nie nodig vir hul groei nie. *Aeromonas salmonicida* kon nie by 37°C groei nie. *Aeromonas hydrophila* het *l*-arabinose verbruik en het ook gas vanaf glukose gevorm. *Aeromonas caviae* het ook *l*-arabinose verbruik, maar kon nie gas vanaf glukose vorm nie. *Aeromonas sobria* en *Plesiomonas shigelloides* kon nie *l*-arabinose verbruik nie, maar *A.sobria* kon sukrose fermenteer en *P.shigelloides* nie. (Krieg en Holt, 1984:516-550).

Die ander fakultatief anaërobe fermenterende basille het onder *Enterobacteriaceae* (Krieg en Holt, 1984:408-516) en *Pasteurellaceae* (Krieg en Holt, 1984: 550-600) geressorteer. Hulle is geïdentifiseer deur gebruik te maak van die verskillende fenotipiese toetse asook kultuurkenmerke soos beskryf in Krieg en Holt(1984:408-600). Die isolate is eerstens onderskei deur middel van die oksidase toets.

Die oksidase positiewe basille is aan die volgende fenotipiese toetse onderwerp: beweeglikheid, teenwoordigheid van kapsels en nitraatreduksie. *Cardiobacterium hominis* kon nie nitraat reduseer nie, maar die ander bakterieë kon egter en is aan verdere toetse onderwerp. *Pasteurella pneumotropica* kon indool produseer asook urease, maar het nie V-faktore benodig nie. *Actinobacillus suis* het nie indool geproduseer nie, maar wel urease; het geen suur

vanaf mannitol gevorm nie, het bloed gehemoliseer en kon op McConkeyagar groei.

Die oksidase negatiewe basille is onderwerp aan die katalase toets. Slegs *Xenorhabdus nematophilus* was nie katalase positief nie, was MR negatief, maar wel beweeglik. Die katalase positiewe groep basille is getoets vir die vorming van NO_2 vanaf NO_3 . *Xenorhabdus luminescens* kon egter nie NO_2 vorm nie, asook nie gas vanaf D-glukose nie. *Klebsiella oxytoca* kon nie H_2S vanaf DSY-agar vorm nie, maar kon wel indool produseer en sitraat as koolstofbron gebruik en was VP positief. *Escherichia adecarboxylata* kon ook indool produseer, maar nie sitraat as koolstofbron gebruik nie, kon op KCN-medium groei, maar nie fenielalaniendeaminase vorm nie. *Hafnia alvei* en *Proteus myxofaciens* kon nie indool produseer nie, het nie 'n geel pigment gevorm nie, maar kon trehalose verbruik. Hulle was egter nie instaat om sitraat as enigste koolstofbron te gebruik nie. Hulle was beweeglik, maar kon nie op KCN-medium groei nie. *H.alvei* kon urease produseer, maar *P.myxofaciens* was nie daartoe instaat nie (Krieg en Holt, 1984:408-600).

3.4. - Opsomming van die chemiese analise van 'n beperkte aantal verkoelings-
sisteme by AEK(UKOR).

Kode	Temp	pH	TOVS	SUSP	ALK	GELEI	CaCO ₃	Mg	SO ₄	Cl	NaNO ₂
Area 74 Lugversorgingstelsel 85/09/30											
74 KN	24	8,7	1128	19	428	1524	391	29	201	134	
74 SP01	17	8,5	1888			1478					
74 SP02	18	8,6	1448			1957					
B4-Gebou Verkoelingsisteesem 85/10/21											
B4 KW	21	10,7	2628			8470					3286
B4 SP01	21	8,1	435			588					
B4 SP02	21	8,2	741			1001					
B4 SP03	21	8,2	699			944					
A- Gebou Verkoelingsisteme 84/07/03											
A-0	19	8,9	8088			10930					
A-3		10,1	2886								
A-C	16	10,4	7659			3900					1510
CEKV	20	8,5	1046			10350					3190
AKT 01	17	8,6	2005	6	206	1414	178	50	295	117	
AKT 02	16	8,5	1027	7	268	2710	242	57	768	275	
AKT 03	16	8,5	1103	3	200	1388	167	51	282	116	
AKT 04	15			3	212	1491	186	52	262	119	

HOOFSTUK 4

BESPREKING

4.1. Kulture ontvang

By drie geleenthede is rein kulture van AEK(UKOR) ontvang. Desember 1984 (8 kulture), Mei 1985 (112 kulture) en Augustus 1985 (70 kulture). In die resultate word Mei en Augustus 1985 se resultate saam gegroep. Hierdie 190 kulture is deur suiwing tot 207 vermeerder. Teen die einde van 1985 is almal tot op spesievlak geïdentifiseer. Die doelwit in 1.9. om hulle minstens tot op genusvlak te identifiseer, is dus ten volle bereik.

4.2. Resultaat bespreking.

4.2.1. Identifikasie.

Die volledige identifikasie van alle kulture word in Hoofstuk 3 aangetoon. Die Desember 1984 kulture word in 3.2.1., 3.2.2. en 3.2.3. gevind. Die Mei-Augustus 1985 kulture is in fenotipiese groepe ingedeel. Die Gram-positiewe tot Gram-varieerbare endospoorvormende aërobe basille word in 3.3.1. tot 3.3.3. uiteengesit. Die Gram-positiewe nie-spoorvormende aërobe basille verskyn in 3.3.4. tot 3.3.6. Die enkele-Gram-positiewe kokke word in 3.3.7. tot 3.3.9. weergegee. Die Gram-negatiewe geflagelleerde aërobe respirerende basille en kokkobasille is in 3.3.10. tot 3.3.12. opgesom. Die Gram-negatiewe ongeflagelleerde aërobe respirerende basille volg dan in 3.3.13. tot 3.3.15. Die Gram-negatiewe fakultatief anaërobe fermenterende basille word in 3.3.16. tot 3.3.18. aangetoon.

Aangesien verkoelingswater nie in Potchefstroom beskikbaar was nie, is besluit om 'n ander uitweg te volg vir die verdere kweeking en identifikasie van die bakterieë. Die medium wat gekies sou word, moes voldoende wees om die totale en relatiewe getalle van die verskillende fisiologiese of taksonomiese tipes te kweek. Om so 'n wye moontlike variasie bakterieë te isoleer, moet die medium so min moontlik selektief wees. Medium met bygevoegde energiebronne word beskou as meer selektief. Daar is dus besluit om geaktiveerde slyk ekstrak agar (GSE) (Prakasam en Dondero, 1967:461) te gebruik sonder bygevoegde energiebronne, aangesien vorige navorsers gevind het dat bakteriese tellings hoër was in varswater wanneer die bakterieë geïsoleer was op 'n arm medium eerder as 'n voedingstofryke medium (Prakasam en Dondero, 1967:461).

Die studie is so beplan dat slegs die aërobe en fakultatief anaërobe bakterieë geïsoleer kon word. Daar sou dus geen sessiele populasies, d.w.s. biofilms, bestudeer kon word nie, maar slegs planktoniese populasies. Geen verpligte anaërobe bakterieë kon uit die verkoelingswater geïsoleer word met die metodes wat aangewend is nie. *Legionella* spesies sou ook nie geïsoleer kon word nie, aangesien die primêre isolasiemedium nie aan hul spesifieke groei-behoef-tes voldoen het nie.

Die isolasie is doelbewus so beplan dat slegs die aërobe bakterieë (verplig aëroob en fakultatief anaëroob) geïsoleer moes word, aangesien die verkoelingswater goed belug is en dus eintlik 'n aërobe makrohabitat skep as 'n anaërobe een. Daar kon egter klein mikrohabitate onder slymerige groei ontstaan, waaronder anaërobe mikrohabitate kon ontstaan (Costerton en Lashen, 1984:13).

Die identifikasie van die verskillende soorte bakterieë is uitgevoer volgens die klassieke metode, deur gebruik te maak van fenotipiese toetse soos uiteengesit onder resultate (vgl. Hoofstuk 3). Daar is sover moontlik gepoog om gebruik te maak van eienskappe wat maklik bepaalbaar is sowel as om die hoeveelheid verskillende eienskappe wat ondersoek is, so min moontlik te hou. Sover moontlik is verwysingspesies ingesluit as positiewe of negatiewe kontroles.

4.2.2. Kulture Desember 1984.

Uit die kulture van Desember 1984 is tien spesies geïsoleer wat ses *Pseudomonas* spesies, drie *Pasteurella* spesies en een *Bacillus* spesie insluit (vgl. 3.2.3.). Die *Pseudomonas* spesies het bestaan uit *P. stutzeri*, *P. mendocina* en *P. thomasi*. Al drie hierdie spesies word algemeen geassosieer met grond en water (Krieg en Holt, 1984:141). *Pseudomonas* en *Pasteurella* is Gram-negatiewe bakterieë terwyl die *Bacillus* Gram-positief is (vgl. 3.2.1.) (Krieg en Holt, 1984:141, 1104).

4.2.3. Gram-positiewe endosporvormende aërobe basille.

In 3.3.3. verskyn die identifikasie van die Gram-positiewe endosporvormende aërobe basille. Die getal van elke spesie is soos volg:

Bacillus coagulans 8, *Bacillus licheniformis* 5, *Bacillus firmis* 5, *Bacillus lentus* 4, *Bacillus cereus* 3, *Bacillus megaterium* 2, en *Bacillus subtilis* 1, 'n totaal van 28 kulture.

B.coagulans is redelik suurverdraagsaam, alhoewel die AEK(UKOR) verkoelingswater aan die alkaliese kant is. *B.licheniformis* lewe veral in grond en kan ook hoë hittebehandeling weerstaan. *B.firmis* en *B.lentus* kom ook algemeen in grond voor. Die endospore van *B.cereus*, *B.megaterium* en *B.subtilis* kom wyd verspreid in die natuur voor. *B.subtilis* endospore kom veral in grond voor en die bakterieë is ook betrokke by die vroeë afbraak van plante- en diermateriaal. Alle *Bacillus* spesies kan hoë temperature oorlewe as gevolg van hul vermoë om weerstandbiedende endospore te vorm (Krieg en Holt,1984:1104).

In 3.3.7. volg 'n interessante verskynsel. Van die 32 kulture het 20 *Bacillus* spesies ingesluit wat hul vermoë om endospore te vorm, verloor het. Hulle is egter nog steeds *Bacillus* spesies. Die aantal *Bacillus* spesies word nou verhoog na 48. Die ander genera en spesies word in 3.3.7. aangetoon. Hiervolgens is die volgende isolasies gedoen:

Bacillus coagulans 5, *Bacillus larvae* 7, *Bacillus sphaericus* 2, *Bacillus licheniformis* 2, *Bacillus popilliae* 1, *Bacillus lentimorbus* 1, *Bacillus firmus* 1, *Bacillus brevis* 1, *Listeria monocytogenes* 3, *Listeria innocua* 3, *Arthrobacter simplex* 3, *Brochothrix thermosphacta* 2, en *Microbacterium lacticum* 1, 'n totaal van 32 kulture.

Die totale aantal *Bacillus coagulans* (3.2.3., 3.3.3. en 3.3.7.) wat geïsoleer is kom nou op 14 te staan, en *Bacillus firmus* op 6. *B.larvae*, *B.popilliae* en *B.lentimorbus* word dikwels met insekte geassosieer. Dit kan moontlik deur insekte na die verkoelingswater oorgedra word. *B.sphaericus* en *B.brevis* word met grond geassosieer en eersgenoemde kom ook in die sedimente van marine- en varswater voor. *Arthrobacter* is 'n spesie wat normaalweg in die grond voorkom. *Listeria monocytogenes* is 'n menslike patoëen, maar dit kom vrylewend in die natuur voor in riool, grond, water en kuilvoer. *L.innocua* kom ook in die grond voor, in plantegroei asook in voëlmis (Krieg en Holt,1984:1234).

4.2.4. Gram-positiewe kokke.

Gedurende hierdie studie is slegs drie Gram-positiewe kokke geïsoleer (vgl. 3.3.11.), naamlik: *Micrococcus luteus*, *Micrococcus varians* en *Staphylococcus aureus*. *Micrococcus* spesies word algemeen in die lug aangetref. *M.varians* kom ook in water voor. *S.aureus* word met die mens geassosieer (Krieg en Holt, 1984:999).

4.2.5. Gram-negatiewe aërobe respirerende basille en kokkobasille.

In 3.3.14. word die identifikasie van die Gram-negatiewe aërobe respirerende basille tot kokkobasille gegee. 'n Ontleding gee die volgende spesiesamestelling:

Pseudomonas alcaligenes 15, *Pseudomonas facilis* 10, *Pseudomonas mendocina* 9, *Pseudomonas saccharophila* 7, *Pseudomonas stutzeri* 6, *Pseudomonas delafieldii* 4, *Pseudomonas aeruginosa* 3, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* 3, *Pseudomonas diminuta* 2, *Pseudomonas pseudomallei* 1, *Pseudomonas pickettii* 1, *Xanthomonas ampilina* 9, *Xanthomonas albilineans* 2, *Xanthomonas axonopodis* 1 en *Zoogloea ramigera* 1, 'n totaal van 74.

Al die *Pseudomonas* spesies word met grond, grond en water, of net met water geassosieer. Die *Pseudomonas* spesies is instaat tot slymerige groei en kan dus mikrohabitate skep en probleme in verkoelingsisteme veroorsaak. *P.alcaligenes*, *P.facilis*, *P.mendocina*, *P.saccharophila* en *P.stutzeri* maak die grootste komponent van die *Pseudomonas* spesies uit, nl. 47/61.

Daar kom 'n opvallende groot getal *Xanthomonas* spesies voor (12). Alhoewel hierdie bakterieë dikwels met plante geassosieer word, waar hulle siektes veroorsaak, kan hulle ook onafhanklik van hul gashere lewe. *X.ampilina* kom die meeste voor: 9/12 (Krieg en Holt, 1984:199).

Slegs een *Z.ramigera* is geïsoleer. In geaktiveerde slyk is die organisme 'n slymvormer wat dikwels sessiel voorkom en baie slym afskei. Dit is moeilik om te weet of dit dalk ook dieselfde optree in verkoelingswater.

4.2.6. Gram-negatiewe nie-geflagelleerde aërobe respirerende basille tot kokkobasille.

In 3.3.18. volg die onbeweeglike basille tot kokkobasille. Die spesiesamestelling lyk as volg:

Flavobacterium breve 5, *Flavobacterium adorum* 3, *Flavobacterium meningosepticum* 1, *Moraxella (Moraxella) phenylpyruvica* 3, *Moraxella (Moraxella) nonliquefaciens* 1, *Moraxella (Moraxella) atlantae* 1, *Kingella denitrificans* 5, *Kingella kingae* 2, en *Acinetobacter calcoaceticus* 5, 'n totaal van 26.

Flavobacterium spesies word dikwels met water geassosieer, net soos *Pseudomonas* spesies. Hier kom 'n redelike verskeidenheid genera en spesies voor, onder dié wat geïsoleer is, wat gewoonlik met water en grond geassosieer word (Krieg en Holt, 1984:353).

4.2.7. Gram-negatiewe fakultatiewe anaërobe fermenterende basille.

Daar is slegs 34 fakultatiewe anaërobe basille geïsoleer. Hul identifisering word in 3.3.22. gegee en die spesiesamstelling is as volg:

Aeromonas sobria 5, *Aeromonas hydrophila* 4, *Aeromonas caviae* 3, *Aeromonas salmonicida* 1, *Plesiomonas shigelloides* 6, *Xenorhabdus luminescens* 3, *Xenorhabdus nematophilus* 1, *Actinobacillus suis* 1, *Klebsiella oxytoca* 2, *Pasteurella pneumotropica* 2, *Escherichia adecarboxylata* 1, *Proteus myxofaciens* 1, *Cardiobacterium hominis* 2, *Zymomonas mobilis* 1 en *Hafnia alvei* 1, 'n totaal van 34.

Aeromonas spesies word dikwels met water geassosieer. *Hafnia alvei* word geassosieer met die feses van mens en dier, insluitend voëls. Hierdie spesie en die res van die geïsoleerde fakultatief anaërobes kon uit die omgewing in die water beland het, aangesien hulle met diere, plante, insekte en grond geassosieer word (Krieg en Holt, 1984:408-600).

4.3. Vergelyking van die aantal genera wat uit verkoelingswater geïsoleer is.Tabel 15. Vergelyking van die genera geïsoleer.

Genus	Aantal isolate					Totale getal
	U	A1	A22	B4	X	
<i>Acinetobacter</i>	-	1	3	-	1	5
<i>Actinobacillus</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Aeromonas</i>	-	11	1	-	1	13
<i>Arthrobacter</i>	-	-	-	1	2	3
<i>Bacillus</i>	1	15	20	12	1	49
<i>Brochotrix</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Cardiobacterium</i>	-	-	2	-	-	2
<i>Escherichia</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Flavobacterium</i>	-	2	5	2	-	9
<i>Hafnia</i>	-	-	-	1	-	1
<i>Kingella</i>	-	3	3	-	1	7
<i>Klebsiella</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Listeria</i>	-	-	3	-	3	6
<i>Moraxella</i>	-	-	4	1	-	5
<i>Microbacterium</i>	-	-	1	-	-	1
<i>Micrococcus</i>	-	2	-	-	-	2
<i>Pasteurella</i>	3	-	1	1	-	5
<i>Plesiomonas</i>	-	2	-	3	1	6
<i>Proteus</i>	-	1	-	-	-	1
<i>Pseudomonas</i>	6	11	18	23	9	67
<i>Staphylococcus</i>	-	-	1	-	-	1
<i>Xanthomonas</i>	-	2	3	6	1	12
<i>Xenorhabdus</i>	-	3	-	1	-	4
<i>Zoogloea</i>	-	-	-	1	-	1
<i>Zymomonas</i>	-	1	-	-	-	1
Totaal	10	60	65	52	20	207

Uit Tabel 15 kan gesien word dat verkoelingsstelsel U se geïsoleerde bakterieë hoofsaaklik uit *Pseudomonas* spesies bestaan het. Hierdie bakterieë is uit 'n verskeidenheid verkoelingsstelsels geneem.

A1 was 'n koeltoring en hier is die hoof isolate *Bacillus* spesies (15) gewees, teenoor 11 *Pseudomonas* spesies en 11 *Aeromonas* spesies. Die Gram-negatiewe bakterieë het egter nog die meerderheid van die populasie gevorm.

A22 was 'n kondenseerder verkoelingsstelsel (vgl. 3.1.) en hier het die *Bacillus* spesies ook die meeste voorgekom, nl. 20 isolate teenoor 18 *Pseudomonas* isolate en 3 *Xanthomonas* spesies. Meer as 50% het dus tot Gram-negatiewe spesies behoort.

B4 en X was sproeierv verkoelingsstelsels (vgl. 3.1.) en was ook aan die een kant half oop. Hier het die *Pseudomonas* spesies oorheers, nl. 32 in die twee stelsels tesame en die *Bacillus* spesies (13) het in getalle hierna gevolg.

Wanneer na hierdie gegewens gekyk word, kan afgelei word dat in die geslote stelsels, nl. die koeltoring en die kondenseerder, die *Bacillus* spesies oorheers het, teenoor die *Pseudomonas* en *Aeromonas* spesies. By die sproeiers was daar egter 'n duidelike oorheersing van *Pseudomonas* spesies.

In die geheel het *Pseudomonas* spesies (67) die meeste voorgekom met *Bacillus* spesies (49) in aansienlike getalle daarna. *Aeromonas* (13) kon ook 'n rol gespeel het, sowel as die *Xanthomonas* en die *Flavobacterium* spesies (12 en 9 onderskeidelik). Die ander spesies kon ook tot die probleem bygedra het wat ondervind is in die verkoelingsstelsels, maar daar kan afgelei word dat die bogenoemde spesies die belangrikste rol gespeel het, veral die Gram-negatiewe spesies.

4.4. Bespreking.

In verkoelingsstelsels, wat komplekse stelsels is, kan enige omgewingstoestand voorkom wat moontlik geskik is vir die groei van mikroörganismes. Koeltorings vorm 'n sproei wat baie mikroörganismes en onsuiverhede bevat. Soos die druppels afbeweeg in die toring, verdamp die water gedeeltelik en verkoel die oorblywende water. Die verkoelde water versamel aan die onderpunt van die toring en word dan gehersirkuleer. Aangesien die verkoelingswater hersirkuleer en verdamp kan organiese en anorganiese materiaal gekonsentreerd raak in die stel-

sel en dus genoeg voedingstowwe daarstel vir mikroorganismes asook gunstige omstandighede vir korrosie- en biofilmvorming. Die stelsels word egter gedreineer vanaf die onderpunt van die toring en met biosiede en antibakteriese middels behandel om hierdie probleme te voorkom. Dit is egter nie altyd so geslaagd nie, soos waargeneem kan word uit die getal en verskeidenheid bakterieë wat geïdentifiseer is in hierdie ondersoek. Daar is hoofsaaklik *Bacillus* spesies uit A1 ('n koeltoring) geïsoleer. *Bacillus* besit die vermoë om endospore te vorm om ongunstige toestande te kan oorlewe, wat dan ook die geval was in hierdie geslote sisteem. *Pseudomonas* en *Aeromonas* spesies het ook in groot getalle voorgekom. Hierdie spesies word algemeen met water en slymvorming geassosieer. Tesame met die ander geïsoleerde bakterieë (vgl. 4.3.) kon hulle instaat wees om biofilms te vorm en dus primêr verantwoordelik wees vir korrosievorming.

By sproeiërs kom daar horisontale oppervlaktes voor om die gemiddelde snelheid van die vallende druppels te verlaag en die tyd wat die druppel blootgestel is aan die verkoelde lugstroom te verhoog. Die sisteme was nie heeltemal geslote sisteme by AEK(UKOR) nie en daar kon dus kontaminante vanaf die omgewing die sisteem bereik. Daar het ook alge in die sisteem voorgekom wat kon dien as 'n filter om ander organismes vas te vang en verskaf ook voedingstowwe aan bakterieë en swamme. Verder was daar naby die een sproeier 'n afvalwaterdam en 'n oop veld. Die natuur was ongeskonde en daar kon dus heelwat mikroorganismes en ander kontaminante, vanaf die dam en die natuur, die sisteem binnekom deur die wind, voëls en insekte. Die sisteme het ook soms tot stilstand gekom (mondeling meedeling) wat probleme verder kon aanmoedig. Hierdie teorie word bevestig deur die aantal en verskeidenheid mikroorganismes wat geassosieer word met die mens, diere, plante, voëls, insekte en die grond wat uit die sisteem geïsoleer is (vgl. 4.2.7.). Dit is veral interessant dat *Hafnia alvei* hier geïsoleer is, aangesien die bakterie geassosieer word met die feses van mens, diere, insluitende voëls.

Die kondenseerder was 'n geslote sisteem en bo-op 'n gebou geleë. Slymvorming is gewoonlik 'n belangrike probleem by hierdie sisteme. Slym trek ook klei en sand aan wat die kondenseerderbuis kan verstop en minder doeltreffende hitteuitruiling veroorsaak. In hierdie ondersoek het daar 20 geïsoleerde *Bacillus* spesies voorgekom teenoor 18 *Pseudomonas* spesies. Laasgenoemde is 'n bekende slymvormer en kon dus primêr die oorsaak wees van die korrosieprobleem by die kondenseerdersisteem.

Daar kan dus in hierdie komplekse stelsels enige omgewingstoestande voorkom wat gewoonlik geskik kan wees vir die groei van alge, blougroen bakterieë, protosoë, swamme en bakterieë in 'n verskeidenheid simbiotiese verwantskappe. Die neerlegging van soute, afbraak van oorblyfsels en die produksie van slym deur die bakterieë verlaag verder die doeltreffendheid van die onderskeie sisteme.

Die probleem is verder vergroot deurdat bakterieë omtrent enige voorwerp sal koloniseer en dus uiteindelik biofilms sal veroorsaak. Mikroorganismes wat korrosie veroorsaak het 'n beperkte omgewing waarin hulle kan groei, maar indien een soort nie onder die omstandighede kan groei nie, sal 'n ander soort wel daartoe instaat wees. Aangesien mikrobiële korrosie geassosieer word met chemiese korrosie, skaalvorming en ander mikrobiële slymmassas, word roetine waarnemings bemoeilik. Verder kon hierdie organismes anaëroë toestande daarstel vir sulfaatreducerende bakterieë (organismes wat hoofsaaklik betrokke is by korrosie van metale en ook primêr bestudeer word). SRB kan dus in assosiasie met *Gallionella* spesies, *Pseudomonas* spesies en *Sphaerotilus* spesies groei. *Pseudomonas*, sowel as ander slymvormers en filamentbakterieë, is egter die oorheersende spesie in industriële water sisteme en veroorsaak dus korrosie deurdat dit ideale toestande daar stel vir SRB en ander korrosie veroorsakende bakterieë.

Direkte ondersoeke van bakterieë in industriële watersisteme (Costerton en Lashen, 1984:13) toon dat hulle aangepas is om op dieselfde manier te groei in aangehegde biofilms wat predominant is in natuurlike watersisteme. Die selle groei en reproduseer op die oppervlakte van metale en verhoog die biomassa en geassosieerde materiaal en vorm 'n gestruktureerde verskynsel. Bakterieë in hierdie beskermde manier van groei, produseer planktoniese selle met 'n verlaagde kans vir oorlewing. Hierdie losgeraakte planktoniese selle kan weer oppervlakte koloniseer of kan groot planktoniese populasies vorm in daardie skaars omgewings waar voedingstowwe baie is en bakteriese antagoniste min.

Naakte planktoniese organismes in suiwer kulture is egter nie verteenwoordigend van eintlike korrosie veroorsakende bakterieë nie. Hulle verteenwoordig slegs daardie klein gedeelte, van die aktiewe sessiele populasie van korrosie veroorsakende bakterieë wat losgekom het vanaf die biofilm. Die dominante populasie in industriële vloeisisteme groei binne aangehegde biofilms (Costerton en Lashen, 1984:13). Bakteriese korrosie word dus hoofsaaklik veroorsaak deur sessiele bakterieë wat onder dik biofilm lewe en bestaan uit aëroë en

fakultatief anaërobe bakterieë wat vasgevang is in veselagtige anioniese uitruilgebiede wat die binnedringing van gelaaiete molekules beperk. Behandeling van sisteme t.o.v. bakterieë is gewoonlik gerig teen planktoniese selle. Hierdie behandeling sal egter nie die sessiele bakterieë baie beïnvloed nie en min uitwerking toon t.o.v. biofilmvorming.

Die mikroorganismes wat in hierdie ondersoek geïsoleer en geïdentifiseer is, het baie ooreengestem met die wat in die literatuur genoem word (vgl. 1.3.1.) en geassosieer word met biofilms. Hier kan dus duidelik waargeneem word dat die planktoniese selle wat geïsoleer en geïdentifiseer is, afkomstig was vanaf die omgewing, maar ook vanaf moontlike biofilms wat in die sisteme voorkom. Hierdie organismes kan dus verteenwoordigend wees van korrosieveroorsakende bakterieë en dus die primêre rede wees vir die probleme ondervind deur AEK (UKOR). Die bakterieë kan dus sekondêre bakteriële groei aanhelp deur die kombinasie van bakteriële kontaminante en anaërobe toestande wat groot probleme sal veroorsaak indien daar nie reg opgetree word nie, veral as in ag geneem word dat mikrobes in die natuur in ewig met mekaar saamlewe, maar sodra ongewenste toestande voorkom, sal sommige ten koste van ander oorlewe.

Korrosie is 'n komplekse verskynsel en selde is slegs 'n enkele meganisme of spesie betrokke.

4.6. Gevolgtrekking.

Tydens hierdie studie is daar 'n verskeidenheid verplig aërobe en fakultatief anaërobe bakterieë geïsoleer wat afkomstig was van verskeie verkoelingsisteme ('n koeltoring, kondenseerder en twee sproeiërs) van AEK(UKOR) wat korrosie probleme ondervind het. Hierdie bakterieë is geïdentifiseer tot op spesievlak deur gebruik te maak van fenotipiese toetse. Verder is daar van die konvensionele voedingsagar as primêre isolasiemedium weg beweeg deur dit te vervang met verkoelingswater. Die stap is uitgevoer omdat daar gepoog is om soveel as moontlik verteenwoordigende bakterieë, wat moontlik probleme veroorsaak het, te isoleer. Geaktiveerde slykekstrakagar is hierna gebruik as sekondêre isolasiemedium en ook vir suiwering, aangesien hierdie medium 'n goeie plaasvervanger was vir verkoelingswateragar wat nie beskikbaar sou wees in die Potchefstroom laboratorium nie. GSE-agar het min bygevoegde energiebronne bevat en was dus ook 'n voedingstofarmmedium. Hierdie medium was baie min selektief en het voldoen aan die vereistes vir 'n plaasvervanger.

'n Groot verskeidenheid Gram-negatiewe bakterieë is geïsoleer en geïdentifiseer waarvan *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Xanthomonas* en *Flavobacterium* spesies die meeste voorgekom het. Daar is nog verskeie ander Gram-negatiewe genera geïsoleer, maar bg. was die hoofsaamstelling. Baie Gram-positiewe *Bacillus* spesies is ook geïsoleer asook enkele Gram-positiewe kokke. Hierdie isolasies het baie ooreengestem met vorige navorsingswerk en daar kan dus die volgende gevolgtrekkings gemaak word:

i) *Pseudomonas* spesies is bekende slymvormers, sowel as *Flavobacterium* spesies en daar kan aanvaar word dat hulle groot massas slym in die verkoelingsisteme geproduseer het. Die ander geïsoleerde spesies kon dus in assosiasie saam met hulle gelewe het. Hierdie slymmassas kan anaërobe toestande daarstel wat baie gunstig vir SRB en ander sekondêre korrosieveroorsakende mikroörganismes is. Primêr het hierdie planktoniese selle dus gunstige korrosie toestande geskep deurdat hulle die vermoë besit om aan omtrent enige voorwerp vas te heg, het hulle biofilmvorming ook gefinisieer en gevestig. Aangesien sisteem-behandeling teen planktoniese selle gerig is, is die sessiele populasie omtrent onaangeraak en is die korrosieprobleem en energieverliese geensins verbeter nie.

ii) *Bacillus* spesies besit die vermoë om endospore te vorm en kan dus vir lang tydperke oorlewe tydens ongunstige toestande. Daarmee saam besit *Bacillus* spesies ook die vermoë om hitteweerstandbiedend te wees en kan dus redelike uiterste toestande oorlewe. *Bacillus* spesies kan dus teenwoordig wees, in assosiasie met van die ander geïsoleerde bakterieë in die verkoelingsisteme en aanleiding tot biofilmvorming gee en dus uiteindelik korrosieprobleme.

iii) Daar was dus genoeg voedingstowwe in die verkoelingsisteme teenwoordig om hierdie geïsoleerde bakterieë se groei te ondersteun sodat slymvorming en biofilmontwikkeling kon plaasvind ten spyte van goed beheerde biosied behandeling van die verkoelingsisteme.

iv) Die isolate moes 'n indirekte rol gespeel het in die korrosieproses, deurdat hulle verlaagde suurstofkonsentrasies op die metaaloppervlaktes veroorsaak het en gunstige toestande geskep het vir die anaërobe korrosieveroorsakende bakterieë, aangesien hulle opsigself nie korrosie veroorsaak nie.

v) Die probleem kan verbeter word deur gebruik te maak van die Robbins toestel vir die steriele isolasie en bestudering van die biofilm self. Bestudering van hierdie geïsoleerde biofilmbakterië, asook biosied werking daarop kan help met toekomstige korrosie probleme. Aangesien hierdie ondersoek baie dieselfde bakterië geïsoleer en geïdentifiseer het as wat vorige navorsers gedoen het, kan daar tog met sukses van die planktoniese populasies gebruik gemaak word as primêre verwysing vir die moontlike bakterië wat in die biofilm, in die spesifieke probleem gebied in die verkoelingsstelsel, voorkom. Dit is moeilik om biofilms in die laboratorium te bestudeer, omdat die presiese toestande, bv. temperatuur, watervloei, omgewingsfaktore, ens. nie so absoluut verteenwoordigend uitgevoer kan word nie en slegs 'n moontlike model daarstel wat verteenwoordigend is van die populasies in die probleemstelsel. Wanneer dit in ag geneem word, verskaf die identifikasie van planktoniese populasies wel relatiewe akkurate inligting wat kan help met die keuse van biosied behandeling sowel as ander anti-mikrobiële middels.

Daar moet altyd in ag geneem word dat korrosie nie 'n eenvoudige proses behels nie, maar baie kompleks is en selde slegs een enkele meganisme of spesie betrek.

BIBLIOGRAFIE

- ABBOTT, B.J., LASKIN, A.I. & MCCOY, C.J. 1973. Growth of *Acinetobacter calcoaceticus* on ethanol. *Applied microbiology*, 25:787-792.
- AFTRING, R.P. & TAYLOR, B.F. 1979. Assessment of microbial fouling in an ocean thermal energy conversion experiment. *Applied and environmental microbiology*, 38:734-739.
- ARNOLD, D.M. 1985. Sulphate reducing bacteria...Corrosion a cause for concern. *Water and waste treatment*, 28:20- ..
- BAND, J.D., LAVENTURE, M., DAVIS, J.P., MALLISON, G.F., SKALIY, P., HAYES, P.S., SCHELL, W.L., WEISS, M., GREENBERG, D.J. & FRASER, D.W. 1981. Epidemic Legionnaires' disease. *JAMA*, 245:2404-2407.
- BOOTH, G.H. 1971. Microbiological corrosion. London : Mills & Boon. 61p.
- BROCK, T.D. 1979. Biology of microorganisms, 3rd ed London : Prentice/Hall International. 802p.
- BRYERS, J. & CHARACKLIS, W. 1981. Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics. *Water research*, 15:483-491.
- BUCHANAN, J.D. & GIBBONS, N.E. 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore : The Williams & Wilkins Co. 1268p.
- BURRIS, R.H. 1974. Methodology. (In Quispel, A., red. The biology of nitrogen fixation. New York : Elsevier. p.9-33.)
- CHARACKLIS, W.G., TRULEAR, M.G., BRYERS, J.D. & ZELVER, N. 1982. Dynamics of biofilm processes: methods. *Water research*, 16:1207-1216.
- CHARACKLIS, W.G. & COOKSEY, K.E. 1983. Biofilms and microbial fouling. *Advances in applied microbiology*, 29:93-138.
- CLOWES, R.C. & HAYES, W. 1968. Experiments in microbial genetics. Oxford : Blackwell Scientific Publications. 244p.

- COOKSEY, K.E. 1981. Requirement for calcium adhesion of a fouling diatom to glass. *Applied and environmental microbiology*, 41:1378-1382.
- COPENHAGEN, W.J. 1950. The pathology of metals. *Metal industry*, 9:137.
- COSTERTON, J.W., GEESEY, G.G. & CHENG, K.J. 1978. How bacteria stick. *Scientific American*, 238 : 86-95.
- COSTERTON, J.W. & GEESEY, G.G. 1979. Which populations of aquatic bacteria should we enumerate? (In Costerton, J.W. & Colwell, R.R., eds. Native aquatic bacteria: enumeration, activity and ecology. Philadelphia : American Society for testing and materials. p.7-18.)
- COSTERTON, J.W., IRVIN, R.T. & CHENG, K.J. 1981. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annual review of microbiology*, 35:299-324.
- COSTERTON, J.W. & LASHEN, E.S. 1984. Influence of biofilm on efficacy of biocides on corrosion-causing bacteria. *Materials performance*, p.13-17.
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M. & MARRIE, T.J. 1987. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology*, 41:435-464.
- CORDES, L.G., WIESENTHAL, A.M., GORMAN, G.W., PHAIR, J.P., SOMMERS, H.M., BROWN, A., YU, V.L., MAGNUSSEN, M.H., MEYER, R.D., WOLF, J.S., SHANDS, K.N. & FRASER, D.W. 1981. Isolation of *Legionella pneumophila* from hospital shower heads. *Annals of internal medicine*, 94:195-197.
- COWAN, S.T. & LISTON, J. 1974. The mechanism of identification. (In Buchanan, R.E. & Gibbons, N.E., eds. Bergey's manual of determinative bacteriology, 8th ed. Baltimore : The Williams & Wilkins Co., 1268p.)
- COWAN, S.T. 1981. Cowan and Steel's manual for the identification of medical bacteria, 2nd ed. Cambridge : Cambridge Press. 238p.

- CROMBIE, D.J., MOODY, G.J. & THOMAS, J.D.R. 1980. Corrosion of iron by sulphate-sulphate-reducing bacteria. *Chemistry and industry (London)*, 12:500-504.
504.
- CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, R.H.A. 1970. Medical microbiology: a guide to the laboratory diagnosis and control of infection, 11th ed. Edinburg : Churchill Livingstone. 587p.
- DONDERO, T.J., ROBERT, M.D., RENDTORFF, R.C., MALLISON, G.F., WEEKS, R.M., LEVY, J.S., WONG, E.W. & SCHAFFNER, W. 1980. An outbreak of Legionnaires' disease associated with a contaminated air-conditioning cooling tower. *The new England journal of medicine*, 302:365-370.
- DUNSTALL, T.G. & SCHWARZ, C.J. 1983. Effects of temperature elevation and entrainment on heterotrophic uptake of (U^{14} -C)Glutamic acid. *Water research*, 17:1847-1853.
- FARQUHAR, G.J. & BOYLE, W.C. 1971. Identification of filamentous microorganisms in activated sludge. *Journal of water pollution control federation*, 43:604-622.
- FLETCHER, M. & FLOODGATE, G.D. 1973. An electron-microscopic demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surfaces. *Journal of general microbiology*, 74:325-334.
- FLIERMANS, C.B., CHERRY, W.B., ORRISON, L.H. & THACKER, L. 1979. Isolation of *Legionella pneumophila* from nonepidemic related aquatic habitats. *Applied and environmental microbiology*, 37:1239-1242.
- FLIERMANS, C.B., CHERRY, W.B., ORRISON, L.H., SMITH, S.J., TISON, D.L. & POPE, D.H. 1981. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology*, 41:9-16.
- FLIERMANS, C.B., BETTINGER, G.E. & FYNISK, A.W. 1982. Treatment of cooling systems containing high levels of *Legionella pneumophila*. *Water research*, 16 : 903-909.

- FLIERMANS, C.B. & HARVEY, R.S. 1984. Effectiveness of 1-Bromo-3-Chloro-5,5-Dimethylhydantoin against *Legionella pneumophila* in a cooling tower. *Applied and environmental microbiology*, 47:1307-1310.
- FRAAS, A.P. & OZISIK, M.N. 1965. Heat exchanger design, New York: John Wiley & Sons. 386p.
- GEESEY, G.G., RICHARDSON, W.T., YECMANS, H.G., IRVIN, R.T. & COSTERTON, J.W. 1977. Microscopic examination of natural sessile bacterial populations from an alpine stream. *Canadian journal of microbiology*, 23:NOTES.
- GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N., NESTER, E.W., WOOD, W.A., KRIEG, N.R. & PHILLIPS, G.B. 1981. Manual of methods for general bacteriology, 2nd ed. Washington D.C. : American society for microbiology. 524p.
- HAMILTON, W.A. 1985. Sulphate-reducing bacteria and anaerobic corrosion. *Annual review of microbiology*, 35:195-217.
- HARRIGAN, W.F. & McCANCE, M.E. 1966. Laboratory methods in microbiology, 2nd ed. London : Academic Press. 362p.
- HAYAT, M.A. 1972. Principles and techniques of electron microscopy. New York : Van Nostrand Reinhold Company. 296p.
- IVERSON, W. 1987. Microbial corrosion of metals. *Advances in applied microbiology*, 32:1-36.
- JONES, J.G. 1983. A note on the isolation and enumeration of bacteria which deposit and reduce ferric iron. *Journal of applied bacteriology*, 54 : 305-310.
- KINNER, N.E., BALKWILL, D.L. & BISHOP, P.L. 1983. Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 45:1659-1669.

- KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Baltimore : Williams & Wilkins. 964p. (vol.1.)
- KUCETA, J.M., STATES, S.J., MCNAMARA, A.M., WADOWSKY, R.M. & YEE, R.B. 1983. Susceptibility of *Legionella pneumophila* to chlorine in tap water. *Applied and environmental microbiology*, 46:1134-1139.
- KURTZ, J.B., BARTLETT, C.L.R., NEWTON, U.A., WHITE, R.A. & JONES, N.L. 1982. *Legionella pneumophila* in cooling water systems. *Journal of hygiene, Cambridge*, 88:369-381.
- LECHEVALLIER, M.W., BARCOCK, T.M. & LEE, R.G. 1987. Examination and characterization of distribution system biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 53:2714-2724.
- LEE, S.H., O'CONNOR, J.T. & BANERJI, S.K. 1980. Biologically mediated corrosion and its effects on water quality in distribution systems. *Journal American water works association*, 72:636-645.
- LITTLE, B., WAGNER, P., GERCEAKOV, S.M., WALCH, M. & MITCHELL, R. 1986. The involvement of a thermophilic bacterium in corrosion processes. *National association of corrosion engineers*, 42:533-536.
- LUTEY, R. 1980. Microbiological corrosion. *Corrosion/80*, March 3-7, 1980/Palmer House/Chicago, Illinois. National association of corrosion engineers, Paper no. 39.
- MARA, D.D. & WILLIAMS, D.J.A. 1971. Polarization studies of pure Fe in the presence of hydrogenase-positive microbes I. Non-photosynthetic bacteria. *Corrosion science*, 11:895-900.
- MARSHALL, K.C., STOUT, R. & MITCHELL, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *Journal of general microbiology*, 68:337-348.
- MARSZALEK, D.S., GERCHAKOV, S.M. & UDEY, L.R. 1979. Influence of substrate composition on marine microfouling. *Applied and environmental microbiology*, 38:987-995.

MCCOY, W.F., BRYERS, J.D., ROBBINS, J. & COSTERTON, J.W. 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Canadian journal of microbiology*, 27:910-917.

MCCOY, W.F. & COSTERTON, J.W. 1982. Growth of sessile *Sphaerotilus natans* in a tubular recycle system. *Applied and environmental microbiology*, 43:1490-1494.

MILLER, P.C. & BOTT, T.R. 1982. Effects of biocide and nutrient availability on microbial contamination of surfaces on cooling-water systems. *Journal of chemical technical biotechnology*, 32:538-546.

MORRIS, G.K., PATTON, C.M., JAMES, C.F., SCOTT, E.J., GORMAN, G., MARTIN, W.T., SKALIY, P., MALLISON, G.F., POLITI, B.D. & MACKEL, D.C. 1979. Isolation of the Legionnaires' disease bacterium from environmental samples. *Annals of internal medicine*, 90:664-666.

NORRIS, J.R. 1959. Isolation and identification of *Azotobacters*. *Laboratory practices*, 8 : 239-243.

OBUEKWE, C.O., WESTLAKE, D.W.S., COOK, F.D. & COSTERTON, J.W.. 1981. Surface changes in mild steel coupons from the action of corrosion-causing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 41:766-774.

ORRISON, L.H., CHERRY, W.B., FLIERMANS, C.B., DEES, S.B., MCDUGAL, L.K. & DODD, D.J. 1981. Characteristics of environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Applied and environmental microbiology*, 42:109-115.

PEDERSEN, K. 1982. Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. *Applied and environmental microbiology*, 43:6-13.

POPE, D.H., SORACCO, R.J. & WILDE, E.W. 1982. Studies on biologically induced corrosion in heat exchanger systems at the Savannah River plant, Aiken, SC. *Materials performance*, 7:43-50.

PRAKASAM, T.B.S. & DONDERO, N.C. 1967. Aerobic heterotrophic bacterial populations of sewage and activated sludge. *Applied and environmental microbiology*, 15:461-467.

- PUCKORIUS, P.R. 1978. Controlling corrosive microorganisms in cooling-water systems. *Chemical engineering*, 85:171-174.
- PUGH, W.H.A. 1982. Microbial fouling of pipelines. *Corrosion prevention and control (Beaconsfield, UK)*, 29:8-10.
- RICHARDSON, D.S. 1982. Cooling-water system biofouling. *Chemical engineering*, 89:103-104.
- SCHIFFRIN, D.J. & DE SANCHEZ, S.R. 1985. The effect of pollutants and bacterial microfouling on the corrosion of copper base alloys in seawater. *Corrosion*, 41:31-38.
- SEELEY, H.W. & VANDEMARK, P.J. 1962. *Microbes in action*, San Francisco : W.H. Freeman & Co., 447p.
- SKERMAN, V.B.D. 1967. *A guide to the identification of the genera of bacteria*, 2nd ed. Baltimore : Williams & Wilkins. 672p.
- SNEATH, P.E.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. en HOLT, J.S., eds. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Baltimore : Williams and Wilkins. 1599p. (vol.2.)
- SORACCO, R.J., GILL, H.K., FLIERMANS, C.B. & POPE, D.E. 1983. Susceptibilities of algae and *Legionella pneumophila* to cooling tower biocides. *Applied and environmental microbiology*, 45:1254-1260.
- STANLEY, P.M. 1983. Factors affecting the irreversible attachment of *Pseudomonas aeruginosa* to stainless steel. *Canadian journal of microbiology*, 29 : 1493-1499.
- STARR, M.P., STOLP, H., TRUPER, H.G., BALOWS, A. en SCHEGEL, H.G. 1981. *The procaryotes. A handbook of habitats, isolation and identification of bacteria*. Berlin : Springer-Verlag. 2284p. (vol.1 & 2)

- TATNALL, R.E. 1981 Fundamentals of bacteria induced corrosion, *Materials performance*, 6:32-38.
- TAYLOR, J. & PARKES, R.J. 1983. The cellular fatty acids of the sulphate-reducing bacteria, *Desulfobacter* sp., *Desulfobulbus* sp., and *Desulfovibrio desulfuricans*. *Journal of General microbiology*, 29:3303-3309.
- TISON, D.L., POPE, D.E., CHERRY, W.B. & FLIERMANS, C.B. 1980. Growth of *Legionella pneumophila* in association with blue-green algae (Cyanobacteria). *Applied and environmental microbiology*, 39:456-459.
- TOBIN, J.O'H., SWANN, R.A. & BARTLETT, C.L.R. 1981. Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems : methods and preliminary results. *British medical journal*, 282:515-517.
- TRULEAR, M.G. & CHARACKLIS, W.G. 1982. Dynamics of biofilm processes. *Journal of water pollution control federation*, 54:1288-1301.
- UHLIG, H.H. 1967. Corrosion and corrosion control, 4th ed. New York : John Wiley and Sons Inc. 371p.
- VICTOREEN, H.T. 1984. Controlling corrosion by controlling bacterial growth. *Journal of American water works association*, 76:87-89.
- WAKERLEY, D.S. 1979. Microbial corrosion in UK industry ; a preliminary survey of the problem. *Chemistry and industry (London)*, 19:656-658.
- WOLF, J. & BARKER, A.N. 1968. The genus *Bacillus*: Aids to the identification of its species. (In Gibbs, B.M. & Shapton, D.A., eds. Identification methods for microbiologists. New York : Academic press. p.93-109.)
- ZOBELL, C.E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of bacteriology*, 46:39-59.