

Vasstelling van die bakteriese profiel van 'n rietbedding op die terrein van 'n industriële aanleg

**Terina Vermeulen
B.Sc.**

**Skripsie voorgelê ter gedeeltelike voldoening aan die vereistes vir die graad
Magister Scientiae in Biotegnologie in die Fakulteit Natuurwetenskappe
aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.**

Studieleier: Prof. P.J. Pretorius

**Potchefstroom
Mei 1996**

Science is more than just a collection of accurate observations and shrewd generalizations. The great achievements of modern science comes from a combination of empiricism and experimentation on the one hand, and careful analysis and deductive reasoning on the other.

Aan my ouers

INHOUDSOPGAWE

Bladsy

ABSTRACT	iv
OPSOMMING	vi
 HOOFSTUK 1: INLEIDING	 1
 HOOFSTUK 2: LITERATUUROORSIG	
2.1 Inleiding	3
2.2 Tipes besoedeling en die gevolge daarvan	3
2.3 Watersuiweringsmetodes tans in gebruik	5
2.4 Rietbeddings	7
2.4.1 Kenmerke van 'n rietbed	7
2.4.2 Samestelling en bou	7
2.4.3 Werking	9
2.4.4 Verskillende tipes rietbeddings	10
2.4.5 Toepassings en gebruike van rietbeddings	11
2.4.6 Voordele van rietbeddings	12
2.4.7 Tekortkominge van rietbeddings	14
2.5 Prosesse van die stikstofkringloop	15
2.5.1 Nitrifisering	15
2.5.2 Denitrifisering	16
2.6 Probleemstelling, doelstelling en benaderingswyse	17
 HOOFSTUK 3: KWANTIFISERING EN IDENTIFISERING VAN BAKTERIEë	
3.1 Inleiding	18
3.2 Eksperimenteel	19

3.2.1	Beskrywing van die rietbed	19
3.2.2	Monstername	19
3.2.3	Totale bakteriese getalle	20
3.2.4	Kwantifisering van denitrifiseerders	20
3.2.5	Kwantifisering van denitrifiseerders	20
3.2.6	Identifikasie van geïsoleerde bakterieë	21
3.2.6.1	Kleurings	21
3.2.6.2	Transmissie elektronmikroskopie (TEM)	22
3.2.6.3	Fenotipiese toetse	22
3.3	Resultate	23
3.3.1	Totale hoeveelheid bakterieë	23
3.3.2	Kwantifisering van nitrifiseerders	27
3.3.3	Kwantifisering van denitrifiseerders	31
3.3.4	Gemiddelde aantal bakterieë oor die vier seisoene	34
3.3.5	Identifikasie van geïsoleerde bakterieë	40

HOOFSTUK 4: BAKTERIEë VAN DIE STIKSTOFKRINGLOOP

4.1	Inleiding	42
4.2	Eksperimenteel	43
4.2.1	Oorkruisuitstryk	44
4.2.2	Skudkulture	45
4.2.2.1	Toets vir nitriet en nitraat	46
4.3	Resultate	47
4.3.1	Oorkruisuitstryk	47
4.3.2	Skudkulture	48
4.4	Samevatting	52

HOOFSTUK 5: BESPREKING

5.1	Inleiding	53
5.2	Kwantifisering en identifisering van bakterieë	53
5.2.1	Totale bakteriese getalle	53
5.2.2	Kwantifisering van nitrifiseerders	56

5.2.3 Kwantifisering van denitrifiseerders	59
5.3 Bakterieë van die stikstofkringloop	60
5.4 Slot	62
AFKORTINGSLYS	64
LITERATUURVERWYSINGS	65
BEDANKINGS	70
BÿLAAG	71

ABSTRACT

A reedbed installed on the premises of Naschem near Potchefstroom to serve as a tertiary treatment of an effluent was the subject of this study. The effluent consists mainly of sewage water and water from a laundry where the clothes of the employees of the explosive plant are washed.

This study is part of a more comprehensive programme to determine the bacterial profile of a constructed reedbed and to identify the factors influencing it, to determine possible tendencies and to make a contribution towards optimising the use of reedbeds as a system for treating various effluents.

The emphasis in this study was to determine the number of bacteria, the number of nitrifying and denitrifying bacteria of the four seasons of a year. Different zones - stagnant, slow and fast moving water - were distinguished in the first ten meters of the reedbed and analyzed with regard to the above-mentioned bacteria. Total bacterial counts were done at 20°C and 37°C on plate count agar (PCA). Nitrifiers were isolated on ammonia agar and nitrite agar and denitrifiers in nitrate broth. Representative isolated bacteria were grouped according to primary identification tests. According to "*Bergeys's Manual of Systematic Bacteriology*" the majority of the bacteria belongs to Sections 4 and 5 and the rest to Section 3 (Krieg *et al.*, 1984) and Sections 12 and 14 (Sneath *et al.*, 1986).

The expected relationship between temperature and bacterial numbers counted at 20°C and 37°C on PCA was observed. At 37°C an increase in numbers was observed with increase in temperature while the opposite was true at 20°C. In agreement with the literature it was observed that the numbers of nitrifying bacteria was the lowest during winter. A clear relationship between the numbers of nitrifying bacteria and the ammonia concentration was, however, not observed. A more significant correlation was observed between the number of denitrifying bacteria and the nitrate concentration in the water. It was shown with the aid of a cross-streak procedure that most probably mainly heterotrophic nitrifying bacteria was observed in this study.

Parts of this work was presented at the following meeting:

Van der Walt, A.M., Pieterse, A.J.H., Wood, A., Vermeulen, T., & Pretorius, P.J.
A Reedbed System for Secondary Treatment of Domestic Wastewater with an Industrial Component.

Biotechnology for Africa 95: All African Conference on Biotechnology, University of Pretoria, November 1995.

OPSOMMING

'n Rietbed op die perseel van Naschem naby Potchefstroom is tydens die studie ondersoek. Hierdie rietbed is aangelê met die doel om as tersiêre behandeling van 'n uitvloeisel te dien en is na 'n bioreaktor aangelê. Die uitvloeisel bestaan hoofsaaklik uit rioolwater en water vanaf die wassery waar die klere van die werkers van die plofstofaanleg gewas word.

Hierdie studie maak 'n deel uit van 'n meer omvattende ondersoek om die bakteriese profiel van 'n gekonstrueerde rietbed te bepaal en om die faktore wat dit beïnvloed te identifiseer, moontlike tendense vas te stel en 'n bydrae tot die optimalisering van die gebruik van rietbeddings as 'n behandelingsstelsel vir 'n verskeidenheid uitvloeiels te maak.

In hierdie studie het die klem geval op bepaling van die totale aantal bakterieë, die aantal nitrifiseerders en denitrifiseerders oor die vier seisoene van 'n jaar. Verskillende sones, naamlik stilstaande, stadig- en vinnigvloeiende water is in die eerste tien meter van die rietbed onderskei en is ondersoek ten opsigte van bogenoemde bakterieseë. Totale bakteriese tellings is by 20°C en 37°C op plaattellingsagar (PTA) gedoen. Nitrifiseerders is op ammoniak- en nitrietagar geïsoleer en denitrifiseerders in nitraatsop. Die bakterieë wat geïsoleer is, is met behulp van primêre identifikasietoetse in groepe ingedeel. Volgens "*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*" het die meeste bakterieë tot Seksie 4 en 5 behoort en die res tot Seksie 3 (Krieg *et al.*, 1984) en Seksie 12 en 14 (Sneath *et al.*, 1986).

Die verwagte verband tussen temperatuur en die bakteriese getalle wat by 20°C en 37°C op PTA geïsoleer is, is waargeneem. By 37°C het die bakteriese getalle gestyg sodra die temperatuur toegeneem het en andersom en by 20°C het die bakteriese getalle toegeneem sodra die temperatuur gedaal het. In ooreenstemming met die literatuur is waargeneem dat die getalle nitrifiseerders in die wintermaande hoër is as in die somermaande. Daar is egter nie 'n baie duidelike verband tussen die aantal nitrifiseerders en die ammoniakkonsentrasie in die water waargeneem nie, maar dit

wou tog voorkom asof daar 'n positiewe korrelasie was. 'n Meer beduidende korrelasie is waargeneem tussen die hoeveelheid denitrifiseerders en die nitraatkonsentrasie. Met behulp van 'n oorkruisuitstryktegniek is aangetoon dat heel waarskynlik hoofsaaklik heterotrofe nitrifiserende bakterieë in hierdie ondersoek waargeneem is.

Gedeeltes van hierdie werk is by die volgende plaaslike kongres voorgedra:

Van der Walt, A.M., Pieterse, A.J.H., Wood, A., Vermeulen, T., & Pretorius, P.J.
A Reedbed System for Secondary Treatment of Domestic Wastewater with an Industrial Component.

Biotechnology for Africa 95: All African Conference on Biotechnology, Universiteit van Pretoria, November 1995.

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die belangrikheid van water op aarde en die mens se afhanklikheid daarvan kan nie genoeg beklemtoon word nie. Ten spyte hiervan oefen die mens groot druk uit op die beskikbare watervoorraad en is dit vinnig besig om 'n skaars hulpbron te word. Verskeie pogings is al aangewend om besoedeling te verminder, om bestaande waterbronne te beskerm teen besoedeling en om water vir hergebruik te suiwer. Die koste verbonde aan laasgenoemde alleen beloop astronomiese bedrae en die praktiese uitvoerbaarheid daarvan skep soms groter probleme. So byvoorbeeld het ontwikkelende gebiede 'n probleem met rioolbehandeling omdat doeltreffende geriewe ontbreek (Simpson, 1982). Baie van die gebiede is verafgeleë wat onderhoud van duur en ingewikkelde tegnologiese apparaat bemoeilik. Tegnies opgeleide personeel ontbreek dikwels in meeste van die gevalle of moet deur 'n opvoedings- en opleidingsproses voorafgegaan word. Op hierdie gebied kan rietbeddings en gekonstrueerde vleilande van onberekenbare waarde wees (Simpson, 1982), want dis 'n lae tegnologie sisteem met min onderhoud (Wood, 1989). Die stelsel is aanpasbaar en kan uitgebrei word indien omstandighede dit sou verlang. Geen duur of ingevoerde onderdele en toerusting word vir rietbeddings benodig nie en die kapitale koste is laag (Simpson, 1982).

Hoewel rioolstelsels en veilige watervoorsiening vandag algemeen in geïndustrialiseerde lande aangetref word (Simpson, 1982), is dit noodsaaklik dat tegnologieë ontwikkel word wat daarop gemik is om die koste van die behandeling van water op alle vlakke te verminder (Nichols, 1992). Dit is dus nie net ontwikkelende lande wat by sulke tegnologieë kan baat nie, maar ook 'n verskeidenheid industrieë op alle vlakke omdat rietbeddings op die perseel aangebring kan word (Bowmer, 1987) en verskeie tipes uitvloeisels kan behandel (Bayes *et al.*, 1989).

Die uitset van die meeste behandelingsisteme word gereeld gemoniteer, maar die bio-gechemiese prosesse wat die waterkwaliteit beïnvloed word selde bestudeer.

Vleilandbiogeochemie sluit 'n komplekse interaksie tussen hidrologie, plantegroei, grond en mikrobiële prosesse in. Hierdie prosesse moet heeltemal begryp word as 'n rietbed effektief ontwerp en bestuur wil word. Mikrobiële prosesse is essensieel vir die funksionering van natuurlike en gekonstrueerde vleilande. Hierdie prosesse sluit die afbraak van organiese verbindings en die mineralisering van nutriënte, degradering van organiese besoedelingstowwe en denitrifisering in. Mikrobiële prosesse is streng verwant aan die grond, grond- en hidrologiese parameters en kan as geïntegreerde indikatore van die doeltreffende funksionering van 'n ekosisteem beskou word (Duncan *et al.*, 1994).

Rietbeddings sluit grond, water, plante en ander biotiese komponente in en kennis van die eienskappe van elke komponent is essensieel vir die doeltreffende bestuur van 'n rietbed (Wood, 1989). Dit is dus noodsaaklik om die prosesse te verstaan wat betrokke is by die werking van die rietbed om sinvolle aanbevelings oor die ontwerp en bestuur van rietbeddings te kan maak (Butler *et al.*, 1990).

Hierdie studie was daarop gerig om 'n bydrae te maak tot die kennis van die bakteriese profiel van 'n gekonstrueerde rietbed. As deel van hierdie doelwit is die bakteriese getalle, naamlik totale populasies, nitrifiseerders en denitrifiseerders, in 'n gekonstrueerde rietbed oor die vier seisoene van 'n jaar gemoniteer (Hoofstuk 3). In die werk wat in Hoofstuk 4 beskryf word, is groter klem gelê op die bakterieë van die stikstofkringloop en die funksie wat hulle verrig tydens die verwydering van die stikstofverbindings uit die water in die rietbed. Die skripsie sluit in Hoofstuk 5 af met die bespreking van die resultate.

HOOFSTUK 2

LITERATUUROORSIG

2.1 Inleiding

“Because of the essential role played by water in supporting human life it also has, if contaminated, great potential for transmitting a wide variety of diseases and illness.” (Tebbutt, 1992.)

Hierdie aanhaling beklemtoon die belangrikheid van water vir die voortbestaan van lewe op aarde en daarom is dit noodsaaklik dat waterbesoedeling beperk en waterhulpbronne beskerm en optimaal benut moet word.

In hierdie hoofstuk word waterbesoedeling kortliks en in die algemeen bespreek om 'n breë oorsig van die huidige toedrag van sake te kry. Verskillende tipes besoedeling word bespreek, met enkele voorbeelde toegelig en die gevolge van besoedeling word vervolgens beklemtoon asook die impak wat dit op die omgewing het. Die bespreking van watersuiwering sluit 'n oorsig van die suiweringsmetodes in wat tans in gebruik is. Deur die jare se bestudering van watersuiweringsmetodes het dit mettertyd duidelik geword dat veral ontwikkelende gebiede 'n probleem met rioolbehandeling het omdat doeltreffende geriewe ontbreek. Op hierdie gebied kan rietbeddings en gekonstrueerde vleilande van onberekenbare waarde wees (Simpson, 1982). Daarom word 'n oorsig gegee van die kenmerke van 'n rietbed, die samestelling en bou van rietbeddings, asook die werking en funksies van die verskillende komponente daarvan. Verskillende tipes rietbeddings, die toepassings en gebruike daarvan en die voordele en tekortkominge van 'n rietbed word ook bespreek. Laastens word 'n oorsig van die stikstofkringloop gegee omdat enkele aspekte van hierdie siklus in hierdie studie ondersoek is.

2.2 Tipes besoedeling en die gevolge daarvan

In die geval van waterbesoedeling is dit belangrik om in gedagte te hou dat water wat in die natuur voorkom reeds 'n verskeidenheid kontaminante wat vanaf erosie, logings- en verweringsprosesse afkomstig is, bevat (Tebbutt, 1992). Volgens Sharpley & Meyer (1994) word soveel as 30 tot 50% van die aarde se vastelande deur nie-puntspesifieke besoedeling van erosie, kunsmis, insekdoders, organiese bemestingstowwe en rioolslyk geaffekteer. Benewens hierdie prosesse in die natuur,

veroorzaak menslike aktiwiteit ook omgewingsbesoedeling, want behalwe hierdie natuurlike kontaminante wat reeds in die water voorkom, word huishoudelike en industriële uitvloeisels tot die water toegevoeg (Tebbutt, 1992). Addisioneel tot die toenemende besoedeling as gevolg van die bevolkingsgroei, moet die industriële ontwikkeling hierdie bevolkingsgroei steun. Dit alles het gelei tot 'n nuwe dimensie in omgewingsbesoedeling, naamlik:

- a) die industriële produksie en verspreiding van chemikalieë wat nog nooit voorheen (of in baie klein hoeveelhede) in die biosfeer voorgekom het nie
- b) die gelokaliseerde konsentrasie en vrystelling van groot hoeveelhede chemikalieë, byvoorbeeld swaarmetale en radio-nukleotiede, wat voorheen in spoorelemente of lae konsentrasies in die biosfeer teenwoordig was
- c) die grootskaalse mobilisering en gevolglik verhoogde biobeskikbaarheid van toksiese chemikalieë wat voorheen ook net in klein hoeveelhede in die biosfeer teenwoordig was (Timmis *et al.*, 1994).

Enige watermassa is daartoe in staat om 'n sekere hoeveelheid besoedeling te assimileer sonder ernstige gevolge as gevolg van die verdunningseffek en die selfreinigingsvermoë van die water (Tebbutt, 1992). Die skielike storting van groot hoeveelhede xenobiotiese verbindings of die herlokalisering van 'n groot hoeveelheid natuurlike materiaal, kan die selfreinigingskapasiteit van die ekosisteem oorweldig en lei tot die akkumulering van besoedelingstowwe tot problematiese of selfs skadelike vlakke (Liu & Suflita, 1993). Besoedelingstowwe in akwatiese ekosisteme wat tans tot groot kommer aanleiding gee, is chemiese verbindings wat in groot hoeveelhede geproduseer word, die omgewing bereik en toksies vir akwatiese organismes is. 'n Verdere ernstige probleem is die moontlikheid van akkumulering van toksiese stowwe of karsinogene deur mikro-organismes oor lang tye van blootstelling. Hierdie verbindings word in organismes in die voedselketting gekonsentreer tot 'n hoër vlak as wat in die omgewing voorkom en dit bly vir lang periodes voortbestaan en veroorsaak dat omgewingskonsentrasies geleidelik toeneem (Ketchum *et al.*, 1978).

Die gevolg van industriële en huishoudelike uitvloeisels wat in natuurlike waterbronne gestort word, is dat die organiese inhoud van die water verhoog en die opgeloste suurstof (DO) vlakke verlaag. In bogenoemde toestande sal mikro-organismes vermeerder en mag dit veroorsaak dat toestande anaëroob en ongunstig word vir diere en hoër plante om in te leef. Behalwe vir die verlaagde DO-vlakke sal daar, af-

hangende van die verdunning, betekenisvolle toenames in opgeloste stowwe, organiese verbindings, nutriënte (byvoorbeeld stikstof en fosfate), kleur en troebelheid wees. Al bogenoemde faktore kan aanleiding tot ongewenste veranderinge in waterkwaliteit gee. Rivierbesoedeling is ongewens, nie slegs omdat dit waterbronne kontamineer nie, maar ook omdat dit addisionele ladinge op behandelingsaanlegte plaas, rekreasiegebruike beperk, die vislewe affekteer en 'n bron van reuke en estetiese probleme tot gevolg kan hê. Die addisionele besoedeling sal dus die aard van die water verander, asook die geskiktheid daarvan vir verskeie gebruike benadeel (Tebbutt, 1992). Die resultaat is dat beide grondproduktiwiteit en omgewingskwaliteit bedreig word (Sharpley & Meyer, 1994) en dit hou weer ekonomiese- en gesondheidsimplikasies vir die publiek in (Gadd & White, 1993).

Faktore wat oor die jare bygedra het tot besoedeling, byvoorbeeld die produksie van nutriëntryke afval asook 'n toename in die bevolkingsdigtheid, het daartoe gelei dat streng beheermaatreëls en standaarde vir die beheer en behandeling van afval noodsaaklik geword het (Wood & Hensman, 1989). Ten einde te verhoed dat enige vorm van lewe aan gevaar blootgestel of benadeel word as gevolg van besoedelde water, moet besoedeling tot die minimum beperk word en reeds besoedelde water, alvorens dit weer tot 'n natuurlike waterbron toegevoeg word, gesuiwer word.

2.3 Watersuiweringsmetodes tans in gebruik

Die bestuur van die kwaliteit van water het 'n belangrike deel van die bestuur van waterhulpbronne geword (Bayes *et al.*, 1989). Die hoofdoelstelling van waterbehandeling is om die besoedelde water só te suiwer dat dit met veiligheid weer gebruik of in riviere teruggepomp kan word. Standaarde vir uitvloeisels is dus so opgestel dat natuurlike waterbronne beskerm word indien 'n uitvloeisel weer in 'n rivier gestort sou word. Van die belangrikste parameters sluit chemiese suurstof aanvraag (COD), gesuspendeerde vastestowwe (SS), ammoniak, fosfate en bakteriologiese kwaliteit van die water in (Lötter, 1994).

Wat watersuiweringsmetodes betref, word daar hoofsaaklik drie hoofklasse onderskei. Eerstens is daar fisiese prosesse wat afhang van die fisiese eienskappe van die besoedelingstof, byvoorbeeld deeltjiegrootte, spesifieke gravitasie, viskositeit, ensovoorts. Voorbeelde van fisiese prosesse is sifting, sedimentasie, filtrasie en gasoordrag. Tweedens is dit chemiese prosesse wat gebaseer is op die chemiese eienskappe van die besoedelingstowwe of daar word gebruik gemaak van die chemiese eienskappe van chemikalieë wat bygevoeg word. Voorbeelde van chemiese prosesse is koagulasie,

presipitasie en ionuutruiling. Laastens is biologiese prosesse wat van biochemiese reaksies gebruik maak om opgeloste of kolloïdale deeltjies te verwyder. Aërobe biologiese prosesse sluit biologiese filtrasie en die geaktiveerde slykproses in. Anaërobe oksidasieprosesse word weer gebruik om organiese slyk en organiese uitvloeisels met hoë konsentrasies besoedelingstowwe te stabiliseer (Tebbutt, 1992).

Rioolstelsels en veilige watervoorsiening word vandag algemeen in geïndustrialiseerde lande aangetref. Die rykdom wat deur industrieë gegenereer word, verseker maksimum gerief aan die verbruiker omdat water in huise vryelik beskikbaar is, en riool en afvloeiwat deur rioolstelsels weggevoer word. Tegnies opgeleide personeel verseker ook die behoorlike ontwerp, werking en bestuur van hierdie sisteme. (Simpson, 1982). Ten spyte van die rykdom wat industrieë genereer, beklemtoon Force (soos aangehaal deur Nichols, 1992) tog die noodsaaklikheid van die ontwikkeling van tegnologieë wat daarop gemik is om die koste van behandeling van water op alle vlakke te verlaag. Soos Jones (soos aangehaal deur Nichols, 1992) dit stel, is die tegnologie om water te suiwer wel beskikbaar, maar die bevolkingsgroei oefen groot druk op die beperkte waterbronne uit, vandaar die noodsaaklikheid vir alternatiewe tegnologieë. Die probleem om bogenoemde fasiliteite in ontwikkelende gebiede te voorsien, is dat hoë standaarde van gesondheid en gerief binne 'n kort tydperk met beperkte hulpbronne en tegnies opgeleide mense bereik moet word (Simpson, 1982). Bevolkingsgroei sal vir die afsienbare toekoms voortduur en tans is daar geen globale oplossing vir die gepaardgaande omgewingsbesoedelingsprobleme nie. Die huidige bekamping van besoedeling en pogings om die omgewing te beskerm, is daarop gemik om die besoedelingstempo te vertraag en om effektiewer prosesse vir die behandeling van toksiese besoedelingstowwe te ontwikkel. Rietbeddings het die potensiaal om as een so 'n proses op te tree om besoedeling effektiewer te bekamp (Timmis *et al.*, 1994).

In ontwikkelende gebiede moet die metode van rioolbehandeling die gesondheidsgevaar van die finale afvloeï en slyk verminder tot aanvaarbare vlakke, geen reuke veroorsaak of as broeiplek vir siektes optree nie. Die stelsel moet aanpasbaar wees en uitgebrei kan word indien omstandighede dit sou noodsaak, geen duur of ingevoerde onderdele en toerusting benodig nie en 'n lae kapitale koste hê. Hierdie vereistes word nie deur konvensionele rioolbehandelingstelsels nagekom nie, want dis ontwerp om organiese verbindings en SS te verwyder voordat die riool behandel word (Simpson, 1982). Volgens Pirnie (soos aangehaal deur Nichols, 1992) sal daar in die toekoms baie aandag geskenk word aan die kwaliteit en hergebruik van water, asook aan die verwydering van biologiese nutriënte. Rietbeddings en die konsep van

kunsmatig gekonstrueerde vleilande beskik oor die potensiaal om baie van die probleme van rioolbehandeling in ontwikkelende gebiede op te los (Simpson, 1982). Die toekomstige rol van natuurlike behandelingsisteme lok wye kommentaar uit wat Haller (soos aangehaal deur Nichols, 1992) se siening insluit dat rietbeddings primêr in landelike gebiede gebruik sal word omdat grond beskikbaar en goedkoop is en ook as gevolg van die lae koste van natuurlike watersuiweringsisteme ten opsigte van konvensionele behandelingsisteme.

2.4 Rietbeddings

2.4.1 Kenmerke van 'n rietbedding

“Wetlands are lands traditionally between terrestrial and aquatic systems where the water table is usually at or near the surface or the land is covered by shallow water.” (Cowardin, 1982).

Volgens die *“Fish and Wildlife Service”* is een van die belangrikste vereistes waaraan 'n stelsel moet voldoen om as 'n vleiland te kwalifiseer, die verskynsel dat die stelsel ten minste periodiek die groei van waterplante moet onderhou en dat die substraat van die gebied hoofsaaklik grond moet wees wat versadig of bedek is met vlak water tydens elke jaar se groeiseisoen. (Cowardin, 1982). Tesame met die protozoa en nematode wat in so 'n vleiland voorkom, word natuurlike vleilande gesimuleer en aangewend tot die mens se voordeel tydens gekonstrueerde vleilande of dan rietbeddings (Reed, 1989). Rietbeddings kan dus gedefinieer word as 'n mensgemaakte stelsel van versadigde substraat waarin plante groei en diere voorkom. Rietbeddings kan onder andere aangewend word om sekondêre en tersiêre huishoudelike-, industriële-, myn- en landbou-uitvloeisels te behandel.

2.4.2 Samestelling en bou

Die faktore wat 'n rol tydens die samestelling en bou van 'n rietbed speel, word hier net kortliks genoem omdat 'n uitgebreide bespreking daarvan nie van toepassing is op hierdie studie nie. Rietbeddings is nog in 'n relatief vroeë stadium van ontwikkeling en goed gedefinieerde ontwerperskriteria en prestasie-eienskappe ontbreek nog grootliks. Nietemin is die resultate van wêreldwye navorsing op hierdie gebied bemoedigend (Bayes *et al.*, 1989).

Die ontwerp en die vorm van die rietbed word bepaal deur die terrein waar die rietbed aangelê moet word, die presiese ligging van die rietbed op hierdie terrein en laastens deur die grootte van die gebied wat beskikbaar is vir die uitleg van die rietbed (Knight, 1994). Laasgenoemde sal dan indirek die lengte van die rietbed bepaal. Daar is waargeneem dat die effektiwiteit van die rietbed afhang van die lengte daarvan en hierdie twee faktore (naamlik die area en die lengte) sal optimaal gekombineer moet word (Cooper *et al.*, 1989).

Die aard van die water en die besoedelingskomponente wat die rietbed moet behandel, moet vasgestel word aangesien dit die keuse van die rietbed (oppervlak- of suboppervlakkvloeisisteen) bepaal (Knight, 1994). Verder is dit ook belangrik om bekend te wees met die besoedelingskomponente wat in die water voorkom omdat daar in die geval van nie-degradeerbare komponente van die assimilatiewe kapasiteit van die grond gebruik gemaak word. Hierdie beginsel is gebaseer op die gebruik van 'n stuk grond wat groot genoeg is sodat die finale konsentrasie van die komponent in die water aan waterkwaliteitstandaarde voldoen (Bayes *et al.*, 1989). Die keuse van plante vir die rietbed word deur albei voorafgaande faktore (naamlik die aard van die besoedelde water en die tipe rietbed) beïnvloed, terwyl die klimaat ook 'n rol speel omdat sekere plante nie bestand is teen koue weerstoestande nie. Die tipe rietbed bepaal die diepte daarvan, die substraat wat gebruik word en die materiaal wat die rietbed van die omgewing isoleer (Knight, 1994).

Die verlangde kwaliteit van die water aan die einde van die rietbed is ook van kardinale belang, want dit bepaal die retensietyd, die vloeisnelheid, asook die beladingstempo van die rietbed (Knight, 1994). Volgens Butler *et al.* (1990) beïnvloed die gradiënt van die rietbed weer die retensietyd en die vloeisnelheid van die water. Laastens is die koste van die rietbed nog 'n berekenbare faktor wat deur al die ander faktore betrokke by die konstruksie van die rietbed beïnvloed word (Knight, 1994).

Opmerkbare ooreenkomste bestaan tussen die komponente van gekonstrueerde rietbeddings wêreldwyd, maar die uiteindelijke standaard waaraan voldoen moet word, is uniek vir elke situasie. Vir elke rietbed om optimaal te funksioneer, moet die komponente van die rietbed optimaal saamgevoeg word vir elke situasie waar rietbeddings aangewend word en die wyse van samevoeging van die verskillende komponente het weer 'n invloed op die werking van die rietbed in die betrokke situasie.

2.4.3 Werking

Rietbeddings sluit grond, water, plante en ander biotiese komponente in en kennis van die eienskappe van elke komponent is essensieel vir die bestuur van 'n rietbed (Wood, 1989). Dit is dus noodsaaklik om die prosesse te verstaan wat betrokke is by die werking van die rietbed om aanbevelings oor die ontwerp van die rietbedding te kan maak (Butler *et al.*, 1990). In Tabel 2.1 is 'n opsomming van die prosesse wat aanleiding gee tot die verwydering deur die rietbed van besoedelingskomponente uit die water.

Tabel 2.1 : Verwyderingsmeganismes in rietbeddings¹

BESOEDELINGSTOF	VERWYDERINGSMEGANISME
Gesuspendeerde vaste stowwe	Sedimentasie, filtrasie en adsorpsie
Biologiese suustof aanvraag	Sedimentasie
Stikstof	Hoofsaaklik nitrifisering en denitrifisering. Minimale verwydering deur plantopname en ammonium vervlugting.
Fosfor	Adsorpsie, kompleksering, presipitasiereaksie in rietbedsubstraat veral met Al, Fe, Ca en leiminerale. Baie min plantopname.
Swaar metale	Presipitasiereaksies na pH-veranderinge, sedimentasie en adsorpsie aan biofilms op plantstingels.
Patogene	Sedimentasie en filtrasie. Kompetisie en natuurlike afsterf. Antibiotikumafskieding deur (1) plantwortels en (2) as gevolg van kompostering van plantmateriaal op die bodem.

¹ Gray & Biddlestone, 1995.

Alhoewel die akwatiese plante oor die algemeen beskou word as die mees voor-die-handliggende komponent van 'n rietbedekosisteem, dui onlangse literatuur daarop dat dié opname van besoedelingskomponente deur plante nie alleen verantwoordelik kan wees vir die hoë effektiwiteit waarmee besoedelingskomponente verwyder word nie,

soos dikwels waargeneem word in die geval van hoë beladingstempo eienskappe van baie behandelingsaanlegte (Bowmer, 1987). Die hoof funksie van plante in die rietbed blyk die vervoer van suurstof te wees. Die suurstof word vanaf die blare deur die stingels tot in die risome vervoer en deur die fyn haarworteltjies tot in die risosfeer. Die suurstof skep 'n aërobe omgewing vir mikro-organismes om in te groei. Die water wat dan deur die substraat van die rietbed beweeg kom in aanraking met hierdie mikro-organismes wat die besoedelingskomponente afbreek (Biddlestone *et al.*, 1991).

Die hoof meganisme vir die verwydering van besoedeling in 'n rietbed sluit beide bakteriële transformasies en fisies-chemiese prosesse in, insluitend adsorpsie, presipitasie en sedimentasie (Tabel 2.2). Daar word aanvaar dat mikro-organismes wat aan die plante geheg is, die grootste bydrae tot die behandeling van die afvalwater in so 'n rietbed lewer, alhoewel ander chemiese en biologiese prosesse ook bydra om die besoedelde water te suiwer soos wat dit deur die rietbed beweeg (Gersberg *et al.*, 1989). As gevolg van die geïntegreerde prosesse wat in 'n rietbed voorkom, sal faktore wat een komponent beïnvloed, noodwendig 'n invloed op die totale ekosisteem hê. Kanalisering in die rietbed veroorsaak byvoorbeeld verhoogde uitvloeivolumes, dit verlaag die watertafel, en ander natuurlike grondbedekking ly ook daaronder. Dit lei weer tot die vernietiging van habitatte wat gevolglik tot 'n moontlike toename in erosie kan lei en uiteindelik gedeeltelike of totale vernietiging van die rietbed veroorsaak (Wood, 1989).

2.4.4 Verskillende tipes rietbeddings

Daar is hoofsaaklik twee tipes rietbedsisteme. Die eerste is die oppervlakovloeisisteme of "free water surface (FWS)" rietbed en stem ooreen met natuurlike vleilande (Reed & Brown, 1992). Die oppervlakovloeisisteme bestaan uit 'n grondsubstraat waarin die plante groei en met water versadig word totdat die watervlak net bo (5 cm) die grondsubstraat is (Gray & Biddlestone, 1995). Die watervlak is dus blootgestel aan die atmosfeer (Reed & Brown, 1992). Die hele rietbed is geïsoleer om te voorkom dat die water nie na die omringende grond deursypel en dit dalk besoedel nie (Biddlestone *et al.*, 1991). In oppervlakovloeisisteme is die suurstof vasgevang in die risosfeer en nie beskikbaar vir die water wat op die oppervlak vloei nie. Die hoofsuurstofbron vir die water is belugting van die water by die wateroppervlak wat aan die atmosfeer blootgestel is. (Reed & Brown, 1992). Soos wat die water horisontaal deur die bedding beweeg word dit gesuiwer. Die rol van die plante in die oppervlakovloeisisteme is onder andere om weerstand teen die vloei van die water te bied, die vloei van die water te onderbreek en 'n plek waar mikro-organismes kan

vasheg. Die vloei van die water bo die substraat tussen die plantstingels deur veroorsaak dat metale uit die water presipiteer. Die presipitaat adsorbeer dan aan die plantstingels of sak uit tot op die substraat. Verder bring die vloei van die oppervlakwater deur die plantstingels 'n pH-verandering te weeg wat veral gebruik word om suurmyndreïndering te behandel (Gray & Biddlestone, 1995).

Die tweede tipe rietbedsisteem is die suboppervlakvloeisisteem. Hierdie sisteem word gekonstrueer van growwe sand, gruis of klippe wat in lae van verskillende diktes gepak word. Die rietbed is met sement of ander materiaal geïsoleer en so ontwerp dat die watervlak onder die oppervlak van die substraat bly. Suurstof vanaf die atmosfeer diffundeer in die bedding via geperforeerde pype wat tussen die lae geplaas word, asook deur die wortels van die riete (Gray & Biddlestone, 1995). In suboppervlakvloeisisteme diffundeer die suurstof nie ver vanaf die wortels nie, maar vorm eerder mikro-suurstof gebiede naby haarwortels (Reed & Brown, 1992). Die suboppervlakvloeisisteme het alternerende periodes van rus en werk. Die water word ingepomp en toegelaat om weg te dreineer. Soos wat die water vertikaal deur die rietbed beweeg, word die water gesuiwer. Tydens die periode van rus, oksideer die vaste stowwe en die boonste lae word weer deurlaatbaar en die proses kan herhaal word (Gray & Biddlestone, 1995). Behalwe dus vir die geperforeerde pype is die plante die enigste ander bron van suurstof om die groei van die mikro-organismes te onderhou en tot die suiweringsproses by te dra omdat die watervlak nie aan die atmosfeer blootgestel is en suurstof in die water kan oplos nie. Suboppervlaksisteme kan ook so ontwerp wees dat die water horisontaal deur die substraat beweeg. Die bodem is dan so ontwerp om 'n eenvormige vloei te verseker en die in- en uitvloeistrukture verseker beheer en verspreiding van die watervlak in die rietbed (Reed & Brown, 1992).

2.4.5 Toepassings en gebruike van rietbeddings

Rietbeddings het groot potensiaal vir die behandeling van rou uitvloeiwatervloeiwater omdat dit 'n wye spektrum besoedelingskomponente kan behandel. Die verskillende aanwendingsmoontlikhede blyk duidelik uit die volgende voorbeelde in Tabel 2.2.

Tabel 2.2 Toepassings en gebruike van rietbeddings tydens watersuiwering¹

TIPE AFVALWATER	TOEPASSING VAN RIETBEDDINGS
Munisipale- en huishoudelike riool	Sekondêre- en tersiêre behandeling en opgradering van oksidasiedamme
Rioolbehandeling na septiese tenk	Huise, hotelle, tyddeeleenhede, karavaanparke, ontspanningsoorde, golfbane
Afvalvloeistof	Vanaf paaie, lughawens en voertuigdienssentrums (treine en busse)
Landbou	Water vanaf melkerye, groenteverpakkings, varkhokke, voerkrale en pluimvee afval
Landopvulgebiede	Dreinerings
Industrieel	Vanaf chemiese vervaardigers, olieraffinaderye, voedsel en alkohol vervaardigers, papiermeule, leerlooierye, tekstiel- en fotolaboratorium afval
Myne	Metaalkontaminasie in water vanaf steenkool- en metaalmyne, soutwater- en suurmyndreinerings
Slyk	Ontwatering en stabilisering

¹ Wood, 1993a; Wood, 1993b; Gray & Biddlestone, 1995.

2.4.6 Voordele van rietbeddings

Rietbeddings het aanwendingsmoontlikhede en voordele bo ander watersuiweringsmetodes omdat bioremediëring (biologiese prosesse) by voorkeur bo duur of gevaarlike chemikalieë gebruik word om besoedelingstowwe te vernietig of te immobiliseer. Bioremediëring kan *in situ* uitgevoer word deur behoorlik gestimuleerde populasies van besoedelingsdegraderende mikro-organismes wat natuurlik voorkom of deur mikro-organismes met unieke kataboliese eienskappe toe te voeg om spesifieke teikenchemikalieë te detoksifiseer of mineraliseer. *In situ*-behandelings blyk om relatief goedkoop en effektief te wees, want dit benodig behandelingstye van maande tot jare, eerder as jare tot dekades (Crawford, 1991).

Rietbeddings kan gebruik word om klein konvensionele rioolwerke op die platteland te vervang en ook vir die sekondêre en tersiêre behandeling van die finale uitvloeï. Anders as in die geval van die normale rioolbehandelingsprosesse, onderhou rietbeddings 'n groter diversiteit mikro-organismes en hoe groter hierdie diversiteit, hoe groter die verskeidenheid verbindings wat afgebreek kan word (Gilges, 1991). 'n

Koste-effektiewe afname in ammoniak, biologiese suurstof aanvraag (BOD), SS, totale kolivorme en organiese materiaal in rioolwater word deur die rietbedbehandeling van besoedelde water verkry. Hierdie proses is ook minder sensitief as die konvensionele rioolwerke vir beladings tydens spitsstye (Butler *et al.*, 1990) en dit was tot dusver nog nie 'n beduidende bron van reuke nie (Bayes *et al.*, 1989). Kommer het ontstaan dat besoedelingstowwe (veral swaarmetale) vanaf die water via die plante na organismes hoër in die voedselketting oorgedra sou word. Die swaarmetale word egter in die wortels en sediment gekonsentreer en byna geen gevaar van vergiftiging bestaan vir voëls en ander diere wat die plante eet nie. (Gray & Biddlestone, 1995).

Rietbeddings bied ook 'n plaaslik beheerde en koste-effektiewe alternatief vir hoë tegnologie sisteme (Butler *et al.*, 1990). Die konstruksie van rietbeddings is eenvoudig en goedkoop (lae kapitale koste) en kan deur relatief onopgeleide personeel opgerig en behartig word omdat rietbeddings 'n "lae tegnologie"-sisteem is (Wood, 1989). Meesal word geen meganiese of elektriese toerusting benodig nie (lae energiebehoeftes) en die koste verbonde aan die werking van die rietbed (werkingskoste) is tot die minimum beperk as gevolg van die lae onderhoudskoste van die sisteem. 'n Verdere voordeel van die sisteem is die hoë behandelingseffektiwiteit daarvan. Ten spyte van koue winterstoestande, is waargeneem dat rietbeddings nog bevredigend funksioneer, selfs wanneer dit aan hewige sneeu blootgestel word (Wood, 1989). Die proses is dus in staat om 'n wye reeks werkingstoestande te deurstaan met die gevolg dat water van 'n konstante kwaliteit geproduseer kan word (Cooper *et al.*, 1989). Die koste verbonde aan die suiwering van besoedelde water en proses- of uitvloeiwat is dus relatief goedkoop en 'n groter verskeidenheid uitvloeisels as net voedsel en huishoudelike afval kan hanteer word (Bayes *et al.*, 1989). Benewens die feit dat rietbeddings water baie effektief suiwer, is dit ook omgewingsvriendelik (Bayes *et al.*, 1989), omdat dit met die omgewing versmelt (Cooper *et al.*, 1989) en 'n estetiese faset aan veral rioolbehandeling verleen (Wood, 1990).

'n Rietbedding kan opgerig word op die plek waar die besoedeling voorkom (Bowmer, 1987), byvoorbeeld rekreasiepersele, logingsgebiede, brouerye, romerye, kleurstoff-fabrieke en olieraffinaderye, landbou afvalgebiede (skure en voerkrale), suurmyn-dreineringsgebiede en industriële persele. Rietbeddings is dus ideaal vir kleinskaalse of lae tegnologie behandelingsisteme by reeds bestaande behandelingsaanlegte of in ontwikkelende lande (Bayes *et al.*, 1989). Die ander voordeel van rietbeddings by bogenoemde aanlegte is dat byprodukte, byvoorbeeld chemiese slyk, verminder word (Knight, 1993).

Rietbeddings word nie alleenlik vir suiweringsdoeleindes gebruik nie. In sommige gevalle is die bedding verleng om landbou-oeste te produseer vanaf die uitvloeisel, wat voordelig is veral in gebiede waar water skaars is (Butler *et al.*, 1990). Die voordeel van rietbeddings hier, teenoor landelike opruimingsgebiede, is die herwinning van water wat weer aangewend kan word om riviervloei te onderhou en watervoorsiening en besproeiing in stand te hou (Bowmer, 1987). Behandeling van afvloeisels vanaf skure en voerkrale kan ook nuttig aangewend word, byvoorbeeld as drinkwater vir diere. Akwatiese plante verwyder die nutriënte uit die voerkraalafvloeisel en as die plante geoes sou word, is dit as uitstekende veevoer beskikbaar. Plante wat in nutriëtryke grond groei, beskik oor veel hoër proteïen- en verteringsvlakke (Wood, 1991).

Rietbeddings besit ook die potensiaal vir die bewaring van voël- en wildlewe (Cooper *et al.*, 1989), omdat dit as habitat vir menige plante en diere dien (soms selfs bedreigde spesies). Verdere bewaringsaspekte van rietbeddings is dat die water op die oppervlak beskerm en gesuiwer word en die waterkwaliteit van grondwater verbeter word. Laastens word vloedwater beheer, grond-erosie voorkom en rietbeddings hou ook rekrasievoordele in (Anon, 1992).

2.4.7 Tekortkominge van rietbeddings

Benewens die feit dat die interaksie tussen die grond, water, plante en mikro-organismes nog onduidelik is (Roberts, 1993), is daar ander aspekte van die rietbed waaraan aandag geskenk moet word. Hierdie aspekte sluit onder andere die faktore in wat vir die effektiwiteit van die rietbed verantwoordelik is en aspekte wat in die samestelling en bou van die rietbed van belang is.

Een van die grootste probleme wat tans nog met rietbeddings ondervind word, is die onvermoë daarvan om die konsentrasie van sekere verbindings en besoedelingstowwe genoegsaam te verlaag. Beide oppervlakkvloei- en suboppervlakkvloeisisteme verlaag nie ammoniak tot aanvaarbare waterstandaarde nie. Die oorsaak kan moontlik toegeskryf word aan onvoldoende suurstofvoorsiening aan nitrifiserende bakterieë (Reed & Brown, 1992). Rietbeddings is ook nie in staat om uitvloeisels met baie hoë BOD-vlakke, byvoorbeeld sekere landbouafval met BOD-vlakke van tot 3000 mg/l, te hanteer nie. Daar is al waargeneem dat oppervlakkvloeisisteme BOD met 80 tot 90% verminder, maar totale stikstof slegs met 20 tot 30% (Gray & Biddlestone, 1995) en totale fosfate met slegs 46% (Knight, 1994). Volgens 'n artikel van Reed & Brown (1992) sal suboppervlakkvloeisisteme fosfate tot 'n beperkte mate uit die water

verwyder omdat die water en die substraat so 'n kort tyd in aanraking met mekaar is en minimale interaksie plaasvind. Oppervlakovloei sisteme het 'n langer retensietyd wat groter kontak tussen die water en die substraat bewerkstellig en fosfate meer effektief verwyder. In albei gevalle word die substraat na verloop van tyd versadig en word fosfate nie meer uit die water verwyder nie. Rietbeddings wat ontwerp is om fosfate te verwyder beslaan normaalweg 'n baie groot area.

Verstopping is die ander probleem waaraan aandag geskenk moet word, want dis die hooforsaak dat water nie deur die substraat vloei nie. Om hierdie probleem op te los moet die hidrologiese ontwerp van 'n rietbed aangepas word ten einde suboppervlakovloei te bewerkstellig. (Reed & Brown, 1992). Die plante in die rietbed is die ander komponent wat 'n bron van uiteenlopende probleme is. Plante wat aanvanklik suksesvol gevestig is, kan swak groei en doodgaan indien die watervlak hoër is as waarvoor die rietbed ontwerp is. Plante kan ook geaffekteer word deur insekte en ander diere lewe, byvoorbeeld moerasbewers (Knight, 1993). Klimaat kan ook die plante beïnvloed omdat sommige plante doodgaan in die winter, maar volgens Reed & Brown (1992) het klimaatsveranderinge geen noemenswaardige effek op die effektiwiteit van die rietbed tydens wintermaande nie. In teenstelling hiermee is verskille in die getalle van die nitrifiserende bakterieë tussen seisoene in varswater sisteme waargeneem (Hall, 1986).

2.5 Prosesse van die stikstofkringloop

2.5.1 Nitrifisering

Nitrifiseerders (ammoniak- en nitrietoksideerders) is Gramnegatiewe chemolitotrofe bakterieë wat op gereduseerde anorganiese stikstofverbindings groei. Koolstofdiksied is die hoof koolstofbron en energie word deur oksidasie van onderskeidelik ammoniak en nitriet verkry. (Pelczar *et al.*, 1993). Nitrifiseerders kom selde in groot getalle voor, maar is tog wydverspreid in grond en water. In habitate waar ammoniak egter teenwoordig is, byvoorbeeld in water wat riool ontvang (behandel of onbehandel), sal nitrifiseerders in groter getalle voorkom. Nitrifisering is 'n streng aërobe proses, dit vind by 'n neutrale pH plaas en word deur anaërobe- en suurtoestande geïnhibeer. Nitrifisering maak die omgewing suur omdat salpetersuur ophoop. (Brock *et al.*, 1994)

Geen litotrofe bakterie wat die volle oksidasieproses van ammoniak na nitraat uitvoer, is bekend nie (Brock *et al.*, 1994), en outotrofe nitrifisering word deur twee verskillende groepe bakterieë uitgevoer, naamlik die ammoniakoksiderende bakterieë

(nitrosofiseerders) wat tot die *Nitrosomonas spp* behoort en die nitrietoksiderende bakterieë (nitraatproduseerders of ware nitrifiseerders of nitrofiseerders) wat tot die *Nitrobacter spp* behoort (Lötter, 1994). Voorbeelde van ammoniakoksideerders sluit in: *Nitrosomonas europaea*, *Nitrococcus nitrosus* en *Nitrosococcus oceanus* en van nitrietoksideerders: *Nitrobacter winogradskyi* en *Nitrospina gracilis* (Pelczar *et al.*, 1993). Sommige heterotrofe bakterieë en fungi oksideer ammoniak tot nitraat, maar die proses is baie stadiger as wanneer litotrofe nitrifiseerders dit uitvoer en dit mag selfs onbeduidend wees (Kuenen & Robertson, 1988; Brock *et al.*, 1994).

2.5.2 Denitrifisering

Denitrifisering is 'n reduksieproses wat nitriet na nitraat en dan na stikstofgas omvorm. Die proses is in der waarheid 'n respiratoriese meganisme waar molekulêre suurstof deur nitraat vervang word (Lötter, 1994). Denitrifisering is 'n anaërobe proses wat deur omgewingstoestande beïnvloed word. Die proses word byvoorbeeld deur 'n hoë konsentrasie organiese materiaal en 'n temperatuurstyging versnel (Pelczar *et al.*, 1993). Denitrifisering kom eerder in staande as bewegende water voor en die tempo is hoër in die somer en winter as tydens die lente en herfs. Voorbeelde van genusse van denitrifiserende mikro-organismes is: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Azospirillum*, *Achromobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Thiobacillus*, *Rhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Propionibacterium*, *Agrobacterium*, *Chromobacterium*, *Hyphomicrobium* en *Vibrio* (Atlas & Bartha, 1993).

Nitrifisering en denitrifisering speel dus albei 'n uiters belangrike rol in die stikstofkringloop van beide terrestriële en akwatiewe ekosisteme. Substrate vir hierdie prosesse word nie net deur natuurlike hersirkulering geproduseer nie, maar ook deur menslike aktiwiteit en dis juis hierdie menslike aktiwiteit wat stikstofverbindinge vorm wat tans groot kommer in veral varswateromgewings veroorsaak (Kuenen & Robertson, 1988). Verhoogde toename in stikstof in die omgewing lei tot verhoogde eutrofisering in water. In gebiede waar landboubesproeiing en uitvloeï van besoedelde water op land oor lang tydperke plaasgevind het, het die ondergrondse water groot hoeveelhede nitrate bevat. Indien dieselfde water vir huishoudelike gebruik aangewend sou word, bestaan die gevaar van methemoglobinemia by babas as gevolg van die verhoogde nitraatvlakke in die water (Gersberg *et al.*, 1983). Die verwydering van stikstof tydens rioolbehandeling is dus baie belangrik.

Effektiewe verwydering van stikstof hang van 'n reeks transformasies af. Na mineralisering van organiese stikstof na ammoniak, vind nitrifisering plaas, gevolg deur deni-

trifisering. Opname deur plante in die rietbed lewer ook 'n bydrae tot stikstofverwydering. Dit is dus belangrik dat die regte toestande geskep sal word sodat nitrifisering en denitrifisering kan plaasvind. Invloede van fisies-chemiese toestande op die tempo van stikstof transformasie in die rietbed is ondersoek en dis waargeneem dat nitrifisering 'n geoksideerde substraat benodig en denitrifisering anaërobe toestande, sowel as 'n organiese koolstofbron (Bowmer, 1987). Die hoofprosesse wat plaasvind tydens rioolbehandeling in 'n rietbed is dus plantopname van stikstof, nitrifisering van ammoniakstikstof in die water en denitrifisering in die onderliggende sediment of anaërobe gedeelte in die risosfeer (Moorhead *et al.*, 1988).

2.6 Probleemstelling, doelstelling en benaderingswyse

Kwantifisering van bakterieë in rietbeddings is al voorheen gedoen (Gray & Biddlestone, 1995), maar oor die verskeidenheid bakterieë wat voorkom en die spesifieke rol van bakterieë in die rietbed ekosisteem tydens transformasies en onder spesifieke toestande in die rietbed, is nog baie min bekend. Daar bestaan ook teenstrydighede ten opsigte van die invloed van seisoenale variasie in temperatuur op die bakteriële populasie in 'n rietbed. Kennis van die samestelling van die bakteriële populasie in 'n rietbed is belangrik om die werking van die rietbed te verstaan en te evalueer. Die primêre doelstelling van hierdie studie was om 'n bydrae te maak om die bakteriële profiel van 'n rietbed vas te stel. Verdere doelstellings was om (1) die totale bakteriële getalle in die rietbed oor 'n tydperk van een jaar te monitor, asook (2) die getalle van die bakterieë van die stikstofkringloop, naamlik die nitrifiseerders en denitrifiseerders. Dit is gedoen om moontlike tendense in die bakteriële getalle vas te stel, faktore wat die bakteriële getalle beïnvloed, te bepaal. Hierdie kennis is nodig vir die ontwerp en uiteindelijke evaluering van die sukses van 'n rietbed.

Die benaderingswyse wat gevolg is, was om by een punt in die rietbed drie sones van mekaar te onderskei in die waterlaag, naamlik stilstaande, stadig- en vinnigvloeiende water en dan bakteriële tellings oor vier seisoene in hierdie sones te vergelyk. Die tellings is tweeweekliks oor 'n tydperk van een jaar gedoen. 'n Verkennende studie is ook gedoen vir verdere karakterisering van die nitrifiseerders.

HOOFSTUK 3

KWANTIFISERING EN IDENTIFISERING VAN BAKTERIEË

3.1 Inleiding

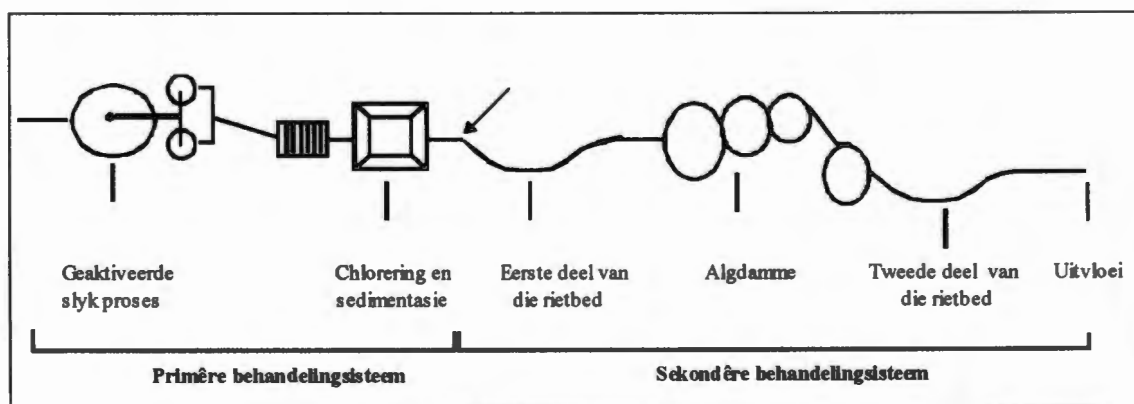
Die werk wat in hierdie hoofstuk beskryf word, is deel van 'n meer omvattende studie om die bakteriese profiel van 'n gekonstrueerde rietbed te bepaal en om die faktore wat dit beïnvloed te identifiseer. In hierdie studie val die klem op die bepaling van die totale aantal bakterieë, die nitrifiserende en denitrifiserende bakterieë oor die vier seisoene van 'n jaar. Die verskillende sones in die rietbed, naamlik stilstaande water, stadig- en vinnigvloeiende water is by 'n spesifieke punt binne die eerste tien meter van die rietbed ten opsigte van bogenoemde bakterieë ondersoek.

Totale bakteriese tellings is by 20°C gedoen om die bakterieë wat natuurlik in die water voorkom te kwantifiseer en by 37°C daardie bakterieë wat as gevolg van besoedeling deur menslike afvalstowwe in die water beland het. Die bakterieë van die stikstofkringloop wat volgens die literatuur die grootste bydrae maak tot die verwydering van stikstof uit die water, naamlik nitrifiseerders en denitrifiseerders (Gersberg *et al.*, 1983), is terselfdertyd gekwantifiseer. Bakterieë wat op die totale plaattellingplate tydens elke monstername voorgekom het en verskil het ten opsigte van koloniemorfologie, is geïsoleer en geïdentifiseer, asook die bakterieë wat op die ammoniak- en nitrietplate voorgekom het, omdat daar slegs twee morfologiese tipes op elk van hierdie plate onderskei kon word.

3.2 Eksperimenteel

3.2.1 Beskrywing van die rietbed

'n Rietbed op die perseel van Naschem naby Potchefstroom is tydens dié studie ondersoek. Hierdie rietbed is hoofsaaklik aangelê met die doel om as tersiêre behandeling van 'n uitvloeisel te dien en is na 'n bioreaktor aangelê (Figuur 3.1). Die uitvloeisel bestaan hoofsaaklik uit rioolwater en water vanaf die wassery waar die klere van die werkers van die plofstofaanleg gewas word. Die bioreaktoruitvloeï loop eers in 'n sewedagdam vanwaar die water oorloop in 'n trog en uiteindelik in die rietbed afvloeï. Die rietbed strek oor ongeveer 100 meter en eindig in 'n opvangdam. Die rietbed word egter deur twee aldamme onderbreek en is verder met bamboe-riete, onder andere wilgerbome en sambreelgras beplant. Die hele rietbed is met sement en klippe uitgelê.



Figuur 3.1: Skematiese voorstelling van die uitvloeiselbehandelingsstelsel by Naschem. Die monsternamepunt word met 'n pyltjie aangedui.

3.2.2 Monstername

Drie sones is in die rietbed by die monsternamepunt onderskei, naamlik die stilstaande, stadig- en vinnigvloeiende water en monstername het tweeweklik geskied (Figuur 3.1). By die monsternamepunt is die gemiddelde diepte van die water ongeveer 10 cm. Die monsters is in gesteriliseerde glashouers geneem en in die yskas bewaar indien dit nie onmiddellik verwerk kon word nie, maar die

verwerking van die watermonsters is gewoonlik binne vier-en-twintig uur na monstername uitgevoer.

Die veranderinge in die vloeivolumes in die rietbed is ook oor die hele tydperk gemoniteer en omdat die watervlak nie noemenswaardig gewissel het nie, word die resultate nie gegee nie.

3.2.3 Totale bakteriese getalle

Totale tellings van bakterieë (20°C en 37°C) is deur middel van spreiplaat op plaattellingsagar (PTA) van Biolab gedoen (kyk Bylaag 1). Verdunnings van 10^{-2} tot 10^{-4} is in 9 ml steriele verdunningswater gemaak en twee stelle spreiplaat van bogenoemde verdunnings is vir al drie sones gemaak. Een stel is vir een week by 20°C en die ander stel by 37°C vir 48 uur geïnkubeer voordat tellings gedoen is.

3.2.4 Kwantifisering van nitrifiseerders

Nitrifisering bestaan uit twee stappe wat deur twee verskillende groepe bakterieë uitgevoer word (kyk 2.1). Die eerste reaksie is die omvorming van ammoniak na nitriet deur nitrosifiseerders en ammoniakagar is hiervoor berei volgens die metode van Lewis en Pramer (1958) (kyk Bylaag 1). Die tweede reaksie is die omvorming van nitriet na nitraat deur nitrofiseerders en hiervoor is nitrietagar volgens die metode van Delwiche en Finstein (1965) berei (kyk Bylaag 1). Vir die isolering van albei groepe bakterieë is 0.1 ml water van al drie sones op die onderskeie spreiplaat versprei nadat verdunnings van 10^{-2} tot 10^{-4} in 9 ml steriele verdunningswater gemaak is. Die plaat is vir een week by 28°C geïnkubeer.

3.2.5 Kwantifisering van denitrifiseerders

Denitrifisering is die omvorming van nitraat na stikstofgas en die nitraatsop wat vir hierdie toets gebruik is, is volgens die metode van Salle (1973) berei (kyk

Bylaag 1) en in proefbuis met Durham-buisies versprei om die stikstofgas wat vorm, op te vang. 'n Lagie steriele aptekersparaffien is bo-op die nitraatsop gevoeg om 'n anaërobe omgewing te skep. Verdunnings van 10^{-2} tot 10^{-4} is in 9 ml steriele verdunningswater gemaak en vyf buise is met elke verdunning geïnokuleer. Die inokulum in elke buis was 1 ml en is vir al drie sones van die rietbed gedoen. Die buise is by 28°C vir een week geïnkubeer. Kwantifisering van die aantal denitrifiseerders in die nitraatsop is met behulp van die meeswaarskynlike-getalmetode (MWG) gedoen (Brock, 1979).

3.2.6 Identifikasie van die geïsoleerde bakterieë

3.2.6.1 Kleurings

(a) Kopeloff-Gramkleuring

Gramkleurings is volgens die metode van Cruickshank *et al.* (1980) gedoen.

(b) Endospoorkleuring

Endospoorkleuring is volgens die metode van Shaeffer en Fulton gedoen (Salle *et al.*, 1973).

(c) Flemming se negatiewe kleuring

Negatiewe kleuring is volgens die metode van Harrigan & McCance (1966) gedoen.

(d) Suurvastekleuring volgens Ziehl-Neelsen se metode

Suurvaste kleuring is volgens die metode van Cowan (1981) gedoen.

3.2.6.2 Transmissie elektronmikroskopie (TEM)

Die bakterieë is op voedingsagarskuinsbodems uitgestryk en vir hoogstens 24 uur geïnkubeer. Na inkubasie is van die groei met 'n inokuleerogie in 'n druppel water gesuspendeer en oorgedra na 'n koperroostertjie wat met 'n Formvar-lagie bedek is. Negatiewe kleuring van die organismes op die roostertjie is met 0,05% uranielasetaat gedoen (Handleiding, Laboratorium vir Elektronmikroskopie, P.U. vir C.H.O.). Die bakterieë is met 'n Phillips CM 10 TEM ten opsigte van selvorm, teenwoordigheid en rangskikking van flagellums, fimbriae en endospore ondersoek.

3.2.6.3 Fenotipiese toetse

(a) Oksidase toets

Die oksidase toets is met vier reagense uitgevoer:

- 1) NNN'N'-tetrametiel-p-fenileendiamien dihidrochloried
- 2) NN-dimetiel-p-fenileendiamien dihidrochloried
- 3) p-amino-NN-dimetielanilien oksalaat
- 4) NNN'N'-tetrametiel-p-fenileendiamien (Cruickshank *et al.*, 1980)

(b) Katalase toets

Katalase toetse is volgens die metode van Harrigan & McCance (1966) gedoen.

(c) Anaërobe groeitoets

Suiwer kulture (24 uur oud) is op voedingsagar uitgestryk. 'n Verpligte aërobe bakterie (*Pseudomonas aeruginosa*) en 'n fakultatief anaërobe bakterie (*Escherichia coli*) is onderskeidelik as positiewe en negatiewe kontroles gebruik. Die voedingsagarplate met die kulture en die kontroles is in 'n anaërobe fles

geplaas en verseël. 'n Vakuumpomp is vir ongeveer 10 minute gebruik om 'n vakuum in die fles te skep. Die fles is verseël en aan 'n silinder met 'n suurstofvrye gasmengsel gekoppel (9.8% koolstofdiksied, 20.3% waterstof en 69.9% stikstof) wat vir ongeveer 2 minute deur die fles geblaas is. Die fles se kleppe is toegedraai en by 20°C vir een week geïnkubeer (Harrigan & McCance, 1966). Die fles is by 20°C geïnkubeer omdat al die bakterieë daar groei, selfs dié wat by 37°C geïsoleer is.

(d) Respirasie-fermentasie toets (RF)

'n Steekkultuur is in die semi-soliede medium gemaak met broomkresolpers as indikator. Die resultate is daagliks vir vier agtereenvolgende dae gelees (Cruickshank *et al.*, 1980).

3.3 Resultate

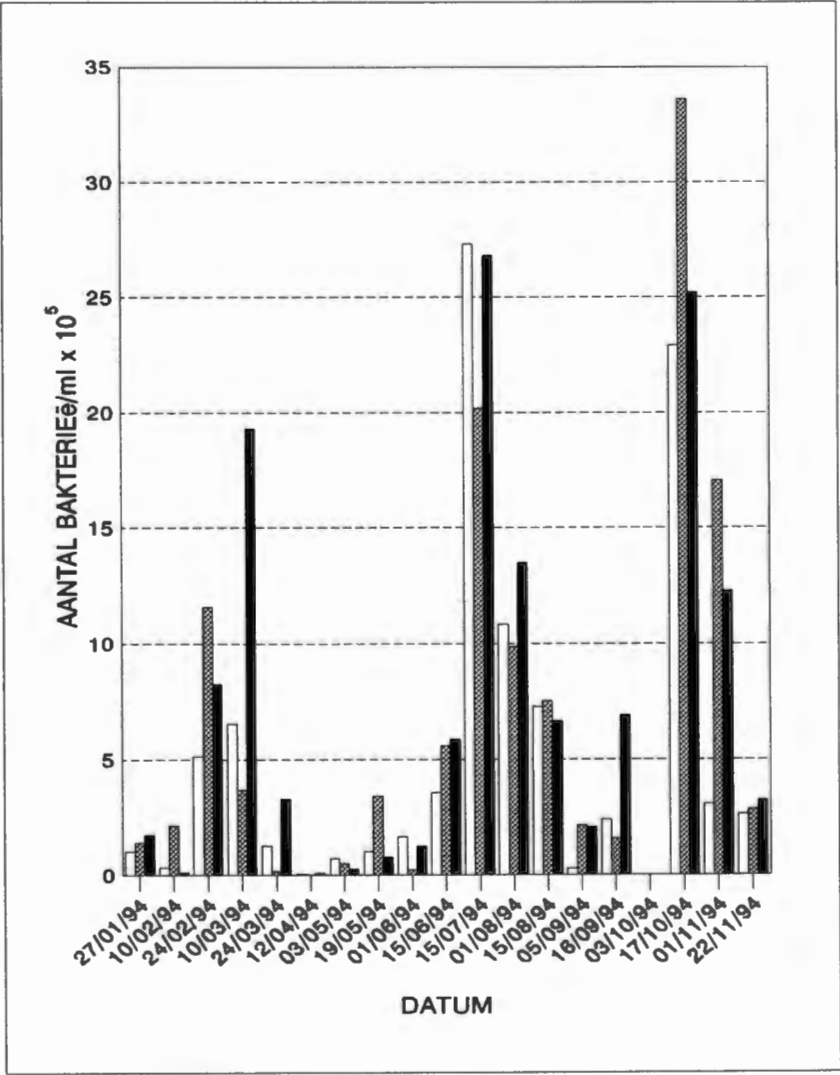
3.3.1 Totale hoeveelheid bakterieë

In Figuur 3.2 word die resultate gegee van die plate wat by 20°C geïnkubeer is en vir die wat by 37°C geïnkubeer is, word die resultaat in Figuur 3.3 gegee. Figuur 3.4 gee die temperatuursveranderinge oor die vier seisoene van 1994. Vir die bespreking van die resultate is die onderskeie seisoene as volg vasgestel:

Somer	22/11/94 tot 24/02/94
Herfs	10/03/94 tot 19/05/94
Winter	01/06/94 tot 15/08/94
Lente	05/09/94 tot 01/11/94

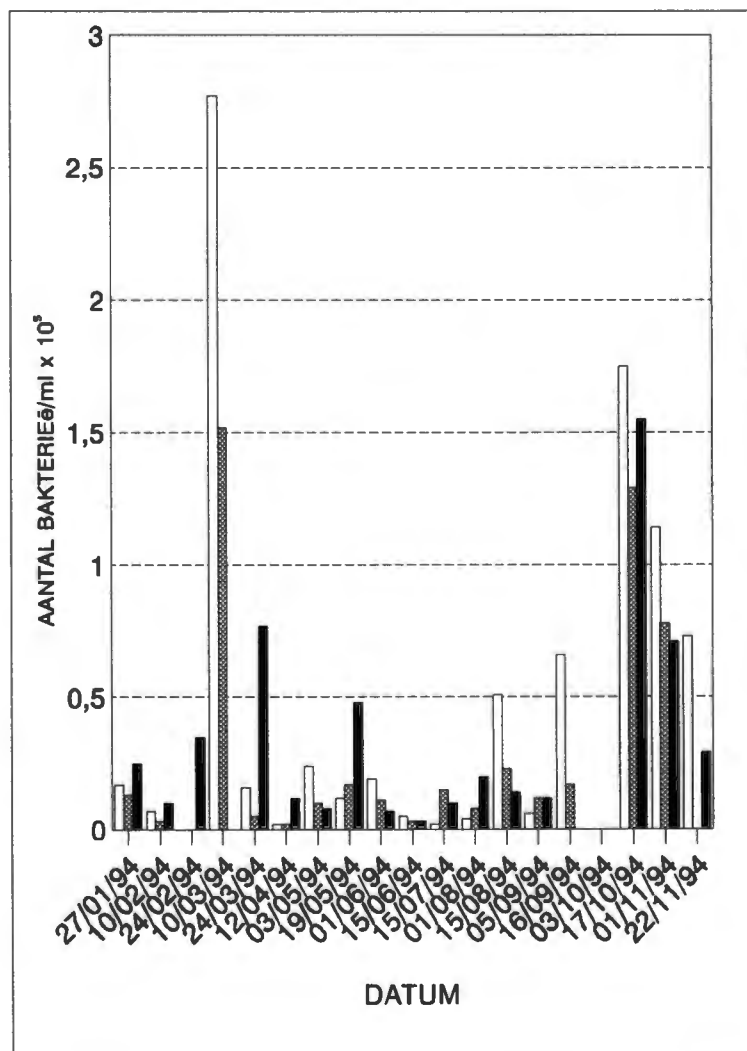
Die hoeveelheid bakterieë wat by 20°C groei, is aan die begin van die somer redelik hoog (2.66 tot 3.25×10^5) (Figuur 3.2) en daal namate die somer vorder, maar styg dan weer teen die einde van die somer (11.6 tot 5.15×10^5) in al drie sones. Aan die begin van die herfs is die bakteriese getalle in al drie sones baie

hoog (3.72 tot 19.3×10^5) en neem geleidelik af, maar teen die einde van die herfs is dit weer bietjie hoër. Die winter word oor die algemeen gekenmerk deur hoër bakteriële getalle in al drie sones met die hoogste getalle teen die middel van die winter (20.2 tot 27.3×10^5), met 'n afname na die einde van die winter. Tydens die aanvang van die lente is daar 'n skerp afname in bakteriële getalle, maar die hoogste tellings van al vier seisoene kom tydens die middel van die lente voor (33.6×10^5) met 'n afname na die einde van die lente toe.



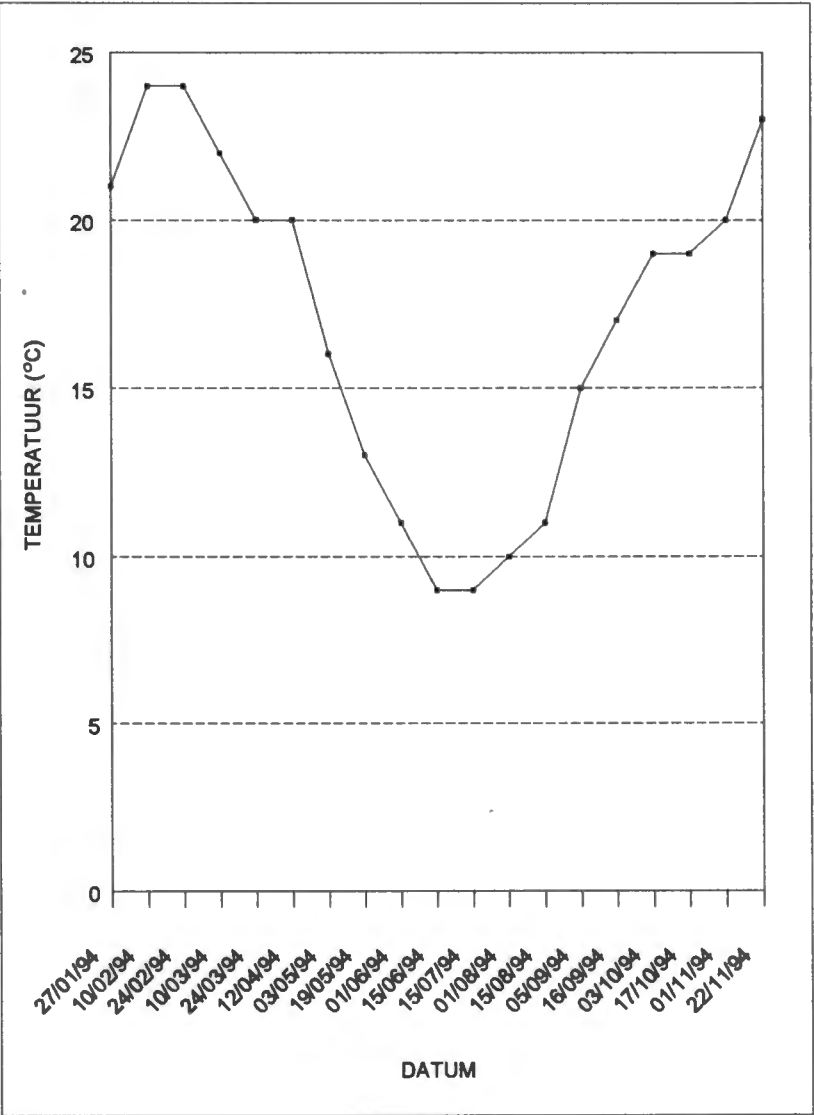
Figuur 3.2 : Die aantal bakterieë/ml op PTA by 20°C in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■). Weens tegniese redes kon betroubare bepalinge nie op 03/10/94 gemaak word nie.

Die aantal bakterieë wat na inkubering by 37°C getel is (Figuur 3.3), is aan die begin en die einde van die somer in die stilstaande, sowel as stadig- en vinnigvloeiende water, relatief baie hoog (13.1 tot 4.69×10^5). In die herfs is die getalle in al drie sones aanvanklik hoog (1.52 tot 15.6×10^5), maar neem later af. Die winter word oor die algemeen gekenmerk deur relatief lae bakteriese getalle (0.02 tot 0.51×10^5) in al die sones wat ondersoek is. Die grootste aantal bakterieë (7560×10^5) is weer eens in die lente in al die sones waargeneem, met 'n afname na die einde van die lente, maar nog steeds hoog in vergelyking met die getalle wat in die somer en herfs waargeneem is.



Figuur 3.3 : Die aantal bakterieë/ml op PTA by 37°C in stilstande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■). Weens tegniese redes kon betroubare bepalinge nie op 03/10/94 gemaak word nie.

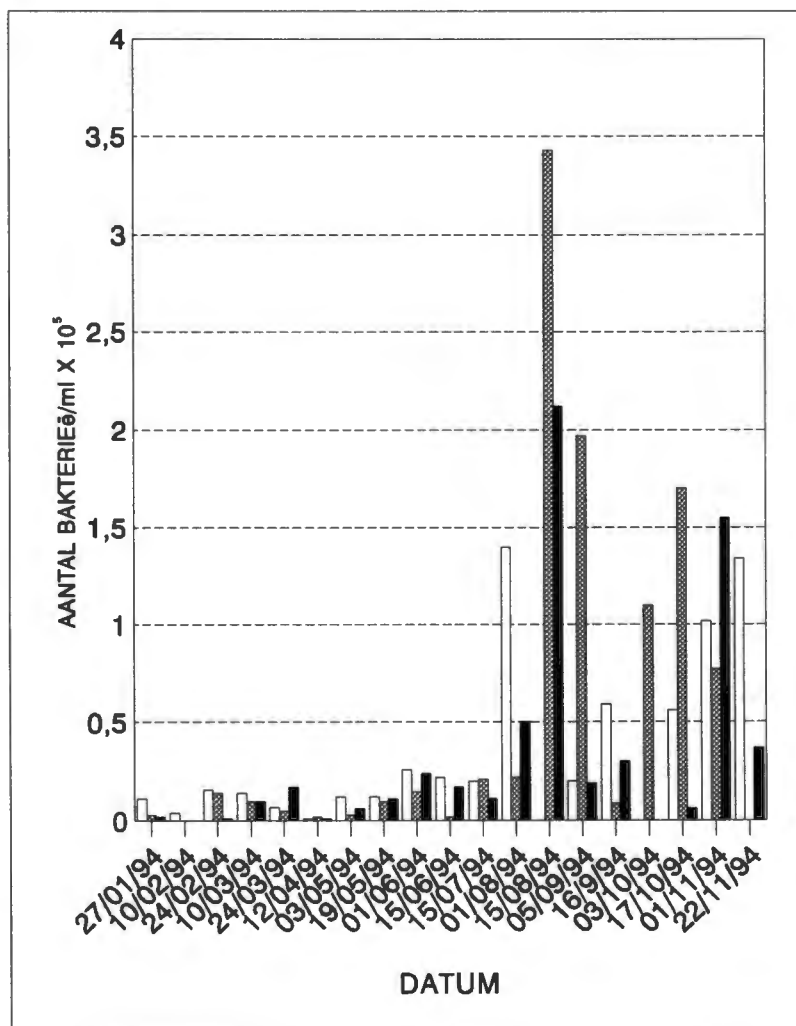
Volgens die patroon van temperatuursverandering (Figuur 3.4) van die water by die monsternamepunt oor die vier seisoene word die somer gekenmerk deur hoë temperature (hoogste van 24°C). Die temperatuur neem geleidelik af tot aan die einde van die winter (laagste van 8°C) en in die lente neem dit weer geleidelik toe tot 20°C.



Figuur 3.4: Die temperatuursverandering (°C) van die water oor die vier seisoene. Die temperatuur is telkens tydens monstername gemeet en elke punt is die gemiddeld van drie lesings. Die termometer is sowat 5 cm diep in die water gehou. Die temperatuur is net op een plek gemeet.

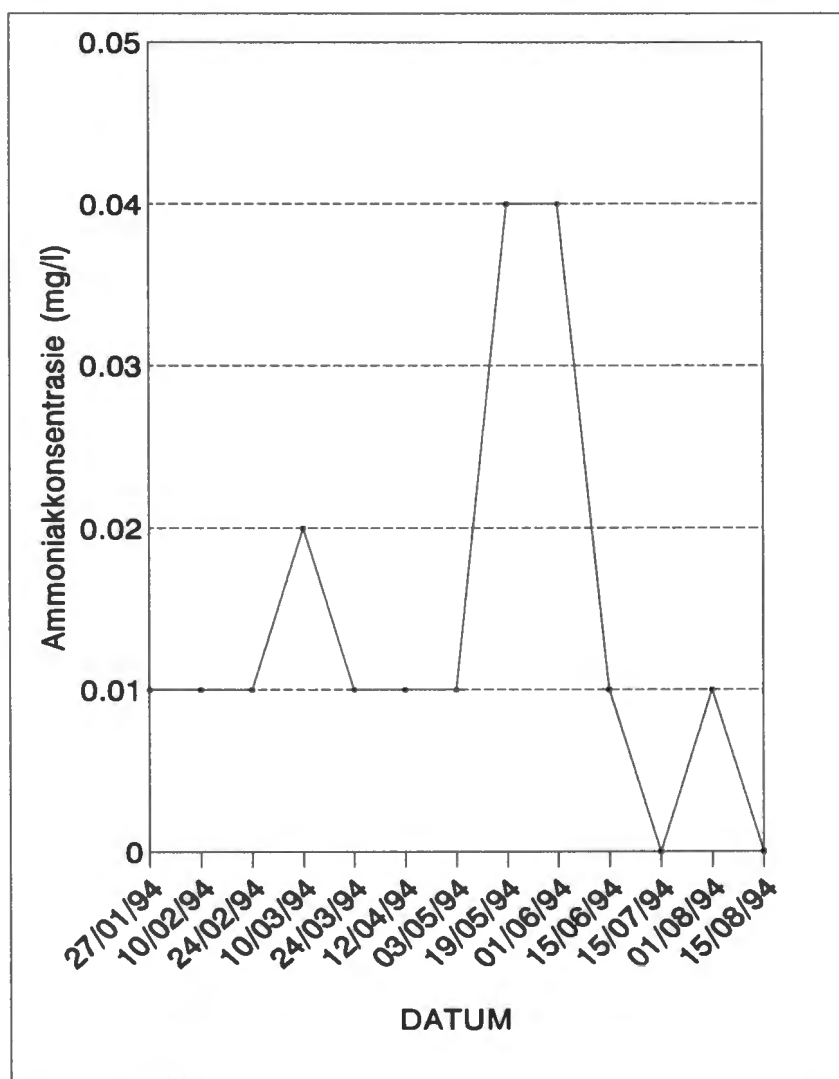
3.3.2 Kwantifisering van nitrifiseerders

Die veranderinge oor die seisoene in die aantal bakterieë wat op ammoniakagar gegroei het, word in Figuur 3.5 gegee. Die hele somer en herfs word gekenmerk deur lae bakteriese getalle (0 tot 0.17×10^5) in al drie sones en dit is eers teen die einde van die winter dat hoër bakteriese getalle waargeneem is (34.23×10^5). In al drie sones is die bakteriese getalle in die lente aanvanklik laag (0.2×10^5), maar word hoër na die einde van die lente (1.55×10^5), behalwe die hoeveelheid bakterieë in die stadigvloeiende water wat deurgaans hoog was in die lente (1.1 tot 1.97×10^5). Trouens, met die uitsondering van 'n paar gevalle was die bakteriese getalle in die stilstaande water die hoogste deur die hele jaar oor al vier die seisoene.



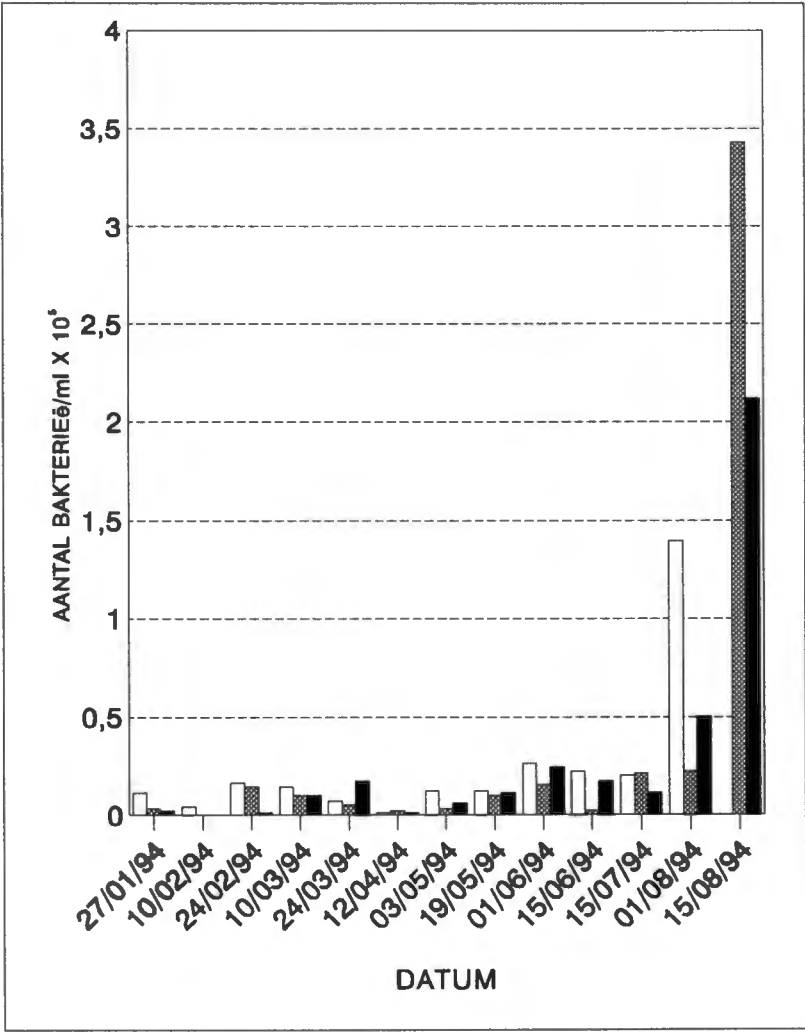
Figuur 3.5 : Die aantal bakterieë/ml op ammoniakagar in stilstandende (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

Die veranderinge in die hoeveelheid ammoniak wat tydens elke monstername in die water teenwoordig was, word in Figuur 3.6 gegee. Met die uitsondering van die styging in die ammoniakkonsentrasie tydens die oorgang van herfs na winter waartydens die ammoniakkonsentrasie van 0.01 mg/l tot 0.04 mg/l gestyg het, het die ammoniakkonsentrasie tussen die grens van 0 tot 0.02 mg/l gevarieer. As gevolg van tegniese redes kon die ammoniakkonsentrasie net tot op 15/08/94 gemeet word en is die resultate tot en met 22/11/94 nie beskikbaar nie. Wanneer Figuur 3.5 en Figuur 3.6 vergelyk word, lyk dit asof die bakteriese getalle hoër was by die laer ammoniakkonsentrasies en dat die hoër ammoniakkonsentrasies (0.04 mg/l) byna geen invloed op die bakteriese getalle gehad het nie.



Figuur 3.6: Veranderinge in die hoeveelheid ammoniak in die water oor die vier seisoene.

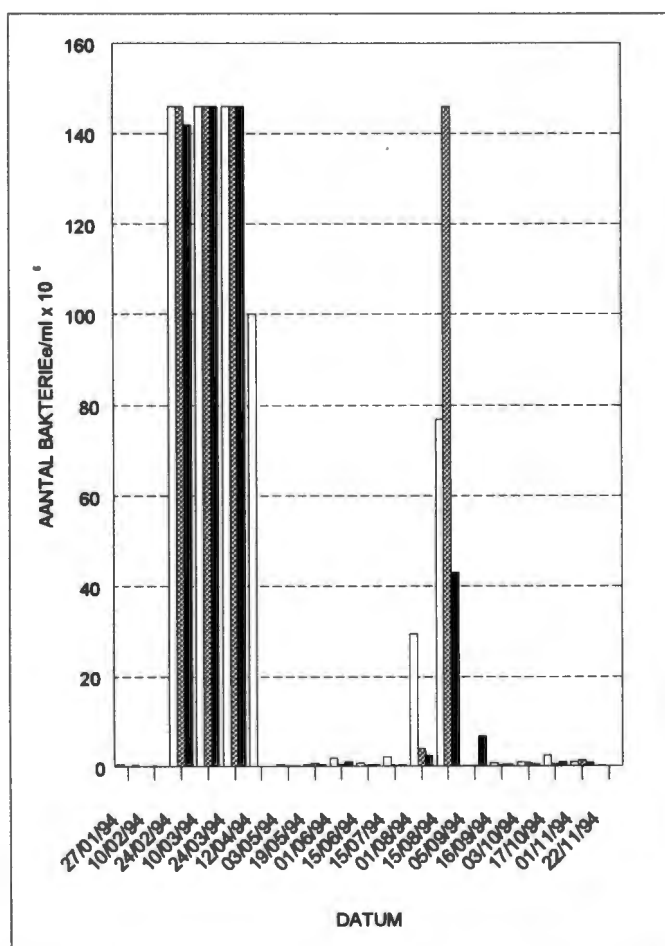
Wanneer die bakteriese getalle van net die eerste sewe maande (27/01/94 tot 15/07/94) (Figuur 3.7) met die ammoniakkonsentrasies vergelyk word, lyk dit tog asof daar 'n verband tussen die hoeveelheid ammoniak en die nitrosifiseerders in die water is. Hoër bakteriese getalle word tydens die hoër ammoniakkonsentrasies 24/02/94 tot 24/03/94 en 03/05/94 tot 15/06/94 waargeneem. Tydens die laer ammoniakkonsentrasies word laer bakteriese getalle waargeneem.



Figuur 3.7 : Die aantal bakterieë/ml op ammoniakagar in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■) vir die eerste sewe maande.

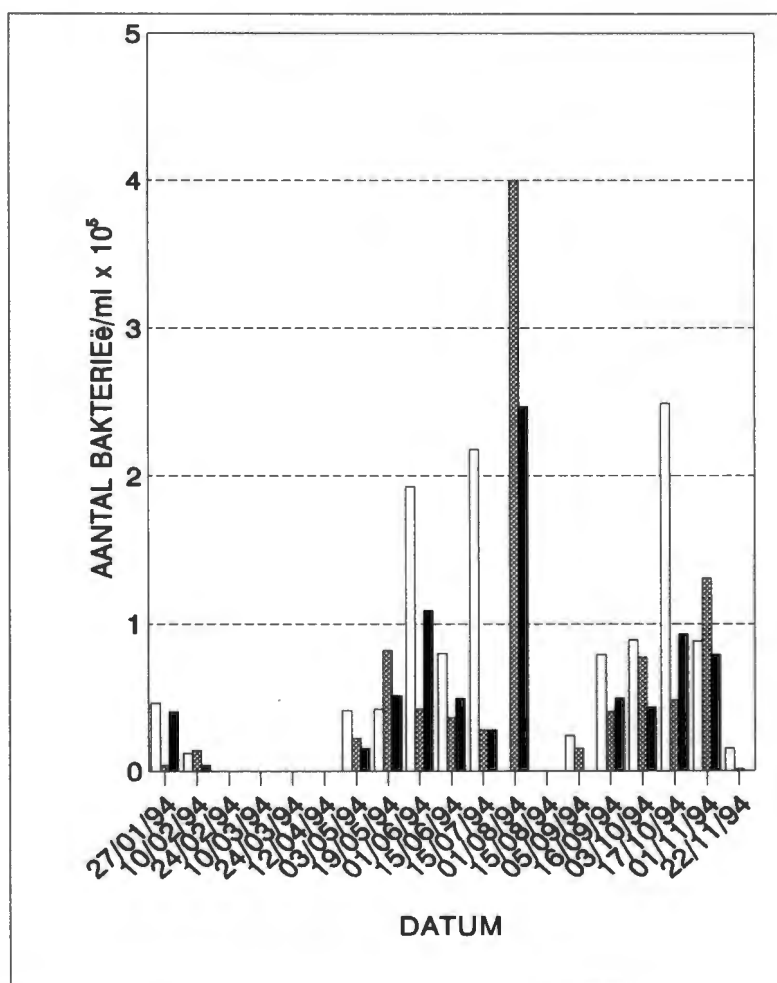
Figuur 3.8 toon die aantal bakterieë wat op nitrietagar gegroei het. Bakteriese getalle tydens die somermaande in al drie sones is aanvanklik laag (0.01 tot 1.34×10^5), maar styg namate die somer vorder (142×10^5). Hoë getalle (100×10^5)

is ook tydens die herfs in al die sones waargeneem met 'n afname na die einde van die herfs. Die winter se getalle is aanvanklik hoog (1.92×10^5), maar neem dan af en teen die einde van die winter is die bakteriese getalle weer baie hoog (77 tot 145.9×10^5). Met die aanvang van die lente toon al drie sones 'n skerp daling in bakteriese getalle (0.15 tot 6.7×10^5) met 'n geleidelike toename oor die seisoen. Wanneer hierdie resultate met Figuur 3.5 vergelyk word, sou verwag word dat dieselfde tendens waargeneem moet word. Indien die bakteriese getalle in Figuur 3.5 dus hoog is, sou dit in Figuur 3.8 ook hoog wees omdat die twee groepe bakterieë in wisselwerking met mekaar is. (Die een se eindproduk is die volgende een se substraat.) Wanneer Figuur 3.5 en Figuur 3.8 vergelyk word blyk bogenoemde nie die geval te wees nie. Uitermate hoë bakteriese tellings is vanaf einde somer tot middel herfs waargeneem en ook aan die einde van die winter. Die hoë bakteriese getalle oor hierdie tydperk is egter onverklaarbaar.



Figuur 3.8: Die aantal bakterieë/ml op nitrietagar in stilstaande (□), stadig (▨) en vinnigvloeiende water (■).

Indien hierdie onverklaarbare resultate weggelaat sou word, sien die resultate soos in Figuur 3.9 daarna uit. Wanneer hierdie resultate nou met Figuur 3.5 vergelyk word, word die verwagte tendens waargeneem, naamlik hoë bakteriese getalle in albei gevalle op ooreenstemmende tydperke. In albei gevalle dus vanaf die begin van die winter tot die einde van die lente in al drie sones. Laer bakteriese getalle het tydens die somer en herfs voorgekom. Dit is ook opmerklik in Figuur 3.9 dat die bakteriese getalle in die stilstaande water reg deur die jaar hoër was as in die ander sones.

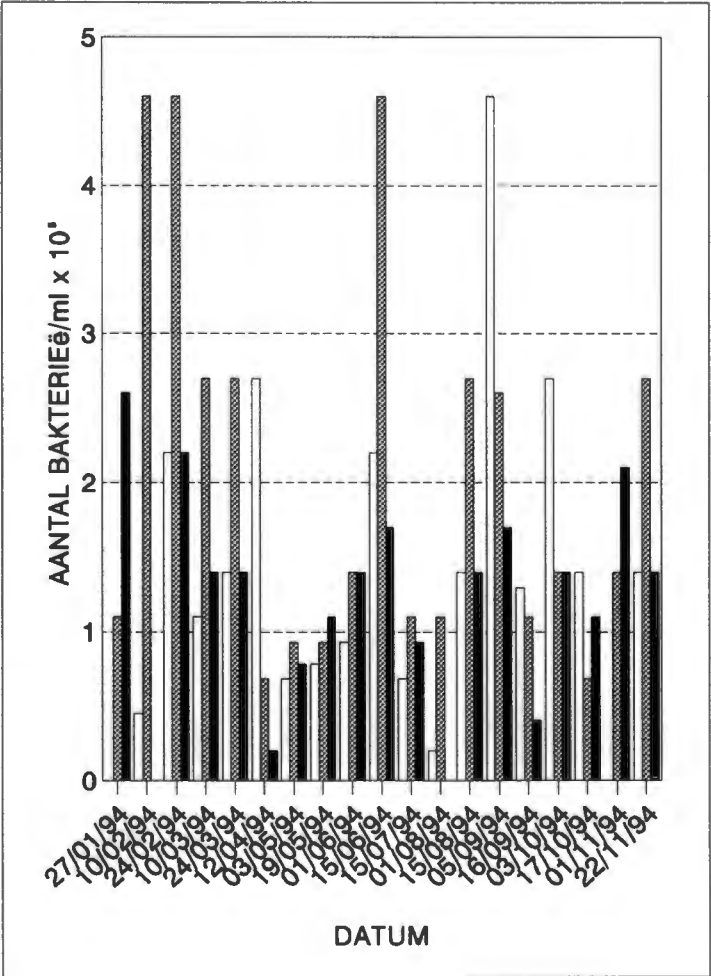


Figuur 3.9 : Die aantal bakterieë/ml op nitrietagar in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

3.3.3 Kwantifisering van denitrifiseerders

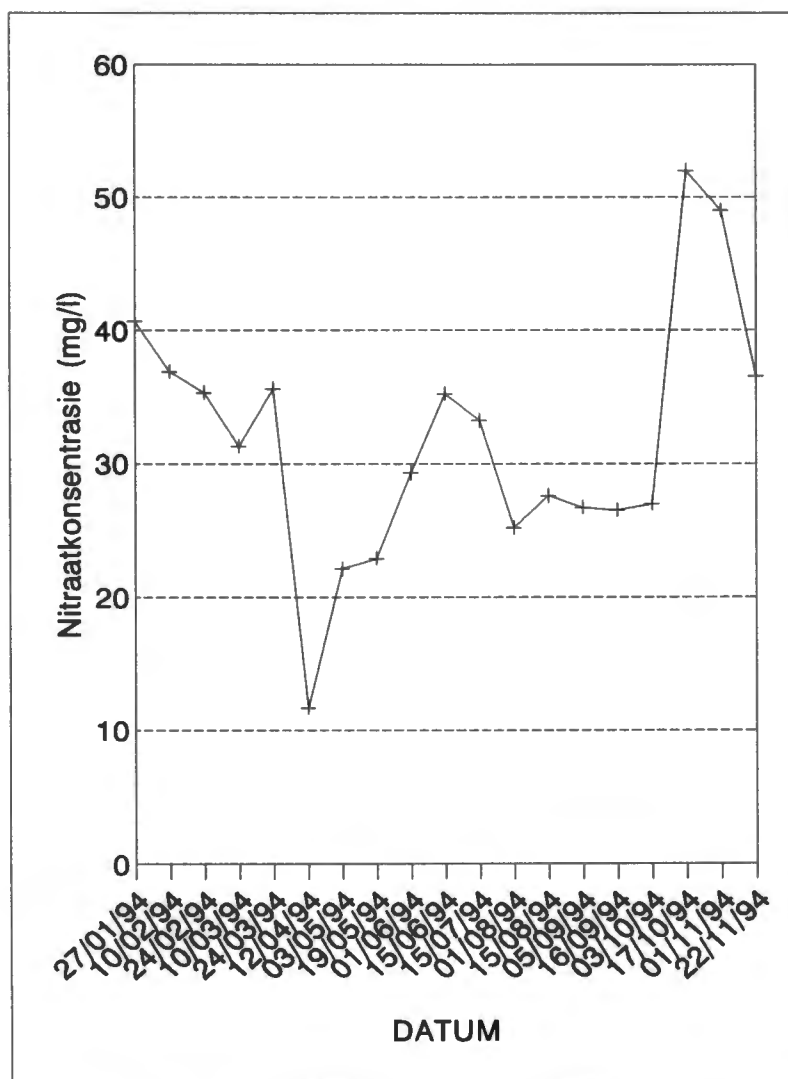
Die hoeveelheid denitrifiseerders in die water is met behulp van nitraatsop gemoniteer en hierdie resultate word in Figuur 3.10 gegee. Die hoeveelheid

bakterieë in die stilstaande en vinnigvloeiende water toon dieselfde tendens tydens die somer, naamlik 'n aanvanklike styging met 'n skerp daling en weer 'n styging. Die bakteriese getalle in die stadigvloeiende water het aanvanklik eers gedaal en daarna gestyg. Tydens die begin van die herfs is die bakteriese getalle in al drie die sones hoog (1.1 tot 2.7×10^5), maar neem later af (0.78 tot 1.1×10^5). Die begin en einde van die winter word deur hoë bakteriese getalle in al die sones gekenmerk (1.4 tot 2.7×10^5) met 'n effense afname in die middel van die winter. Bakteriese getalle in die lente in al drie sones is aanvanklik hoog (1.7 tot 4.6×10^5) en neem later effens af.



Figuur 3.10 : Die aantal bakterieë/ml in nitratoop in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■). Die hoeveelheid bakterieë in die stilstaande water was op 27/01/94 buitengewoon hoog en word nie in hierdie figuur aangedui nie; die y-as sou buite verhouding groot moes wees.

Die nitraatkonsentrasie in die water is voortdurend gemoniteer om vas te stel of daar 'n verband bestaan tussen die hoeveelheid nitraat in die water en die aantal denitrifiseerders in die water, en dié resultaat word in Figuur 3.11 gegee. Wanneer Figuur 3.10 en Figuur 3.11 vergelyk word, wil dit voorkom asof daar 'n direkte verband tussen die nitraatkonsentrasie in die water en die hoeveelheid denitrifiseerders in die water is.



Figuur 3.11: Veranderinge in die hoeveelheid nitraat in die water oor die vier seisoene.

Vanaf die begin van die somer tot middel herfs was daar 'n afname in die hoeveelheid nitraat (40 tot 11.7mg/l) (Figuur 3.11). In die ooreenstemmende tydperk was daar volgens Figuur 3.10 ook 'n afname in die bakteriese getalle. 'n Geleidelike styging in die nitraatkonsentrasie tot in die middel van die winter is

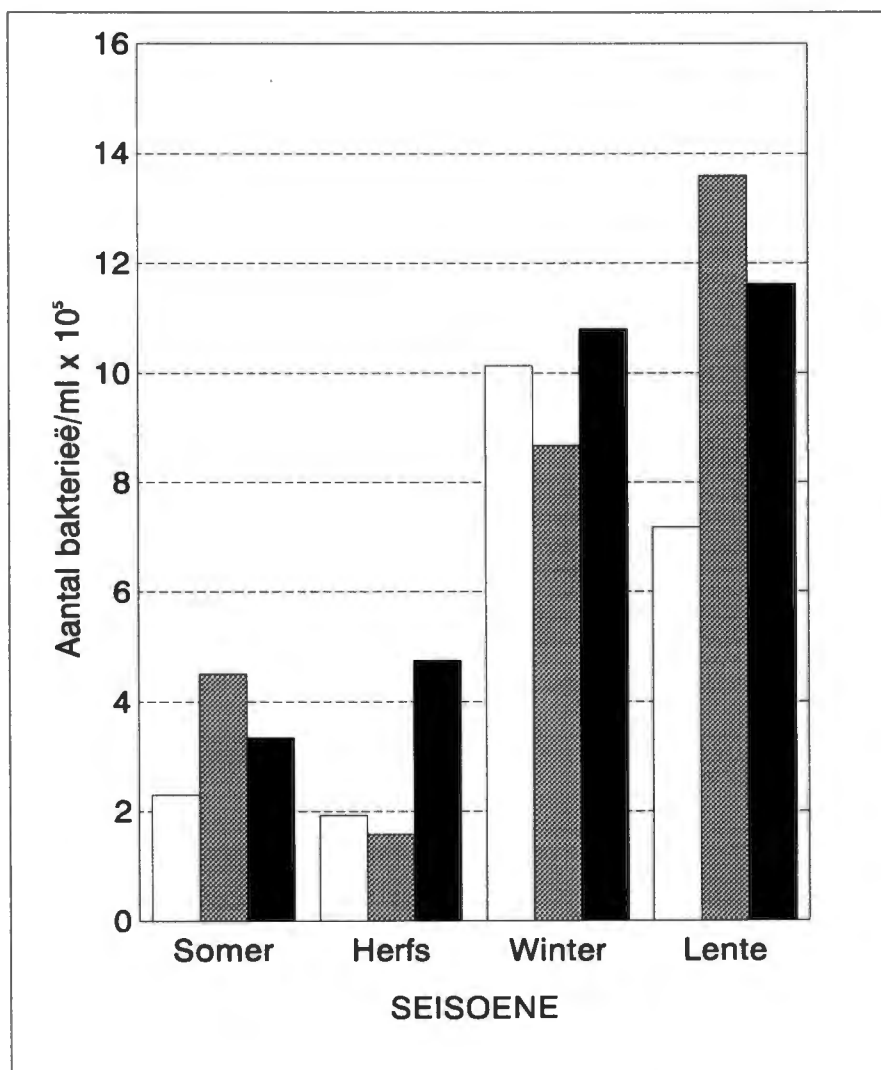
waargeneem (11.7 tot 35.2 mg/l) en in Figuur 3.10 kan 'n styging in die bakteriese getalle ook waargeneem word. Die nitraatkonsentrasie het weer afgeneem tot by 27.6 mg/l (Figuur 3.11) en 'n ooreenstemmende afname in die bakteriese getalle is waargeneem (Figuur 3.10) vir die ooreenstemmende tydperk 15/06/94 tot 01/08/94. 'n Styging in die nitraatkonsentrasie daarna het weereens 'n ooreenstemmende styging in die bakteriese getalle tot gevolg gehad. Hoewel die nitraatkonsentrasie daarna redelik konstant gebly het, het die bakteriese getalle baie toegeneem (byvoorbeeld van 1.4 tot 4.6×10^5 in die stilstaande water op 05/09/94). Na die aanvanklike styging in die bakteriese getalle was daar 'n daling en op 03/10/94 het die bakteriese getalle in al drie sones weer gestyg terwyl die nitraatkonsentrasie min of meer onveranderd gebly het. 'n Geweldige toename in die nitraatkonsentrasie op 01/11/94 (52 mg/l) het anders as wat voorheen waargeneem is, laer bakteriese getalle tot gevolg gehad. Die hoë nitraatkonsentrasie op 01/11/94 en 22/11/94 het weer soos voorheen hoë bakteriese getalle tot gevolg gehad.

3.3.4 Gemiddelde aantal bakterieë oor die vier seisoene

Ten einde 'n sinvolle vergelyking te kan maak ten opsigte van variasies en tendense in die bakteriese profiel, is die gemiddeld van die aantal bakterieë van elke seisoen in elk van die drie sones (stilstaande water, stadig- en vinnigvloeiende water) vergelyk.

Die gemiddelde waardes vir die getalle van die bakterieë wat op plaattellingsagar by 20°C getel is, word in Figuur 3.12 gegee. Wanneer Figuur 3.4 (die temperatuursveranderinge oor die vier seisoene) hiermee vergelyk word, word groter hoeveelhede bakterieë (7.18 tot 13.6×10^5) waargeneem wanneer die temperatuur laer is wat vir al drie sones tydens die winter en lentemaande waargeneem is. Die omgekeerde is ook waar - by die hoër temperature (tydens die somer en herfs) word laer bakteriese getalle in al die sones waargeneem. In die somer en die lente is die gemiddelde hoeveelheid bakterieë in die stadigvloeiende water die hoogste, maar tydens herfs en winter is die gemiddelde

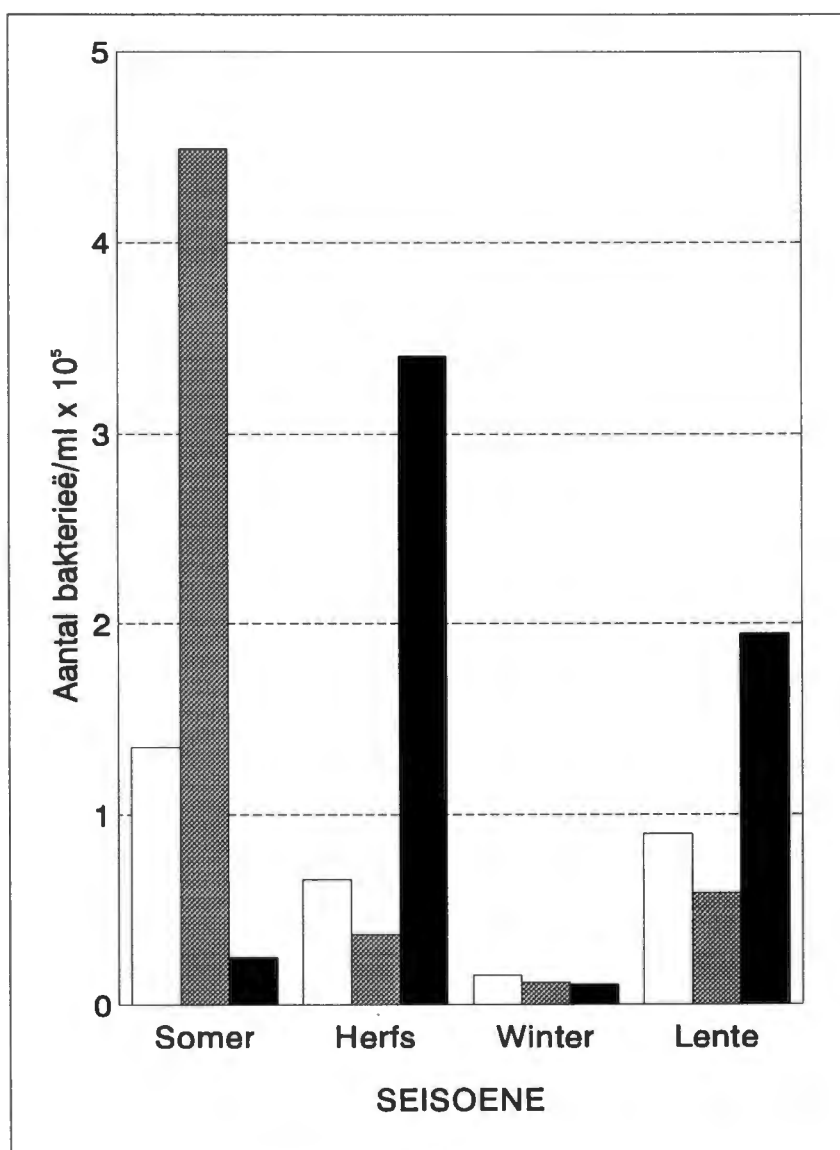
hoeveelheid bakterieë in die vinnigvloeiende water weer die meeste. In die winter- en somermaande is die verskil in die gemiddelde hoeveelheid bakterieë tussen die verskillende sones nie so groot soos in die lente nie. Tydens die herfs is die aantal bakterieë in die vinnigvloeiende water twee maal groter as in die ander sones en in die lente is die bakteriese getalle in die stilstaande water amper die helfte van die ander twee sones (stadig- en vinnigvloeiende water).



Figuur 3.12: Gemiddelde hoeveelheid bakterieë oor die vier seisoene op PTA by 20°C in stilstande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

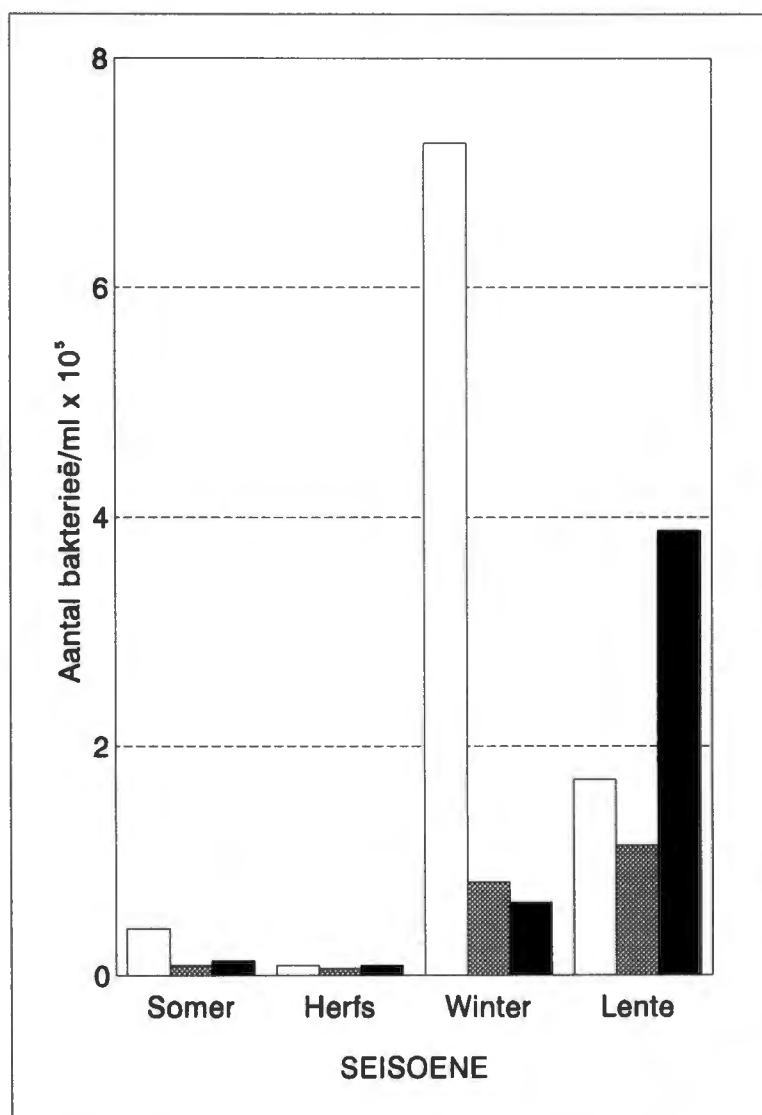
Figuur 3.13 toon die gemiddeld van die hoeveelheid bakterieë per seisoen wat op plaattellingsagar by 37°C gegroei het. Die grootste hoeveelheid bakterieë in die stilstande (1.36×10^5) en stadigvloeiende (4.49×10^5) water kom tydens die

somer voor terwyl die grootste hoeveelheid bakterieë (3.41×10^5) in die vinnigvloeiende water in die herfs waargeneem is. In al die sones is die bakteriese getalle die laagste tydens die wintermaande. Wanneer Figuur 3.12 en Figuur 3.13 vergelyk word, is die gemiddelde hoeveelheid bakterieë wat by 37°C (Figuur 3.13) gegroei het heelwat laer as die gemiddelde hoeveelheid bakterieë wat by 20°C (Figuur 3.12) gegroei het. Volgens Figuur 3.12 (20°C) is die grootste hoeveelheid bakterieë tydens die winter en lente waargeneem terwyl dit net die teenoorgestelde by 37°C (Figuur 3.13) is waar die grootste hoeveelheid bakterieë tydens die somer en herfs waargeneem is.



Figuur 3.13: Gemiddelde hoeveelheid bakterieë oor die vier seisoene op PTA by 37°C in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

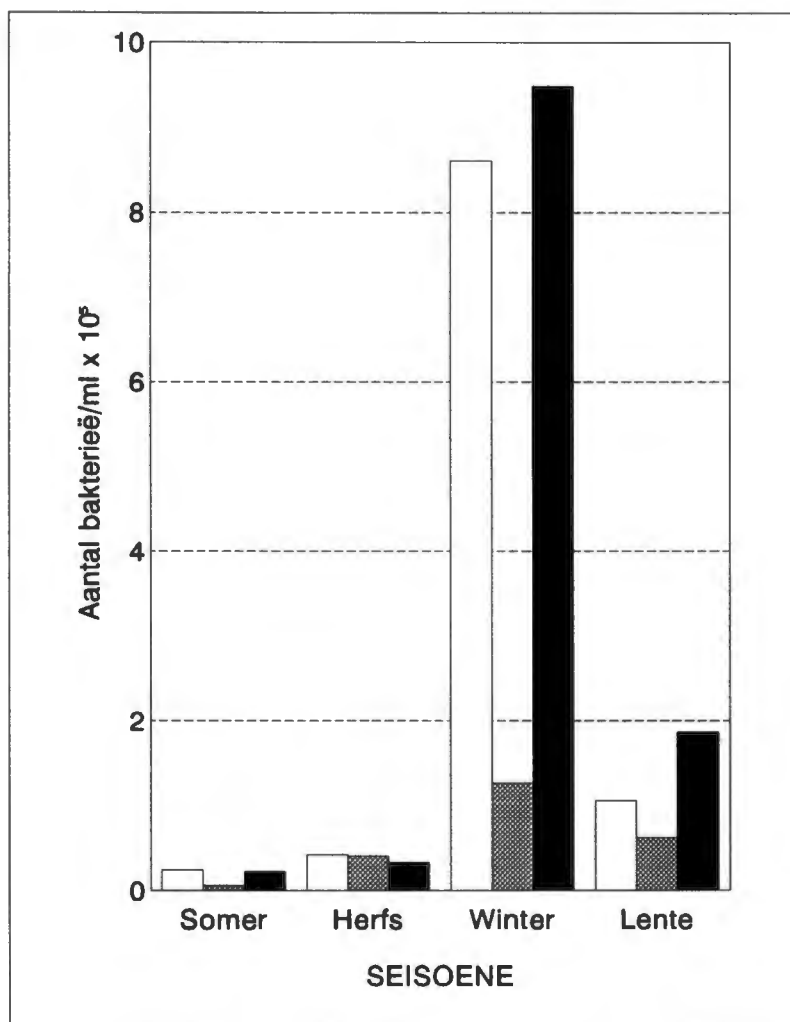
Die grootste hoeveelheid bakterieë (7.26×10^5) in die stilstaande water wat op ammoniakagar groei kom in die wintermaande voor (Figuur 3.14) en tydens die lente in die stadigvloeiende (1.13×10^5) en vinnigvloeiende water (3.88×10^5). Die hoeveelheid bakterieë wat op ammoniakagar gegroei het, is in die winter en lente oor die algemeen hoër as in die somer en herfs.



Figuur 3.14: Gemiddelde hoeveelheid bakterieë oor die vier seisoene op ammoniakagar in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

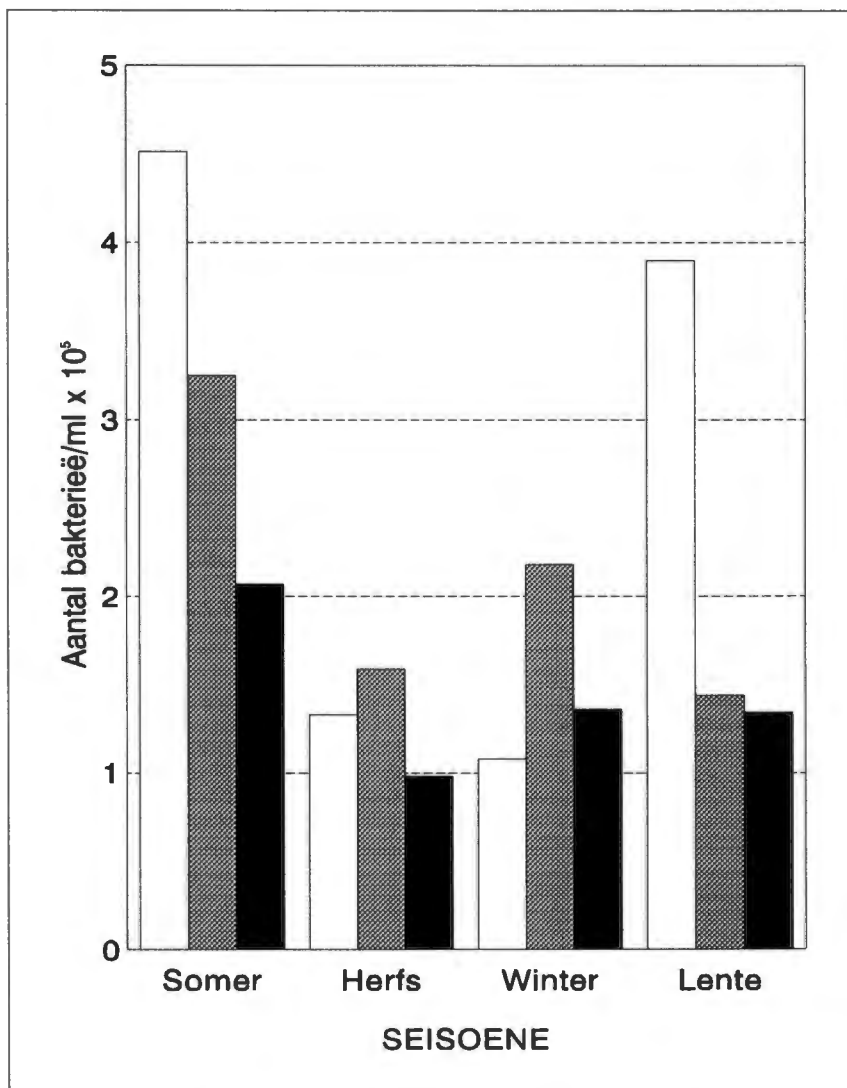
Volgens Figuur 3.15, wat die gemiddelde hoeveelheid bakterieë op nitrietagar aantoon, kom die hoogste getalle in al drie die sones in die winter voor (1.27 tot 9.48×10^5), met die tweede hoogste in die lente en die laagste in die somer en die

herfs. Opvallend is die stadigvloeiende water waarin die gemiddelde hoeveelheid bakterieë wel die hoogste in die winter is, maar nie so hoog soos die stilstaande en vinnigvloeiende water se gemiddelde getal nie.



Figuur 3.15 : Gemiddelde hoeveelheid bakterieë oor die vier seisoene op nitrietagar in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■).

Die gemiddelde hoeveelheid denitrifiseerders wat in nitraatsop gegroei het word in Figuur 3.16 gegee. Oor die algemeen lyk dit of die getalle in die somer hoog is (2.07 tot 4.51×10^5) en dan geleidelik afneem in die herfs en in die winter en lente weer toeneem. Die hoeveelheid bakterieë in die stadigvloeiende water het in die lente afgeneem na 'n toename in die winter. Opvallend in Figuur 3.16 is die hoë gemiddelde hoeveelheid bakterieë in die stilstaande water in die somer en lente.



Figuur 3.16 : Gemiddelde hoeveelheid bakterieë oor die vier seisoene in nitratoop in stilstaande (□), stadig- (▨) en vinnigvloeiende water (■). Die bakteriese getalle van 27/01/94 vir die stilstaande water is in berekening gebring.

'n Effense verskuiwing van die seisoenale indelings (kyk 3.3.1) om byvoorbeeld die somerseisoen te verleng en die lente te verkort, het nie 'n noemenswaardige uitwerking op die resultate gehad nie en die seisoenindelings is daarom onveranderd gelaat.

Die pH in die rietbed is ook oor die hele tydperk gemoniteer (resultate nie getoon), maar die pH het nie 'n betekenisvolle variasie getoon (8.9 tot 10.2) dat

dit as 'n invloed in die veranderinge in die bakteriese getalle gereken kan word nie.

3.3.5 Identifikasie van geïsoleerde bakterieë

Die bakterieë wat vanaf ammoniak- en nitrietagar geïsoleer is, is A tot D genummer en dié vanaf PTA 1 tot 15. Die bakterieë vanaf PTA is op grond van koloniemorfologie en kleur van mekaar onderskei en geïsoleer. Verteenwoordigende voorbeelde is tydens elke monstername afgetel, gesuiwer en die primêre identifikasietoetse is uitgevoer. Op die ammoniak- en nitrietagar kon telkens net vier verskillende kolonies op grond van koloniemorfologie van mekaar onderskei word en al vier is geïsoleer, gesuiwer en primêre identifikasietoetse is uitgevoer. Die resultate van die primêre identifikasietoetse word in Tabel 3.1 gegee. Volgens Tabel 3.1 is die meeste bakterieë Gram negatief en slegs een bakterie (nommer 9) het endospore gevorm. Geen bakterie was suurvast en almal was katalase positief.

Tabel 3.1 Die resultate van die primêre identifikasie toetse

Kultuur	Gram kleuring	Endospoor kleuring	Negatiewe kleuring	Suurvaste kleuring	Oksidase	Katalase	Anaërobe groeitoets	RF
A	-	-	Basil	-	+	+	+	RF ¹
B	-	-	Basil	-	-	+	+	R ²
C	-	-	Vibrio	-	+	+	-	R
D	-	-	Basil	-	+	+	+	RF
1	-	-	Basil	-	+	+	-	R
2	-	-	Basil	-	-	+	-	R
3	-	-	Basil	-	-	+	-	R
4	-	-	Basil	-	-	+	+	R
5	-	-	Basil	-	-	+	-	R
6	-	-	Kok	-	+	+	-	R
7	-	-	Kok	-	-	+	-	R
8	+	-	Kok	-	-	+	+	RF
9	+	+	Basil	-	+	+	+	RF
10	-	-	Basil	-	-	+	-	RF
11	-	-	Kok	-	-	+	-	R
12	-	-	Kok	-	-	+	-	R
13	-	-	Kok	-	-	+	+	R
14	-	-	Basil	-	+	+	+	R
15	-	-	Basil	-	+	+	+	R

1 Respiratief en fermentatief

2 Respiratief

* + = fakultatief anaëroob of streng anaëroob

- = aëroob

Nadat al die primêre identifikasietoetse op die geïsoleerde bakterieë uitgevoer is, is die bakterieë met behulp van “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*” (Krieg & Holt, 1984) in groepe ingedeel (Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Groepering van bakterieë volgens “*Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*”

Kultuur	Groep
A	Seksie 5 Fakultatief anaërobe Gram negatiewe basille
B	Seksie 5 Fakultatief anaërobe Gram negatiewe basille
C	Seksie 3 Nie beweeglike (of selde beweeglike) Gram negatiewe geboë bakterieë
D	Seksie 5
1	Seksie 4 Gram negatiewe aërobe basille en kokke
2	Seksie 4 Gram negatiewe aërobe basille en kokke
3	Seksie 4 Gram negatiewe aërobe basille en kokke
4	Seksie 5
5	Seksie 4
6	Seksie 4
7	Seksie 4
8	Seksie 12 Gram negatiewe kokke
9	Seksie 14 Gewone nie-spoorvormende Gram negatiewe basille
10	Seksie 4
11	Seksie 4
12	Seksie 4
13	Seksie 5
14	Seksie 5
15	Seksie 5

Die meeste bakterieë in Tabel 3.2 behoort dus tot Seksie 4 en 5 en nie een bakterie het tot die outotrofe nitrifiseerders behoort nie (kyk Hoofstuk 4).

HOOFSTUK 4

BAKTERIEË VAN DIE STIKSTOFKRINGLOOP

4.1 Inleiding

Soos reeds in Hoofstuk 3 genoem is, is hierdie werk deel van 'n meer omvattende studie van die bakteriese profiel van 'n rietbed en in Hoofstuk 3 het die klem hoofsaaklik op die bakteriese getalle in die rietbed geval. Die werk wat in hierdie hoofstuk beskryf word, is deel van 'n meer verkennende studie ten opsigte van die bakterieë wat in stikstofomsetting betrokke is.

Die invloed in die rietbed is hoofsaaklik rioolwater wat eers deur die bioreaktor behandel is (kyk 3.2.1) en daar kom dus stikstofverbindinge in die rietbed in wat verwyder moet word. Inligting oor die prosesse van nutriëntomskakeling in 'n gekonstrueerde vleiland (rietbed) word benodig om die werkingsparameters te optimaliseer, insluitend die fisiese en biologiese ontwerp van die stelsel. Hierdie aspek is tot onlangs verwaarloos, moontlik as gevolg van die probleme wat ondervind word om nutriëntomskakeling te meet binne 'n sisteem wat met onvolledige vermenging en komplekse hidrologie geassosieer is (Bowmer, 1987). 'n Beskrywing van die mikrobiese populasies in natuurlike en gekonstrueerde vleilande is belangrik om vas te stel of die gekonstrueerde rietbed 'n funksioneel beduidende mikrobiese gemeenskap besit. So 'n beskrywing kan ook gebruik word om spesifieke mikrobiese aktiwiteit, wat betrekking het op waterkwaliteit, te evalueer. Om dus 'n lewende mikrobiese komponent met spesifieke metaboliese eienskappe in 'n rietbed tot stand te bring, is een van die ontwykende doelwitte in rietbedkonstruksie (Duncan & Groffman, 1994).

Een van die kenmerke van die (anorganiese) stikstofkringloop is die heterogeniteit van die bakterieë wat betrokke is. Selfs in omskakelingsreaksies soos nitrifisering, wat voorheen as die eksklusiewe eienskap van 'n paar gespesialiseerde outotrofe (*Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrococcus* en

Nitrobacter spp) beskou is, het dit mettertyd duidelik geword dat heterotrofe bakterieë (*Arthrobacter*) en fungi (*Aspergillus*) bydra, en selfs die primêre bron van nitrifisering in sommige gevalle is (Kuenen & Robertson, 1988). Daar is dus besluit om 'n verkennende studie te loods ten opsigte van die voorkoms en aard van die nitrifiseerders in die rietbed.

Nitrifiseerders is chemolitotrofe bakterieë wat koolstofdioksied uit die lug as anorganiese koolstofbron vir energie gebruik (Pelczar *et al.*, 1993). Hulle kan verpligte nitrifiseerders wees wat koolstofdioksied as enigste energiebron gebruik (klassieke of ware nitrifiseerders) of fakultatiewe (heterotrofe) nitrifiseerders wat nie noodwendig koolstof uit die lug verkry en swak onder bogenoemde toestande groei (Brock *et al.*, 1994). Dit is ook aangetoon dat nitrifisering 'n baie sensitiewe parameter is om die effek van besoedelingstowwe in 'n bepaalde habitat te meet (Hicks *et al.*, 1990). Laasgenoemde beteken dat 'n goeie kennis van die nitrifiserende bakterieë se gedrag in 'n rietbed 'n goeie aanduiding kan wees van die welstand van daardie rietbed.

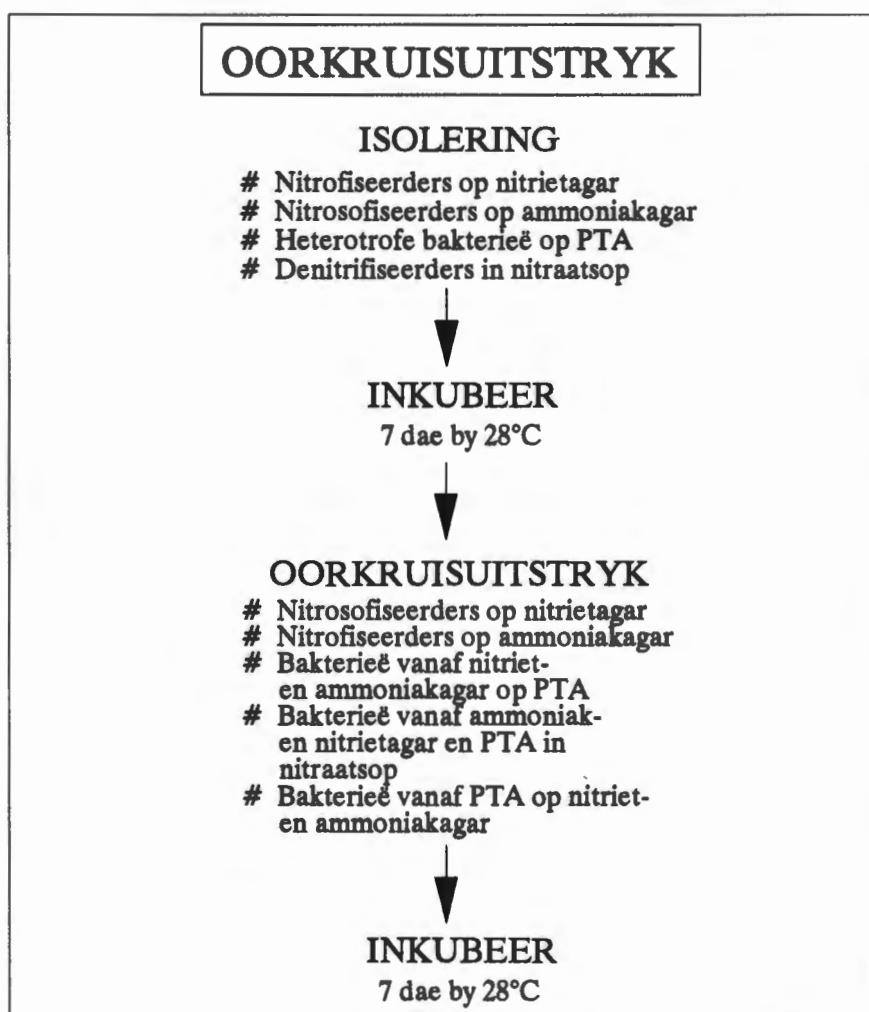
4.2 Eksperimenteel

Die feit dat daar wel bakterieë op die nitriet- en ammoniakagar gegroei het (Hoofstuk 3), bevestig dat daar bakterieë in die uitvloeisel voorkom wat op anorganiese stikstofverbindinge groei. Volgens Lötter (1994) bestaan die outotrofe nitrifiseerders uit twee verskillende groepe bakterieë wat baie spesifiek in hul werking is. Die bakterieë sou dus na regte nie op mekaar se media groei nie. Om hierdie verskynsel te toets, is verteenwoordigers van die twee groepe nitrifiseerders, nadat hulle gesuiwer is, oorkruis op die onderskeie media uitgestryk. Die bakterieë wat op PTA en ammoniak- en nitrietagar gegroei het, is ook in nitraatsop geïnkuleer om vas te stel of hulle nitraat kan omskakel na stikstofgas (denitrifisering). Hiervolgens sou onderskei kan word tussen "ware" of outotrofe en heterotrofe nitrifiseerders.

4.2.1 Oorkruisuitstryk

Die nitrosifiseerders wat op die ammoniakagar groei is op nitrietagar uitgestryk en die nitrofiseerders wat op nitrietagar groei is op ammoniakagar uitgestryk. Die agar wat in die onderskeie media gebruik is, is vooraf met water, chloroform of etanol gewas om alle moontlike organiese verbindings uit die agar te verwyder. Daar is ook, as 'n vierde alternatief, van ioonagar gebruik gemaak. Groei van enige van hierdie bakterieë op die onderskeie media sou dan beteken dat die bakterie die anorganiese komponente van die media as nutriënte benut en nie groei as gevolg van organiese onsuiverhede wat daarin voorkom nie. Outotrofe nitrifiseerders sou nie op die medium groei indien die bakterieë oorkruis uitgestryk sou word nie, maar heterotrofe nitrifiseerders wel. Die verskillende agars is in beide die ammoniak- en nitrietagar vergelyk ten opsigte van die groei van bakterieë. Nadat dit geblyk het dat daar geen verskil ten opsigte van bakteriese groei tussen die verskillende agars was nie, is daar besluit om net chloroform te gebruik om die agar te was omdat dit die vlugtigste is en die proses daardeur vergemaklik word.

Die plate is by 28°C vir een week geïnkubeer en daarna ondersoek vir groei. Die bakterieë wat aanvanklik vanaf die ammoniak- en nitrietagar geïsoleer is, is ook op PTA uitgestryk en vir een week en by 28°C geïnkubeer en vir groei ondersoek. Die bakterieë is ook in nitraatsop geïnokuleer en vir een week by 28°C geïnkubeer en daarna vir gasvorming ondersoek. Die bakterieë wat uit die rietbed op PTA geïsoleer is, is onderskeidelik op ammoniak- sowel as nitrietagar uitgestryk en ook vir een week by 28°C geïnkubeer en vir groei ondersoek. Figuur 4.1 gee 'n skematiese uiteensetting van die oorkruisuitstryk-protokol wat gevolg is.

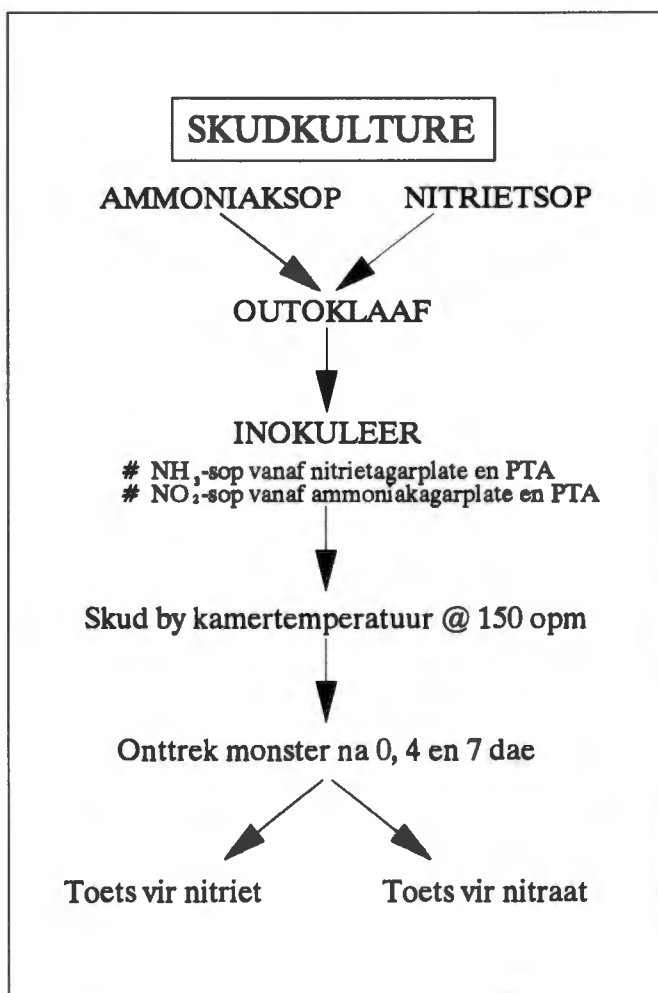


Figuur 4.1: 'n Skematiese voorstelling van die oorkruisuitstrykprotokol wat gevolg is.

4.2.2 Skudkulture

Oorspronklike nitrosifiseerders wat aanvanklik vanaf ammoniakagar geïsoleer is, is in nitrietsop geïnkuleer asook die nitrofiseerders vanaf nitrietagar in ammoniaksop. Die opstelling van die skudkulture is 'n uitbreiding van die oorkruisuitstrykprotokol om vas te stel of enige ammoniak en nitrate deur die onderskeie oorkruiskulture geproduseer is. Die ander bakterieë wat uit die rietbed op PTA geïsoleer is, is ook in onderskeidelik nitriet- en ammoniaksop

geïnkuleer om dit met die bakterieë vanaf die ammoniak- en nitrietagar te vergelyk. Die flesse is by 25 tot 28°C (kamertemperatuur) teen 150 omwentelinge per minuut (opm) geskud en die nitriet- en nitraatkonsentrasie na 0, 3 en 7 dae met behulp van die SQ 118 fotometer bepaal. In Figuur 4.2 word 'n skematiese uiteensetting van die protokol wat gevolg is, gegee.



Figuur 4.2 : 'n Skematiese voorstelling van die skudkultuurprotokol wat gevolg is.

4.2.2.1 Toets vir nitriet en nitraat

Hierdie toetse is met die SQ 118 fotometer volgens die voorskrifte van die verskaffer uitgevoer (Merck).

4.3 Resultate

4.3.1 Oorkruisuitstryk

Volgens die resultate van Tabel 4.1 het nie een van die bakterieë wat vanaf PTA, nitriet- en ammoniakagar geïsoleer is, in nitraatsop gegroei nie. Al die bakterieë, ook die vanaf nitriet- en ammoniakagar, groei op PTA. Wat groei op nitriet- en ammoniakagar betref, was slegs nommers 3, 5, 9 en 14 uitsonderings in die sin dat hierdie bakterieë net op óf die ammoniakagar óf die nitrietagar gegroei het terwyl al die ander bakterieë wat getoets is op albei media gegroei het of glad nie gegroei het nie. In die geval van nommers 3, 5, 9 en 14 waar groei wel op beide tipes groeimedium waargeneem is, het egter baie min groei voorgekom. Volgens Tabel 3.2 behoort hierdie bakterieë tot Seksies 4, 5 en 14.

Tabel 4.1 Resultate van oorkruisuitstrykeksperiment

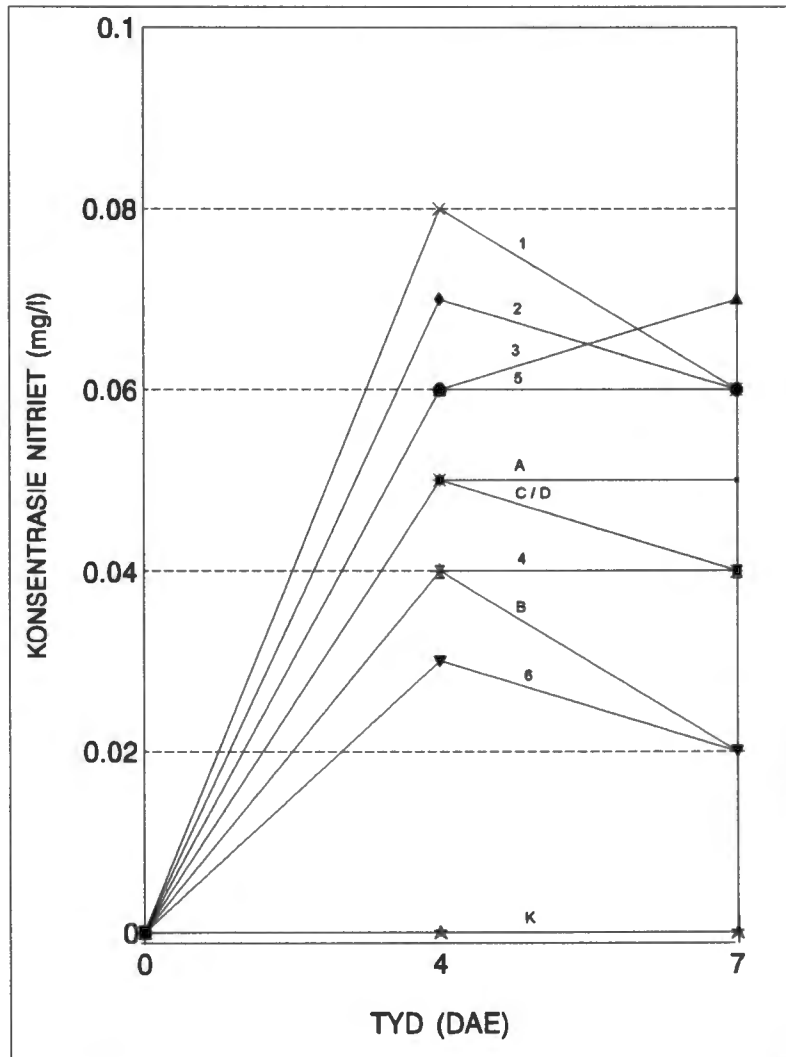
KULTUUR	OOR-SPRONG	AMMONIAK-AGAR	NITRIETAGAR	DENITRI-FISERING	PTA
A	Kom vanaf ammoniak- en nitrietagar	+	+	-	+
B		+	+	-	+
C		+	+	-	+
D		+	+	-	+
1	Kom vanaf PTA	+	+	-	+
2		-	-	-	+
3		+	-	-	+
4		-	-	-	+
5		+	-	-	+
6		+	+	-	+
7		+	+	-	+
8		-	-	-	+
9		-	+	-	+
10		-	-	-	+
11		+	+	-	+
12		+	+	-	+
13		+	+	-	+
14		-	+	-	+
15		+	+	-	+

+ dui groei aan

- dui geen groei aan

4.3.2 Skudkulture

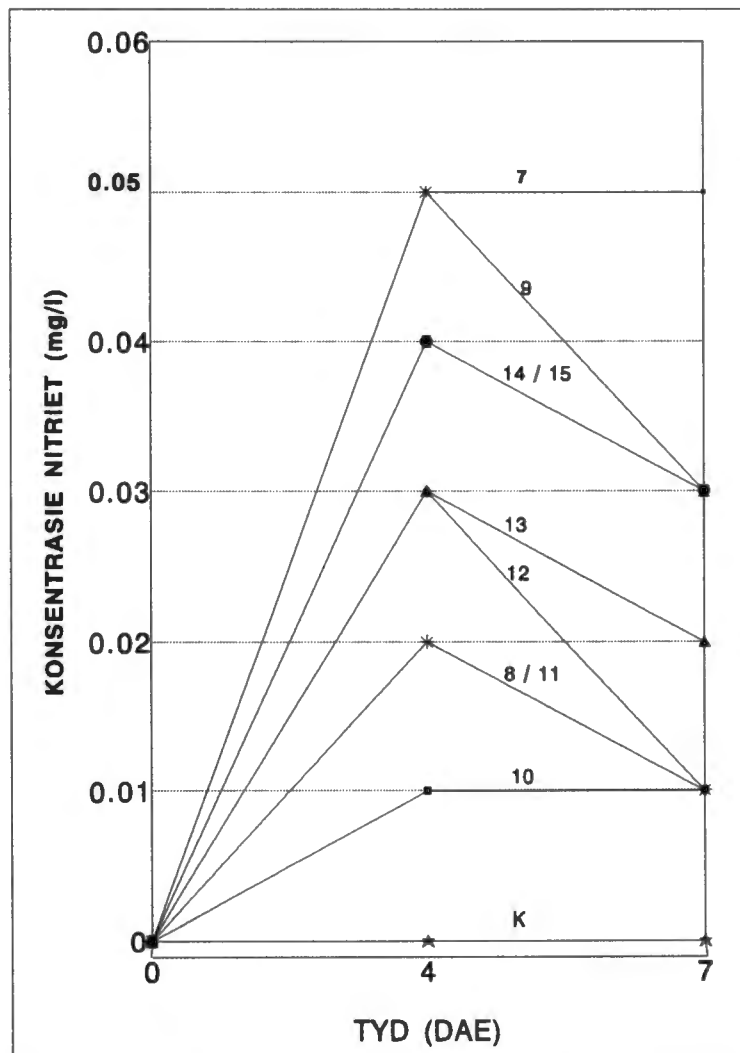
Die resultate van die hoeveelheid nitriet wat in die skudkulture gevorm is, word in Figuur 4.3 en Figuur 4.4 gegee. Die resultate word in twee figure verdeel omdat een figuur te “besig” sal wees.



Figuur 4.3: Hoeveelheid nitriet in die skudkulture. Die hoeveelheid nitriet is na 0, 4 en 7 dae inokulasie bepaal. Numering van die verskillende kulture is dieselfde as vir Tabel 4.1.

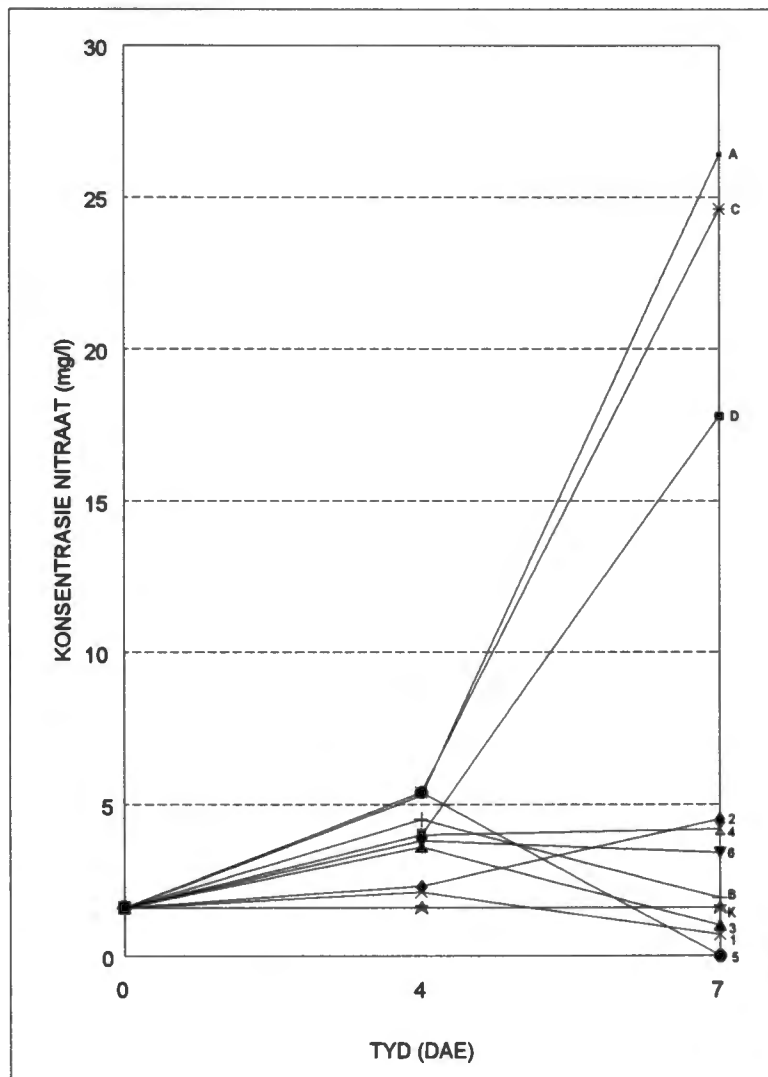
Volgens hierdie resultate het B van al die bakterieë wat vanaf die stikstofagar geïsoleer is, na vier dae die minste nitriet gevorm. Slegs nommer 6 wat vanaf PTA geïsoleer is het na vier dae swakker gevaar as B. Volgens Figuur 4.4 het nommers 8, 10, 11, 12 en 13 'n laer nitrietkonsentrasie as B in Figuur 4.3. Verskeie bakterieë toon dieselfde nitrietkonsentrasie as B op dag 4. Volgens

Figuur 4.3 is dit nommer 4 en volgens Figuur 4.4 is dit nommers 14 en 15. Daar is heelwat bakterieë wat aanvanklik van die PTA afgetel is wat ammoniak beter na nitriet omgeskakel het en 'n hoër nitrietkonsentrasie tot gevolg gehad het as die bakterieë wat oorspronklik van die ammoniak- en nitrietagar afgetel is. A toon die hoogste nitrietkonsentrasie van die bakterieë wat vanaf die ammoniak- en nitrietagar afgetel is en nommers 1, 2, 3 en 5, almal vanuit Seksie 4 (Tabel 3.2), in Figuur 4.3 toon hoër nitrietkonsentrasies as A. Die nitrietkonsentrasies vanaf dag 4 tot dag 7 het of dieselfde gebly of gedaal in beide Figuur 4.3 en Figuur 4.4. Nommer 3 was die enigste uitsondering omdat die nitrietkonsentrasie steeds toegeneem het.



Figuur 4.4: Hoeveelheid nitriet in die skudkulture. Die hoeveelheid nitriet is na 0, 4 en 7 dae inokulasie bepaal. Numering van die verskillende kulture is dieselfde as vir Tabel 4.1.

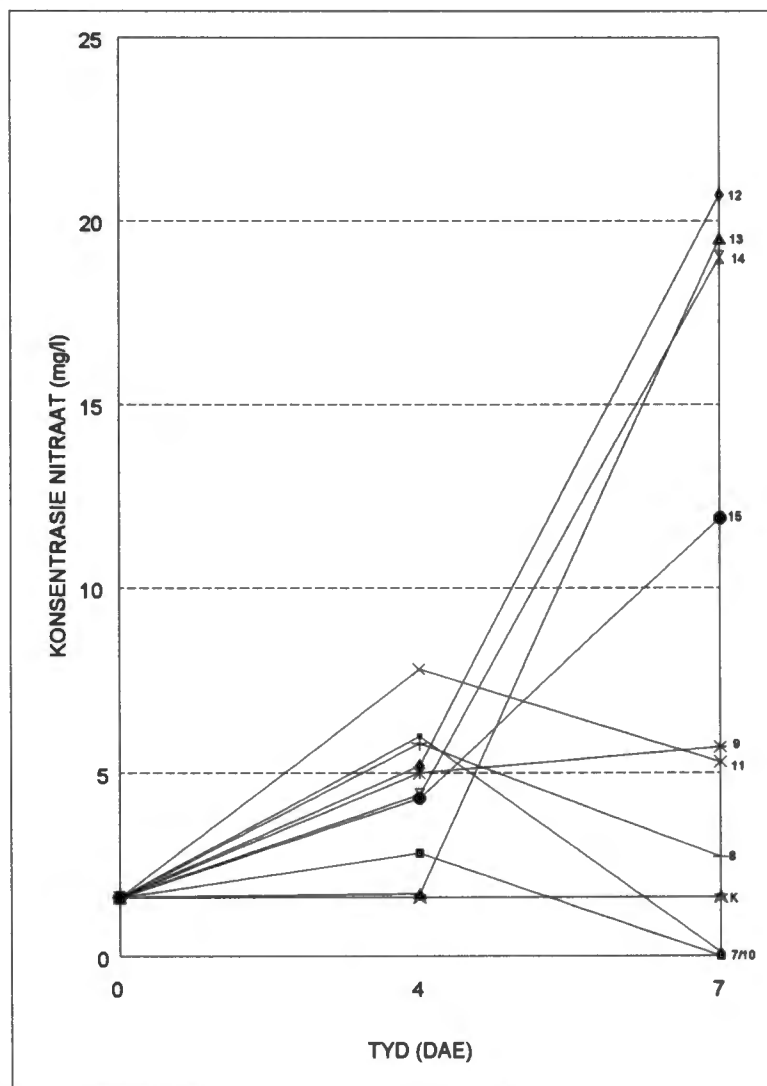
Vir die meeste bakterieë was daar dus aanvanklik 'n styging in die nitrietkonsentrasie gevolg deur 'n daling. Ten slotte kan die bakterieë in Figuur 4.3 en 4.4 in drie groepe ingedeel word, naamlik bakterieë waarvan die nitrietkonsentrasie na die vierde dag afgeneem het, dieselfde gebly of toegeneem het, hetsy bakterieë vanaf die ammoniak- en nitrietagar of van die PTA afgetel was.



Figuur 4.5: Hoeveelheid nitraat in die skudkulture. Die hoeveelheid nitraat is na 0, 4 en 7 dae inokulasie bepaal. Numering van die verskillende kulture is dieselfde as vir Tabel 4.1.

In Figuur 4.5 en Figuur 4.6 word die hoeveelheid nitraat wat deur die onderskeie bakterieë in die skudkulture gevorm is, gegee. Die resultate word ook in twee figure gegee omdat een figuur te “besig” sal wees. In hierdie geval

het B weereens die laagste omskakeling bewerkstellig. Volgens Figuur 4.5 is dit nommers 1, 3, 5 en 7 en nommer 10, almal vanuit Seksie 4 (Tabel 3.2), volgens Figuur 4.6 wat minder nitraat as B geproduseer het. Anders as in die vorige omskakelingsreaksie vorm A die meeste nitraat en C die tweede meeste. Volgens Figuur 4.6 het nommers 12, 13 en 14 byna dieselfde hoeveelheid nitraat as D (Figuur 4.5) geproduseer. In kulture 2, 4 en 6 (Figuur 4.3) en 8, 9, 11 en 15 (Figuur 4.4) is die hoeveelheid nitraat wat gevorm is, tussen die van kulture B en D. Weereens kon die drie groepe bakterieë onderskei word, naamlik die bakterieë waarvan die konsentrasie toeneem, dieselfde gebly of afgeneem het.



Figuur 4.6: Hoeveelheid nitraat in die skudkultuur. Die hoeveelheid nitraat is na 0, 4 en 7 dae inokulasie bepaal. Numering van die verskillende kulture is dieselfde as vir Tabel 4.1.

4.4 Samevatting

Die oorkruisuitstrykprotokol is gevolg om te onderskei tussen die twee groepe nitrifiseerders en uitsluitel te gee of hulle ware nitrifiseerders is al dan nie. Na aanleiding van Kuenen & Robertson (1988) se stelling dat nitrifisering nie meer die eksklusiewe eienskap van nitrofikseerders en nitrosofikseerders is nie, is die bakterieë wat vanaf PTA geïsoleer is ook op onderskeidelik die ammoniak- en nitrietagar uitgestryk. 'n Belangrike waarneming wat gemaak is, was dat betekenisvolle groei op die onderskeie oorkruismedia waargeneem is. Die skudkultuurprotokol is opgestel om die hoeveelheid nitriet en nitraat wat die verskillende bakterieë produseer, te meet. Volgens die resultate van die skudkulture is nitriet definitief vanaf ammoniak en nitraat vanaf nitriet deur die onderskeie bakterieë gevorm. Hierdie produkte is egter teen verskillende tempo's en patrone gevorm; drie groepe organismes is vir elke groep onderskei, naamlik bakterieë waarvan die konsentrasie toegeneem, dieselfde gebly of afgeneem het.

HOOFSTUK 5

BESPREKING

5.1 Inleiding

Die belang van 'n rietbed in watersuiwering en die voordeel wat rietbeddings inhou vir watersuiwering in veral ontwikkelende gebiede en industrieë is breedvoerig in die literatuuroorsig (Hoofstuk 2) beskryf. Uit hierdie beskrywing blyk dit dat daar nog baie min bekend is oor die spesifieke rol en verspreiding van bakterieë in 'n rietbed tydens watersuiwering. Hierdie toedrag van sake kan daaraan toegeskryf word dat daar in die verlede eensydig baie meer aandag geskenk is aan daardie aspekte wat betrokke is by die ontwerp en bou van 'n rietbed om die effektiwiteit te verseker. Die breë doelstelling van hierdie studie was dus om 'n bydrae te maak om die bakteriese profiel van 'n gekonstrueerde rietbed vas te stel. Hierdie kennis kan gebruik word om die invloed van omgewings- en ander faktore op die doeltreffendheid van 'n rietbed te evalueer. Hierdie kennis kan ook bydra tot die ontwerp van rietbeddings, ten einde te verseker dat geskikte nisse ontstaan vir die groei van bepaalde groepe bakterieë met spesifieke metaboliese eienskappe.

5.2 Kwantifisering en identifisering van bakterieë

5.2.1 Totale bakteriese getalle

Groter bakteriese populasies is aan die begin en einde van die somer waargeneem (Figuur 3.2). Dit was tydens die laer temperature, met ander woorde in die lente en herfs net voor en na die somer (Figuur 3.4). Behalwe vir 'n paar uitsonderings lyk dit asof hier 'n omgekeerde verband tussen die bakteriese getalle (Figuur 3.2) en die veranderinge in temperatuur (Figuur 3.4) is. Soos die temperatuur daal, neem die bakteriese getalle toe en omgekeerd. Van die hoogste bakteriese getalle is dan ook by die laagste temperature waargeneem. 'n Moontlike verklaring vir hierdie verskynsel kan wees dat die laer temperature nader aan die optimum temperatuur vir die bakterieë is wat natuurlik in die water voorkom en natuurlike bewoners van die monsternamepunt is. Sodra die temperatuur dan tydens die somer toeneem, neem die hoeveelheid bakterieë weer af.

Volgens Figuur 3.12 lyk dit nie asof die hoër bakteriese getalle in die stilstaande water voorkom nie, maar eerder in die bewegende water (stadig- en vinnigvloeiende water). In die somer en lente is die bakteriese getalle in die stadigvloeiende water die hoogste en in die herfs en winter in die vinnigvloeiende water. Dit lyk dus asof die natuurlike bakterieë wat in die water voorkom eerder sessiel as planktonies is. Die werking van die rietbed kan dus so bedryf word dat die water in die rietbed tydens die herfs en winter vinniger vloei en tydens die somer en lente stadige vir optimale werking van die rietbed omdat die toestande in die water vir die bakterieë dan gunstig blyk te wees. Gilges (1991) is van mening dat 'n groter diversiteit mikro-organismes 'n groter verskeidenheid verbindings kan afbreek. Omdat die bakteriese getalle hoër is, beteken dit nie noodwendig 'n groter diversiteit bakterieë nie, maar die kans vir laasgenoemde is groter. Aangesien daar in hierdie studie nie spesifiek na die diversiteit van die bakterieë opgelet is nie, kan dit nie onomwonde uit die resultate bewys word nie en is verdere studie hiervoor nodig.

Oor die algemeen lyk dit asof die rietbed beter in die winter en lente funksioneer, want die bakteriese getalle is hoër. Toestande tydens die somer en herfs sal dus geoptimaliseer moet word sodat hoër bakteriese getalle kan voorkom en die werking van die rietbed so verbeter kan word.

Wanneer die resultate van Figuur 3.3 en 3.4 vergelyk word, is dit duidelik dat in die geval van die bakterieë wat by 37°C gegroei het, die getalle styg sodra die temperatuur styg en omgekeerd. By 37°C word geselekteer vir die bakterieë wat nie normaalweg in die water voorkom nie, maar as gevolg van besoedeling deur menslike afvalstowwe in die water beland het (kyk 3.1). Sulke bakterieë se optimum groeitemperatuur is dus hoër en daarom kan die toename in die aantal bakterieë wat in die water voorkom tydens die hoër temperature aan die teenwoordigheid van hierdie bakterieë toegeskryf word.

Die ideaal is seker om so spoedig moontlik van bogenoemde bakterieë ontslae te raak omdat sommige van hulle patogeen is. Volgens Figuur 3.13 is lae temperature ongunstig vir hierdie bakterieë. Tydens die warmer seisoene sal temperatuur die teenoorgestelde uitwerking hê en 'n ander manier sal gevind moet word om dié bakterieë se getalle te verminder. Die metabolisme vermoëns van hierdie bakterieë is egter nie bekend nie. Die moontlikheid dat hulle dus 'n bydrae kan maak om besoedelingstowwe af te breek en uit die water te verwyder, bestaan wel. In so 'n geval sal toestande eerder geskep word om

hulle getalle te laat toeneem. Uit die resultate van hierdie studie is dit egter nie moontlik om te voorspel watter geval wenslik is nie.

Omdat die bakterieë die vermoë besit om te nitrifiseer (kyk Tabel 4.1) sal die ammoniak- en nitrietkonsentrasies dus ook 'n invloed op die bakteriese getalle wat op die PTA geïsoleer is uitoefen. Wanneer die invloed van die ammoniakkonsentrasie (Figuur 3.6) op die bakterieë wat by 20°C geïsoleer is (Figuur 3.2) bestudeer word, is die invloed nie baie duidelik nie. Die aanvanklike styging in die ammoniakkonsentrasie op 10/03/94 het wel 'n toename in bakteriese getalle tot gevolg gehad, maar die toename in die ammoniakkonsentrasie op 19/05/94 na 0.04 mg/l het net 'n effense toename in die bakteriese getalle tot gevolg gehad. Die temperatuur was gunstig op daardie stadium (besig om te daal), maar die bakteriese getalle het nie baie toegeneem nie. By die baie lae ammoniakkonsentrasies van 15/07/94 tot 15/08/94 het weer van die hoogste bakteriese getalle voorgekom. Dit kan wees dat die ammoniakkonsentrasie op 19/05/94 toksies vir die bakterieë was - ander faktore is ook moontlik - maar daar is dus nie 'n baie duidelike verband tussen die bakteriese getalle en die ammoniakkonsentrasie in die water nie.

Wat die invloed van die nitraatkonsentrasie op die bakteriese getalle in die water betref, was die bakteriese getalle by die hoë nitraatkonsentrasies hoog (Figuur 3.2 en 3.11). By die laagste nitraatkonsentrasie op 12/04/94 was die bakteriese getalle die laagste ooit oor die hele tydperk wat dit gemoniteer is. Op die oog af lyk dit dus asof die bakteriese getalle wat natuurlik in die water voorkom meer sensitief vir veranderinge in die nitraatkonsentrasie as die ammoniakkonsentrasie is.

Wanneer die effek van die ammoniakkonsentrasie op die bakteriese getalle wat by 37°C geïsoleer is (Figuur 3.3 en 3.6) bestudeer word, is daar 'n toename in die bakteriese getalle op 10/03/94 waargeneem wanneer die ammoniak-konsentrasie die eerste keer styg, maar wanneer dit die vlak van 0.04 mg/l op 19/05/94 bereik is daar byna geen verandering in die bakteriese getalle nie. By die laer ammoniakkonsentrasie op 15/07/94 tot 15/08/94 was daar nie 'n ooreenstemmende styging in die bakteriese getalle soos wat in Figuur 3.2 die geval was nie. Die ammoniakkonsentrasie kon toksies wees, die temperatuur kon 'n rol speel of die bakterieë wat by 37°C geïsoleer is en dus nie normaalweg in die water voorkom nie, is nie sensitief vir veranderinge in die ammoniakkonsentrasies in die water nie.

Die geval blyk dieselfde te wees wanneer Figuur 3.3 en Figuur 3.11 vergelyk word. Geen noemenswaardige toenames in die bakteriese getalle kom tydens stygings in die nitraatkonsentrasies voor nie. Om egter definitiewe uitsluitel oor die bogenoemde waarnemings van ammoniak- en nitraatkonsentrasies op die bakterieë te gee, sal verdere studie verg en kan as 'n moontlike volgende projek aangepak word.

Die betekenis van al bogenoemde waarnemings vir die werking van die rietbed is dus dat die bakterieë wat natuurlik in die water voorkom moontlik die nitraatverbindinge in die water gebruik, want die getalle neem toe as die nitraatkonsentrasie toeneem. Dit word egter nie omgeskakel na stikstofgas toe nie, want nie een van die isolate het gedenitrifiseer nie (kyk Tabel 4.1). Volgens Lötter (1994) is die ander alternatief dat die stikstofverbindinge in die riool na selmateriaal omgeskakel word. Die ammoniak word ook deur die bakterieë gebruik, hoewel nie by voorkeur nie. In Hoofstuk 4 (Figuur 4.3 en 4.4) word laasgenoemde afleiding bevestig.

Die verhoogde bakteriese getalle in die stadigvloeiende water tydens die somer en lente en in die vinnigvloeiende water tydens die herfs en winter (Figuur 3.12) waarvan vroeër melding gemaak is, kan dus ook as gevolg van die invloed van die ammoniak- en nitraatkonsentrasie wees. Die ammoniak- en nitraatkonsentrasie is nie vir elke sone afsonderlik gemeet nie, dus sal daar nie in hierdie geval spesifieke aanbevelings gemaak kan word vir optimum toestande vir die verwydering van onderskeidelik ammoniak en nitraat uit die water nie. Die voorspelling kan egter gewaag word dat ammoniak en nitraat beter in bewegende as stilstaande water verwyder sal word omdat die bakteriese getalle daar hoër is.

5.2.2 Kwantifisering van nitrifiseerders

Uit 'n vergelyking tussen die aantal nitrosifiseerders (Figuur 3.5) en die ammoniakkonsentrasie (Figuur 3.6) oor die gemete tydperk, is daar nie eintlik sprake van 'n bepaalde tendens nie. Figuur 3.7 gee die bakteriese getalle op ammoniakagar vir die eerste sewe maande van die jaar (die tydperk waarvoor die resultate van die ammoniakkonsentrasie beskikbaar is). Wanneer Figuur 3.6 en Figuur 3.7 vergelyk word wil dit voorkom asof 'n styging in die ammoniakkonsentrasie 'n styging in die aantal bakterieë tot gevolg het en omgekeerd (hoewel dit voorkom asof die bakterieë nie baie sensitief is vir

veranderinge in die ammoniakkonsentrasie nie want klein, indien enigsins betekenisvolle veranderinge kan in die bakteriese getalle waargeneem word). Omdat die ammoniakkonsentrasie vir die hele jaar nie beskikbaar was nie, kon daar nie 'n vergelyking tussen die bakteriese getalle vanaf 05/09/94 tot 22/11/94 en die ammoniakkonsentrasie getref word om moontlik uitsluitel oor bogenoemde waarneming te gee of verder lig op die onderwerp te gooi nie. Die effek van veranderinge in die hoeveelheid ammoniak in die water op die bakteriese getalle by die monsternamepunt het in hierdie studie nie duidelik na vore gekom nie.

Die stikstofkringloop begin wanneer die ammonium na nitriet omvorm word deur nitrosifiseerders en word gevolg deur die nitrifiseringsreaksie waartydens nitriet na nitraat deur nitrofiseerders omgesit word (Brock *et al.*, 1994). Die hoogste getalle nitrosifiseerders kom vanaf die einde van die winter tot die begin van die somer voor en die hoogste getalle nitrofiseerders weer vanaf die einde van die herfs tot die begin van die somer. Die verwagting sal dus wees dat indien genoeg ammoniumione beskikbaar is en dit deur die nitrosifiseerders na nitriet omgeskakel word die nitriekonsentrasie sal styg en hoër getalle nitrofiseerders tot gevolg sal hê. 'n Vergelyking tussen Figuur 3.5 en Figuur 3.9 bevestig hierdie verband.

Die hoogste getalle nitrifiseerders (nitrofiseerders en nitrosifiseerders) kom dus hoofsaaklik tydens die winter- en lentemaande voor. Hansen (Kuenen & Robertson, 1988) beweer dat indien die temperatuur alleen in ag geneem sou word, die verwagting sou wees dat die hoogste nitrifiseringstempo tydens die hoër temperature sou voorkom, maar hulle het in seewater waargeneem dat nitrifisering in die somer die laagste was. Wanneer Figuur 3.4 en Figuur 3.5 vergelyk word, is die bakteriese getalle hoër vanaf 01/08/94 tot 22/11/94 (middel van die winter tot die begin van die somer). Die verwagting sou wees dat die hoogste nitrifisering die hele lente en somer sou wees wanneer die hoër temperature (20 tot 24°C) voorgekom het (Figuur 3.4). Die temperatuur vanaf 27/01/94 tot 12/04/94 was die hoogste (20 tot 24°C) en het eers daarna begin afneem. Die getalle nitrifiseerders oor dié tyd was egter van die laagste. Vanaf 01/08/94 tot 15/08/94 (einde van die winter) waar die getalle nitrifiseerders reeds begin toeneem het, was die temperatuur nog redelik laag (10 tot 11°C). Met die uitsondering van die begin van die somer (Figuur 3.5) se hoë getalle nitrosifiseerders, was nitrifisering tydens die somer dus inderdaad die laagste. Hierdie verskynsel is ook deur Hall (1986) in 'n varswatermeer waargeneem.

Hierdie verskynsel kan aan verskeie faktore toegeskryf word. Outotrofe en heterotrofe nitrifiseerders kompeteer tydens warmer maande met mekaar vir die beskikbare ammonium. Die heterotrofe nitrifiseerders groei vinniger en het as resultaat dus die laer nitrifiseringstempo (Kuenen & Robertson, 1988). Die feit dat daar net heterotrofe nitrifiseerders vanaf die stikstofplate geïsoleer is (Hoofstuk 4), ondersteun hierdie verklaring. Kuenen & Robertson (1988) is van mening dat die heterotrofe nitrifisering 'n minder belangrike proses in die natuur in akwatiese sisteme is as outotrofe nitrifisering. Die bewering is al gemaak, dat al sou die heterotrofe nitrifiseerders in die sediment van 'n akwatiese sisteem 'n duisend maal meer wees as hulle huidige getalle, hulle bydrae tot die totale nitrifisering in die sediment onbelangrik is. Daar is egter aanduidings dat heterotrofe nitrifiseerders gelyktydig denitrifiseer en min of geen nitriet akkumuleer. Hulle nitrifiseringstempo is in werklikheid hoër as wat dit wil voorkom, maar steeds laer as baie outotrofe nitrifiseerders (Kuenen & Robertson, 1988). Uit die resultate blyk dit dat bogenoemde nie die geval in die waterlaag is nie, want daar kon slegs heterotrofe nitrifiseerders geïsoleer word.

Twee ander faktore wat ook 'n rol mag speel, maar nie uit die resultate van hierdie studie met sekerheid gestaan kan word nie, is die suurstofpenetrasie en sulfiedproduksie in die rietbed. Die diepte van die suurstofpenetrasie is minder tydens die warmer somermaande en kan 'n effek op die nitrifiseringstempo hê (Kuenen & Robertson, 1988) omdat dit algemeen bekend is dat nitrifisering (nitrofileerders en nitrosofileerders) sensitief is vir 'n suurstoftekort (Lötter, 1994), dus lei dit tot die afname in die nitrifiseringstempo tydens die somer en herfs. Sulfiedproduksie is volgens Hansen (Kuenen & Robertson, 1988) die hoogste in die somer en inhibeer nitrifisering en kan ook as 'n moontlikheid oorweeg word vir die lae nitrifiseringstempo tydens die warmer seisoene.

Nitrosofileerders is egter meer sensitief vir temperatuur as nitrofileerders en dit kan tot 'n ophoping van nitriet in 'n sisteem lei (Lötter, 1994). As die resultate van Figuur 3.4 met die van Figuur 3.8 vergelyk word, kom die "nie-betroubare" resultate (kyk p 31) juis by die hoogste temperatuur van die jaar voor. Die moontlikheid bestaan dus dat dit nie noodwendig onbetroubare resultate was nie, maar die werklike getalle nitrofileerders as gevolg van die hoë temperatuur. Die feit dat dit egter nie in die nitrosofileerders se getalle weerspieël word nie, met ander woorde dat daar nie 'n gelyktydige styging in

daardie getalle waargeneem was nie (Figuur 3.5), kan daartoe lei dat die resultate as nie-betroubaar beskou kan word nie.

Volgens Figuur 3.5 kom die hoogste bakteriese getalle, met uitsondering van 'n paar gevalle, deurgaans in die stilstaande water voor. Dieselfde geld volgens Figuur 3.9 vir die bakteriese getalle in die stilstaande water. Volgens Kuenen & Robertson (1988) is nitrifisering in die sediment byna altyd hoër as in die waterlaag bo die sediment. Die nitrifisering in die sediment is nie hierdie studie gemoniteer nie, maar na aanleiding van bogenoemde stelling en die waarneming uit Figuur 3.5 en Figuur 3.9, kan die afleiding gemaak word dat nitrifisering in akwatiese sisteme eerder in stilstaande as bewegende water voorkom.

5.2.3 Kwantifisering van denitrifiseerders

'n Vergelyking van die resultate van Figuur 3.10 en Figuur 3.11 dui op 'n tendens van 'n afname in die bakteriese getalle sodra die nitraatkonsentrasie afneem. Hierdie toedrag van sake kan goed verklaar word as daar na die stikstofkringloop gekyk word. Die bakterieë wat met die nitraatsop geselekteer word, is verantwoordelik vir die omvorming van nitraat na stikstofgas (Brock *et al.*, 1994). Dus sal 'n afname in die nitraatkonsentrasie beteken dat minder bakterieë hierdie primêre stikstofbron vir groei tot hul beskikking het en dat die getalle dan sal afneem soos wat in Figuur 3.10 waargeneem kan word.

Volgens Bowmer (1987) het temperatuur ook 'n invloed op denitrifisering en is 'n gemiddelde temperatuur van 20 tot 30°C die ideale toestand vir vinnige denitrifisering. Volgens Figuur 3.4 is die warmer temperature in die somer, aan die einde van die lente en aan die begin van die herfs (gemiddelde temperatuur ongeveer 22°C) en wanneer dit met Figuur 3.10 vergelyk word, kom hoër bakteriese getalle wel by die hoër temperature voor. 'n Afname in die temperatuur in die herfs het gepaard gegaan met 'n afname in die bakteriese getalle en 'n toename in temperatuur in die winter weer 'n toename in die bakteriese getalle. Dit is opmerklik dat die bakteriese getalle in die winter by die laagste temperatuur relatief hoog was (Figuur 3.10). Dit bevestig Wood (1989) se waarneming dat rietbeddings nog steeds bevredigend funksioneer tydens die kouer wintermaande, want volgens hierdie studie was daar nie 'n merkbare afname in bakteriese getalle van die denitrifiseerders in die winter nie. Volgens die resultate van hierdie studie is die getalle van die denitrifiseerders oor die algemeen hoër as dié van die nitrifiseerders. Volgens Bowmer (1987)

kan die effektiwiteit van stikstofverwydering deur denitrifisering deur stadige ammonifisering en nitrifisering vertraag word. Na aanleiding van die resultate van die bakteriële getalle van beide nitrifiseerders en denitrifiseerders lyk dit nie asof denitrifisering beïnvloed is deur die lae getalle nitrifiseerders nie. Die voorspelling kan gewaag word dat denitrifisering op nog groter skaal sou plaasvind indien die toestande vir nitrifisering geoptimaliseer word en groter getalle nitrifiseerders teenwoordig sou wees. Vir die effektiewe verwydering van stikstofverbindings uit die water wil dit voorkom asof die ontwerp van die rietbed op die verhoging van denitrifisering gerig moet wees.

'n Wye verskeidenheid heterotrofe bakterieë, byvoorbeeld *Pseudomonas spp.* en *Aeromonas spp.* kan 'n effek op denitrifisering hê (Lötter, 1994). Die bakterieë wat vanaf die ammoniak- en nitrietagar geïsoleer is (A tot D, Tabel 3.1), is wel heterotrofe nitrifiseerders, maar volgens Tabel 4.1 het nie een van hierdie bakterieë positief getoets vir denitrifisering nie. Die heterotrofe nitrifiseerders A, B, C en D kompeteer dus nie vir dieselfde verbindings as die denitrifiseerders nie en sal dus nie 'n invloed op mekaar uitoefen nie.

Die wye verspreiding van denitrifiseerders in die natuur toon dat daar geen duidelike korrelasie tussen die grootte van die denitrifiseringspopulasie en die hoeveelheid organiese materiaal wat teenwoordig is nie. Die verskeidenheid isolate wat waargeneem kan word gee ook nie 'n aanduiding van die hoeveelheid organiese materiaal wat in 'n bepaalde habitat teenwoordig is nie (Kuenen & Robertson, 1988).

5.3 Bakterieë van die stikstofkringloop

Die oorkruisuitstryk van die bakterieë het aangetoon dat die bakterieë wat op onderskeidelik die ammoniak- en nitrietagar geïsoleer is, nie outotrofe nitrifiseerders is nie, maar heel waarskynlik heterotrofe nitrifiseerders is. Kuenen & Robertson (1988) het wel, soos voorheen genoem, beweer dat die bydrae van heterotrofe nitrifiseerders tot die totale nitrifisering onbelangrik is, maar gesien die lig dat hier net heterotrofe nitrifiseerders geïsoleer is, laat twyfel oor die algemene geldigheid van die stelling ontstaan. 'n Soorgelyke opmerking is deur Killham (1986) gemaak te opsigte van die rol van heterotrofe nitrifiseerders in grond. Kuenen & Robertson (1988) het egter verder gemeen dat nitrifisering meeste van die tyd hoër in die sediment is as in die waterlaag bo die sediment plaasvind. Watermonsters is in die waterlaag bo

die sediment geneem en dus kan dit wees dat nitrifisering deur outotrofe nitrifiseerders hoër in die sediment is, maar laer in die waterlaag bo die sediment. Uit die resultate van hierdie studie blyk dit dat heterotrofe nitrifisering 'n groter rol in die waterlaag van hierdie rietbed speel as outotrofe nitrifisering. Verdere studie is egter nodig om dit onomwonde te bewys.

Volgens die resultate van Figuur 4.3 en 4.4 is daar verskeie bakterieë vanaf die PTA wat dieselfde en selfs hoër hoeveelhede nitriet as die bakterieë vanaf die ammoniak- en nitrietagar geproduseer het. Die resultate staaf bogenoemde afleiding dat heterotrofe nitrifiseerders 'n groter rol mag speel as outotrofe nitrifiseerders tydens nitrifisering in die waterlaag van die rietbed wat bestudeer is. Die nitriekonsentrasie daal telkens van dag 4 tot dag 7 en kan moontlik verklaar word deur die feit dat die nitrietverbinding nie stabiel is nie (Brock *et al.*, 1994). Die nitriet wat op dag 4 gemeet is, het nie behoue gebly om op dag 7 gemeet te word saam met die wat op dag 4 gevorm het nie, daarom die moontlike daling. 'n Ander moontlikheid vir die afname in die nitriekonsentrasie is dat dieselfde bakterieë die nitriet na nitraat omskakel en die nitriekonsentrasie gevolglik daal. So 'n afleiding is heeltemal moontlik as die resultate van Figuur 4.5 en Figuur 4.6 in ag geneem word, waar dieselfde bakterieë se vermoë om nitriet na nitraat om te skakel getoets is. Uit die resultate blyk dit dat laasgenoemde reaksie die een is wat by voorkeur plaasvind in al die bakterieë omdat die hoeveelheid nitraat wat in die skudkulture geproduseer is, baie hoër is as die nitriekonsentrasie wat deur dieselfde bakterieë geproduseer is. 'n Moontlike verklaring daarvoor kan wees dat nitrietomskakeling vinniger as ammoniakomskakeling plaasvind (Gottschalk, 1986).

Volgens die resultate van Figuur 4.3 was nommer 3 die enigste uitsondering wat 'n toename in nitriekonsentrasie getoon het en wel vanaf dag 4 tot dag 7. Volgens Figuur 4.5 het nommer 3 van die minste nitraat geproduseer. Nommers 1, 5, 7 en 10 (Figuur 4.5 en Figuur 4.6) se nitraatkonsentrasies was laer as dié van nommer 3. Interessant is dat nommers 1, 5 en 7 in Figuur 4.3 en Figuur 4.4 van die hoogste nitriekonsentrasies geproduseer het. Laasgenoemde drie bakterieë voer dus by voorkeur die ammoniak-omvormingsreaksie uit. Nommer 10 se nitriekonsentrasie was die laagste van al die bakterieë (Figuur 4.4). Hierdie bakterie is dus in staat om albei nitrifiseringsreaksies uit te voer, maar nie by voorkeur nie en net onder dwangtoestande, byvoorbeeld deur die bakterie op die ammoniak- en

nitrietagar uit te stryk of in die ammoniak- en nitrietsop van die skudkulture te inokuleer.

5.4 Slot

Uit die resultate van die bakteriese getalle (kyk Hoofstuk 3) lyk dit oor die algemeen asof die bakteriese getalle in al drie sones in die winter- en lentemaande die hoogste was, uisonderings kom in Figuur 3.13 en 3.16 voor. Verder wil dit voorkom asof die bakteriese getalle in die bewegende water (stadig- en vinnigvloeiende water) hoër was as in die stilstaande water. Figuur 3.16 was 'n uitsondering op laasgenoemde. Na aanleiding van bogenoemde lyk dit asof rietbeddings soortgelyk aan dié een wat as tersiêre behandeling van riooluitvloeiensel dien, nie regtig groot baat vind by stilstaande water nie. Die ontwerp hoef dus nie voorsiening te maak vir gebiede waar die water stilstaan nie. Die optimum vloeisnelheid sal egter bepaal moet word sodat die water nie weer te vinnig vloei en nie behoorlik gesuiwer word nie. Die voordeel van die bewegende water is dat die retensietyd baie korter word, dat die water vinniger kan deur beweeg en gesuiwer word en dat groter volumes water in 'n korter tyd gesuiwer kan word. Bakteriese getalle in die somer- en herfsmaande is ook hoër in bewegende water, maar die getalle oor die algemeen is laer as dié in die lente- en wintermaande. Die ontwerp van die rietbed in laasgenoemde geval sal aangepas moet word om toestande so te optimaliseer dat hoër bakteriese getalle in die somer en herfs voorkom. Gersberg *et al.* (1983) het gevind dat die toevoeging van 'n addisionele koolstofbron denitrifisering verhoog. Verder kan verhoogde suurstofspanning in die wortels die groei van bakterieë bevorder (Butler *et al.*, 1983). 'n Verlaging van die watervlak in die lente en somer kan ook 'n bydrae lewer tot verhoogde DO in die water.

Daar is grootliks voldoen aan die doelstellings vir hierdie studie en die spesifieke doelstellings is ook bereik (kyk 2.6). Heelwat vrae het egter in hierdie studie na vore gekom wat tydens 'n opvolgende studie aandag kan geniet. Een hiervan is dat die bakterieë wat geïdentifiseer is nie volgens die sones ingedeel is nie. Daar kon dus nie aangedui word watter bakterieë by voorkeur in watter sone voorkom nie. Dieselfde geld vir die indeling van die bakterieë in die vier seisoene van die jaar. 'n Tweede leemte was dat die bakterieë nie tot op Familie- of Genus-vlak geïdentifiseer is nie.

Wat die toekomsbeplanning van die projek betref kan die hele studie herhaal word om die bakterieë wat in die sediment van die rietbed voorkom, te bestudeer. Verder kan die metaboliese vermoëns van die bakterieë aandag geniet met behulp van API- of Biolog-sisteme om hulle bydrae tot die werking van die rietbed te ondersoek. Faktore wat volgens hierdie studie 'n moontlike invloed op die bakteriese getalle van die rietbed uitgeoefen het (byvoorbeeld ammoniak- en nitrietkonsentrasie) kan op laboratoriumskaal verder ondersoek word om vas te stel tot watter mate dit die bakteriese getalle beïnvloed.

AFKORTINGSLYS

Al	Aluminium
BOD	Biologiese suurstof aanvraag
Ca	Kalsium
COD	Chemiese suurstof aanvraag
DO	Opgeloste suurstof
Fe	Yster
opm	omwentelinge per minuut
PCA	Plate Count Agar
PTA	Plaattellingsagar
SS	Gesuspendeerde vaste stowwe

LITERATUURVERWYSINGS

ANON. 1992. SWCS adopts wetland policy statement. **Journal of Soil and Water Conservation**, 47:439-440.

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. 1993. Microbial ecology: fundamentals and applications. 3rd ed. Menlo Park: Benjamin/Cummings. 563p.

BAYES, C.D., BACHE, D.H. & DICKSON, R.A. 1989. Land treatment systems: design and performance with special reference to reed beds. **Journal of Water and Environmental Management**, 3:588-598.

BIDDLESTONE, A.J., GRAY, K.R. & JOB, G.D. 1991. Treatment of dairy farm wastewaters in engineered reed bed systems. **Process Biochemistry**, 26:265-268.

BOWMER, K.H. 1987. Nutrient removal from effluent by an artificial wetland; influence of rhizosphere aeration and preferential flow studied using bromide and dye tracers. **Water Research**, 21:591-599.

BROCK, T.D. 1979. Biology of microorganisms. 3rd ed. London: Prentice-Hall. 802p.

BROCK, T.D., MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M. & PARKER, J. 1994. Biology of microorganisms. 7th ed. London: Prentice-Hall. 909p.

BUTLER, J.E., LOVERIDGE, R.F., FORD, M.G., BONE, D.A. & ASHWORTH, R.F. 1990. Gravel bed hydroponic systems used for secondary and tertiary treatment of sewage effluent. **Journal of Water and Environmental Management**, 4:276-284.

COOPER, P.F., HOBSON, J.A. & JONES, S. 1989. Sewage treatment by reed bed systems. **Journal of the Institution of Water and Environmental Management**, 3:60-74.

COWAN, S.T. 1981. Cowan and Steel's manual of the identification of medical bacteria. 2nd ed. Cambridge: University Press. 238p.

COWARDIN, L.M. 1982. Wetlands and deepwater habitats: a new classification. **Journal of Soil and Water Conservation**, 37:83-85.

CRAWFORD, R.L. 1991. Bioremediation of groundwater pollution. **Current Opinion in Biotechnology**:436-439.

CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, R.H.A. 1980. Medical microbiology. Vol 2. 12th ed. New York: Churchill Livingstone. 587p.

DELWICHE, C.C. & FINSTEIN, M.S. 1965. Carbon and energy sources for the nitrifying autotroph *Nitrobacter*. **Journal of Bacteriology**, 90:102-107.

DUNCAN, C.P. & GROFFMAN, P.M. 1994. Comparing microbial parameters in natural and constructed wetlands. **Journal of Environmental Quality**, 23:298-305.

GADD, G.M. & WHITE, C. 1993. Microbial treatment of metal pollution - a working biotechnology? **Tibtech**, 11:353-359.

GERSBERG, R.M., ELKINS, B.V. & GOLDMAN, C.R. 1983. Nitrogen removal in artificial wetlands. **Water Research**, 17:1009-1014.

GERSBERG, R.M., LYON, S.R., BRENNER, R. & ELKINS, B.V. 1989. Integrated wastewater treatment using artificial wetlands: a gravel marsh case study. (In Hammer, D.A., ed. Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural. USA: Lewis Publishers. p145-152.)

GILGES, K. 1991. For treating wastewater, build your own swamp. **Chemical Engineering**, 98:56U,W & Y.

GOTTSCHALK, G. 1986. Bacterial metabolism. 2nd ed. New York: Springer-Verlag. 359p.

GRAY, K.R. & BIDDLESTONE, A.J. 1995. Engineered reed-bed systems for wastewater treatment. **Tibtech**, 13:248-252.

HALL, H.G. 1986. Nitrification in lakes. (In Prosser, J.I., ed. Nitrification. Oxford: IRL Press. p127-156.)

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

HICKS, R.J., STOTSKY, G. & VAN VORIS, P. 1990. Review and evaluation of the effects of xenobiotic chemicals on microorganisms in soil. **Advances in Applied Microbiology**, 35:195-253.

KETCHUM, B.H., ZITKO, V. & SAWARD, D. 1978. Aspects of heavy metal and organohalogen pollution in aquatic ecosystems. (In McIntyre, A.D. & Mills, C.F. eds. Ecological toxicology research. 2nd ed. New York: Plenum Press. p75-90.)

KILLHAM, K. 1986. Heterotrophic nitrification. (In Prosser, J.I., ed. Nitrification. Oxford: IRL Press. p117-126.)

KNIGHT, R.L. 1993. Operating experience with constructed wetlands for wastewater treatment. **Tappi-journal**, 76:109-112.

KNIGHT, R.L. 1994. Treatment wetlands database now available. **Water Environment and Technology**, 6:31-33.

KRIEG, N.R. & HOLT, J.G. eds. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins. 964p.

KUENEN, J.G. & ROBERTSON, L.A. 1988. Ecology of nitrification and denitrification. (In Cole, J.A. & Ferguson, S.J. eds. The nitrogen and sulphur cycles. New York: Cambridge University Press. p161-218.)

LEWIS, R.F. & PRAMER, D. 1958. Isolation of *Nitrosomonas* in pure cultures. **Journal of Bacteriology**, 76:526.

LIU, S. & SUFLITA, J.M. 1993. Ecology and evolution of microbial population for bioremediation. **Tibtech**, 11:344-352.

LÖTTER, L.H. 1994. Water pollution control in a metropolitan region. **Municipal Engineer**, 25:26-34.

MOORHEAD, K.K., REDDY, K.R. & GRAETZ, D.A. 1988. Nitrogen transformation in a waterhyacinth-based water treatment system. **Journal of Environmental Quality**, 17:71-76.

NICHOLS, A.B. 1992. Forecasting the wastewater treatment industry. **Operations Forum**, 9:26-31.

PELCZAR, M.J., CHAN, E.C. & KRIEG, N.R. 1993. Microbiology: concepts and applications. 6th ed. New York: McGraw-Hill. 918p.

REED, W. 1989. Wastewater treatment methods: natural systems versus the "black box". **Bio Cycle**, 30:68-69.

REED, S.C. & BROWN, D.S. 1992. Constructed wetland design: the first generation. **Water Environment Research**, 64:776-781.

ROBERTS, L. 1993. Wetlands trading is a loser's game, say ecologists. **Science**, 260:1890-1892.

SALLE, A.J. 1973. Laboratory manual on fundamental principles of bacteriology. 7th ed. New York: McGraw-Hill. 201p.

SHAPRLEY, A. & MEYER, M. 1994. Minimizing agricultural nonpoint-source impacts: a symposium overview. **Journal of Environmental Quality**, 23:1-4.

SIMPSON, J.R. 1982. Water pollution control in developing areas: problems and needs. **Water Science and Technology**, 14:9-11.

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

TIMMIS, K.N., STEFFAN, R.J. & UNTERMON, R. 1994. Designing microorganisms for the treatment of toxic wastes. **Annual Reviews of Microbiology**, 525-557.

TEBBUTT, T.H.Y. 1992. Principles of water quality control. 4th ed. Oxford: Pergamon Press. 251p.

WOOD, A. 1989. The use of macrophytes in water pollution control. **SA-Waterbulletin**, 15:12-15.

WOOD, A. & HENSMAN, L.C. 1989. Research to develop engineering guidelines for implementation of constructed wetlands for wastewater treatment in Southern Africa. (*In* Hammer, D.A., *ed.* Constructed wetlands for wastewater treatment: municipal, industrial and agricultural. USA: Lewis Publishers. p581-589.)

WOOD, A. 1990. Ecological plant treatment for septic tank effluent. **Water Sewage and Effluent**, 10:23-25.

WOOD, A. 1991. Use artificial wetlands to stop pollution. **Farmers Weekly**, 8:26-27.

WOOD, A. 1993a. Wastewater treatment performance of artificial wetlands investigated. **SA-Waterbulletin**, 19:21-23.

WOOD, A. 1993b. The application of artificial wetlands in South Africa. **Journal of the Institution of Municipal Engineers**, 18:15,17-18.

BEDANKINGS

Graag wil ek my opregte dank en waardering teenoor die volgende persone uitspreek:

My studieleier, Prof. P.J. Pretorius, vir u leiding, hulp en raad tydens hierdie studie

Naschem vir finansiële steun en in die besonder Dr. Vic Hamilton-Attwell

Retha van der Walt vir die verskaffing van sekere resultate

Karin Vergeer vir haar rekenaarvaardigheid met die oordra van die figure en hulp met die finale afronding van die tikwerk

Hilda van der Westhuizen vir die taalkundige versorging van die skripsie

Elsa Brand vir die vertaling van die opsomming

My ouers vir hulle belangstelling en ondersteuning

Die Hemelse Vader vir Sy groot genade en aan wie al die eer toekom

BYLAAG 1

Samestelling van die media:

Ammoniakagar

Na_2HPO_4	13.5g
KH_2PO_4	0.7g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1g
NaHCO_3	0.5g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0144g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0184g
Agar	20g
dH ₂ O	1l

Los op in water, stel die pH op 8 in en outoklaaf by 121°C vir 15 min.

Nitraatsop

Oplossing A

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.002g
NaHCO_3	1.3g
dH ₂ O	200ml

Los op in water en membraansteriliseer met 'n 0.2 µm filter.

Oplossing B

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.02g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.005g
dH ₂ O	200ml

Los op in water en outoklaaf by 121°C vir 15 min.

Oplossing C

NaNO ₂	0.24g
K ₂ HPO ₄	0.5g
KH ₂ PO ₄	0.5g
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25µg
Agar	20g
dH ₂ O	600ml

Los op in water en outoklaaf by 121°C vir 15 min. Koel af tot 50°C, voeg Oplossing A en B by en giet plate.

Plaattellingsagar

Triptoon	5g
Gisekstrak	2.5g
Dekstrose	1g
Agar	14.5g
dH ₂ O	1l

Outoklaaf by 121°C vir 15 min.