DIE GROEIBEHOEFTES VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

Christa Susan van Wyk, B.Sc., Hons. B.Sc., H.O.D.

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

Leier: Dr H.A. Esterhuysen

POTCHEFSTROOM

1995

DANKBETUIGINGS

Graag betuig ek hiermee my opregte dank en waardering aan:

Onse Vader in die hemel

My man, Johan, vir sy daadwerklike aansporing en bystand

My leier, Dr Andre Esterhuysen, vir sy raad en leiding

Frans du Plessis vir tegniese en taalversorging

Frik Kemp en Madelein Roos vir hulle hulp met druk van grafieke en tabelle

Danie Opperman van Sastech, Navorsing en Ontwikkeling (N & O) vir sy daadwerklike bystand

Irene Blignaut vir haar hulp met die tik van die skripsie

Willie Lessing vir druk- en bindwerk

Aan alle ander persone en instansies wat in enige opsig behulpsaam was met die voorbereiding en opstelling van hierdie verhandeling

OPSOMMING

Die struktuur van steenkool lei daartoe dat dit nie geredelik biologies afgebreek kan word nie, aangesien die natuur nie 'n metode verskaf het om die koolstof in die steenkoolmolekules te verwerk nie. Steenkool is ook hoogs onoplosbaar in water en die meeste organiese oplosmiddels, behalwe onder uiterste toestande.

Huidige chemiese prosesse in steenkoolomsetting en verwerking is baie duur, dus is mikrobiese vervloeiing of verbrokkeling 'n belangrike opsie wat ondersoek word. Daar is sekere ***Pseudomonas*** spesies wat in staat is om natuurlike bitumineuse steenkool gedeeltelik af te breek met die gepaardgaande omskakeling daarvan na wateroplosbare bruin stowwe en vrystelling van surfaktante in die medium.

Die koste van die ontginning van steenkool word 'n al belangriker faktor, veral waar die steenkoolneerslae redelik diep is. Steenkool voorsien tans aan ongeveer 85% van Suid-Afrika se energiebehoeftes en dus is dit noodsaaklik dat metodes vir die verbetering van ekstraksie in steenkoolmyne, verdere ontwikkeling van steenkoolomsettings-tegnologieë en energiebesparing, verbeter moet word.

Biologiese behandeling van steenkool mag toepassing vind op die volgende terreine:

* organiese of koolstofgedeelte
  - depolimerisering
  - reduksie van suurstofkomponente
  - dekarboksilering
* verwydering van swawel of stikstof

Suid-Afrikaanse steenkool bestaan hoofsaaklik uit die maserale vitriniet, inertiniet en eksiniet in verskillende verhoudings, afhanklik van die oorsprong en spesifieke laag wat gevorm is. Die materiaal wat na verbranding op die rooster agterbly, is hoofsaaklik minerale.

Steenkoolbioprosessering wat deur middel van mikro-organismes uitgevoer kan word, word in twee areas verdeel:

* steenkoolsuiwering
* steenkoolomsetting.

Die aktiwiteite van mikro-organismes word grootliks deur die chemiese en fisiese toestande van hul omgewings beïnvloed. Deur omgewingsinvloed te verstaan, kan die verspreiding van mikro-organismes in die natuur verstaan word en kan metodes om mikrobiese aktiwiteite te beheer, ontwikkel word. Enige organisme het, binne sy toleransiereeks, 'n optimum vir enige gegewe toestand waarby groei en vermeerdering die vinnigste plaasvind.

Temperatuur is een van die belangrikste omgewingsfaktore wat groei en oorlewing van organismes beïnvloed. Beide die optimale groeitemperatuur en die reeks temperature wat 'n organisme kan weerstaan, bepaal of daardie organisme teenwoordig sal wees en watter rol dit in die ekostelsel sal speel.

Behalwe dat termiese vernietiging deur pH beïnvloed word, speel pH ook 'n belangrike rol in optimale groei van mikro-organismes. Die meeste mikro-organismes verkies 'n neutrale pH van 7,00, hoewel daar die enkele uitsonderings is wat suur of alkaliese groeimediums verkies.

Die effek van suurstof op die groei van mikro-organismes is duidelik waarneembaar uit die feit dat sekere mikro-organismes slegs in teenwoordigheid van en andere slegs in afwesigheid van suurstof kan groei.

Soms is bykomstige voedingstowwe nodig wanneer bakterieë kunsmatig gekweek word. Sulke voedingstowwe is teenwoordig in gisekstrak, wat 'n komplekse bron van nutriënte is, met ander woorde, een waarvan die presiese samestelling nie bekend is nie.

Die doel van hierdie navorsing was om die groeibehoeftes van steenkool-geassosieerde mikro-organismes te bepaal. Met die ondersoek sou dit moontlik wees om die invloed van sekere omgewingsparameters soos temperatuur, pH, suurstof en gisekstrak op geselekteerde isolate, vas te stel.

Die ondersoek is in vier groepe verdeel:

* Die effek van temperatuur op die groei van geselekteerde isolate
* Die effek van pH op die groei van geselekteerde isolate
* Die effek van suurstof op die groei van geselekteerde isolate
* Die effek van gisekstrak op die groei van geselekteerde isolate.

Die volgende waarnemings is gemaak:

Die verskillende isolate verkies verskillende temperature, pH's en konsentrasies suurstof vir groei. Die navorsing toon dat 'n gisekstrakkonsentrasie van 0,2% optimaal vir groei van al die isolate is.

Die resultate van hierdie navorsing kan in die praktyk toegepas word, indien die betrokke instansies sou besluit om van mikro-organismes gebruik te maak vir die verbrokkeling van moeilik ontginbare steenkool.

ABSTRACT

Because of the structure of coal, it cannot be biodegraded readily. Nature has not provided a method to process the carbon in coal molecules. Coal is also highly insoluble in water and many organic solvents, except under extreme circumstances. Current chemical processes in coal conversion are very costly and for this reason it is important to investigate alternative routes such as microbial liquefaction or disintegration of coal. Certain ***Pseudomonas*** species are capable of partly degrading bituminous coal and, at the same time, converting it to water soluble brown substances and releasing surfactants in the medium.

Large quantities of coal in South Africa became very expensive to mine utilizing conventional technology. Coal supplies 85% of South Africa's energy requirements at the moment and therefore methods to improve extraction in coal mines, further development of coal conversion technologies and energy conservation, should be improved.

Biological treatment follows the following route:

* organic or carbon portion
  - depolimerization
  - reduction of oxygen components
  - decarboxylation
* removal of sulphur or nitrogen

South African coal consists mainly of the macerals vitrinite, inertinite and exinite in different ratios, depending on the origin and specific layer formed. The material remaining on the grid after incineration, is mainly mineral matter.

Coal bio-processing can be divided into two areas:

* coal purification
* coal conversion,

The activities of micro-organisms are largely influenced by the chemical and physical conditions of their environment. When one understands the influence of the environment, the distribution of micro-organisms in nature can be understood and then the methods to control microbial activities can be developed. Any organism has, within its range of tolerance, an optimum for any given condition at which growth and multiplication will take place most rapidly.

Temperature is one of the most important environmental factors influencing growth and survival of organisms. Both the optimal growth temperature and the range of temperatures that an organism can withstand, will determine whether that organism will be present as well as its role in the ecosystem.

Not only does pH influence thermal killing but it also plays an important role in optimal growth of micro-organisms. Most micro-organisms prefer a neutral pH of 7,00, although some exceptions prefer an acidic or alkaline medium for growth.

The effect of oxygen on growth of micro-organisms is clearly evident from the observations that certain micro-organisms can grow only in the presence of, and others can grow only in the absence of oxygen.

Occasionally additional nutrients are required when culturing bacteria artificially. Such nutrients are present in yeast extract which is a complex nutrient source, meaning that its exact composition is unknown.

The aim of the present research was to determine the growth requirements of coal-associated micro-organisms. Through this investigation it should be possible to establish the influence of certain environmental parameters such as temperature, pH, oxygen and yeast extract, on selected isolates.

The investigation was divided into four sections:

- The effect of temperature on the growth of selected isolates
- The effect of pH on the growth of selected isolates
- The effect of oxygen on the growth of selected isolates
- The effect of yeast extract on the growth of selected isolates.

The following observations were made:

The various isolates preferred different temperatures, pH's and concentrations of oxygen for growth. Research has shown that a yeast extract concentration of 0,2% was optimal for growth of all the isolates.

Should authorities concerned decide to use micro-organisms for comminution of coal that is difficult to mine, the results of this research can be applied in practice.

INHOUDSOPGAWE

HOOFSTUK 1 - INLEIDING 1

HOOFSTUK 2 - LITERATUUROORSIG 3

2.1 Aspekte van steenkoolstruktuur 3

2.1.1 Oorsprong van die organiese komponent 7

2.1.2 Oorsprong van die anorganiese komponent 8

2.1.3 Voginhoud 8

2.1.4 Steenkoolrang 8

2.2 Steenkool in Suid-Afrika 10

2.3 Samestelling van Suid-Afrikaanse steenkool 13

2.4 Biologiese omsetting van steenkool 14

2.5 Omgewingsfaktore wat mikrobegroei beïnvloed 15

2.5.1 Die effek van temperatuur 17

2.5.2 Die effek van pH 19

2.5.3 Die effek van suurstof 23

2.5.3.1 Die toksisiteit van suurstof 24

2.5.3.2 Suurstofsensitiewe ensieme 25

2.5.3.3 Die rol van oksigenases in aërobe mikro-organismes 25

2.5.3.4 Redokspotensiaal 26

2.5.4 Effek van voedingstowwe 27

2.5.4.1 Algemene voedingstofvereistes 27

2.5.4.2 Behoefte vir koolstof, waterstof en suurstof 28

2.5.4.3 Voedingstipes van mikro-organismes 28

2.5.4.4 Behoeftes vir stikstof, fosfor en swawel 30

2.5.4.5 Groeifaktore 30

2.5.4.6 Kultuurmedia 31

HOOFSTUK 3 - EKSPERIMENTEEL 34

3.1 Bakteriese isolate en steenkool 34

3.1.1 Isolering en identifisering van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 34

3.1.1.1 Isolering 34

3.1.1.2 Identifisering 35

3.1.1.2.1 Morfologies 35

3.1.1.2.2 Primere onderskeidingstegnieke 36

3.1.1.2.3 Sekondere toetse 36

3.2 Bepaling van die invloed van temperatuur op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 37

3.3 Bepaling van die invloed van pH op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 38

3.4 Bepaling van die invloed van suurstof op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 38

3.5 Bepaling van die invloed van gisekstrak op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 39

HOOFSTUK 4 - RESULTATE EN BESPREKING 41

4.1 Die invloed van temperatuur op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 41

4.1.1 Resultate 41

4.1.2 Bespreking 41

4.2 Die Invloed van pH op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 49

4.2.1 Resultate 49

4.2.2 Bespreking 49

4.3 Bepaling van die invloed van suurstof op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 64

4.3.1 Resultate 64

4.3.2 Bespreking 65

4.4 Bepaling van die invloed van gisekstrak op die groei van steenkool-geassosieerde mikro-organismes 73

4.4.1 Resultate 73

4.4.2 Bespreking 73

HOOFSTUK 5 - GEVOLGTREKKING 82

5.1 Algemeen 82

5.2 Die invloed van temperatuur 82

5.3 Die invloed van pH 83

5.4 Die invloed van suurstof 83

5.5 Die invloed van gisekstrak 83

5.6 Slotsom 84

BIBLIOGRAFIE

HOOFSTUK 1

INLEIDING

Die behandeling van steenkool deur middel van bioprosessering het slegs onlangs sterker op die voorgrond getree. Hierdie veld is nog in 'n embrioniese stadium, maar beloof om 'n area van aktiewe navorsing in komende jare te word. Terselfdertyd is dit 'n bekende feit dat mikro-organismes in staat is om die houtagtige komponent van plantweefsel, naamlik lignien, af te breek. Dit is ook aanvaar dat steenkool verkry word vanaf die houtagtige gedeeltes van plantweefsel en dus lignienagtige strukture bevat. Gevolglik is lignienafbrekende mikro-organismes natuurlike kandidate vir steenkoolverbrokkeling (Fakoussa, 1991 : 187).

In die Verenigde Koninkryk word daar heelwat werk gedoen op fisiese skeidingsprosesse wat gebruik word in steenkoolveredeling. Mikro-organismes word gebruik om die oppervlak-eienskappe van verskillende deeltjies gedurende flottasie te verander. Hierdie benadering het die potensiaal van 'n relatief kort kontaktyd toepassing en lae kapitaaluitleg.

Onlangse metodes wat in steenkoolveredeling toegepas word, is gebaseer op die verskille in die fisiese kenmerke wat die skeiding van swaweldraende en asvormende minerale onsuiwerhede affekteer. Een aspek van steenkoolveredeling is vermaling vir vrystelling van minerale (Liu, 1982 : v).

Vermaling in fisiese steenkoolveredeling is 'n essensiële stap om minerale onsuiwerhede, voor hul skeiding uit steenkool, vry te stel. Fisiese vermaling of chemiese verbrokkeling staan as "comminution" bekend en dit behels die blootstelling van rou steenkool aan sekere chemikalieë soos gasagtige of vloeistof ammoniak.

Hierdie blootstelling het tot gevolg die fragmentasie van rou steenkool tussen verskillende mikroskopiese bestanddele van steenkool en minerale onsuiwerhede. Alkaliese ammoniak lei dus tot steenkoolverbrokkeling en terselfdertyd vind daar geen

chemiese reaksie tussen die chemikalie en die organiese gedeelte van steenkool plaas nie. Hierdie is 'n fisiese, eerder as 'n chemiese proses (Liu, 1982 : vi).

Hieruit kan afgelei word dat, indien mikro-organismes vir steenkoolverbrokkeling aangewend sou word, dit moontlik deur die vorming van 'n alkali sou kon plaasvind.

Wanneer mikro-organismes onder kunsmatige laboratoriumtoestande gekweek word, vind ons hipotetiese ideale toestande. Eksperimentele werk met werklike organismes vereis egter dat baie faktore in aanmerking geneem moet word. Aktiwiteite van mikro-organismes word grootliks geaffekteer deur die chemiese en fisiese toestande van hulle omgewings. Mikro-organismes reageer nie almal dieselfde teenoor 'n gegewe omgewingsfaktor nie. Om die waarheid te sê, kan een omgewingsfaktor voordelig vir een mikro-organisme wees en nadelig vir 'n ander. Die omgewing van 'n mikro-organisme moet dus in aanmerking geneem word (Atlas en Bartha, 1980 : 133).

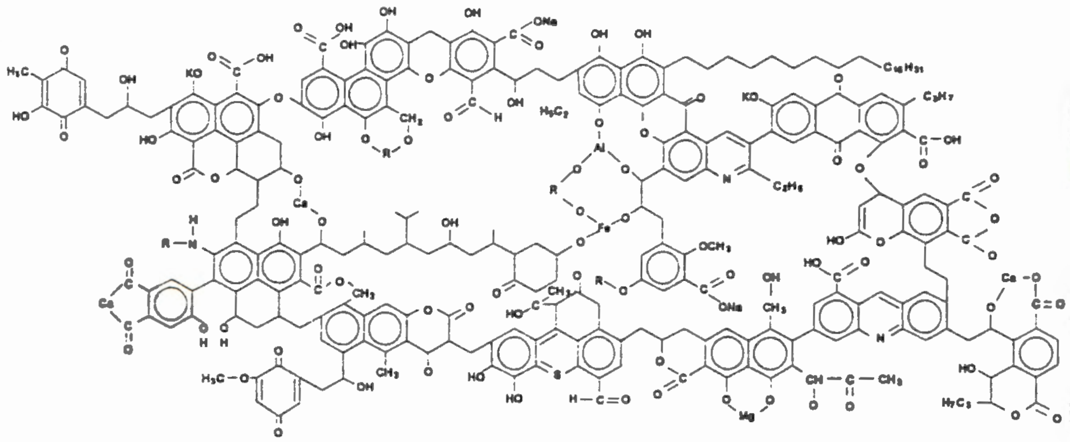
Die doel van hierdie navorsing was om die optimale omgewingstoestande vir steenkoolgeassosieerde mikro-organismes te bepaal. Met die ondersoek is spesifiek gekyk na temperatuur-, pH-, suurstof- en gisekstrakbehoeftes van mikro-organismes wat op steenkoolmedia geïsoleer is. Die resultate van hierdie ondersoek vorm 'n basis vir verdere navorsing ten opsigte van die bioprosessering van steenkool in Suid-Afrika.

Voortspruitend uit hierdie probleemstelling was dit noodsaaklik om die volgende literatuurstudie uit te voer.

HOOFSTUK 2
LITERATUUROORSIG

2.1 ASPEKTE VAN STEENKOOLSTRUKTUUR

Steenkool blyk nie die ideale materiaal vir biologiese assimilasie te wees nie, alhoewel dit van biologiese oorsprong is (Olson en Brinckman, 1986 : 1638). Dit is 'n hoogs varieerbare en heterogene mengsel waar 'n gedeelte van die swawel in steenkool organies gebind is. 'n Voorgestelde chemiese struktuur vir Duitse bruin steenkool word in figuur 1 aangetoon (Quigley, 1992 : 40).



Figuur 1: **Voorgestelde chemiese struktuur vir Duitse bruin steenkool (Quigley, 1992 : 40)**

Die groot hoeveelhede steenkool wat wêreldwyd voorkom, bestaan omdat die natuur nie 'n metode verskaf het om die koolstof in die steenkoolmolekules te

verwerk nie. Die toestande was nie hiervoor geskik nie (d.w.s. tekort aan suurstof, heersende temperature en druk). Steenkool is van biologiese oorsprong en is grootliks onoplosbaar in water en baie organiese oplosmiddels, behalwe onder uiterste toestande.

Die lae poreusiteit in steenkool skep 'n probleem tydens mikrobiese afbraak en die buitenste oppervlak is feitlik die enigste beskikbare omgewing vir afbraak. Aansienlike hoeveelhede anorganiese onsuiwerhede kom in die vorm van kwarts, klei en swaelverbindings voor (Couch, 1988 : 208).

Die gebruik van steenkool (harde steenkool of ligniet) as brandstof skep sekere probleme soos lugbesoedeling, probleme met vervoer (vergeleke met vloeibare brandstof) en ander hanteringsprobleme (bv. steenkoolstof). Resente chemiese prosesse in steenkoolomsetting of steenkoolvervloeiing is baie duur, dus is mikrobiese vervloeiing van steenkool 'n belangrike opsie om die volgende redes:

- om nuwe metodes vir omsetting van steenkool te ondersoek wat onder matige toestande (normale temperatuur en druk) kan voortgaan,

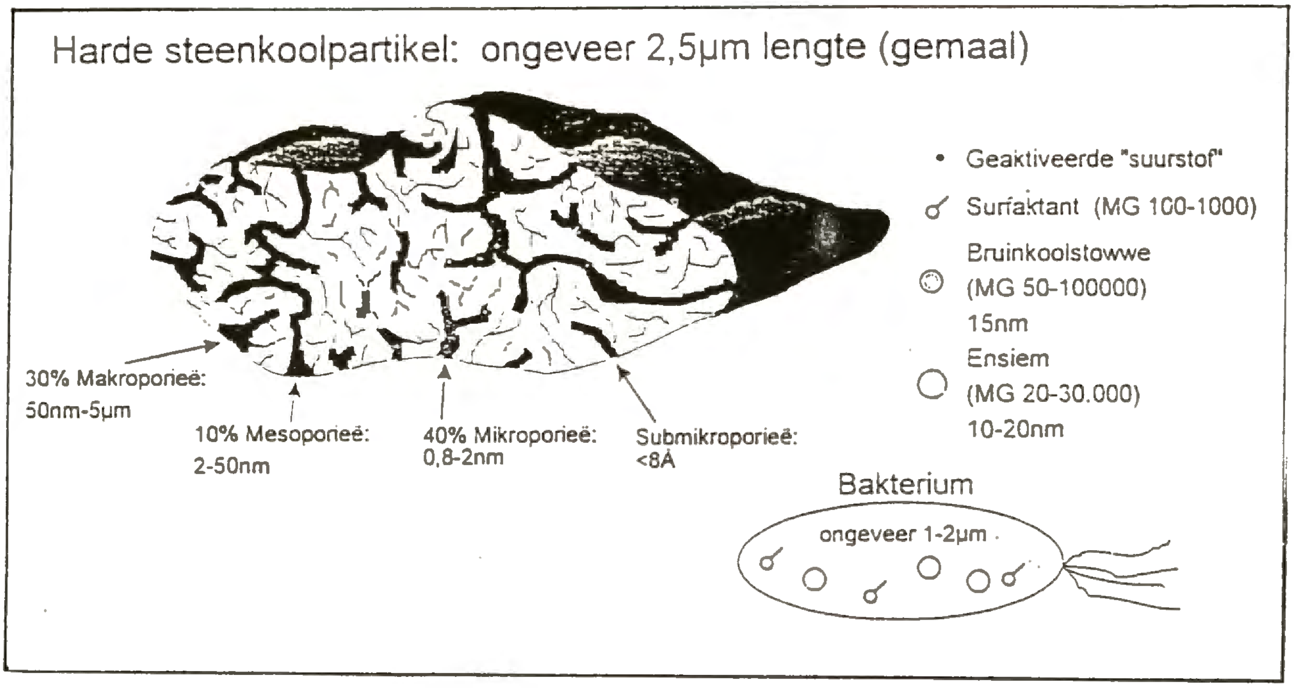
- om steenkoolslik deur middel van mikrobiese surfaktante en oksidatiewe ensieme te produseer,

- om nuwe tegnieke in toekomstige steenkoolherwinning te ontwikkel (Fakoussa, 1991 : 187).

Sekere spesies van ***Pseudomonas*** is in staat om natuurlike bitumineuse steenkool gedeeltelik af te breek. Gedeeltes van die steenkoolpartikels word na wateroplosbare bruin stowwe met 'n molekulêre massa van tussen 50 000 en 100 000 omgeskakel. Terselfdertyd stel die bakterieë 'n aantal surfaktante in die medium vry (Fakoussa, 1991 : 187).

In 'n groottevergelyking tussen 'n klein harde steenkoolpartikel (gemaal tot 'n

grootte van 2,5 µm) en bakterieë, is aangetoon dat bakterieë slegs gedeeltes van die makroporieë kan binnedring (sien figuur 2).



Figuur 2: **Groottevergelyking tussen steenkoolpartikels en mikrobiese komponente (Fakoussa, 1991 : 189)**

Ensieme is in staat om die mesoporieë ook binne te dring, maar die meeste steenkoolporieë (omtrent 80%) gee toegang vir biosurfaktante en ander molekules. Die bruin verbindings vrygestel uit die steenkooldeeltjies is hidrofiel van aard en uit hul gedrag teenoor ioonuitruilingsharse kan afgelei word dat hulle 'n groot aantal anioniese groepe bevat (Fakoussa, 1991 : 188).

Steenkool is fisies en chemies 'n heterogene klip wat hoofsaaklik uit organiese materiaal bestaan. Hierdie organiese materiaal is vanaf plantoorblyfsels gevorm. In die eerste stadium, hoofsaaklik biochemies van aard, is mos neergelê wat gedurende 'n latere geochemiese stadium verstening ondergaan het. Oor 'n tydperk van etlike miljoene jare, onder invloed van druk en temperatuur, is hierdie verstening deur neerlegging van sedimente veroorsaak. Die organiese sedimentêre klip so gevorm, bestaan uit plantfossiele, bekend as maserale, en minerale

insluitsels (Kemp, 1986 : 1). Die maserale is mikroskopies-aparte areas wat in drie hoofklasse ingedeel kan word:

- vitriniet,
- eksiniet (of lipiniet),
- inertiniet.

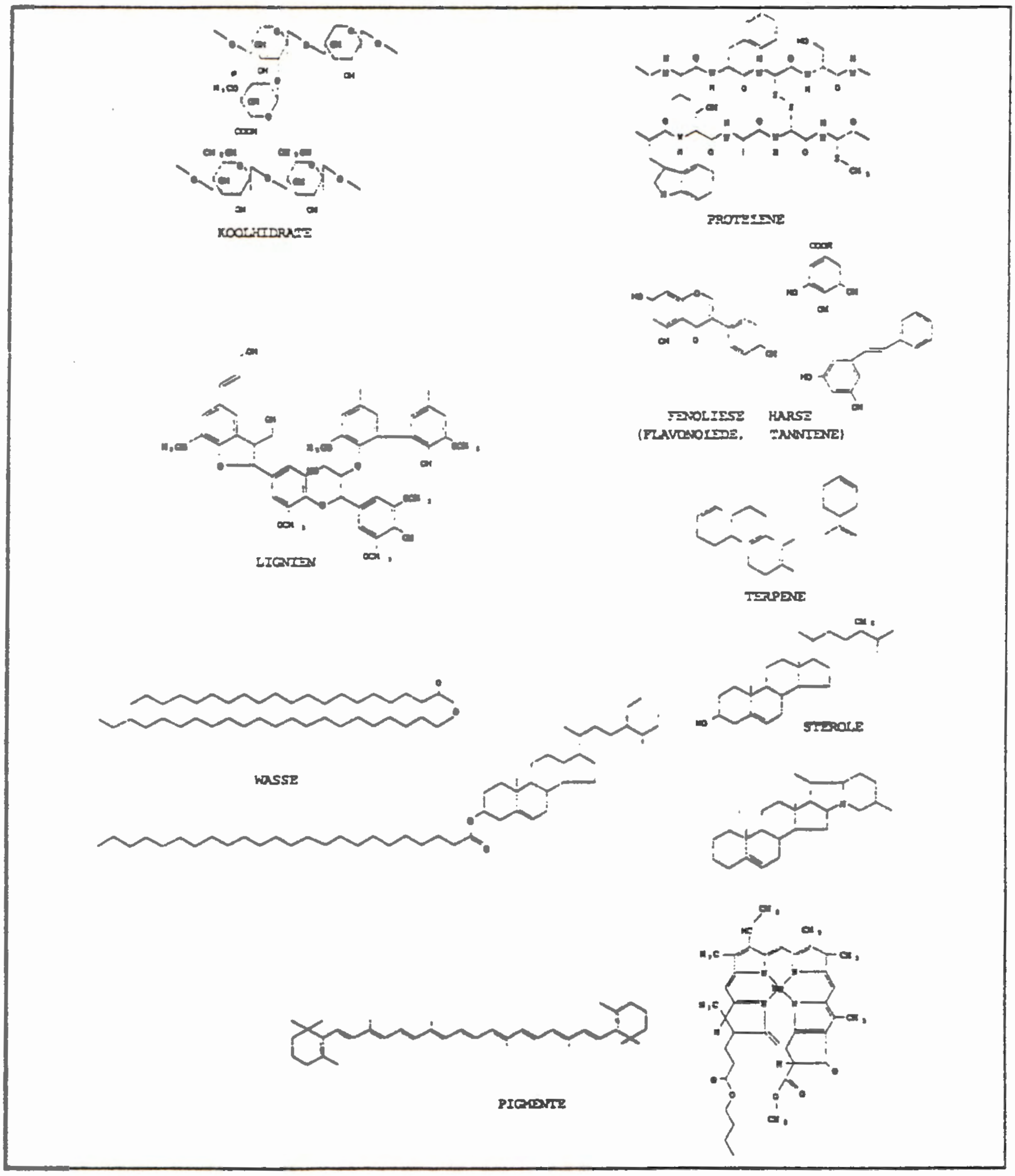
Vitriniet kom die meeste voor in die steenkool wat in hierdie ondersoek gebruik is en is van houtagtige plantmateriaal afkomstig (hoofsaaklik lignien) en die eksiniet vanaf lipiede en wasagtige plantstowwe. Die oorsprong van inertiniet is waarskynlik houtskool deur prehistoriese piroliseprosesse gevorm (Haenel, 1991 : 1).

As gevolg van die oorsprong van steenkool is dit 'n feitlik nie-vlugtige, onoplosbare, nie-kristaldraende, uiters komplekse mengsel organiese molekules wat baie in grootte en struktuur wissel. 'n Gedetailleerde strukturele karakterisering is uiters moeilik, daarom word steenkoolstruktuurnavorsing intensief gedoen. In beginsel is daar twee benaderings om steenkoolstruktuur te bepaal. Die een poog om die steenkoolmakromolekules in verteenwoordig-ende fragmente op te breek en die oorspronklike struktuur vanaf hierdie fragmente te verkry. Die ander benadering probeer om steenkool direk te karakteriseer deur tegnieke wat die nie-vernietigende ondersoek van soliede materiaal toelaat. Sulke tegnieke sluit onder andere in infrarooispektrometrie, vastetoestand kernmagnetieseresonans-spektroskopie, X-straal diffraksie en elektronmikroskopie (TEM) in (Haenel, 1991 : 1).

Steenkool is al beskryf as "koolstofagtige klip" en bevat beide organiese en anorganiese komponente (Faison, 1992 : 10).

2.1.1 Oorsprong van die organiese komponent

Plante bevat 'n verskeidenheid chemiese bestanddele (sien figuur 3) wat almal tot die steenkoolstruktuur bydra. Hierdie plantbestanddele vertoon wisselende grade van weerstand teen mikrobiese afbraak. Byvoorbeeld: koolhidrate, proteïene en



Figuur 3: **Steenkoolvoorvoerders vanaf plantaardige oorsprong (Faison, 1992 : 13)**

sekere lipiede kan makliker afgebreek word, terwyl lignien, harse en terpene meer stabiel teenoor mikrobiese aanval mag wees. Plantweefsel, soos kurklae of stuifmeelkorrels wat met weerstandbiedende materiaal verryk is, mag besonder bestand wees teen bio-afbreking (Faison, 1992 : 12).

2.1.2 Oorsprong van die anorganiese komponent

Volgens Faison (1992 : 12) sluit die minerale stowwe in steenkool die volgende in: silikate, karbonate, sulfiede, oksiede, sulfate, fosfate, spoorelemente en hul geassosieerde ione. Klei beslaan 50-80% van die totale minerale materie in steenkool. Sommige van die anorganiese materiaal in steenkool is afkomstig vanaf die plantmateriaal waarvan steenkool gevorm is. Primêre minerale materie sluit swawel, stikstof en fosfor in, asook 'n verskeidenheid spoormetale in mikrobiese en plantweefsel teenwoordig.

2.1.3. Voginhoud

Volgens Faison (1992 : 14) ontstaan vog in steenkool op twee maniere:

- inlating van water gedurende die versteenkolingsproses en
- vanaf water geassosieer met plantmateriaal waarvandaan steenkool gevorm word.

Steenkool se poreusiteit laat water toe om deur die steenkoolmatriks te vloei. Steenkool word dan ook beskryf as 'n ioonuitruilingshars gelaai met deurvloeiende water (Faison, 1992 : 14).

2.1.4 Steenkoolrang

Die vorming van steenkool bestaan hoofsaaklik uit drie stappe, nl.

- **Afsetting**

  Dit verwys na neerlegging en verrotting van dooie plantmateriaal wat deur omgewingsfaktore, soos suurstofspanning, beïnvloed word.

- **Diagenese**

  Dit is 'n herkombinasie of herrangskikking van organiese en anorganiese komponente (Faison, 1992 : 10). Volgens Van Nierop (1988 : 2) verwys dit na die biochemiese omskakeling van die primêre dooie materiaal.

- **Metamorfisme**

  Dit verwys na 'n duidelike verandering wat tot 'n meer kompakte en kristalagtige toestand lei. Metamorfisme-reaksies is grootliks fisies-chemies van aard (Faison, 1992 : 10).

Volgens Faison (1992 : 15) het steenkooldiagenese en metamorfisme 'n geleidelike toename in steenkoolrang tot gevolg: vanaf veen (wat streng gesproke nie steenkool is nie) deur ligniet, subbitumineuse en bitumineuse steenkool en antrasiet (sien Tabel 1).

Tabel 1: Klassifikasie van steenkool volgens rang (Faison, 1992 : 16)

	Rang			
Kenmerk	Ligniet	Subbitumineuse	Bitumineuse	Antrasiet
Ouderdom (x 10^6 jaar)	20-60	60-100	>100	>200
% Samestelling(m/m)[a]				
Koolstof	70-75	75-85	85-90	90-97
Waterstof	4-6	4-6	4-5	3-5
Suurstof	20-25	10-20	5-10	1-3
Aromatiese koolstof-inhoud (% van totale koolstof)	30-50	60-70	70-80	80-95
Ringkondensasie-indeks[b]	1-2	1.5-2.5	2-5	>5
% Vlugtigheids-inhoud(m/m)	40-50	35-50	10-45	<14
% Voginhoud (m/m)[c]	20-45	5-25	1-5	<1
Verhittingswaarde[d] (x 10^3 Bte/lb)	6.3-8.3	8.3-11.5	10.5-14	>14

[a] Droë, mineraal-materievrye basis, genormaliseer vir uitsluiting van swawel en stikstof. Totale % swawel (organies plus anorganies) in V.S.A. steenkool: 0.3-5 m/m. Totale % stikstof in V.S.A. steenkool: <2 m/m.

[b] Gemiddelde aantal vyf- of sesledige ringe per geslote ringstelsel.

[c] Inherente vog.

[d] Mineraal-materievrye basis.

2.2 STEENKOOL IN SUID-AFRIKA

Die groot hoeveelheid steenkool wat in Suid-Afrika voorkom het aanleiding daartoe gegee dat dit tot die land se primêre energiebron ontwikkel het (South Africa (Republic), Department of Foreign Affairs, 1985 : 322). Dit is in teenstelling met die ekonomieë van ander lande wat op olie-energie gegrond is.

Die steenkoolmynindustrie vorm 'n groot komponent van die totale mynindustrieë van Suid-Afrika, veral by nie-goudminerale waar dit die oorheersende rol speel (Hugo, 1986 : 1). Die toepassingsmoontlikhede van steenkool en die produkte wat tydens die verwerking daarvan verkry word, byvoorbeeld die vervloeiing daarvan, is legio en baie bekend.

Steenkool is vir Suid-Afrika van kardinale belang (nie net op die uitvoermark nie, maar ook vir plaaslike gebruik), veral met inagneming van die feit dat Suid-Afrika naas die V.S.A., Rusland en China oor die meeste reserwes beskik (Tinney, 1992 : 30). Die steenkoolreserwes waaroor Suid-Afrika beskik moet optimaal benut word ten einde die grootste moontlike voordeel daaruit te trek. Ten einde hierdie doel te bereik, is dit noodsaaklik om ook die groot hoeveelhede bitumineuse steenkool wat nog onontgin is, op so 'n manier te probeer verwerk dat dit makliker ontginbaar word.

Suid-Afrika het 'n *in situ* steenkoolreserwe van 113 000 miljoen ton waarvan ongeveer 57 000 miljoen ton ekonomies deur hedendaagse tegnologie ontgin kan word. Steenkool voorsien tans aan *ca* 85% van Suid-Afrika se primêre energiebehoeftes. Die toenemende sukses van sintetiese brandstofontwikkeling deur die Suid-Afrikaanse Steenkool-, Olie- en Gaskorporasie (SASOL) behoort daartoe te lei dat Suid-Afrika se afhanklikheid van ingevoerde olie nog verder sal afneem. Die hoofdoel van SASOL is die vervaardiging van petroleumprodukte uit steenkool en in 1990 is geskat dat by voltooiing en volle produksie van die drie aanlegte 'n totaal van 35 miljoen ton steenkool jaarliks verbruik behoort te word (South Africa (Republic), Department of Foreign Affairs, 1990 : 322).

Suid-Afrika is tans besig met 'n primêre optimalisering van energiehulpbron-ontwikkeling wat veral gerig is op die verbetering van ekstraksiemetodes in steenkoolmyne, verdere ontwikkeling van steenkoolomsettingstegnologieë, sintetiese brandstofontwikkeling en energiebesparing. In 1988 is 1 426 miljoen ton plaaslik gebruik (South Africa (Republic), Department of Foreign Affairs, 1990 : 322). Die steenkoolmyne by Secunda vorm die grootste ondergrondse steenkoolmynkompleks in die wêreld (Theron, 1994 : 14). Moderne mynboutegnieke wat in steenkoolmyne gebruik word, het tot 'n verhoging in fyn steenkoolproduksie gelei. Groot hoeveelhede onbenutte fyn steenkool word tans in Suid-Afrika geproduseer.

Suid-Afrika beskik oor *ca* 10% van die wêreld se steenkoolreserwes wat nog sowat 250 jaar kan hou teenoor die sowat 50 jaar van ru-olie. Steenkooluitvoere het in 1988 43,4 miljoen ton beloop waarvan die meeste deur Richardsbaai uitgevoer is. Die steenkoolriwwe is relatief dik en meer as 50% ontginbare reserwes lê op dieptes van minder as 100 m; dus kan die meeste Suid-Afrikaanse steenkool relatief maklik en goedkoop gebruik word (South Africa (Republic), Department of Foreign Affairs, 1985 : 322).

Navorsing met die oog op die benutting van fyn steenkool behels onder andere die volgende:

- veredeling,
- brikettering,
- geaktiveerde koolstof,
- biologiese swawelverwydering,
- biologiese vervloeiing en verbrokkeling (Opperman, 1994, persoonlike mededeling).

Verlaging van die asinhoud deur enige veredelingsproses verhoog die waarde en benutbaarheid van steenkool aansienlik. Vir oppervlakgerigte veredelingsprosesse is 'n hidrofobe oppervlak voordelig. Biologiese behandeling van steenkool mag

moontlik ook op hierdie vlak 'n toepassing vind. Navorsing ten opsigte van biologiese behandeling van steenkool word op die volgende terreine gedoen:

(I) Organiese of koolstofgedeelte (kan moontlik as voeding/kunsmis gebruik word):

- depolimerisering, sleutelbindings word deur ensieme gebreek;
- reduksie van suurstofkomponente, - C = O tot CH_2;
- dekarboksilering, - COOH na CO_2.

Hierdeur word die hittewaarde verhoog en help dit ook met die veredelingsproses.

(ii) Verwydering van swawel of stikstof:

Tydens verbranding van steenkool word verbindings met suurstof naamlik SO_x of NO_x as afvalprodukte gevorm. Ondersoek word gedoen oor moontlikhede om swawel of stikstof biologies te verwyder.

Tegnieke wat gebruik word om die oppervlakke te karakteriseer en evalueer, is onder andere:

- **Zetapotensiaal**

  Zetapotensiaalbepaling (oppervlakladingbepaling) is die meting van die oppervlakpotensiaal van deeltjies wat in 'n oplossing gesuspendeer is (Van Nierop, 1988 : 16).

- **Filmflottasie**

  Hierdie metode word aangewend om die benatbaarheid van steenkool wat aan verskillende oksidasie toestande onderwerp is, vas te stel (Van Nierop, 1988 : 19).

- **Oppervlakekstraksie**

  Oppervlakekstraksie lewer 'n vinnige en akkurate bepaling van die

hidrofobisiteit van die steenkooloppervlak (Van Nierop, 1988 : 17).

Oppervlakoksidasie van fyn steenkool benadeel die oppervlakgerigte veredelingsmetodes. Deur mikrobes te gebruik om die steenkooloppervlak te modifiseer, kan veredelingsprosesse moontlik meer ekonomies uitgevoer word.

2.3 SAMESTELLING VAN SUID-AFRIKAANSE STEENKOOL

Behalwe vir enkele uitsonderings bevat Suid-Afrikaanse steenkool hoofsaaklik vitriniet, inertiniet, eksiniet en ander oorblyfsels van blare en saad (Suid-Afrikaanse Steenkoolverwerkingsvereniging, 1977 : 11).

Steenkool verbrand nie geheel en al nie, daar is altyd materiaal wat inert gedurende verbranding is. Hierdie materiaal bestaan uit vog en minerale wat in 'n veranderde vorm as as op die rooster na volledige ontbranding agterbly.

- **Vog**
  Steenkool bevat altyd water waarna verwys word as die voginhoud (sien 2.1.3).

- **Inherente vog**
  Hierdie vog is bevat in die stukke en brokkies steenkool. Steenkool is deurspek met baie klein porieë wat die inherente vog bevat.

- **Oppervlakvog**
  Oppervlakvog is buite- of vry vog wat in krake en nate op die oppervlak van steenkool voorkom.

- **Minerale**
  Minerale is die anorganiese inerte vaste materiaal in steenkool en net soos vog verminder dit die hittewaarde van steenkool deurdat dit die persentasie

koolstof verlaag (Suid-Afrikaanse Steenkoolverwerkingsvereniging, 1977 : 12).

2.4 BIOLOGIESE OMSETTING VAN STEENKOOL

Mikrobiesgekataliseerde prosesse is vandag 'n multimiljard Rand industrie. Die toepassing van mikrobiese, plant- en dierselle vir die produksie van bruikbare verbindings, is grootskaals. Mikrobiese omsetting van lignoselluloosagtige materiaal, die biologiese voorloper van steenkool, is ook al in detail bestudeer (Narayan en Ho, 1988 : 487).

Steenkoolbioprosessering kan in twee aspekte verdeel word:

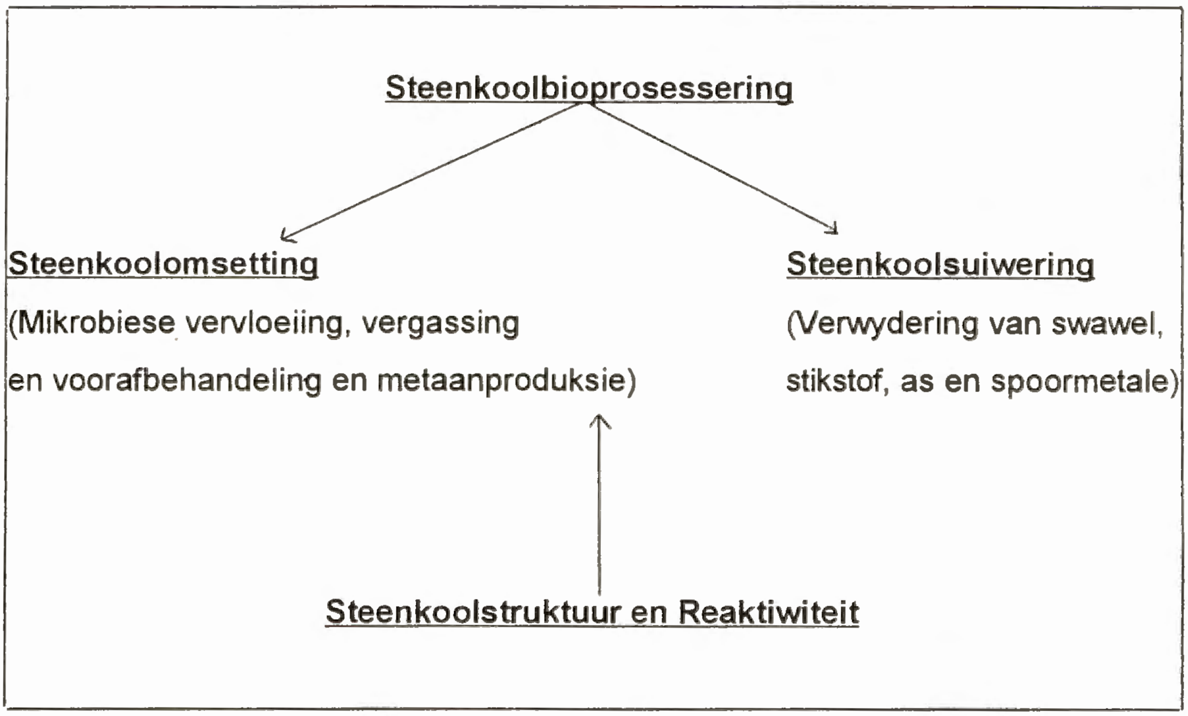
- **Steenkoolsuiwering**: Dit behels die verwydering van ongewenste komponente soos swawel, stikstof en spoormetale.

- **Steenkoolomsetting**: Mikrobiese vervloeiing, vergassing en voorafbehandeling en metaanproduksie (Isbister *et al.*, 1988 : 281; Narayan en Ho, 1988 : 487).

Die vermoë van enige mikrobe of konsortium van mikrobes om 'n komplekse struktuur af te breek of te verander, hang van die soorte chemiese bindings en die drie-dimensionele omgewing rondom die bindings af. Steenkoolomsetting hang dus nou saam met steenkool makromolekulêre struktuur en biochemiese meganismes waardeur mikrobes of ensieme bindings breek. Hierdie verwantskappe word in figuur 4 uiteengesit.

Die doelwitte van mikrobiese steenkoolsuiwering is heeltemal duidelik: verwydering van swawel, stikstof en spoormetale deur "sagte" mikrobiese prosesse. In die veld van mikrobiese steenkoolomsetting is die doelwitte egter nie heeltemal so duidelik nie. Byvoorbeeld, in die geval van mikrobiese lignienafbraak is die doelwit duidelik,

nl. volledige afbraak van lignien. 'n Mens wil egter nie steenkool totaal afbreek nie, maar dit slegs omskakel na 'n meer bruikbare vorm deur die toepassing van mikrobiese transformasies (Narayan en Ho, 1988 : 489).



Figuur 4: **Steenkoolbioprosesseringsareas (Narayan en Ho, 1988 : 488)**

2.5 OMGEWINGSFAKTORE WAT MIKROBEGROEI BEÏNVLOED

Die aktiwiteite van mikro-organismes word grootliks deur die chemiese en fisiese toestande van hulle omgewings beïnvloed. Deur die omgewingsinvloed te verstaan kan die verspreiding van mikro-organismes in die natuur verstaan word en kan metodes om mikrobiese aktiwiteite te beheer en ongewenste organismes te vernietig, dus ontwikkel word (Brock en Bartha, 1984 : 239).

Daar is twee belangrike wette wat die interaksies van biologiese stelsels en hul abiotiese omgewings verklaar, nl. Liebig se wet van die Minimum en Shelford se wet van Toleransie (Atlas en Bartha, 1980 : 133).

Liebig se wet stateer dat die totale opbrengs of biomassa van enige organisme deur die voedingstof wat in die laagste (minimum) konsentrasie teenwoordig is, bepaal word en is in verhouding met die behoeftes van daardie organisme.

Voedingsbehoeftes wissel tussen mikro-organismes en dus sal sekere mikro-organismes in 'n gegewe ekosisteem kan groei en ander nie. Die wet impliseer ook dat in enige gegewe ekosisteem daar die een of ander groeibeperkende faktor sal wees. Byvoorbeeld, in 'n ekosisteem sal die groei van een mikrobiese populasie deur konsentrasies beskikbare fosfor beperk word en, in dieselfde stelsel, sal die groei van 'n ander mikrobiese populasie deur konsentrasies beskikbare stikstof beperk word.

Die hoeveelheid en voorkoms van organismes in 'n omgewing word nie slegs deur voedingstowwe bepaal nie, maar ook deur verskillende fisies-chemiese faktore soos temperatuur, redokspotensiaal en pH. Liebig se wet is met beperkte sukses op hierdie parameters toegepas (Atlas en Bartha, 1980 : 133).

Shelford se wet van Toleransie het 'n wyer beginsel en stateer dat, om te oorleef en te groei, benodig elke organisme 'n komplekse stel toestande. Vir 'n organisme om suksesvol te wees, moet elkeen van hierdie toestande binne die toleransiereeks van 'n gegewe organisme bly.

Indien enige toestand, soos byvoorbeeld temperatuur, die minimum of maksimum toleransie van die organisme oorskry, sal dit nie floreer nie en dus geëlimineer word. Die toleransiereekse van mikro-organismes en die wisseling van chemiese en fisiese faktore in 'n ekostelsel sal nie bepaal watter organismes in 'n ekostelsel teenwoordig is nie, maar eerder watter mikro-organismes op 'n volgehoue basis in so 'n ekostelsel teenwoordig kan wees.

Sommige mikro-organismes het 'n wye toleransie vir 'n gegewe faktor terwyl ander slegs 'n nou reeks van daardie faktore kan oorleef. So kan euritermiese mikro-organismes byvoorbeeld 'n wye reeks temperature oorleef terwyl sterotermiese

mikro-organismes slegs 'n nou reeks kan oorleef. Enige organisme het, binne sy toleransiereeks, 'n optimum vir enige gegewe toestand waarby groei en vermeerdering die vinnigste plaasvind. Daar is deur Odum voorgestel dat 'n kombinasie van Liebig en Shelford se wette ekologies van die grootste waarde is. So stateer Odum se Gekombineerde wet dat die teenwoordigheid en sukses van 'n organisme of 'n groep organismes van 'n komplekse stel toestande afhang. Die interaktiewe aard van omgewingsdeterminante bemoeilik die taak van mikrobiese ekoloë om die beherende of beperkende faktore in natuurlike stelsels toe te pas (Atlas en Bartha, 1980 : 134).

2.5.1 Die effek van temperatuur

Temperatuur is een van die belangrikste omgewingsfaktore wat groei en oorlewing van organismes beïnvloed. Dit kan lewende organismes op een van twee maniere affekteer: soos die temperatuur styg, sal chemiese en ensiematiese reaksies in die sel vinniger plaasvind en groei ook vinniger geskied. Bokant 'n sekere temperatuur is proteïene, nukleïensure en ander sellulêre komponente egter sensitief vir hoë temperature en mag hulle onomkeerbaar geïnaktiveer word. Dit gebeur dus dat as die temperatuur binne 'n gegewe reeks styg, sal groei en metaboliese funksies tot by 'n punt waar inaktiveringsreaksies intree, toeneem. Bokant hierdie punt sal selfunksies skerp daal tot by zero. Daar is dus vir elke organisme 'n minimum temperatuur waaronder groei nie langer plaasvind nie, 'n optimum temperatuur waarby groei die vinnigste geskied en 'n maksimum temperatuur waarbokant groei nie kan plaasvind nie.

Die optimum temperatuur is altyd nader aan die maksimum as die minimum. Hierdie drie temperature, wat as kardinale temperature bekend staan, is gewoonlik kenmerkend vir elke soort organisme, maar is nie volkome vasgestel nie en kan deur ander omgewingsfaktore verander word (Brock *et al.*, 1984 : 240).

Beide die optimale groeitemperatuur en die reeks temperature waarbinne 'n organisme kan groei, bepaal of daardie organisme teenwoordig sal wees en watter

rol dit in die ekostelsel sal speel. Mikro-organismes word geklassifiseer as psigrofiele, met 'n lae optimum temperatuur (5-15 °C), mesofiele, met 'n matige optimum temperatuur (25-40 °C) en termofiele, met 'n hoë optimum temperatuur (40-60 °C) (Atlas en Bartha, 1980 : 137).

Normaalweg moet die selmembraan in 'n vloeibare staat wees om behoorlik te funksioneer. Dit mag wees dat die minimum temperatuur van 'n organisme ontstaan deurdat die selmembraan vries sodat dit nie langer in voeding-stofoordrag of protongradientvorming funksioneer nie (Brock *et al.*, 1984 : 240).

Hoë temperatuuraanpassing van termofiele sluit groot hoeveelhede versadigde lipiede in membrane in wat voorkom dat die membrane by hoë temperature smelt. By sommige termofiele wat by hoë temperature groei, vind daar sintese van hitteweerstandbiedende ensieme plaas (Atlas en Bartha, 1980 : 137).

Dit is wel so dat biochemiese prosesse by hoë temperature versnel, maar oor die algemeen het termofiele organismes langer generasietye as mesofiele. Hierdie paradoks kan verklaar word as daar in ag geneem word dat ensiemproteïene vinnig by termofiele groeitemperature geïnaktiveer word. Termofiele mikro-organismes gebruik baie energie om termies geïnaktiveerde proteïene te herstel en te vervang, dus is hul generasietye langer en hul selopbrengs in verhouding met hoeveelheid substraat gebruik, laag.

Mikro-organismes sal nie noodwendig afsterf wanneer hulle nie by 'n sekere temperatuur kan groei nie; endospore, siste en ander rustende stadiums is bekend en selfs vegetatiewe selle kan tydperke oorleef wanneer hulle buite hul temperatuurreeks vir aktiewe groei gekweek word.

Oorlewing is dikwels beter by temperature laer as die organisme se groeireeks, maar dit gebeur dat hul groeisnelheid en metaboliese aktiwiteite sal afneem. Organismes sal makliker afsterf as temperature bokant hul groeireeks styg. Die uitwerking van temperatuur op mikro-organismes is met ander omgewingsfaktore

interaktief; vogtigheid het byvoorbeeld 'n duidelike invloed op die termiese sterfte van mikro-organismes. Klam hitte is baie meer effektief om organismes te dood as droë hitte: 15 tot 20 min by 120 °C met stoom is voldoende vir sterilisasie, terwyl droë hitte van 160 tot 180 °C vir 3 tot 4 h vir dieselfde effek benodig word (Atlas en Bartha, 1980 : 140).

Die pH beïnvloed ook termiese doding. By neutrale pH is mikro-organismes meer bestand teen hoë temperature as by suur of alkaliese pH-waardes. Interaksies tussen verskillende abiotiese faktore laat mikro-organismes toe om in habitats waar dit moontlik mag lyk asof een abiotiese parameter verby die toleransiereeks van daardie mikro-organismes mag wees, te oorleef en te groei (Atlas en Bartha, 1980 : 140).

Behalwe dat temperatuur 'n invloed uitoefen op groei en oorlewing, affekteer dit ook die metaboliese aktiwiteite van mikro-organismes.

In die algemeen sal hoër temperature wat nie mikro-organismes dood nie, hoër metaboliese aktiwiteite tot gevolg hê, byvoorbeeld verhoogde temperatuur het verhoogde suurstofverbruik tot gevolg. Dit dui op die onderliggende invloed van temperatuur op ensiem-aktiwiteite. Tot by 'n temperatuur waar proteïen-denaturasie plaasvind, sal toename in temperatuur die snelheid van ensiematiese aktiwiteite verhoog (Atlas en Bartha, 1980 : 140).

2.5.2 Die effek van pH

Die waterstofioonkonsentrasie van 'n oplossing word gemeet as die pH en pH word gedefinieer as -log [H^+]. Onder hoogs alkaliese of suurtoestande kan sommige mikrobiese selkomponente gehidroliseer word of ensieme word gedenatureer. Normaalweg kan mikro-organismes nie uiterste pH-waardes weerstaan nie. Daar is egter sommige asidofiele bakterieë wat uiterste suurtoestande kan weerstaan of selfs vereis vir groei (Atlas en Bartha, 1980 : 157-158).

Baie hoë (> 10) en baie lae (< 3) pH-waardes is inhiberend vir die meeste mikro-organismes, maar sommiges word nogtans in omgewings waar pH-waardes naby aan 0 is asook naby aan 11 en selfs hoër is, aangetref (Grant en Long, 1981 : 60).

Organismes wat by sodanige pH uiterstes groei, het te doen met effekte anders as hoë of lae konsentrasies H^+ of OH^-. Metaalione is baie meer oplosbaar by lae pH en mikro-organismes wat in suurmyndreineringswater of steenkoolhope koloniseer, weerstaan hoë konsentrasies metale soos koper en molibdeen wat toksies vir ander mikro-organismes kan wees. Mikro-organismes wat by hoë pH groei, bestaan in 'n omgewing waar daar feitlik geen divalente katione soos Mg^{2+} en Ca^{2+} teenwoordig is nie en moet hoogs ingewikkelde stelsels besit om hierdie metale te konsentreer. Die interne pH van asidofiele en alkalofiele wyk nooit meer as 2 pH-eenhede af van neutraal nie en in die algemeen sal intrasellulêre ensieme van sulke selle nie by pH-uiterstes funksioneer nie.

Ekstrasellulêre ensieme het gewoonlik 'n optimum pH soortgelyk aan die optimum pH vir groei. Die verskil in pH tussen die buite- en binnekant van die sel word waarskynlik deur uitsluitingsmeganismes vir OH^- en H^+ uitgevoer of daar mag spesifieke pompmeganismes wees. Alkalofiele het definitiewe probleme om energie deur middel van chemie-osmotiese prosesse te genereer aangesien die normale pH-gradient oor die selmembraan omgekeer is. Daar is geen bewyse vir duidelike verskille tussen die selwande van asidofiele, alkalofiele en ander mikro-organismes nie.

Daar is wel aanduidings dat asidofiele ongewoon groot hoeveelhede gesikliseerde lipiede asook 'n oormaat amino-bevattende fosfolipiede bevat wat in 'n H^+-uitsluitende meganisme kan optree (Grant en Long, 1981 : 61-62). Dit is gewens om in kultuurmedia 'n relatief konstante pH gedurende groei te behou en dit word die beste deur die gebruik van buffers uitgevoer. Dit is soute van swak sure of basisse wat waterstofione opneem of afgee soos wat die waterstofioonkonsentrasie in die medium verander. Dit hou dus die waterstofioon-konsentrasie konstant.

Verskillende buffers is vir verskillende pH-reekse geskik. In die pH-reeks 6 tot 8 is fosfaat 'n uitstekende buffer en word dikwels in kultuurmedia gebruik. Onder matige suurtoestande is sitraat 'n goeie buffer terwyl boorsuur en gliserien by alkaliese pH 'n buffer is. Hoewel daar baie soorte buffers is, is dit essensieel om seker te wees dat die buffer geen toksiese effekte op die organisme het nie.

Sommige bakterieë word deur relatief klein hoeveelhede fosfaat, 'n algemene buffer, geïnhibeer. As 'n buffer nie gebruik kan word nie, word pH-beheer uitgeoefen deur met tussenposes gedurende groei, klein hoeveelhede gekonsentreerde alkali of suur by te voeg. Dit sal dan die pH terugbring na die gewenste waarde. In grootskaalse kwekings word outomatiese toestelle gebruik wat die pH meet en 'n klep open om alkali of suur, soos benodig, in te laat en die pH sodoende konstant te hou (Brock *et al.*, 1984 : 258).

Elke organisme het 'n pH-reeks waaroor groei moontlik is en het gewoonlik ook 'n goedgedefinieerde optimum pH. Die meeste natuurlike omgewings het pH-waardes tussen 5 en 9 en organismes met hul optimum in hierdie reeks, is algemeen. Slegs 'n paar spesies kan by pH-waardes laer as 2 of hoër as 10 groei (Brock *et al.*, 1984 : 259). Die optimale pH-waardes en die toleransiereekse vir pH van verskillende bakterieë word in tabel 2 weergegee. In die algemeen blyk dit dat mikro-organismes beter as hoër organismes by suuromgewings aangepas is, alhoewel daar 'n uitsondering hier is, naamlik die sianobakterieë. Hierdie organismes is totaal afwesig in omgewings met pH laer as 4, hoewel 'n aantal eukariotiese alge by pH-waardes laer as dit floreer. ***Euglena mutabilis*** word wydverspreid aangetref soos byvoorbeeld in steenkool-, koper- en sinkmyne waar dit in die suurwater lewe (Brock *et al.*, 1984 : 259).

Alhoewel mikro-organismes in habitats oor 'n wye pH-reeks aangetref word, is hul interne pH waarskynlik naby aan neutraal. Neutraliteit is noodsaaklik omdat daar baie suur- en alkalilabiele komponente in die sel is.

Chlorofil, DNS en baie proteïene word deur 'n suur pH vernietig, terwyl RNS en

Tabel 2: **Minimum, optimum en maksimum pH-waardes van verskillende bakteriee (Atlas en Bartha, 1980 : 158)**

Organisme	pH		
	Minimum	Optimum	Maksimum
Escherichia coli	4,4	6,0-7,0	9,0
Proteus vulgaris	4,4	6,0-7,0	8,4
Aerobacter aerogenes	4,4	6,0-7,0	9,0
Pseudomonas aeruginosa	5,6	6,6-7,0	8,0
Erwinia carotovora	5,6	7,1	9,3
Clostridium sporogenes	5,0-5,8	6,0-7,6	8,5-9,0
Nitrosomonas spp	7,0-7,6	8,0-8,8	9,4
Nitrobacter spp	6,6	7,6-8,6	10,0
Thiobacillus thiooxidans	1,0	2,0-2,8	4,0-6,0
Lactobacillus acidophilus	4,0-4,6	5,8-6,6	6,8

fosfolipiede sensitief vir 'n alkaliese pH is. Die optimum pH vir intrasellulêre ensieme is gewoonlik rondom neutraal, hoewel ensieme in die periplasmiese ruimte en ekstrasellulêre ensieme 'n pH optimum vir aktiwiteit naby aan die pH van die omgewing mag hê (Brock *et al.*, 1984 : 260).

Die pH kan elektronies of kolorimetries bepaal word. Vir kolorimetriese bepaling kan 'n verskeidenheid kleurstowwe wat verskillende dissosiasie-afhanklike kleure by verskillende pH-waardes vertoon, gebruik word. Hierdie kleurstowwe kan in 'n papierstrokie opgeneem word, wat dan in die omgewingsmonster gedoop word. Die kleur wat ontwikkel, word met standaarde vergelyk om die pH te bepaal.

Die pH kan meer akkuraat met elektroniese pH-meters gemeet word; die elektrodes van die pH-meter word in die monsteroplossing gedompel. Hierdie prosedure is eenvoudig en akkuraat vir waterige monsters.

Baie ekostelsels is met karbonaat en bikarbonaat gebuffer. Die hoeveelheid beskikbare CO_2 in oplossing is dus as gevolg van hierdie bufferstelsel, baie meer.

Beskikbare CO_2 is belangrik vir primêre produktiwiteit (Atlas en Bartha, 1980 : 159). Dit is dus duidelik dat pH 'n definitiewe invloed op die vermoë van 'n organisme om in 'n gegewe omgewing te kan groei, uitoefen.

2.5.3 Die effek van suurstof

Die huidige atmosfeer van die aarde bevat ongeveer 20% van die hoogs reaktiewe gas, suurstof. Met die uitsondering van baie bakterieë en 'n paar protosoë, wurms en molluske, is alle organismes van die beskikbaarheid van molekulêre suurstof as elektronakseptor afhanklik. Die respons van bakterieë teenoor suurstof is baie wisselend en dit is 'n belangrike faktor in hul kweking. Bakterieë word in verskeie kategorieë op grond van hul suurstofbehoeftes ingedeel:

* aërobe wat afhanklik van suurstof is,
* fakultatief anaërobe wat suurstof gebruik as dit beskikbaar is,
* anaërobe wat nie suurstof kan gebruik nie.

Die anaërobe bestaan uit twee tipes:

* streng anaërobe vir wie suurstof toksies is,
* aërotolelante anaërobe wat 'n kort blootstelling aan suurstof kan oorleef.

Alhoewel die toksisiteit van suurstof die duidelikste aangedui word deur die uitwerking daarvan op streng anaërobe, is dit nogtans ook vir aërobe organismes teen hoë konsentrasies toksies. Baie streng aërobe kan nie by suurstofkonsentrasies hoër as atmosferies (dit wil sê hoër as 20% v/v) groei nie. Sommige streng aërobe vereis suurstofkonsentrasies aansienlik laer as atmosferies (2 tot 10% v/v) om te kan groei. Aërobe bakterieë wat sulke suurstofsensitiwiteit onder alle groeitoestande vertoon, staan as mikro-aërofiele bekend. Die behoefte van 'n streng aërobe organisme vir 'n verminderde suurstofkonsentrasie word dikwels grootliks deur òf die energiebron òf die stikstofbron beïnvloed. Baie waterstofverbruikende bakterieë wat atmosferiese suurstofkonsentrasies weerstaan

wanneer gekweek met organiese substrate, vereis aansienlik laer suurstofkonsentrasies wanneer waterstof as energiebron gebruik word. Sommige aërobe stikstoffikserende bakterieë kan stikstof slegs in totale afwesigheid van suurstof fikseer (Stanier *et al.*, 1987 : 210).

2.5.3.1 Die toksisiteit van suurstof

Alle bakterieë bevat ensieme wat in staat is om met suurstof te reageer; die aard en verskeidenheid van hierdie ensieme bepaal die fisiologiese verhouding van die organisme tot suurstof. Die oksidasie van flavoproteïene lei gewoonlik tot die vorming van 'n toksiese verbinding, H_2O_2, as een hoofproduk. Hierdie oksidasies (en moontlik ander ensiem-gekataliseerde oksidasies of oksigenasies) produseer klein hoeveelhede van 'n selfs meer toksiese vrye radikaal, superoksied.

By aërobe en aërotolerante anaërobe mikrobes word die potensieel dodelike opeenhoping van superoksied voorkom deur die ensiem superoksieddismutase, wat die omsetting daarvan na suurstof en waterstofperoksied kataliseer. Feitlik al hierdie organismes bevat ook die ensiem katalase wat waterstofperoksied afbreek na suurstof en water:

$$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \xrightarrow{\text{superoksieddismutase}} O_2 + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{\text{katalase}} 2H_2O + O_2$$

Die melksuurbakterieë is in staat om in teenwoordigheid van suurstof te groei, en besit nie die ensiem katalase nie. Hulle hoop egter nie merkwaardige hoeveelhede H_2O_2 op nie; sommige van hulle breek dit deur peroksidase af.

Peroksidase is 'n ensiem wat die oksidasie van organiese verbindings deur H_2O_2 kataliseer, wat dan na water gereduseer word. Ander gebruik 'n katalase-agtige reaksie wat afhanklik van hoë intrasellulêre konsentrasies Mn^{2+} is (Stanier *et al.*, 1987 : 211).

Dit is duidelik dat superoksieddismutase en katalase of peroksidase 'n rol in die beskerming van die sel teen die toksiese gevolge van suurstofmetabolisme speel. Organismes wat 'n blootstelling aan suurstof kan weerstaan, bevat gewoonlik superoksieddismutase, alhoewel nie noodwendig katalase nie. Alle streng anaërobe tot dusver ondersoek, kort egter beide superoksieddismutase en katalase (Stanier *et al.*, 1987 : 211).

2.5.3.2 Suurstofsensitiewe ensieme

Baie ensieme, veral die van streng anaërobe bakterieë, word vinnig en onomkeerbaar deur blootstelling aan suurstof gedenatureer. 'n Voorbeeld is nitrogenase, die ensiem verantwoordelik vir stikstoffiksering. Selfs die nitrogenases van streng aërobe stikstoffikserende bakterieë soos die ***Azotobacter*** groep, vertoon suurstofsensitiwiteit na ekstraksie uit die sel.

In intakte selle van ***Azotobacter*** word nitrogenase waarskynlik teen inaktivering deur hoë snelheid van suurstofverbruik deur hierdie organisme, beskerm (Stanier *et al.*, 1987 : 212).

2.5.3.3 Die rol van oksigenases in aërobe mikro-organismes

Hoewel die primêre metaboliese funksie van suurstof in streng aërobes die optrede as terminale elektronontvanger is, dien dit ook as kosubstraat vir ensieme wat sommige stappe in die dissimilasie van aromatiese verbindings en alkane kataliseer. Hierdie ensieme staan as oksigenases bekend; hulle help met die direkte byvoeging van òf een òf twee suurstofatome aan die organiese substraat. Baie aërobe ***Pseudomonas*** spesies wat in staat is om aromatiese verbindings of alkane as enigste koolstof- of energiebron te gebruik, is denitrifiseerders en kan dus anaëroob groei deur nitraat in plaas van suurstof as terminale elektronontvanger te gebruik.

Volgens Krieg en Holt, (1984 : 146) word geeneen van die ***Pseudomonas*** spesies

as 'n werklike stikstoffikseerder beskou nie. ***Pseudomonas glathei*** wat in stikstofvrye media gekweek is, het wel gegroei, maar het geen asetileen gereduseer nie.

By eukariote en sommige prokariote behels die biosintese van sterole en onversadigde vetsure sekere stappe aangehelp deur oksigenases. Gevolglik vereis giste sterole en onversadigde vetsure as groeifaktore wanneer fermentatief onder anaërobe toestande gekweek, hoewel hulle hierdie selkomponente kan sintetiseer indien hulle aëroob gekweek word (Stanier *et al.*, 1987 : 212).

2.5.3.4 Redokspotensiaal

Baie ensiematiese reaksies is oksidasie-reduksiereaksies. In sulke reaksies word een verbinding geoksideer en 'n ander gereduseer. Die vermoë van 'n organisme om oksidasie-reduksiereaksies uit te voer, hang van die oksidasie-reduksiestaat van die omgewing af. In 'n oplossing sal die verhouding geoksideerde tot gereduseerde komponente die redokspotensiaal bepaal. Sommige mikro-organismes kan slegs in oksiderende omgewings aktief wees, terwyl ander slegs in reduserende omgewings aktief kan wees.

Die redokspotensiaal word grootliks deur teenwoordigheid of afwesigheid van molekulêre suurstof beïnvloed. Die redokspotensiaal word as E_h uitgedruk; 'n positiewe E_h-lesing bevoordeel oksidasie en 'n negatiewe E_h dui 'n reduserende omgewing aan. Die redokspotensiaal is temperatuur- en pH-afhanklik (Atlas en Bartha, 1980 : 159-160).

2.5.4 Effek van voedingstowwe

Om energie te verkry en nuwe sellulêre komponente te vervaardig, moet organismes 'n voorraad roumateriaal of voedingstowwe hê. Nutriënte is stowwe wat in biosintese en energieproduksie gebruik word en word dus ook vir mikrobiese groei vereis (Prescott *et al.*, 1990 : 93).

2.5.4.1 Algemene voedingstofvereistes

Analise van mikrobiese selsamestelling wys dat 95% of meer van die droë massa van selle uit 'n paar hoofelemente bestaan: koolstof, suurstof, waterstof, stikstof, swawel, fosfaat, kalium, kalsium, magnesium en yster. Hierdie word na verwys as makro-elemente of makronutriënte omdat hulle in redelik groot hoeveelhede vereis word. Die eerste ses (C,O,H,N,S en P) is komponente van koolhidrate, lipiede, proteïene en nukleïensure.

Die oorblywende vier makro-elemente bestaan as katione in die sel en het verskeie funksies. Kalium word vir ensiemaktiwiteite soos proteïensintese vereis. Kalsium dra onder andere by tot hitteweerstand van bakteriese endospore; magnesium dien as kofaktor vir baie ensieme, vorm komplekse met ATP en stabiliseer ribosome en selmembrane. Yster word in die sintese van sitochrome gebruik en as kofaktor vir ensieme en elektrondraende proteïene.

Behalwe die genoemde makro-elemente benodig alle mikro-organismes 'n aantal mikro-elemente, mikronutriënte of spoorelemente. Hierdie spoorelemente - mangaan, sink, kobalt, molibdeen, nikkel en koper - word deur die meeste selle vereis, maar in sulke klein hoeveelhede dat kontaminante in water, glasware en gewone media-komponente dikwels voldoende vir groei is.

Dit is dus moeilik om 'n besondere spoorelementbehoefte aan te toon. Mikro-elemente vorm normaalweg 'n deel van ensieme en kofaktore en hulle help in katalisering van reaksies en onderhoud van proteïenstruktuur. Mangaan help byvoorbeeld baie ensieme wat die oordrag van fosfaatgroepe kataliseer, molibdeen word benodig vir stikstoffiksering en kobalt is 'n komponent van vitamien B_{12} (Prescott *et al.*, 1990 : 93).

2.5.4.2 Behoefte vir koolstof, waterstof en suurstof

Dikwels word daar aan die behoefte vir koolstof, waterstof en suurstof tesame

voldoen. Koolstof word vir die skelet van alle organiese molekules en molekules wat as koolstofbron dien, benodig, en bevat gewoonlik ook waterstof- en suurstofatome.

Een van die mees merkwaardige voedingskenmerke van mikro-organismes is hul buitengewone aanpasbaarheid met betrekking tot koolstofbronne. Daar is geen natuurlike organiese molekuul wat nie deur die een of ander mikro-organisme gebruik kan word nie. Aktinomisete is daarvoor bekend dat hulle amielalkohol, alkane en selfs rubber kan afbreek.

Sommige bakterieë kan feitlik enigiets as koolstofbron gebruik: byvoorbeeld ***Pseudomonas cepacia*** kan meer as eenhonderd verskillende koolstof-verbindings gebruik. Ongelukkig word mensgemaakte stowwe soos plastiek en DDT baie stadig of glad nie afgebreek nie.

Die voedingsbehoeftes van mikro-organismes wissel grootliks tussen verskillende spesies. Hierdie behoeftes kan ook in 'n spesie wissel as gevolg van geen-mutasies (Prescott *et al.*, 1990 : 93-94).

2.5.4.3 Voedingstipes van mikro-organismes

Alle organismes benodig bronne van bogenoemde elemente, asook energie en elektrone of waterstof vir groei om te kan plaasvind. Mikro-organismes kan op grond van hul voedingsbehoeftes geklassifiseer word (sien tabel 3).

Beskikbaarheid van organiese voedingstowwe mag 'n beperkende faktor vir mikrobiese groei in sommige ekostelsels wees. Sommige mikro-organismes vereis relatief hoë konsentrasies organiese materie (eutroof) vir groei terwyl ander weer slegs in ekostelsels met lae konsentrasies organiese materie groei (oligotroof). Organiese verbindings kan toksies vir party mikro-organismes wees.

Meting van organiese verbindings in 'n ekostelsel kan soms gebruik word om

Tabel 3: **Bronne van koolstof, energie en waterstof of elektrone. (Prescott *et al.*, 1990 : 94)**

Koolstofbronne:	
Outotroof	CO_2 enigste of hoofbiosintetiese koolstofbron
Heterotroof	Gereduseerde voorafgevormde organiese molekules vanaf ander organismes
Energiebronne:	
Fototroof	Lig
Chemotroof	Oksidasie van organiese of anorganiese verbindings
Waterstof- of Elektronbronne:	
Litotroof	Gereduseerde anorganiese molekules
Organotroof	Organiese molekules

primêre produktiwiteit van outotrofe mikro-organismes vas te stel.

Daar is baie anorganiese verbindings wat essensiële voedingstowwe vir mikro-organismes is terwyl baie anorganiese stowwe toksies vir mikro-organismes is. Wanneer anorganiese verbindings as mikrobiese voedingstowwe of inhibeerders gebruik wil word, moet die chemiese vorm daarvan in aanmerking geneem word (Atlas en Bartha, 1980 : 161-164).

2.5.4.4 Behoeftes vir stikstof, fosfor en swawel

Om te kan groei moet 'n mikro-organisme in staat wees om groot hoeveelhede stikstof, fosfor en swawel te inkorporeer. Alhoewel hierdie elemente vanaf dieselfde voedingstowwe wat koolstof verskaf, verkry word, moet mikro-organismes gewoonlik

anorganiese bronne ook gebruik. Stikstof word vir die sintese van aminosure, puriene, pirimidiene, sommige koolhidrate en lipiede, ensiem-kofaktore en ander stowwe benodig. Fosfor is in nukleïensure, fosfolipiede, nukleotiedes soos ATP, 'n aantal kofaktore, sommige proteïene en ander selkomponente teenwoordig. Swawel word vir die sintese van stowwe soos die aminosure sisteïen en metionien, sommige koolhidrate, biotien en tiamien benodig (Prescott *et al.*, 1990 : 95-96).

2.5.4.5 Groeifaktore

Mikro-organismes, veral baie van die fotolitotrofe outotrofe, groei en plant dikwels voort wanneer minerale as bronne van stikstof, fosfor, swawel en energie verskaf word. Hierdie organismes beskik oor die ensieme en metaboliese weë wat benodig word om alle essensiële selkomponente te sintetiseer.

Baie mikro-organismes beskik egter nie oor een of meer van hierdie ensieme nie en kan dus nie al die nodige bestanddele vervaardig nie en moet dit dus uit die omgewing verkry. Sulke organiese verbindings wat vereis word omdat hulle essensiële selkomponente of voorlopers van sulke komponente is, staan as groeifaktore bekend. Die drie hoofklasse groeifaktore is:

* aminosure, benodig vir proteïensintese,
* puriene en pirimidiene benodig vir nukleïensuursintese, en
* vitamiene wat ensiem-kofaktore opmaak (Prescott *et al.*, 1990 : 95-96).

2.5.4.6 Kultuurmedia

Baie van mikrobiologie hang van die vermoë om mikro-organismes in die laboratorium te kweek en te onderhou af en dit is slegs moontlik wanneer die geskikte kultuurmedia beskikbaar is. Hoewel alle mikro-organismes bronne van energie, koolstof, stikstof, fosfor, swawel en ander minerale benodig, sal die presiese samestelling van 'n bevredigende medium van die spesie wat gekweek moet word, afhang, aangesien voedingsbehoeftes so grootliks wissel.

Kennis van 'n mikro-organisme se habitat is handig wanneer 'n geskikte kultuurmedium geselekteer word, omdat sy voedingsbehoeftes na sy natuurlike omgewing verwys. Daar bestaan twee hoofklasse media, naamlik:

* **Sintetiese of gedefinieerde media**

  Dit is media waarvan alle komponente bekend is en dit word veral in navorsing gebruik. Volgens Starr *et al.* (1981 : 142) kan baie chemo-organotrofe bakterieë in 'n chemies-gedefinieerde of sintetiese medium gekweek word. Dit bestaan uit minerale soute (makro- en mikro-elemente), 'n koolstofbron en 'n stikstofbron. Indien nodig, kan dit met groeifaktore aangevul word.

  Die samestelling van 'n sintetiese medium hang van die die behoeftes van die besondere organismes af. 'n Medium wat slegs uit minerale soute bestaan, staan as 'n minerale medium bekend, terwyl 'n volledige medium wat vir die kweking van chemo-organotrofe bakterieë dien, bykomstige komponente vir groei benodig (Starr *et al.*, 1981: 142).

* **Komplekse media**

  Dit is media waarvan sommige komponente onbekend is. Dit is 'n baie bruikbare tipe medium omdat 'n enkele komplekse medium ryk en volledig genoeg kan wees om aan die behoeftes van baie verskillende mikro-organismes te voldoen. Komplekse media word ook dikwels benodig omdat die voedingsbehoeftes van 'n besondere mikro-organisme onbekend is.

Komplekse media bevat ongedefinieerde komponente soos peptone, vleisekstrak en gisekstrak. Dit verskaf anorganiese ione, aminosure, peptiede, puriene, pirimidiene, essensiele vitamine, koolhidrate en ander organiese verbindings aan die komplekse media (Starr *et al.*, 1981 : 142).

Peptone is proteïenhidrolisate wat deur gedeeltelike proteolitiese vertering van vleis, kaseïen, sojameel, gelatien en ander proteïenbronne berei is. Hulle dien as bronne van koolstof, energie en stikstof.

Vleisekstrak is 'n waterige ekstrak van maer beesvleis en bevat aminosure, peptiede, nukleïensure, organiese sure, vitamiene en minerale.

Gisekstrak is 'n waterige hidrolisaat van brouersgis en is 'n uitstekende bron van B-vitamiene asook van stikstof en koolstof. Dit verskaf uitstekende groeitoestande vir 'n aantal mikro-organismes en word gewoonlik by kultuurmedia as 'n bron van vitamiene teen 'n konsentrasie van drie tot vyf gram per liter gevoeg (Prescott *et al.*, 1990 : 100-102).

Ten spyte van adsorpsie aan oppervlakke, is voedingstofkonsentrasies gewoonlik baie laer in die natuur as in gewone laboratoriumkultuurmedia, dikwels 100 tot 1000 keer laer. Dit is dus duidelik dat mikro-organismes in natuurlike omgewings dikwels aan voedingsarme toestande onderwerp is.

Selfs waar ryker voedingsbronne beskikbaar is, soos byvoorbeeld blare-afval of alggroei in woude of alggroei op damme, is voedingstowwe slegs vir 'n kort rukkie beskikbaar aangesien dit vinnig deur mikrobes gekoloniseer en geassimileer word. Die mikrobes keer dan daarna weer terug na 'n semi-uithongeringsdieet. Organismes in die natuur moet dus kan aanpas by 'n fees-of-hongersnoodtoestand (Brock en Madigan, 1988 : 599).

Analise van gisekstrak

-	Totale stikstof (N) uitgedruk as persentasie van die droë gewig	9,6%
-	Koaguleerbare proteïen	nie waarneembaar
-	Sulfaatas	maksimum 15%
-	Fosforverbindings (P)	maksimum 2,5%

-	Swaar metale (Pb)	maksimum 0,0005%
-	Kalsium	maksimum 0,05%
-	Magnesium	maksimum 0,05%
-	Verlies tydens droging (105 °C, 4 h)	maksimum 5%
-	pH (1% oplossing)	5,5 tot 7,0

(Merck, 1985 : 170).

HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTEEL

3.1 BAKTERIESE ISOLATE EN STEENKOOL

3.1.1 Isolering en identifisering van steenkool-geassosieerde mikro-organismes

3.1.1.1 Isolering

Die bakterieë is gedurende 1990 vanuit steenkooldamme by die WNNR geïsoleer. Die pH van die meeste damme is rondom neutraal en wissel vanaf 6,93 tot 8,01. Isolasie is op 1% steenkoolgisekstrakagarplate (10,0g fyngemaalde, subbitumineuse steenkool, 150-200 µm, 2,0g gisekstrak en 20,0g agar opgelos in 1000ml gedistilleerde water en by 121 °C vir 15 minute gesteriliseer) wat asepties in steriele petribakkies gegiet is, gedoen. Waterberg 1.7-steenkool is as volg gekarakteriseer (sien tabel 4):

Tabel 4: **Analise van Waterberg 1.7-steenkool (Opperman, 1994, persoonlike mededeling)**

Kort-analise	
As %	32,9
Vog %	2,4
Vlugtige stowwe %	28,5
Gefikseerde koolstof %	36,2
Eindanalise	
C %	79,78
H %	5,35
N %	1,55
Organiese S %	0,66
O %	12,66
Maseraalanalise	
Vitriniet %	73,9
Eksiniet %	3,6
Reaktiewe semi-fusiniet %	6,1
Inertiniet %	16,4
Refleksie van vitriniet %	0,61

Die kort-analise is deur middel van termo-gravimetriese analise by Sastech N & O uitgevoer (Opperman, 1994, persoonlike mededeling).

Die eind-analise, wat deur verbrandingsreaksies uitgevoer word, sowel as die maseraalanalise, is deur die WNNR uitgevoer (Opperman, 1994, persoonlike mededeling). Maseraalanalises is onder olie-immersie uitgevoer; verskillende maserale kleur en lyk verskillend onder die ligmikroskoop (Falcon en Snyman, 1986 : 10).

Uit tabel 4 is dit duidelik dat hierdie steenkooltipe 'n baie hoë as- sowel as gefikseerde koolstofinhoud het. Dit dui daarop dat steenkool wel as mikrobiese substraat aangewend kan word. Die hoë asinhoud toon aan dat die steenkool van lae rang is wat resulteer in die onveredelbaarheid daarvan. Die gevolg van hierdie onveredelbaarheid is dat daar jaarliks 'n groot hoeveelheid uitskotsteenkool op afvalhope gestort word, wat lei tot ekologiese besoedeling. Die steenkoolmonster wat getoets word, is dus van die vitriniettipe.

Gedurende suiwering van die bakterieë is Kopeloff-Gramkleuring (Cruickshank *et al.*, 1975 : 35) gereeld op die geïsoleerde kolonies uitgevoer totdat daar verseker is dat reinkulture verkry is. Die isolate is by 22 °C gekweek aangesien dit die heersende temperatuur van die steenkooldamme is waaruit die isolate verkry is.

Nadat 'n 1% steenkoolgisektrakmedium (10,0g steenkool, 2,0g gisekstrak, 1000ml gedistilleerde water, gesteriliseer by 121 °C vir 15 minute) met die isolate geïnokuleer is, is dit vir 120 h geïnkubeer. Daar is deur vroeëre eksperimente aangetoon dat groei tot by 120 h toegeneem het, waarna daar geen verdere toename in die aantal lewensvatbare kolonies was nie. Dieselfde rede geld vir die inkubasie van die spreiplate (sien 3.2) tot 72 h. Groei het vanaf 24 tot 72 h toegeneem, waarna daar geen noemenswaardige toename in die aantal lewensvatbare kolonies was nie.

3.1.1.2 Identifisering

3.1.1.2.1 Morfologies

Al die isolate is deur middel van die volgende kleurings en tegnieke onder die ligmikroskoop bestudeer:

* Kopeloff-Gramkleuring (Cruickshank *et al.*, 1975 : 35)
* negatiewe kleuring van Fleming (Harrigan en McCance, 1966 : 13)
* Schaeffer en Fulton se spoorkleuring (Salle, 1973 : 25)
* suurvaste kleuring van Ziehl-Neelsen (Cowan, 1981 : 163)
* die hangdruppeltegniek om beweeglikheid te bepaal (Cruickshank *et al.*, 1975 : 188)

Die transmissie-elektronmikroskoop is gebruik om die volgende te bestudeer:

* teenwoordigheid, aantal en rangskikking van flagellums
* skedes by flagellums
* voorkoms van fimbriae
* vorming van endospore
* bevestiging van selmorfologie

(Esterhuysen, 1988 : 83).

3.1.1.2.2 Primêre onderskeidingstegnieke

Die volgende fenotipiese toetse is op die reinkulture uitgevoer:

* katalase (Cowan en Steel, 1965 : 22; Harrigan *et al.*, 1966 : 65)
* oksidase (Cowan en Steel, 1965 : 148; BφVre en Hendriksen, 1976 : 93; Cruickshank *et al.*, 1975 : 180,181; Gerhardt *et al.*, 1981 : 524)

* respirasie-fermentasie toets (Cruickshank *et al.*, 1975 : 171,173)
* anaërobe groei toets (Harrigan en McCance, 1966 : 48-49; Clowes en Hayes, 1968 : 229).

Die isolate is op grond van die primêre identifikasiemetodes in sewe groepe verdeel.

3.1.1.2.3 Sekondêre toetse

Uit elke groep is 'n isolaat lukraak gekies wat deur middel van 'n identifikasieskema saamgestel uit Starr *et al.* (1981); Krieg en Holt (1984); Sneath *et al.* (1986); Staley *et al.* (1989) en Williams *et al.* (1989), met fenotipiese toetse tot op spesievlak geïdentifiseer is. Die sewe bakteriese isolate is die volgende:

Bacillus brevis
Kurthia gibsonii
'n Streptomyces spesie
Pseudomonas pickettii
Pseudomonas gladioli
Pseudomonas stutzeri
'n Pseudomonas spesie

Die invloed van sekere omgewingsparameters is op geselekteerde steenkool-geassosieerde mikro-organismes bepaal.

3.2 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN TEMPERATUUR OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

Kweek elke isolaat in 100 ml voedingsop (Oxoid, 1990 : 2-167) by 22 °C vir

24 h. Inokuleer 'n 2% inokulum van elke isolaat in aparte 500 ml 1% steenkoolgisekstrakmedium, (sien 3.1.1.1). Inkubeer by 10 °C vir 120 h.

Berei spreiplate (10^{-1} tot 10^{-9}) van bogenoemde kulture vanaf tyd 0, 24-uurliks, vir 5 dae op 1% steenkoolgisekstrakagarplate (sien 3.1.1.1). Inkubeer die plate vir 24 tot 72 h by 22 °C. Die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede (kve) is bereken vanaf die hoogste telling van kolonies wat na 24, 48 en 72 h verkry is.

Herhaal bogenoemde eksperiment vir elke isolaat by temperatuur 20, 30 en 40 °C respektiewelik.

3.3 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN pH OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

Kweek elke isolaat in 100 ml voedingsop (sien 3.2) by 22 °C vir 24 h. Inokuleer 'n 2% inokulum van elke isolaat in aparte 500 ml 1% steenkoolgisekstrakmedium (sien 3.1.1.1) waarvan die pH by 3,0 ingestel is. Inkubeer by 22 °C vir 120 h.

Berei spreiplate (10^{-1} tot 10^{-9}) van bogenoemde kulture vanaf tyd 0, 24-uurliks, vir 120 h (sien 3.1.1.1) op 1% steenkoolgisekstrakagarplate (sien 3.1.1.1). Inkubeer die plate vir 24 tot 72 h by 22 °C. Die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede (kve) is bereken vanaf die hoogste telling van kolonies wat na 24, 48 en 72 h verkry is.

Herhaal bogenoemde eksperiment vir elke isolaat by pH 6,0, 7,0 en 9,0 respektiewelik.

3.4 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN SUURSTOF OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

Kweek elke isolaat in 100 ml voedingsop (sien 3.2) by 22 °C vir 24 h. Inokuleer 'n 2% inokulum van elke isolaat in aparte 1000 ml 1% steenkoolgisekstrakmedium (sien 3.1.1.1). Inkubeer by 22° C vir 120 h met lug wat deurborrel teen 'n tempo van 0,1 *l*.min^{-1}.

Berei spreiplate (10^{-1} tot 10^{-9}) van bogenoemde kulture vanaf tyd 0, 24-uurliks, vir 120 h (sien 3.1.1.1) op 1% steenkoolgisekstrakagarplate (sien 3.1.1.1). Inkubeer die plate vir 24 tot 72 h by 22 °C.

Die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede (kve) is bereken vanaf die hoogste telling van kolonies wat na 24, 48 en 72 h verkry is.

Herhaal bogenoemde eksperiment vir elke isolaat by 'n suurstoftoevoer van 0,5 en 1 *l*.min^{-1} asook vir 'n statiese kultuur wat as kontrole dien.

Bepaal die opgeloste suurstof by dag 0 van elke eksperiment met deurborreling van lug teen 0,1, 0,5 en 1,0 *l*. min^{-1}, asook van die kontrole. Gebruik die Winkler-Alsterbergmetode (Greenberg *et al.*, 1985 : 391).

Die opgeloste suurstof van elke eksperiment was soos volg:

0,1 *l*. min^{-1}	: 0,61 mg O_2/dm^3
0,5 *l*. min^{-1}	: 0,87 mg O_2/dm^3
1,0 *l*. min^{-1}	: 2,07 mg O_2/dm^3
Kontrole	: 1,20 mg O_2/dm^3

3.5 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN GISEKSTRAK OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

Kweek elke isolaat in 100 ml voedingsop (sien 3.2) by 22 °C vir 24 h. Inokuleer 'n 2% inokulum van elke isolaat in aparte 500 ml steenkoolmedium (10,0g steenkool, 1000ml gedistilleerde water, gesteriliseer by 121 °C vir 15 minute) waarvan die gisekstrakkonsentrasie 0,01% is. Inkubeer by 22 °C vir 120 h.

Berei spreiplate (10^{-1} tot 10^{-9}) van bogenoemde kulture vanaf tyd 0, 24-uurliks, vir 120 h (sien 3.1.1.1) op 1% steenkoolgisekstrakagarplate (sien 3.1.1.1). Inkubeer die plate vir 24 tot 72 h by 22 °C.

Die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede (kve) is bereken vanaf die hoogste telling van kolonies wat na 24, 48 en 72 h verkry is.

Herhaal bogenoemde eksperiment vir elke isolaat by gisekstrakkonsentrasies van 0,1%, 0,2% en 0,5% respektiewelik.

HOOFSTUK 4
RESULTATE EN BESPREKING

4.1 DIE INVLOED VAN TEMPERATUUR OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

4.1.1 Resultate

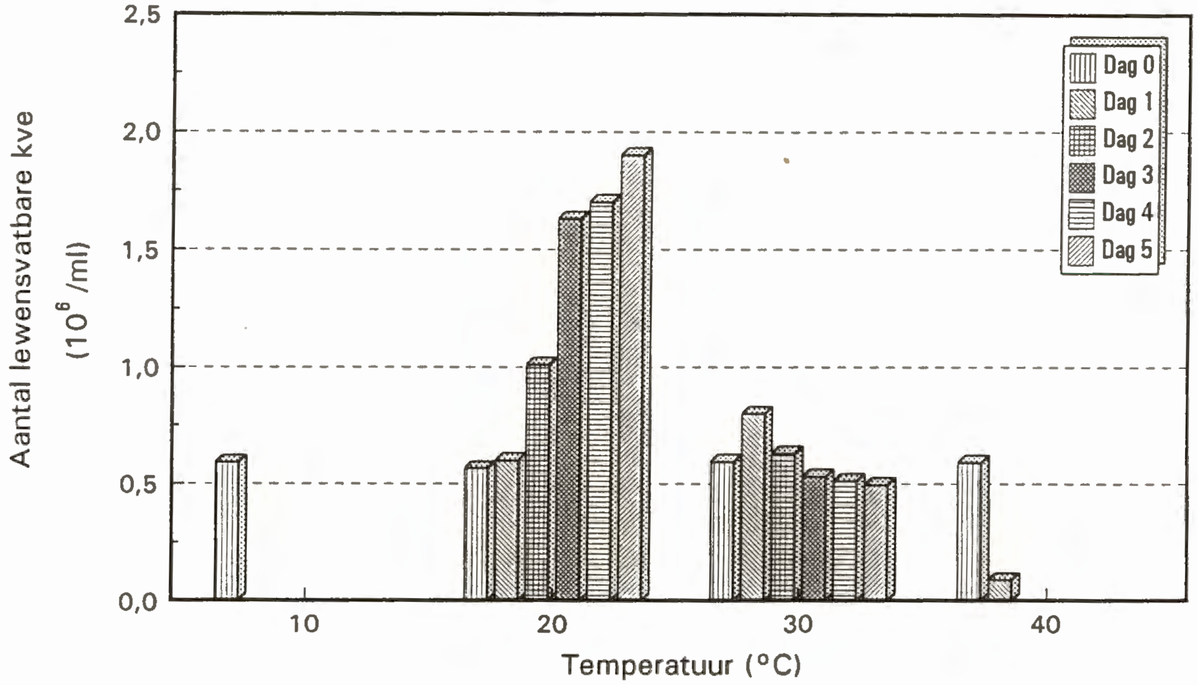
Die tellings van die verskillende lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende temperature word in tabelle 5 tot 11 weergegee. Figure 5 tot 11 is grafiese voorstellings van die verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende temperature.

4.1.2 Bespreking

Uit tabelle 5 tot 11 en figure 5 tot 11 is dit duidelik dat:

* ***Bacillus brevis*** 'n groeitemperatuur van 20 °C verkies. Volgens Sneath *et al.* (1986 : 1122) vertoon ***Bacillus brevis*** groei by 40 °C, maar verklaar ook (Sneath *et al.*, 1986 : 1131) dat die spesie heterogeen is (sien tabel 5 en figuur 5).
* by ***Kurthia gibsonii*** is 30 °C die gunstigste groeitemperatuur. Volgens (Sneath *et al.*, 1986 : 1255) is die optimale groeitemperatuur vir ***Kurthia*** 25-30 °C. Die algemene bron vir ***Kurthia gibsonii*** is feses van sekere plaasdiere wat grond- en oppervlakwater kan kontamineer (Sneath *et al.*, 1986 : 1255; Starr *et al.*, 1981 : 1888). (Sien tabel 6 en figuur 6).
* dit blyk dat 20-30 °C vir 'n ***Streptomyces*** spesie die gunstigste groei-temperatuur is. Volgens Starr *et al.* (1981 : 2034) is grond die habitat van

Figuur 5: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende temperature

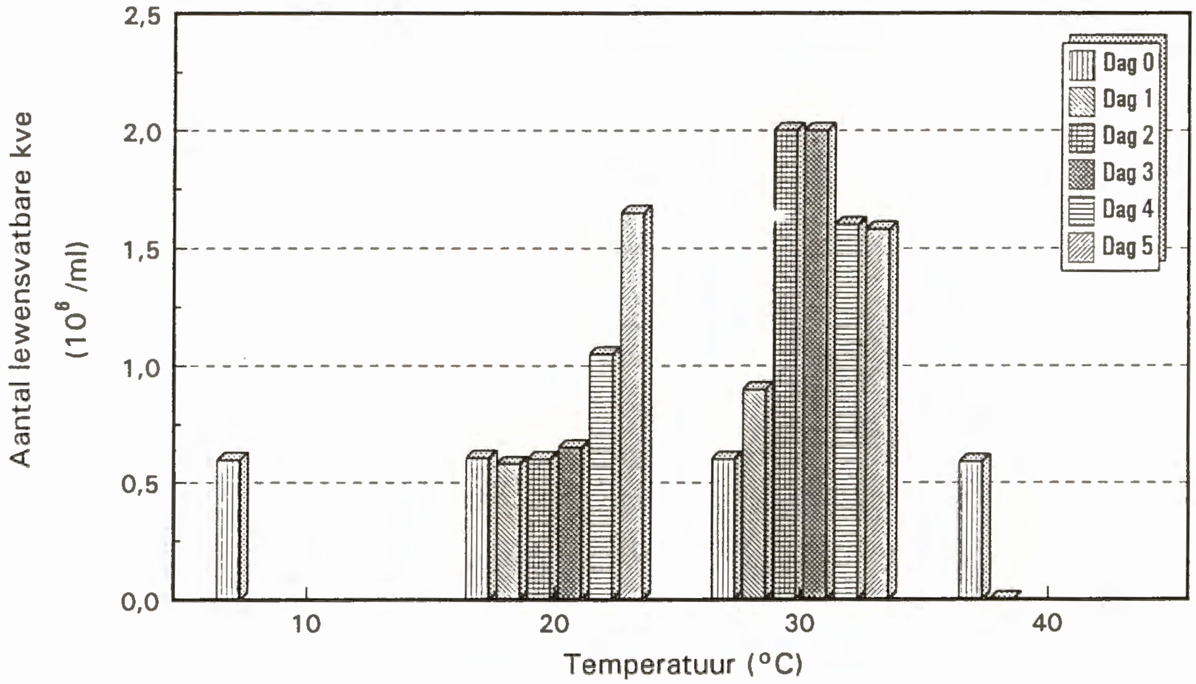


Tabel 5: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	10	20	30	40
Dag 0	590 000	565 000	593 000	590 500
Dag 1	0	600 000	800 000	8 900
Dag 2	0	1 010 000	630 000	0
Dag 3	0	1 630 000	530 000	0
Dag 4	0	1 700 000	510 000	0
Dag 5	0	1 900 000	495 000	0

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 6: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende temperature

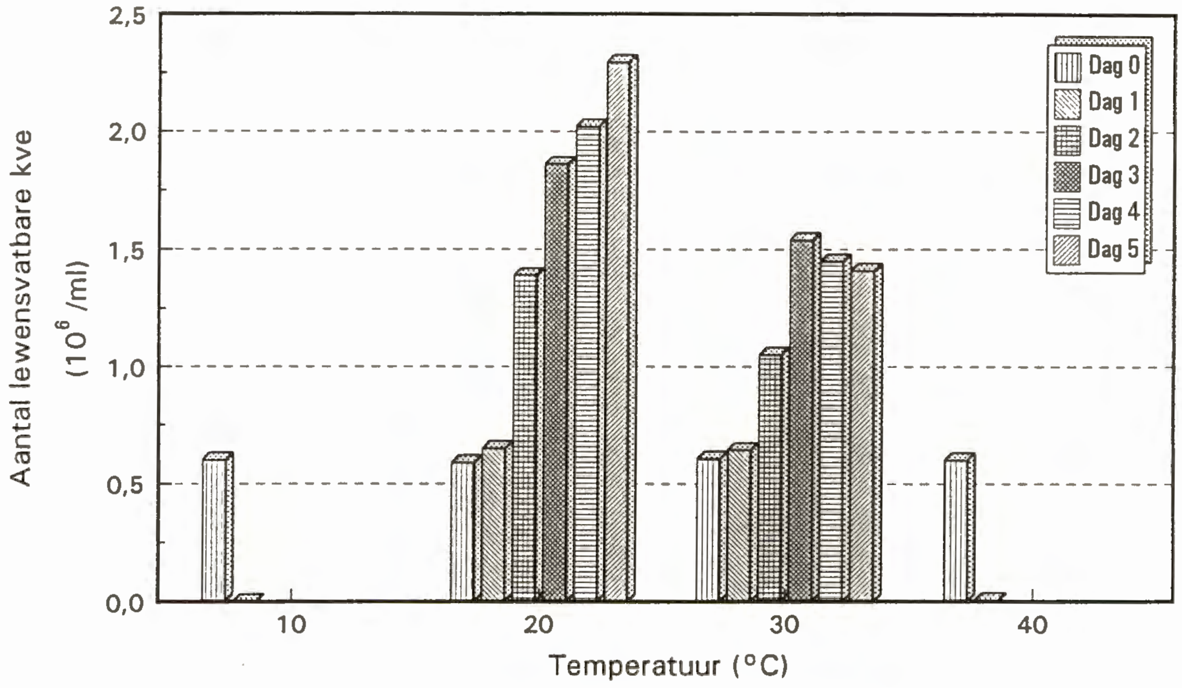


Tabel 6: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	**10**	**20**	**30**	**40**
Dag 0	598 000	605 000	601 000	590 500
Dag 1	0	580 000	900 000	3 100
Dag 2	0	600 000	2 000 000	0
Dag 3	0	650 000	2 000 000	0
Dag 4	0	1 050 000	1 600 000	0
Dag 5	0	1 650 000	1 580 000	0

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 7: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende temperature

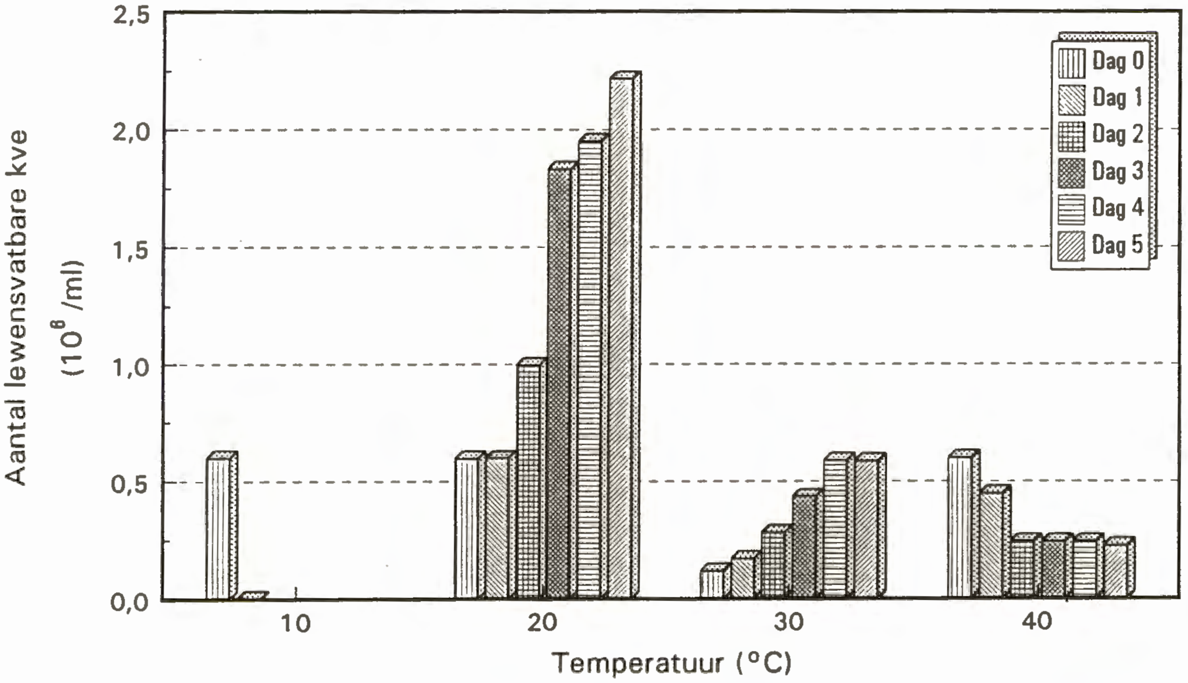


Tabel 7: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	10	20	30	40
Dag 0	598 500	590 000	605 000	600 500
Dag 1	1 300	650 000	643 000	4 600
Dag 2	0	1 390 000	1 050 000	0
Dag 3	0	1 860 000	1 540 000	0
Dag 4	0	2 020 000	1 450 000	0
Dag 5	0	2 293 000	1 410 000	0

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 8: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende temperature

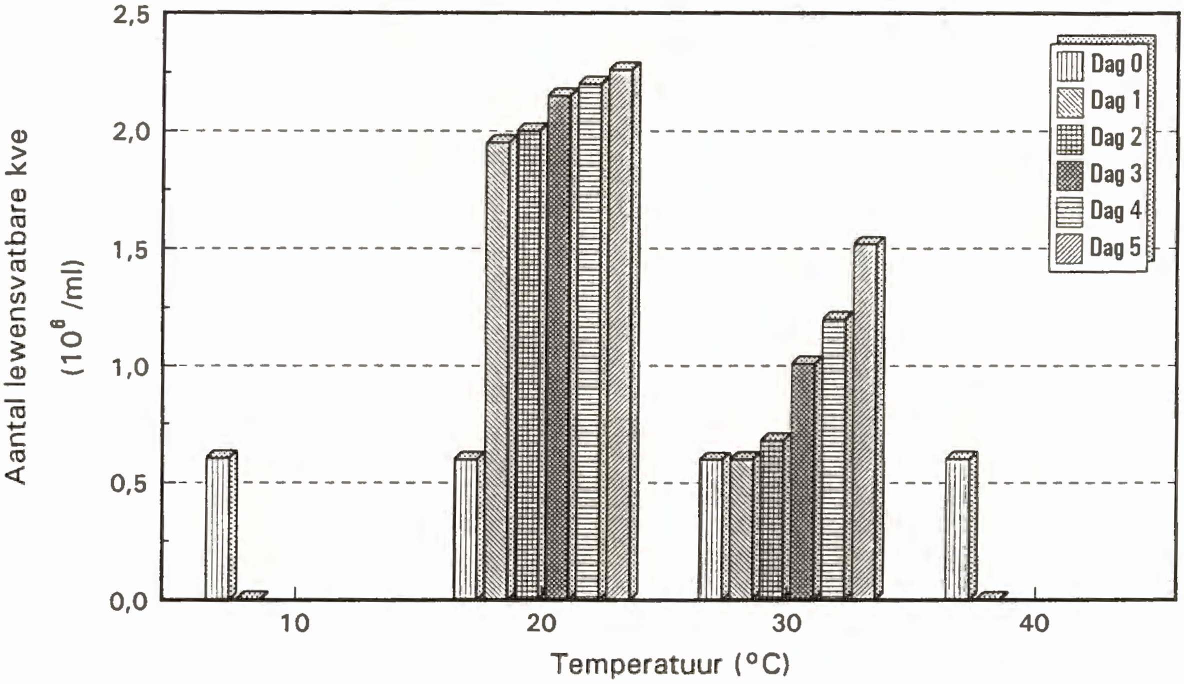


Tabel 8: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	**10**	**20**	**30**	**40**
Dag 0	601 000	696 000	118 600	600 000
Dag 1	1 600	598 000	171 000	447 000
Dag 2	0	995 000	281 000	244 000
Dag 3	0	1 830 000	435 000	242 900
Dag 4	0	1 950 000	589 000	244 000
Dag 5	0	2 215 000	585 000	226 000

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 9: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende temperature

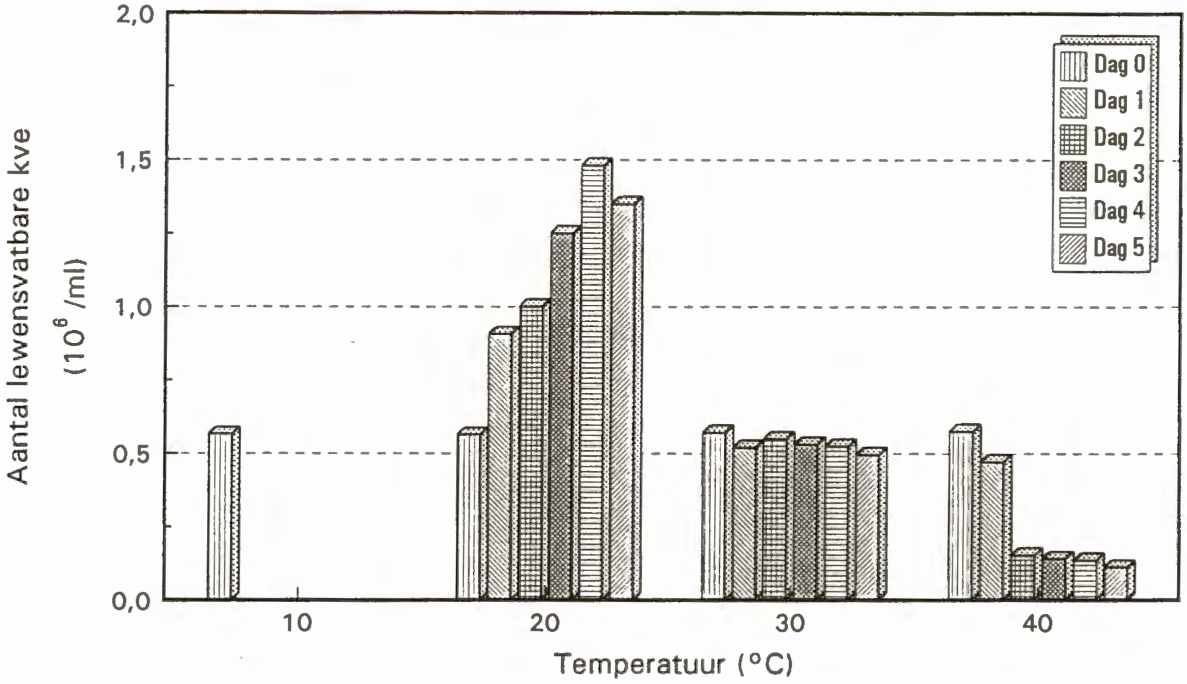


Tabel 9: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	10	20	30	40
Dag 0	605 000	600 000	598 000	602 000
Dag 1	5 000	1 950 000	600 000	3 600
Dag 2	0	2 000 000	680 000	0
Dag 3	0	2 150 000	1 010 000	0
Dag 4	0	2 200 000	1 200 000	0
Dag 5	0	2 260 000	1 520 000	0

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 10: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende temperature

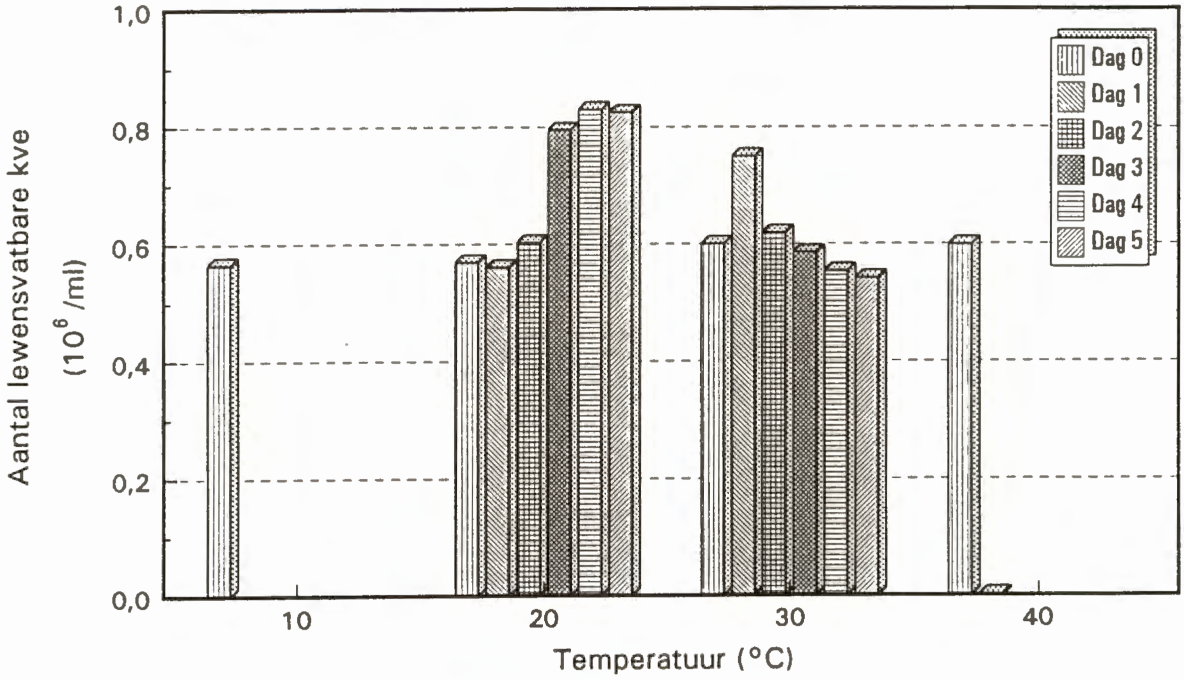


Tabel 10: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	**10**	**20**	**30**	**40**
Dag 0	565 000	563 000	571 000	575 000
Dag 1	0	906 000	520 000	470 000
Dag 2	0	1 000 000	550 000	152 000
Dag 3	0	1 250 000	530 000	140 000
Dag 4	0	1 480 000	525 000	135 000
Dag 5	0	1 350 000	495 000	111 000

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 11: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende temperature



Tabel 11: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende temperature

	TEMPERATUUR (°C)			
TYD IN DAE	**10**	**20**	**30**	**40**
Dag 0	565 000	570 000	601 000	600 000
Dag 1	0	561 000	750 000	1 600
Dag 2	0	603 000	620 000	0
Dag 3	0	795 000	586 000	0
Dag 4	0	830 000	554 000	0
Dag 5	0	825 000	542 500	0

pH = 7
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

die meeste lede van die familie ***Streptomycetaceae*** waar hulle onder andere in staat is om plant- en dierereste te degradeer (sien tabel 7 en figuur 7).

* ***Pseudomonas pickettii***, ***Pseudomonas gladioli***, ***Pseudomonas stutzeri*** en 'n ***Pseudomonas*** spesie 'n groeitemperatuur van 20 °C verkies. ***Pseudomonas*** spesies is al vanaf 'n groot verskeidenheid materiaal, insluitende grond, vars- of seewater, riool, ens. geïsoleer (Starr *et al.*, 1981 : 658). Volgens Krieg en Holt (1984 : 141) kan die ***Pseudomonadaceae*** oor 'n temperatuurreeks van 4-43 °C groei (sien tabelle 8-11 en figure 8-11). 30 °C is minder gunstig met 10 en 40 °C ongunstig (sien tabel 8-11 en figuur 8-11).

4.2 DIE INVLOED VAN pH OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

4.2.2 Resultate

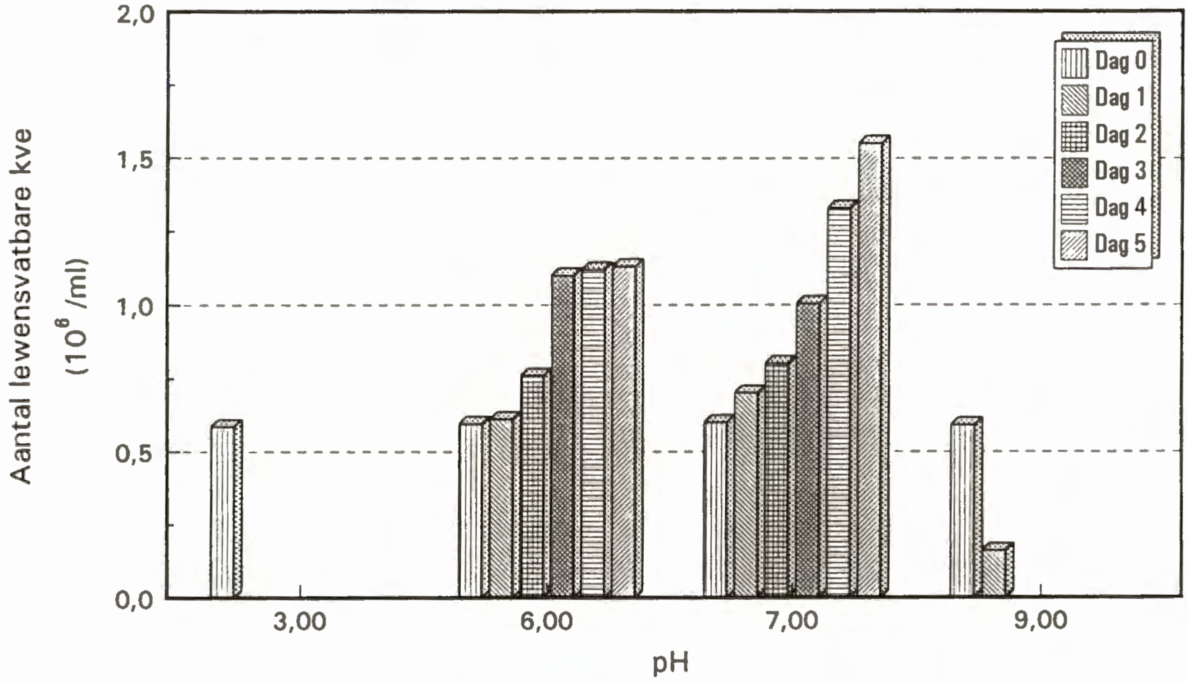
Die tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende pH's word in tabelle 12, 14, 16, 18, 20, 22, en 24 weergegee. Figure 12, 14, 16, 18, 20, 22, en 24 is grafiese voorstellings van die verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende pH's.

Die daaglikse verandering in pH van die kultuurmedia met verskillende bakteriese isolate by pH 3, 6, 7 en 9 word in tabelle 13, 15, 17, 19, 21, 23 en 25 weergegee. Figure 13, 15, 17, 19, 21, 23 en 25 is grafiese voorstellings van die daaglikse verandering in pH van die onderskeie bakteriese isolate.

4.2.2 Bespreking

Uit tabelle 12, 14, 16, 18, 20, 22 en 24 en figure 12, 14, 16, 18, 20, 22 en 24 is dit

Figuur 12: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende pH's

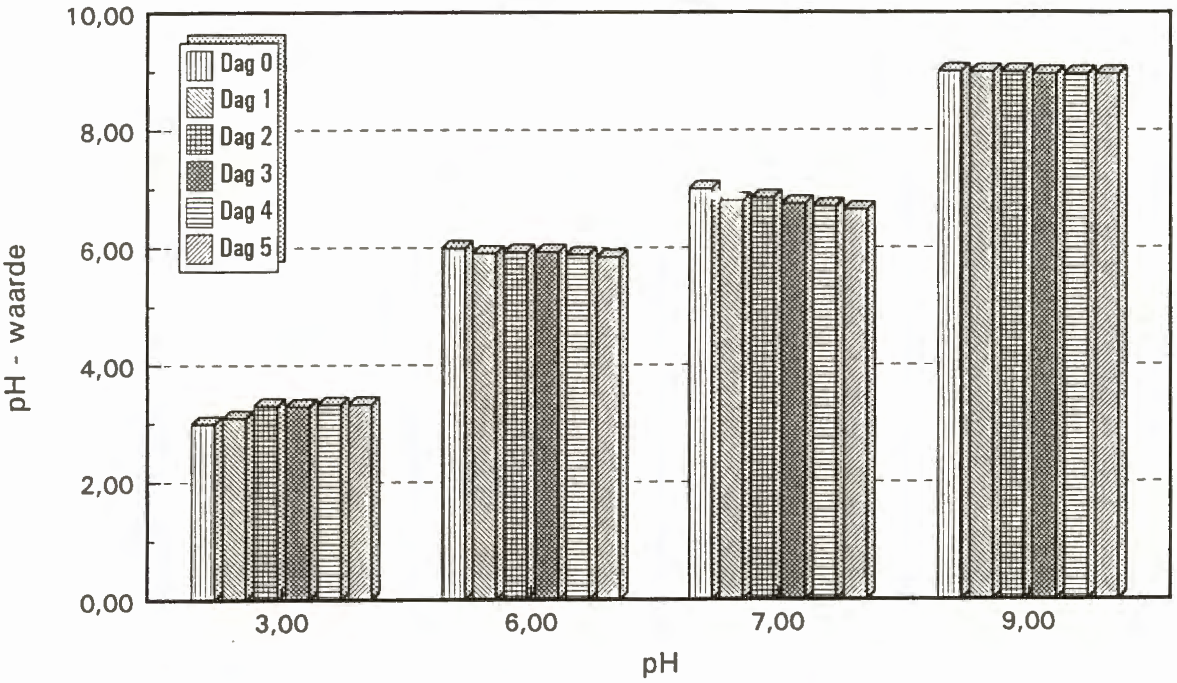


Tabel 12: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	585 000	595 000	600 000	590 000
Dag 1	0	610 000	700 000	160 000
Dag 2	0	760 000	800 000	0
Dag 3	0	1 100 000	1 000 500	0
Dag 4	0	1 120 000	1 330 000	0
Dag 5	0	1 130 000	1 550 500	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 13: Daaglikse verandering in pH by *Bacillus brevis* by verskillende pH's

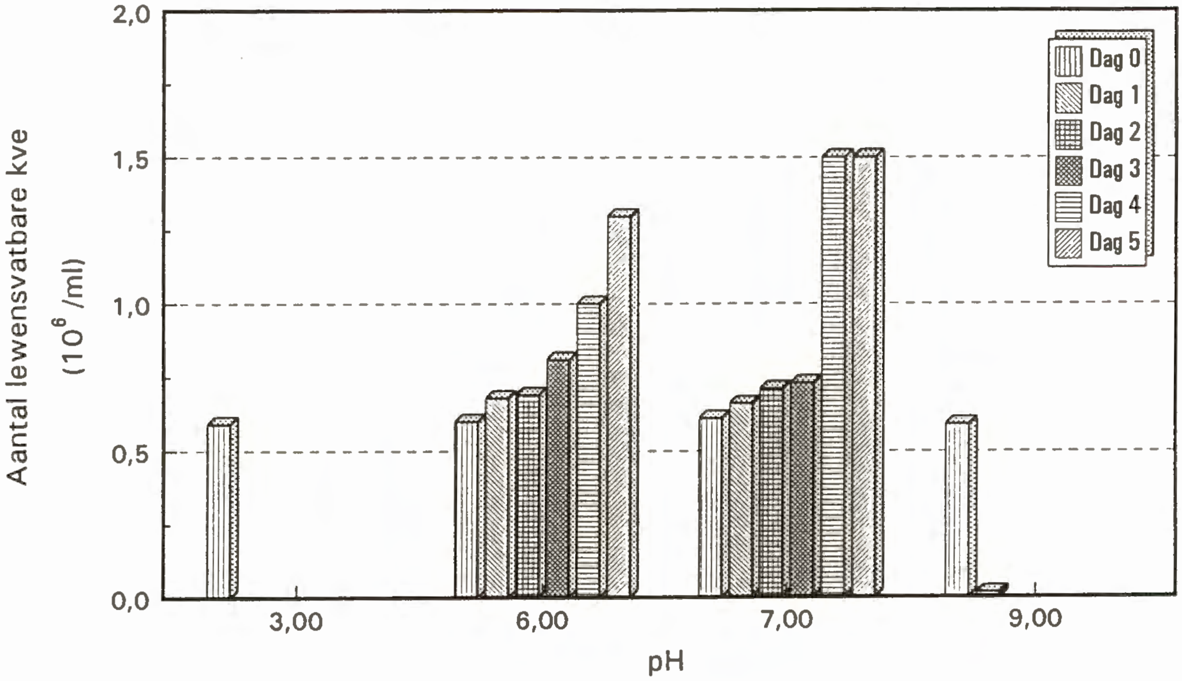


Tabel 13: Daaglikse verandering in pH by *Bacillus brevis* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,10	5,91	6,80	8,98
Dag 2	3,30	5,93	6,85	8,98
Dag 3	3,29	5,93	6,75	8,95
Dag 4	3,33	5,89	6,70	8,95
Dag 5	3,33	5,84	6,65	8,95

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 14: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende pH's

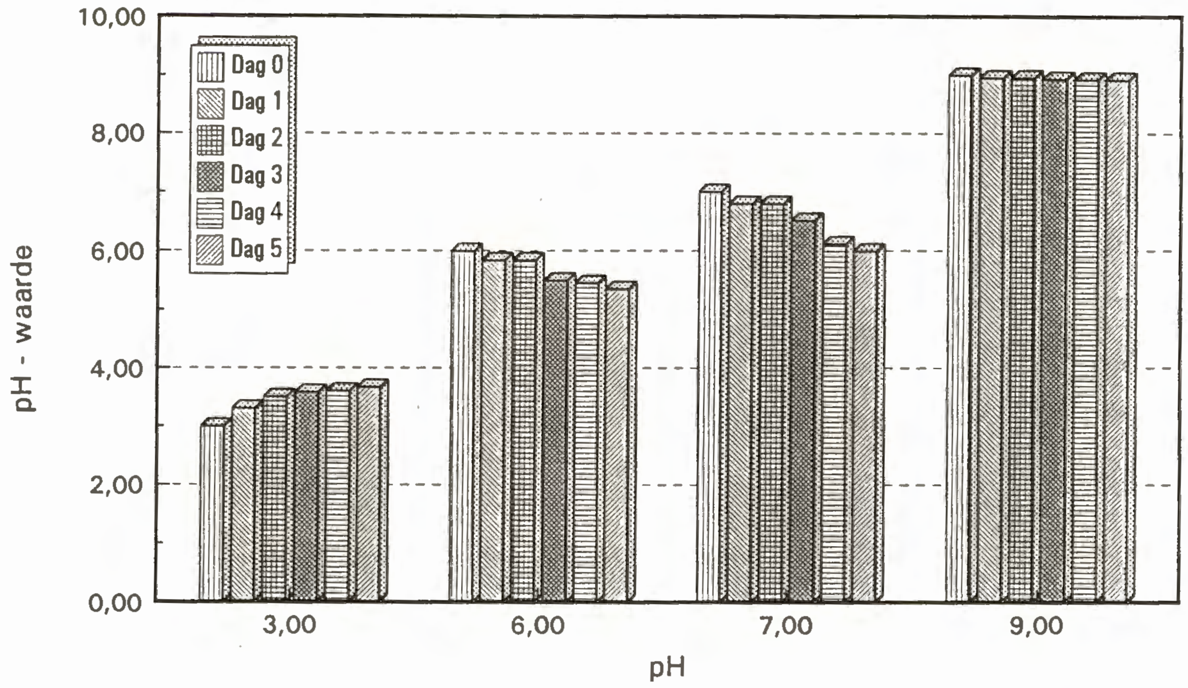


Tabel 14: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	590 000	600 000	610 000	590 000
Dag 1	0	680 000	660 000	16 000
Dag 2	0	690 000	710 000	0
Dag 3	0	810 000	730 500	0
Dag 4	0	1 000 000	1 500 000	0
Dag 5	0	1 300 000	1 500 000	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 15: Daaglikse verandering in pH by *Kurthia gibsonii* by verskillende pH's

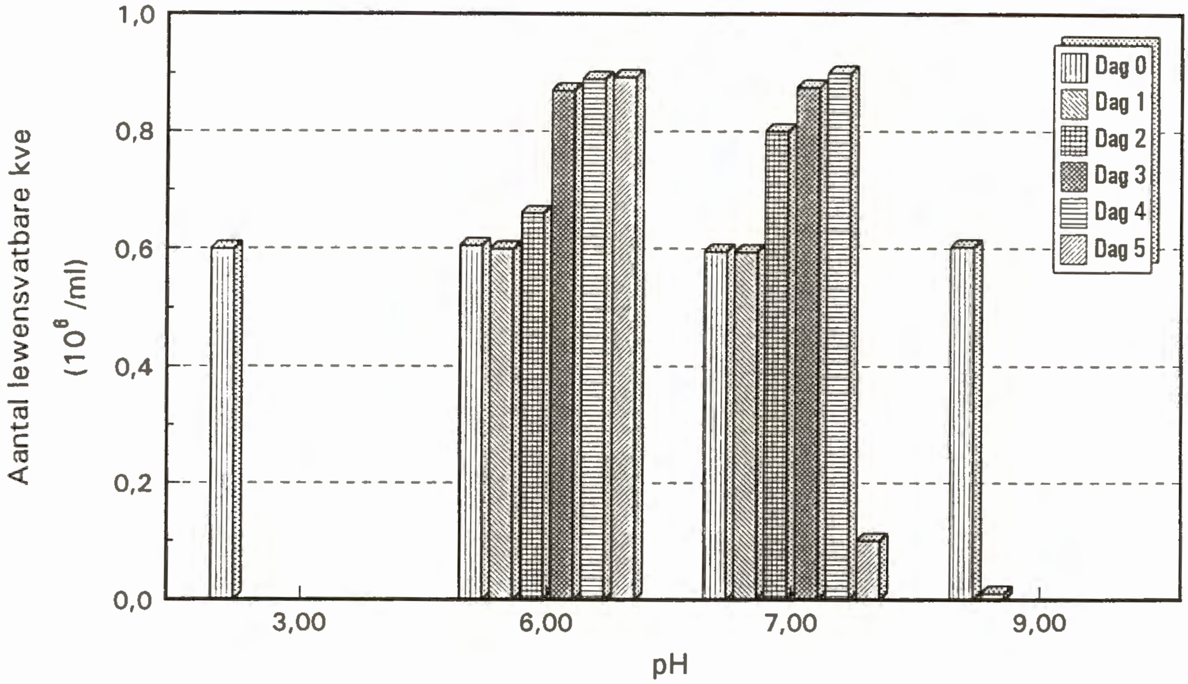


Tabel 15: Daaglikse verandering in pH by *Kurthia gibsonii* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,30	5,84	6,80	8,95
Dag 2	3,50	5,84	6,80	8,95
Dag 3	3,58	5,50	6,52	8,93
Dag 4	3,60	5,45	6,12	8,92
Dag 5	3,67	5,35	6,00	8,92

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 16: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende pH's

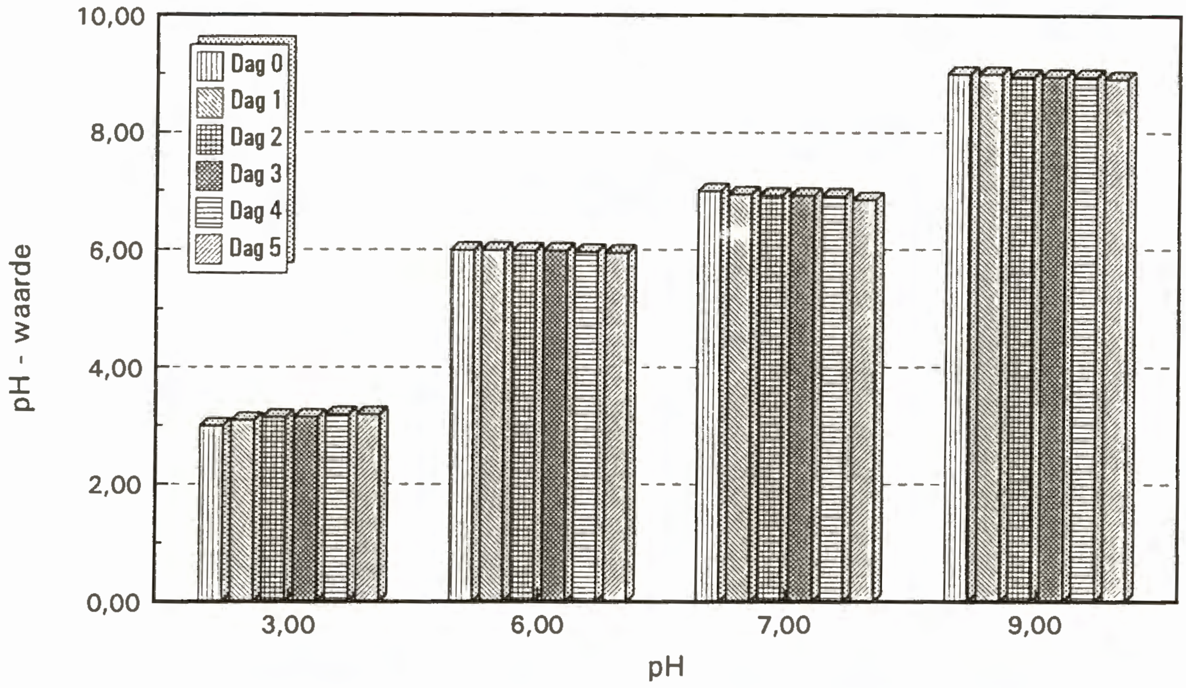


Tabel 16: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	600 000	605 000	595 000	603 000
Dag 1	0	600 000	594 000	10 500
Dag 2	0	660 000	800 000	0
Dag 3	0	870 000	875 000	0
Dag 4	0	890 000	900 000	0
Dag 5	0	893 000	100 000	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 17: Daaglikse verandering in pH by 'n *Streptomyces* spesie by verskillende pH's

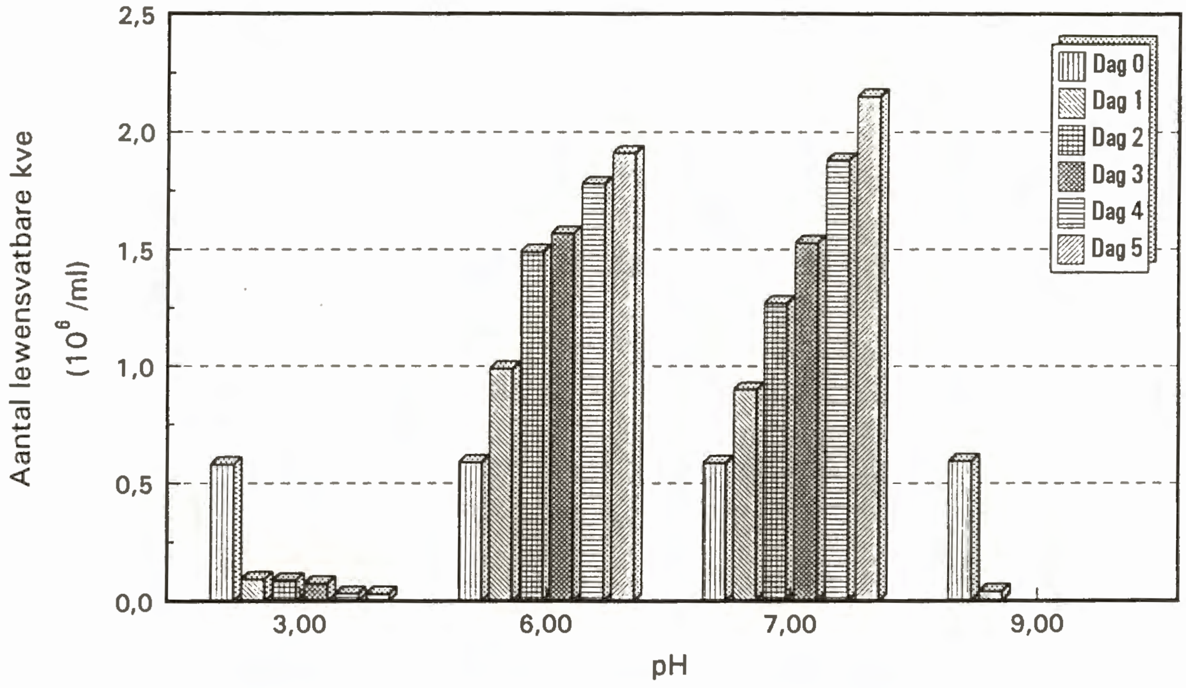


Tabel 17: Daaglikse verandering in pH by 'n *Streptomyces* spesie by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,10	6,00	6,95	9,00
Dag 2	3,15	5,98	6,93	8,95
Dag 3	3,15	5,98	6,93	8,95
Dag 4	3,20	5,96	6,91	8,95
Dag 5	3,20	5,95	6,85	8,92

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 18: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende pH's

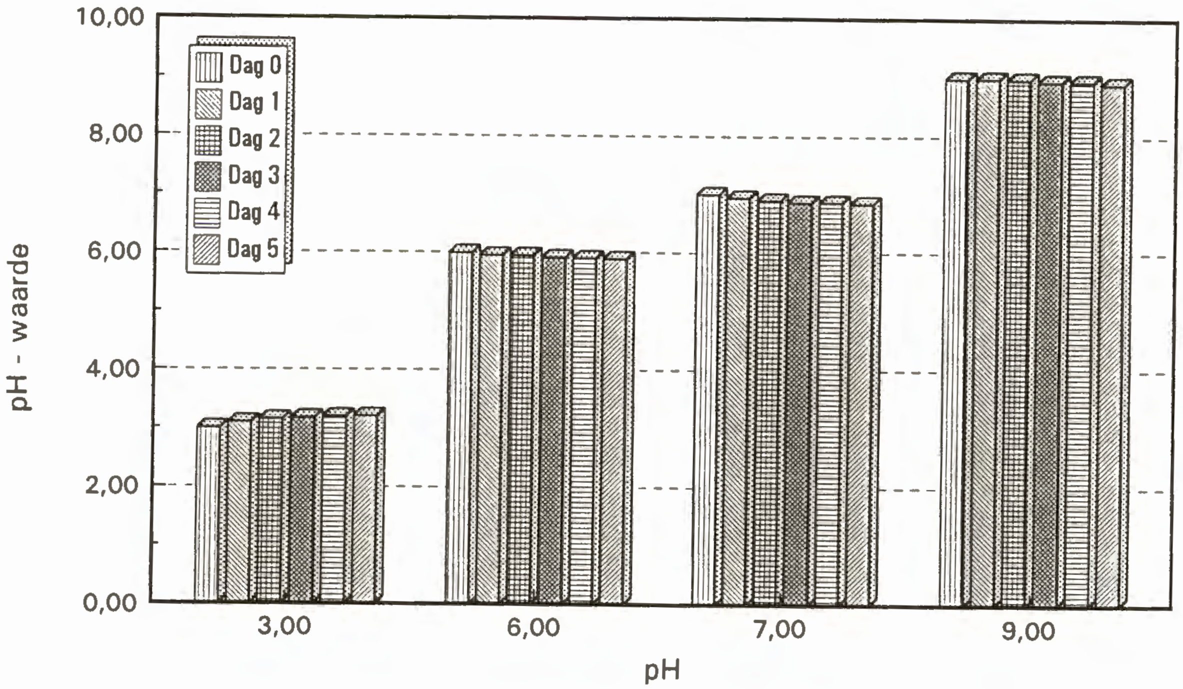


Tabel 18: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	580 000	590 000	585 000	595 000
Dag 1	9 230	990 000	900 000	40 000
Dag 2	8 950	1 490 000	1 270 000	0
Dag 3	7 420	1 570 000	1 530 050	0
Dag 4	3 080	1 780 000	1 880 000	0
Dag 5	3 000	1 910 000	2 150 000	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 19: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas pickettii* by verskillende pH's

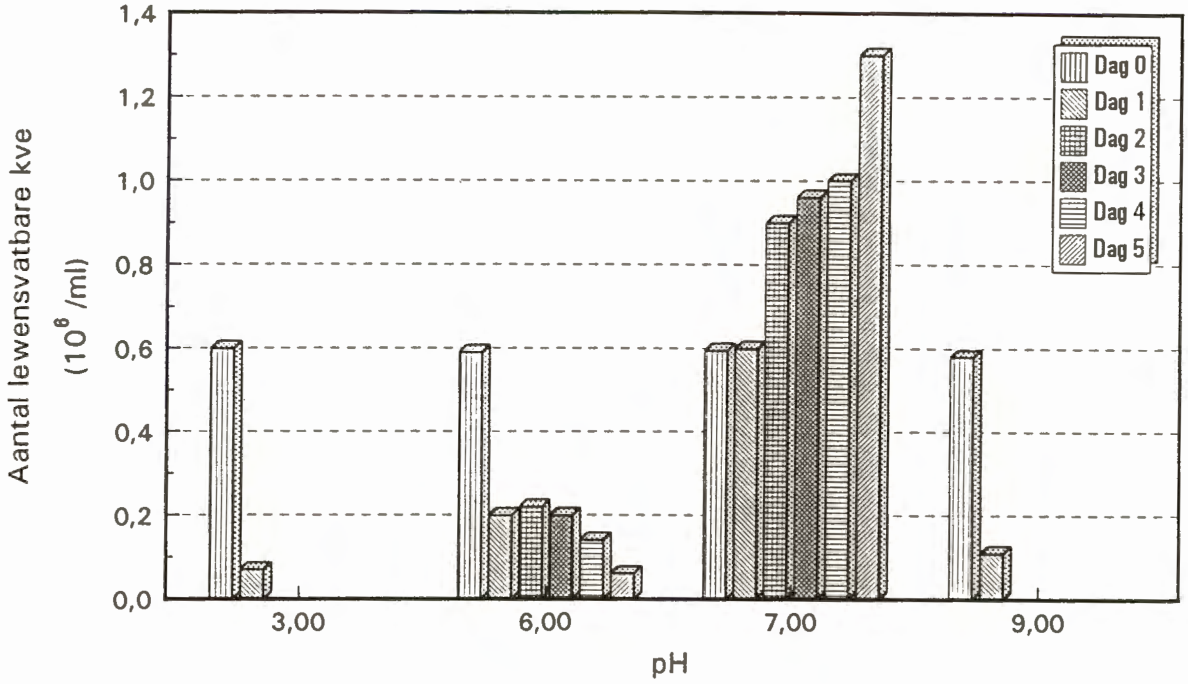


Tabel 19: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas pickettii* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,10	5,95	6,95	9,00
Dag 2	3,15	5,95	6,90	8,98
Dag 3	3,17	5,92	6,87	8,95
Dag 4	3,20	5,91	6,87	8,95
Dag 5	3,21	5,90	6,85	8,91

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 20: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende pH's

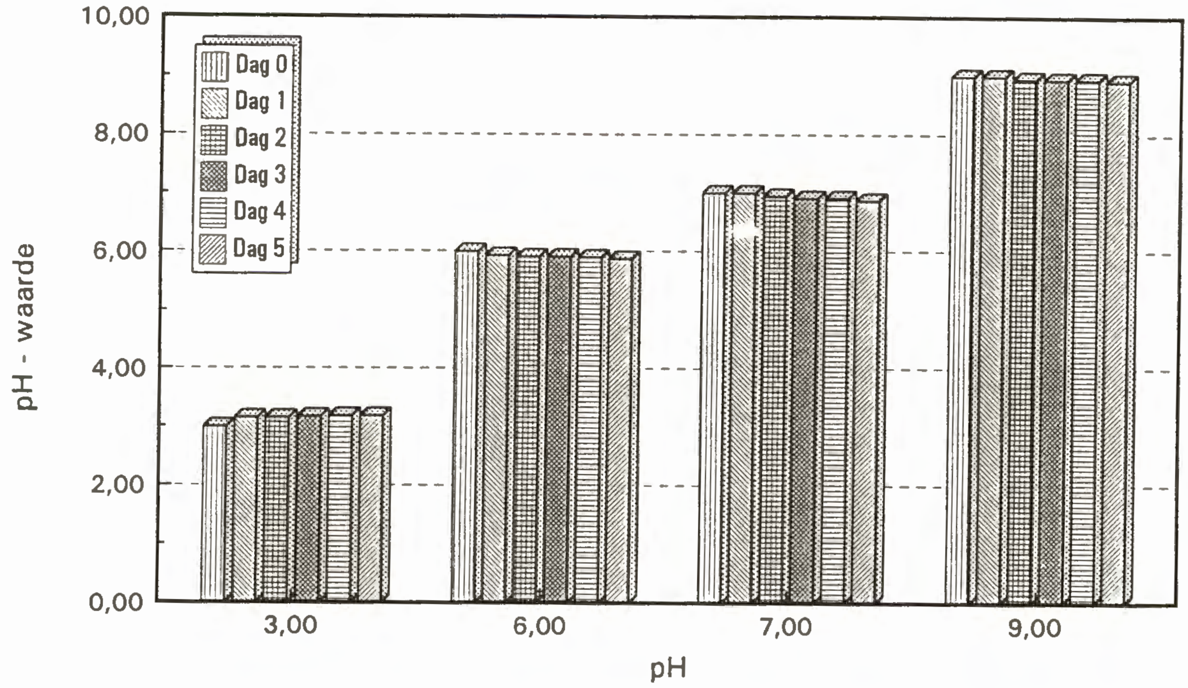


Tabel 20: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	600 000	590 000	595 000	580 000
Dag 1	70 000	200 000	600 000	110 000
Dag 2	0	220 000	900 000	0
Dag 3	0	200 000	960 000	0
Dag 4	0	140 000	1 000 000	0
Dag 5	0	61 000	1 300 000	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 21: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas gladioli* by verskillende pH's

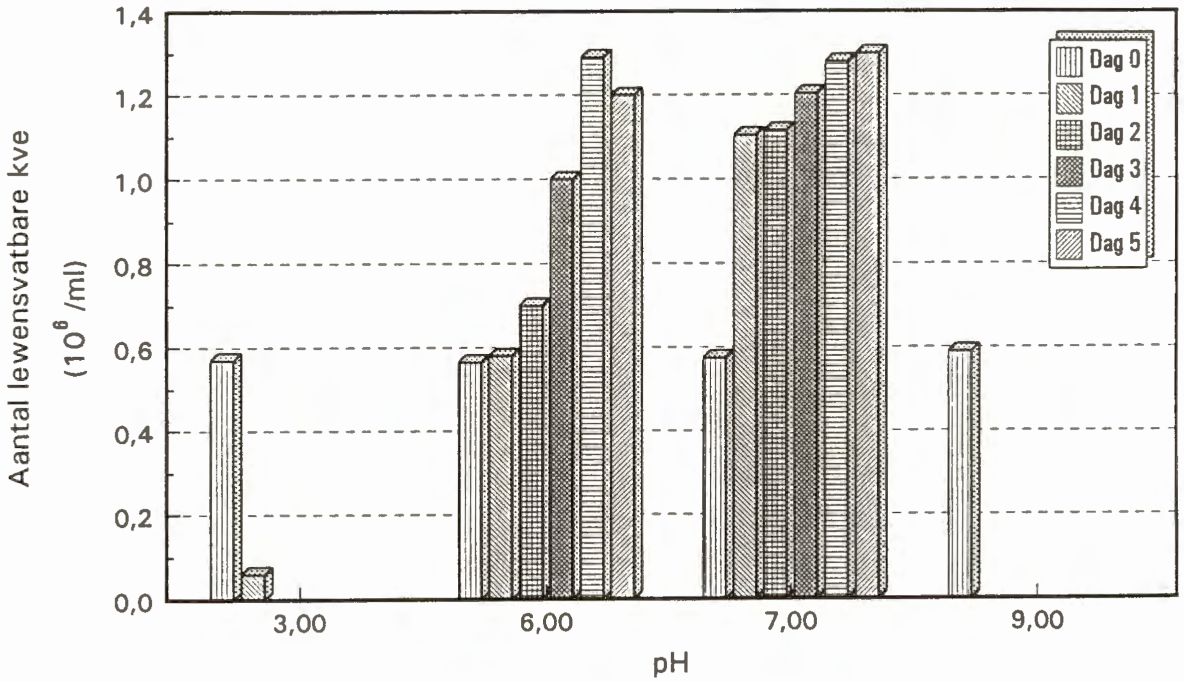


Tabel 21: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas gladioli* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,15	5,93	7,00	9,00
Dag 2	3,15	5,91	6,95	8,95
Dag 3	3,17	5,91	6,91	8,94
Dag 4	3,19	5,90	6,91	8,94
Dag 5	3,19	5,87	6,87	8,92

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 22: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormede eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende pH's

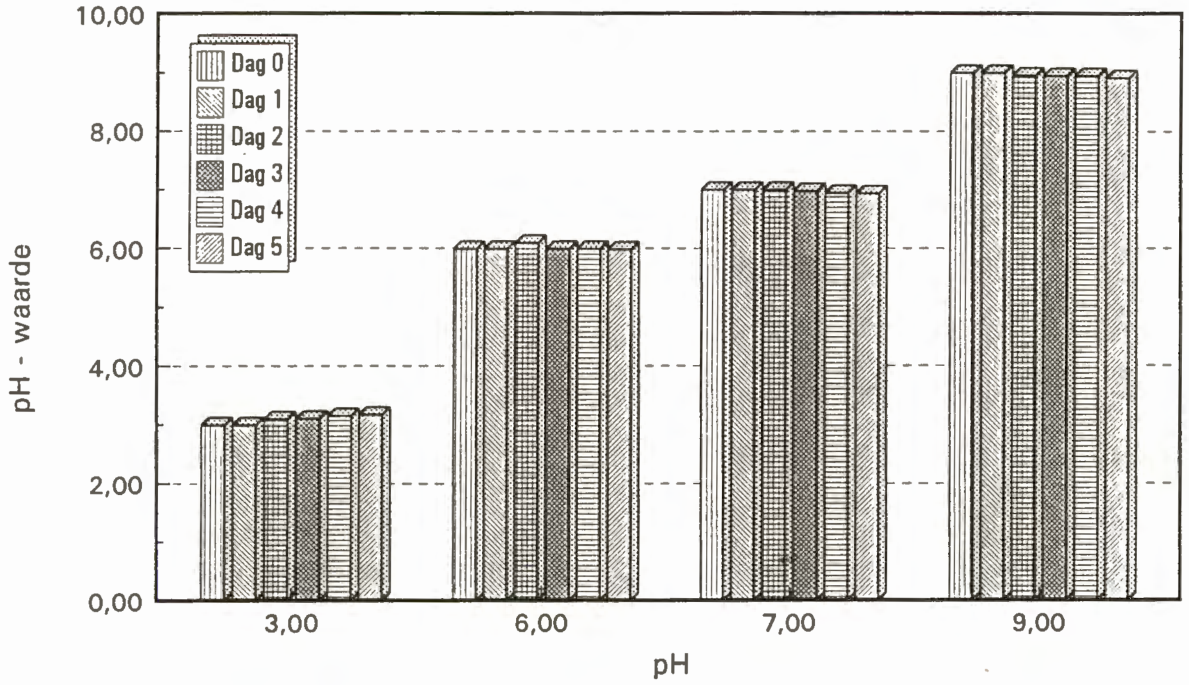


Tabel 22: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	570 000	565 000	575 000	590 000
Dag 1	60 000	580 000	1 104 000	0
Dag 2	0	700 000	1 115 000	0
Dag 3	0	1 000 000	1 204 000	0
Dag 4	0	1 290 000	1 280 000	0
Dag 5	0	1 200 000	1 300 000	0

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 23: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas stutzeri* by verskillende pH's

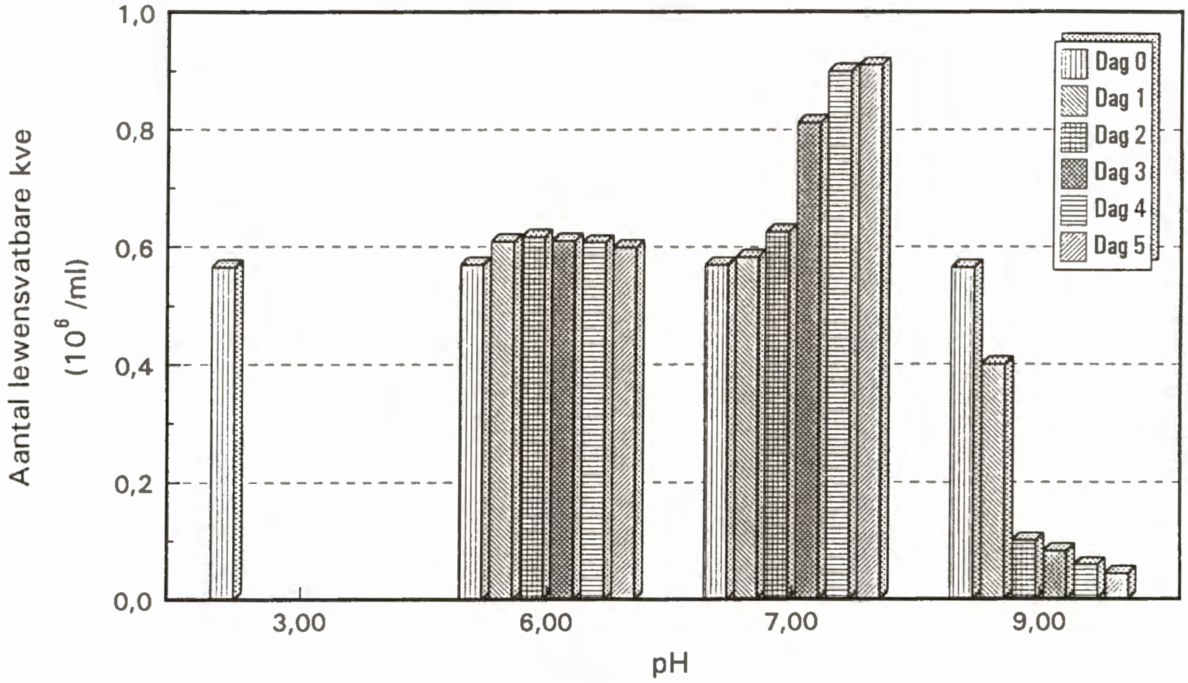


Tabel 23: Daaglikse verandering in pH by *Pseudomonas stutzeri* by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 2	3,10	6,10	7,00	8,95
Dag 3	3,11	6,00	6,98	8,94
Dag 4	3,15	6,00	6,95	8,94
Dag 5	3,17	5,98	6,94	8,91

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 24: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende pH's

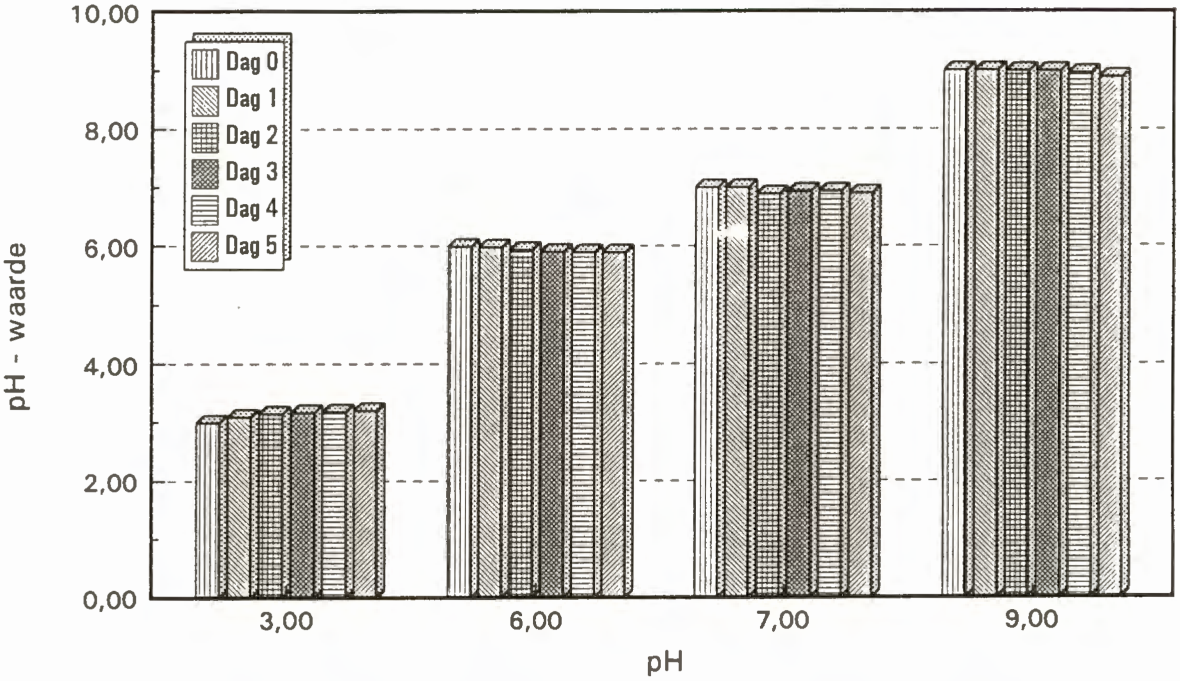


Tabel 24 Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	565 000	570 000	570 000	565 000
Dag 1	0	610 000	583 000	400 000
Dag 2	0	617 000	626 000	101 000
Dag 3	0	611 000	812 000	83 000
Dag 4	0	608 000	900 000	59 000
Dag 5	0	600 000	910 000	44 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

Figuur 25: Daaglikse verandering in pH by 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende pH's



Tabel 25: Daaglikse verandering in pH by 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende pH's

	pH			
TYD IN DAE	**3,00**	**6,00**	**7,00**	**9,00**
Dag 0	3,00	6,00	7,00	9,00
Dag 1	3,10	5,99	7,00	9,00
Dag 2	3,15	5,94	6,98	8,99
Dag 3	3,17	5,91	6,94	8,99
Dag 4	3,18	5,90	6,94	8,95
Dag 5	3,21	5,90	6,90	8,89

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
Statiese kulture

duidelik dat:

* ***Bacillus brevis*** 'n optimum groei-pH van 7,00 besit wat ooreenstem met Sneath *et al.* (1986 : 1122) wat rapporteer dat hierdie spesie goeie groei by pH 6,8 in voedingsop toon (sien tabel 12 en figuur 12).
* by ***Kurthia gibsonii*** pH 7,00 die gunstigste is. Volgens Sneath *et al.* (1986 : 1255) en Starr *et al.* (1981 : 1890) vind die beste groei van ***Kurthia*** by 'n neutrale pH plaas (sien tabel 14 en figuur 14).
* by 'n jong ***Streptomyces*** spesie 'n pH van 7,00 meer gunstig vir groei is. Dit word deur Starr *et al.* (1981 : 2036) gestaaf waar bewys is dat suurgrond, mos en mynwater 'n spesifieke biota streptomisete huisves (sien tabel 16 en figuur 16).
* ***Pseudomonas pickettii*, *Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas stutzeri*** en 'n ***Pseudomonas*** spesie almal 'n pH van 7,00 die gunstigste vind. Volgens Krieg en Holt, (1984 : 156) kom ***Pseudomonas*** spesies wydverspreid voor, maar onder sekere omgewingstoestande (pH naby neutraal, mesofiele temperatuurreeks, opgeloste organiese materiaal en genoeg opgeloste suurstof) sal hulle dominant word (sien tabelle 18, 20, 22 en 24 en figure 18,20, 22 en 24).

Uit tabelle en figure 9, 11, 13, 15, 17, 19 en 21 is dit duidelik dat daar by al die isolate vanaf dag 0 tot dag 5 van inkubasie, 'n geringe toename by pH 3,00 is. By pH 6,00, 7,00 en 9,00 is daar egter 'n geringe dalende neiging by al die bakteriese isolate. Volgens Quigley (1992 : 36) sal kulture wat op steenkool groei, alkaliese middels vrystel wat lei tot styging in pH. Verdere verslae is ook deur Quigley (1992 : 36) gelewer wat daarop dui dat laegraadse, verweerde en salpetersuur-behandelde steenkool onder alkaliese toestande oplosbaar is.

4.3 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN SUURSTOF OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

4.3.1 Resultate

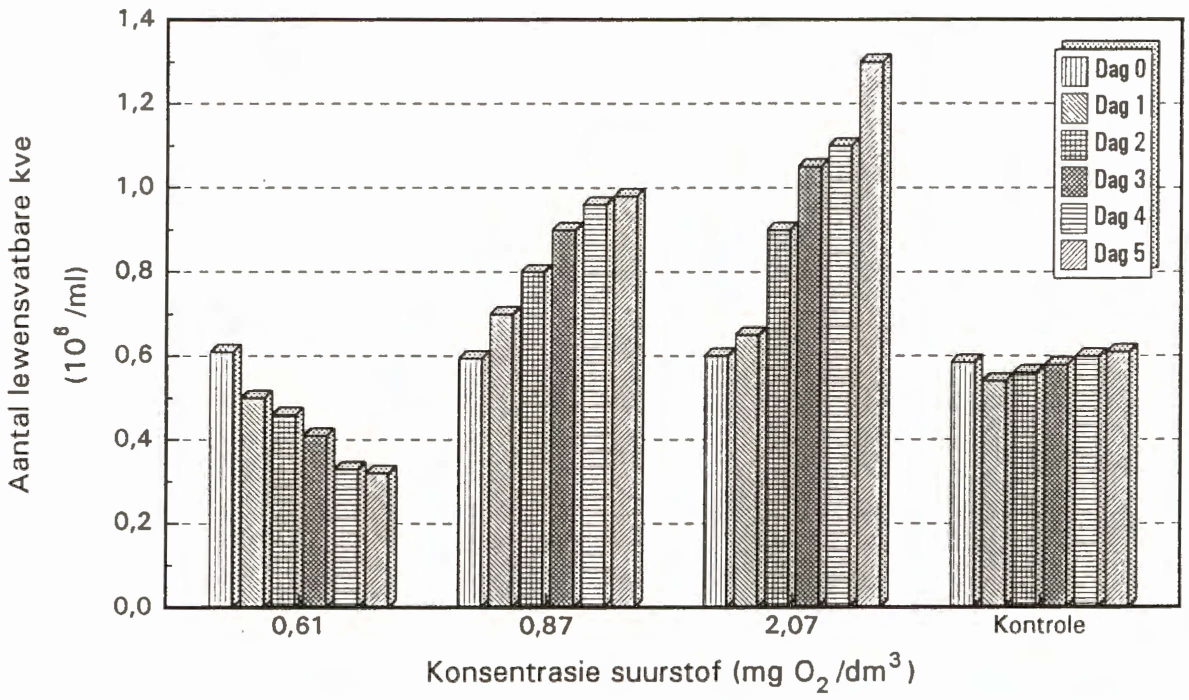
Die tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende konsentrasies suurstof word in tabelle 26 tot 32 weergegee. Figure 26 tot 32 is grafiese voorstellings van die verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende isolate by verskillende konsentrasies suurstof.

4.3.2 Bespreking

Uit tabelle 26 tot 32 en figure 26 tot 32 is dit duidelik dat:

* 'n suurstofkonsentrasie van 2,07 mg O_2/dm^3 vir ***Bacillus brevis*** die gunstigste is (sien tabel 26 en figuur 26). Sneath *et al.* (1986 : 1105) meld dat ***Bacillus*** spesies aëroob of anaëroob kan groei, maar stateer dat ***Bacillus brevis*** nie tot anaërobe groei in staat is nie (Sneath *et al.*, 1986 : 1122).
* by ***Kurthia gibsonii*** 'n suurstofkonsentrasie van 2,07 mg O_2/dm^3 die gunstigste vir groei is (sien tabel 27 en figuur 27). Volgens Sneath *et al.* (1986 : 1255) en Starr *et al.* (1981 : 1891) is ***Kurthia*** streng aërobe organismes.
* 'n ***Streptomyces*** spesie die beste by 'n suurstofkonsentrasie van 0,87 mg O_2/dm^3 groei (sien tabel 28 en figuur 28). Volgens Starr *et al.* (1981 : 2057) is die streptomisete verplig aërobe organismes; in skudkulture op 'n voedingsryke medium groei hulle op die oppervlakte, maar in voedingsarme media, of met 'n nie-metaboliseerbare koolstofbron, groei hulle mikro-aerofiel.

Figuur 26: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende konsentrasies suurstof

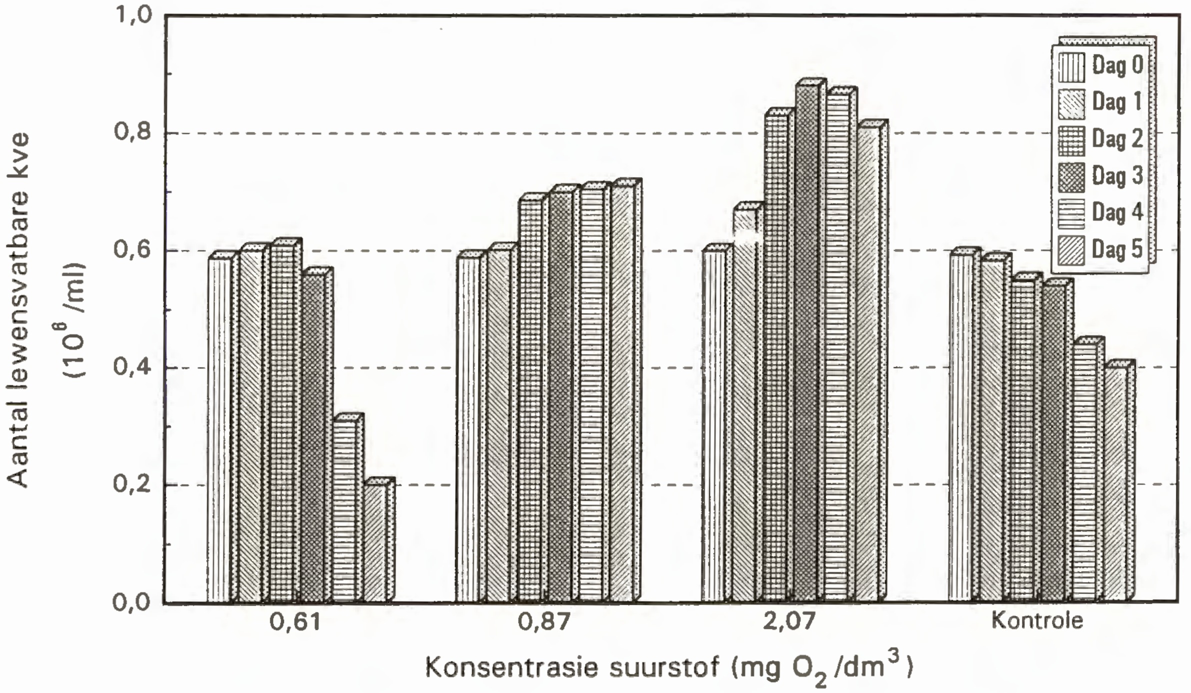


Tabel 26: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	610 000	595 000	601 000	585 000
Dag 1	500 000	700 000	650 000	541 000
Dag 2	460 000	800 000	900 000	560 000
Dag 3	410 000	900 000	1 050 000	580 000
Dag 4	330 000	960 000	1 100 000	600 000
Dag 5	321 000	980 000	1 300 000	610 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 27: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende konsentrasies suurstof

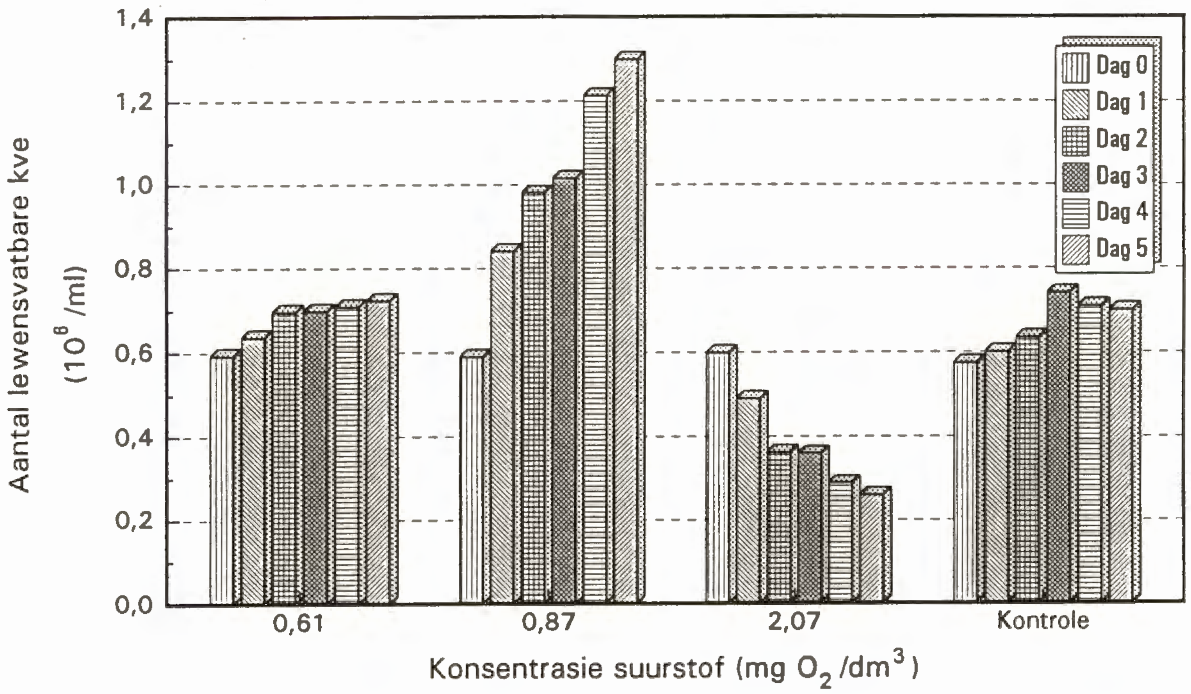


Tabel 27: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	587 000	589 000	600 000	593 000
Dag 1	601 000	602 000	670 000	583 000
Dag 2	610 000	686 000	830 000	550 000
Dag 3	560 000	700 000	880 000	540 000
Dag 4	310 000	705 000	865 000	440 000
Dag 5	200 000	710 000	810 000	400 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 28: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende konsentrasies suurstof

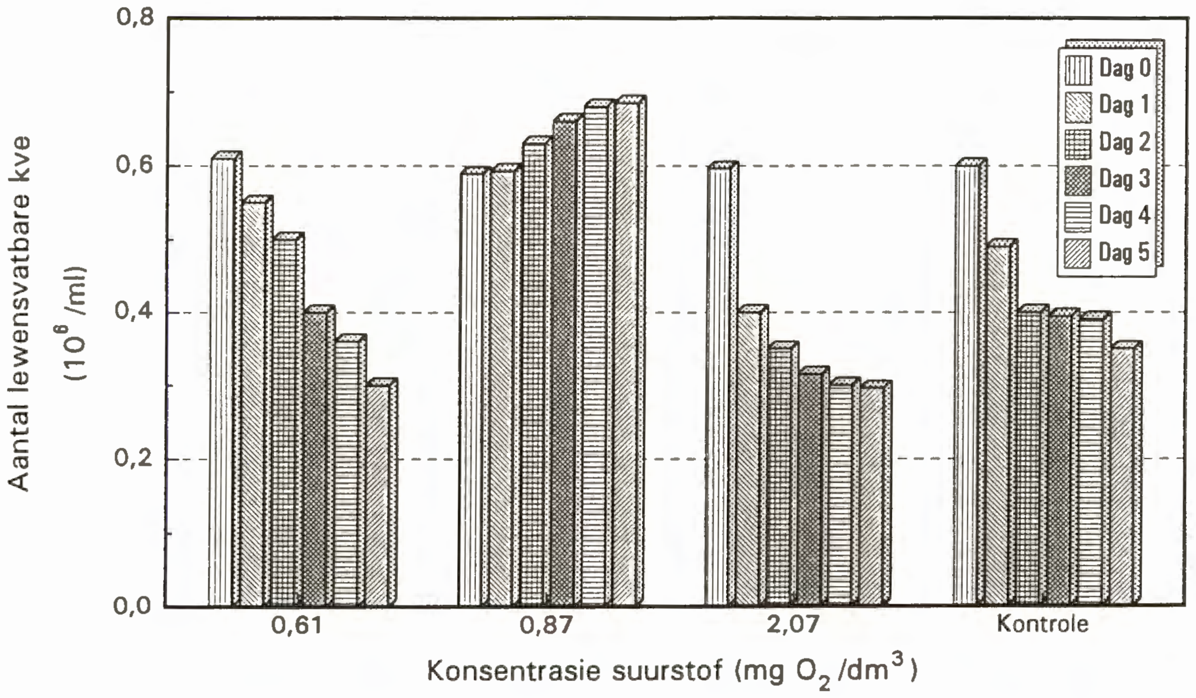


Tabel 28: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van'n *Streptomyces* spesie by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	593 000	590 000	599 000	575 000
Dag 1	637 000	841 000	491 000	601 000
Dag 2	697 000	981 000	362 000	635 000
Dag 3	698 000	1 016 000	360 000	741 000
Dag 4	710 000	1 213 000	289 000	701 000
Dag 5	723 000	1 300 000	260 000	700 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 29: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende konsentrasies suurstof

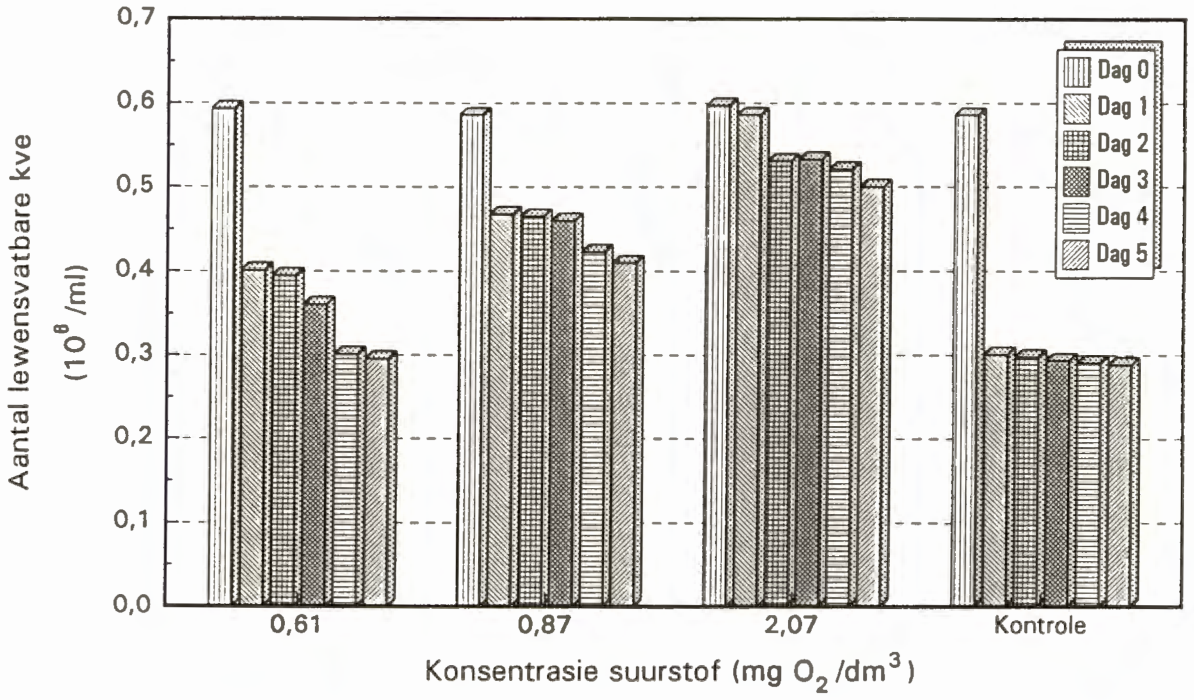


Tabel 29: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	610 000	589 000	596 000	600 000
Dag 1	550 000	593 000	400 000	490 000
Dag 2	500 000	630 000	350 000	400 000
Dag 3	400 000	660 000	315 000	395 000
Dag 4	360 000	680 000	300 000	390 000
Dag 5	300 000	685 000	296 000	350 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 30: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende konsentrasies suurstof

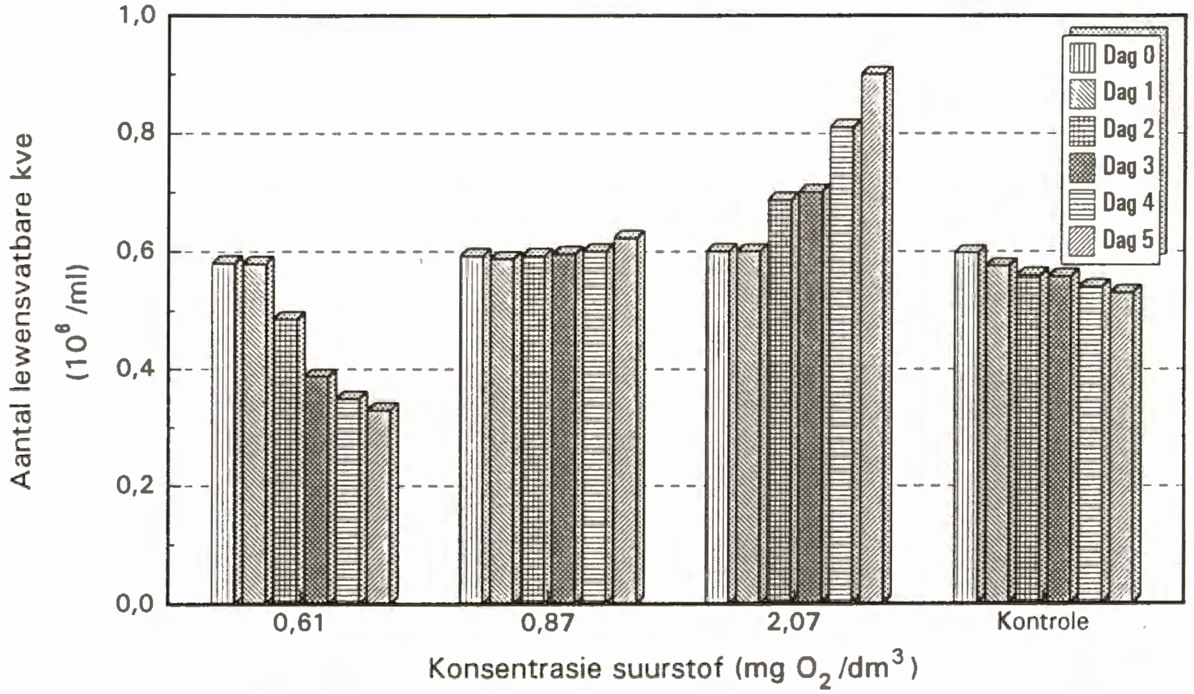


Tabel 30: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	593 000	586 000	597 000	586 000
Dag 1	401 000	468 000	586 000	301 000
Dag 2	395 000	465 000	531 000	298 000
Dag 3	361 000	460 000	533 000	294 000
Dag 4	301 000	423 000	521 000	291 000
Dag 5	296 000	410 000	500 000	289 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 31: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende konsentrasies suurstof

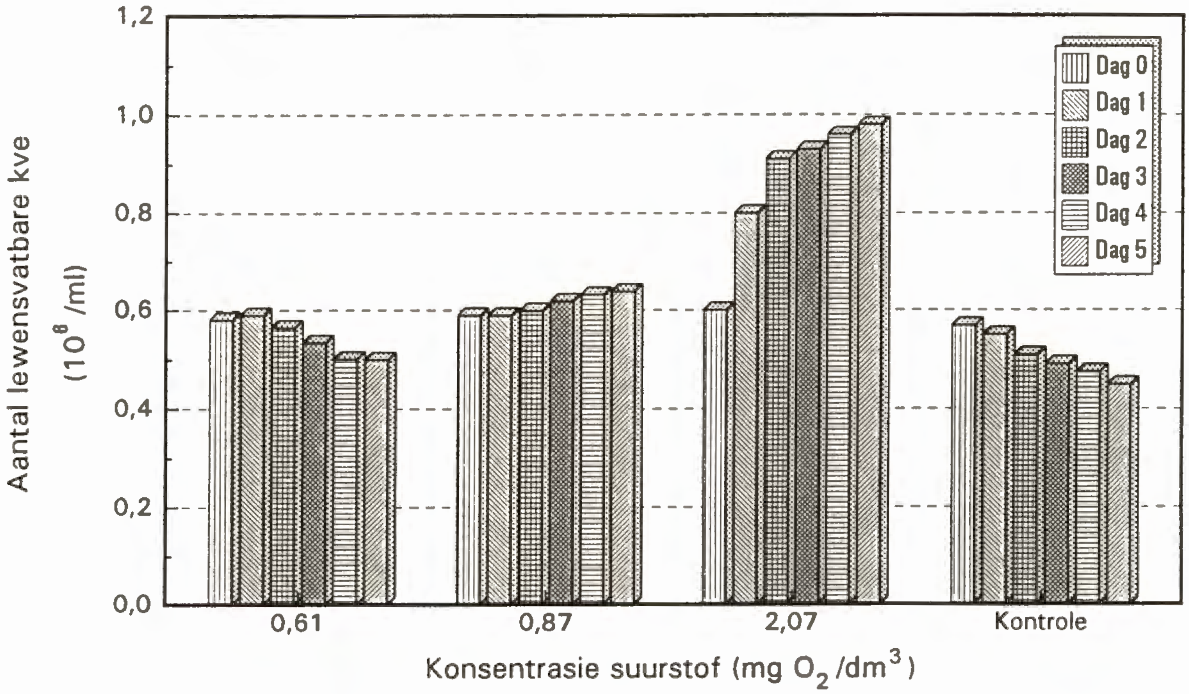


Tabel 31: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	581 000	593 000	601 000	598 000
Dag 1	580 000	588 000	600 000	576 000
Dag 2	486 000	593 000	697 000	560 000
Dag 3	388 000	596 000	700 000	558 000
Dag 4	350 000	601 000	810 000	540 000
Dag 5	330 000	623 000	900 000	530 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

Figuur 32: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende konsentrasies suurstof



Tabel 32: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievromende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende konsentrasies suurstof

	KONSENTRASIE SUURSTOF (mg O_2/dm^3)			
TYD IN DAE	**0,61**	**0,87**	**2,07**	**Kontrole (1,20)**
Dag 0	581 000	591 000	601 000	569 000
Dag 1	590 000	591 000	800 000	551 000
Dag 2	565 000	600 000	910 000	510 000
Dag 3	535 000	620 000	930 000	491 000
Dag 4	501 000	633 000	960 000	475 000
Dag 5	500 000	640 000	980 000	450 000

Temperatuur = 22°C
Gisekstrak = 0,2%
pH = 7,00

* ***Pseudomonas gladioli*, *Pseudomonas stutzerii*** en 'n ***Pseudomonas*** spesie almal 'n suurstofkonsentrasie van 2,07 mg O_2/dm^3 verkies, maar ***Pseudomonas pickettii*** die beste groei by suurstofkonsentrasie 0.87 mg O_2/dm^3 (sien tabelle 29 tot 32 en figure 29 tot 32). Dit word verklaar deur Krieg en Holt, (1984 : 141) en Starr *et al.* (1981 : 655) wat stel dat ***Pseudomonas*** 'n streng aërobe organisme is. ***Pseudomonas pickettii*** besit die vermoë om gas vanaf nitraat tussen 20 en 30 °C te vorm (Krieg *et al.*, 1984 : 176).

4.4 BEPALING VAN DIE INVLOED VAN GISEKSTRAK OP DIE GROEI VAN STEENKOOL-GEASSOSIEERDE MIKRO-ORGANISMES

4.4.1 Resultate

Die tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende bakteriese isolate by verskillende konsentrasies gisekstrak word in tabelle 33 tot 39 weergegee. Figure 33 tot 39 is grafiese voorstellings van die verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van die verskillende isolate by verskillende konsentrasies gisekstrak.

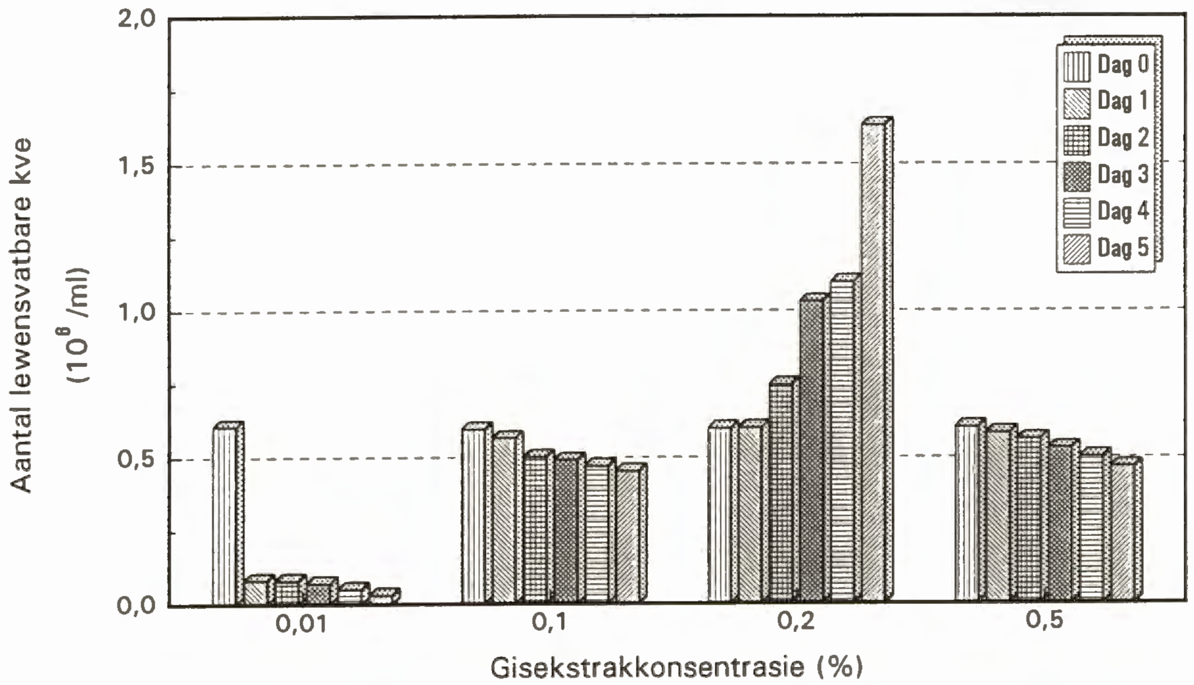
4.4.2 Bespreking

Uit tabelle 33 tot 39 en figure 33 tot 39 is dit duidelik dat:

* ***Bacillus brevis*** 'n gisekstrakkonsentrasie van 0,2% verkies (sien tabel 33 en figuur 33). Volgens Sneath *et al.* (1986 : 1131) besit ***Bacillus brevis*** minimale voedingsbehoeftes. Dit word gereflekteer uit die feit dat 'n konsentrasie van 0,2% gisekstrak voldoende vir groei was.
* 'n gisekstrakkonsentrasie van 0,2% vir ***Kurthia gibsonii*** die gunstigste is (sien tabel 34 en figuur 34). In Starr *et al.* (1981 : 1890) en Sneath *et al.* (1986 : 1255) word aangevoer dat ***Kurthia*** goed in die laboratorium op 0,2-0.25% gisekstrakmedium groei.

* 'n ***Streptomyces*** spesie die beste by gisekstrakkonsentrasie 0,2% groei (sien tabel 35 en figuur 35). Volgens Starr *et al.* (1981 : 2055) word gisekstrak in 'n geskikte isolasiemedium vir streptomisete ingesluit.
* ***Pseudomonas pickettii***, ***Pseudomonas gladioli***, ***Pseudomonas stutzerii*** en 'n ***Pseudomonas*** spesie almal die beste by gisekstrakkonsentrasie 0,2% groei (sien tabelle 36 tot 39 en figure 36 tot 39). Volgens Starr *et al.* (1981 : 658) het ***Pseudomonas*** baie eenvoudige voedingsbehoeftes. 'n Spesiale verrykingskultuurmedium met gisekstrak vir ***Pseudomonas*** word in Starr *et al.* (1981 : 1308) aangetref.

Figuur 33: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

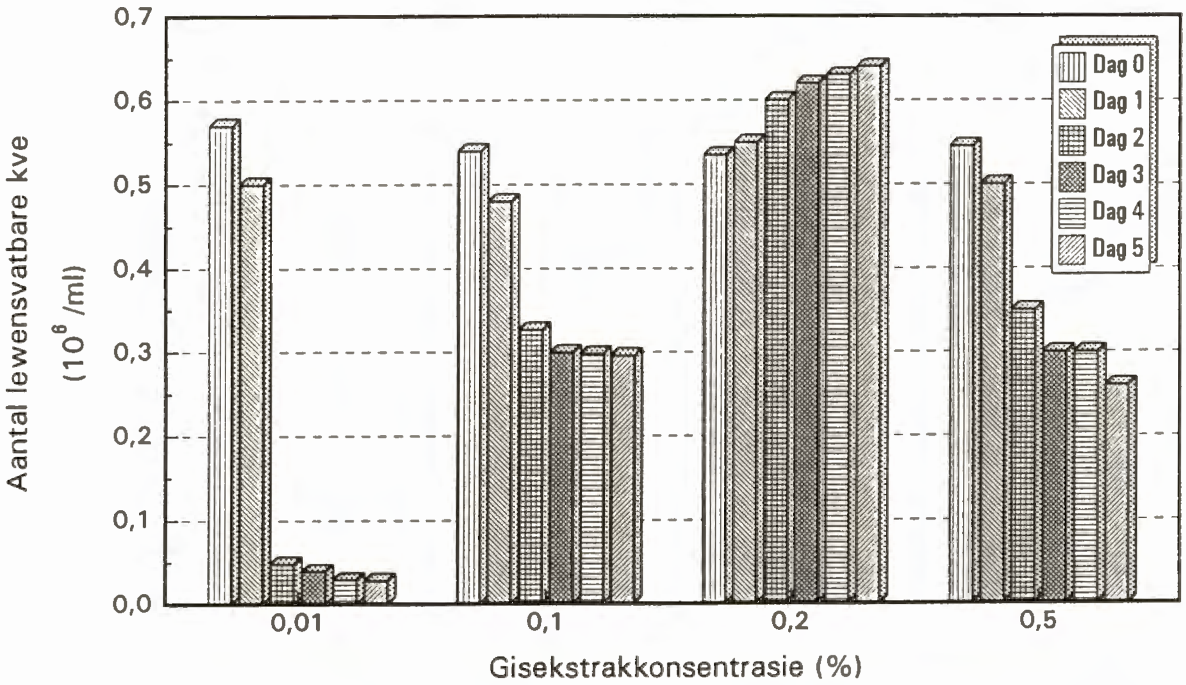


Tabel 33: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Bacillus brevis* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	605 000	595 000	598 000	601 000
Dag 1	81 000	565 000	600 000	582 000
Dag 2	79 500	500 000	745 000	561 000
Dag 3	71 300	490 000	1 030 000	530 000
Dag 4	50 100	469 000	1 095 000	500 000
Dag 5	30 500	452 000	1 630 000	466 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 34: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

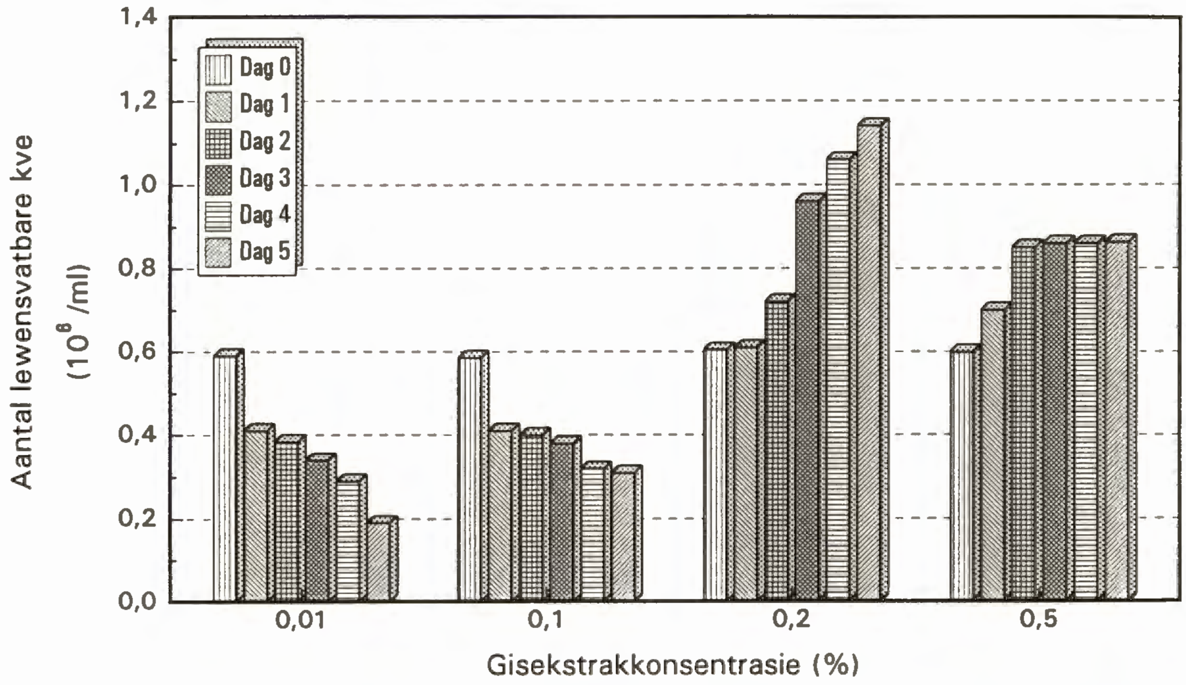


Tabel 34: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Kurthia gibsonii* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	0,01	0,1	0,2	0,5
Dag 0	570 000	540 000	535 000	545 000
Dag 1	500 000	480 000	550 000	500 000
Dag 2	48 000	327 000	600 000	350 000
Dag 3	39 000	300 000	620 000	300 000
Dag 4	29 000	298 000	630 000	300 000
Dag 5	28 000	296 000	640 000	260 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 35: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende gisekstrakkonsentrasies

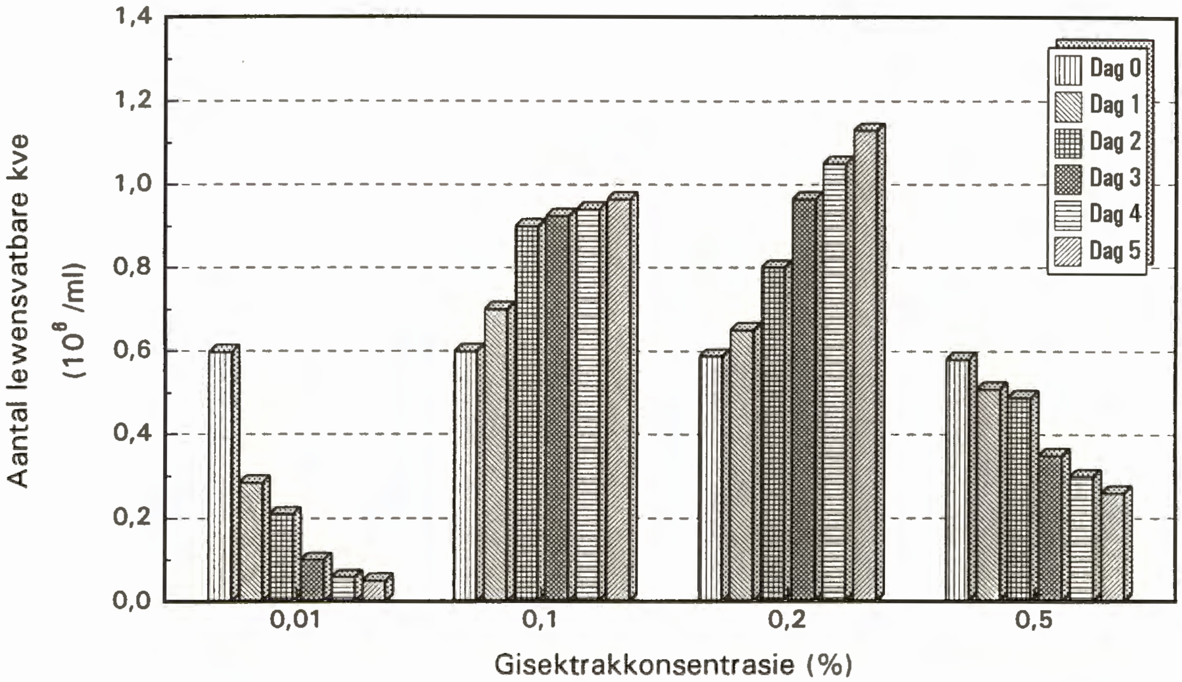


Tabel 35: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Streptomyces* spesie by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	590 000	585 000	605 000	600 000
Dag 1	410 000	410 000	610 000	700 000
Dag 2	384 000	400 000	720 000	850 000
Dag 3	340 000	380 000	960 000	860 000
Dag 4	290 000	320 000	1 060 000	860 000
Dag 5	190 000	310 000	1 141 000	863 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 36: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

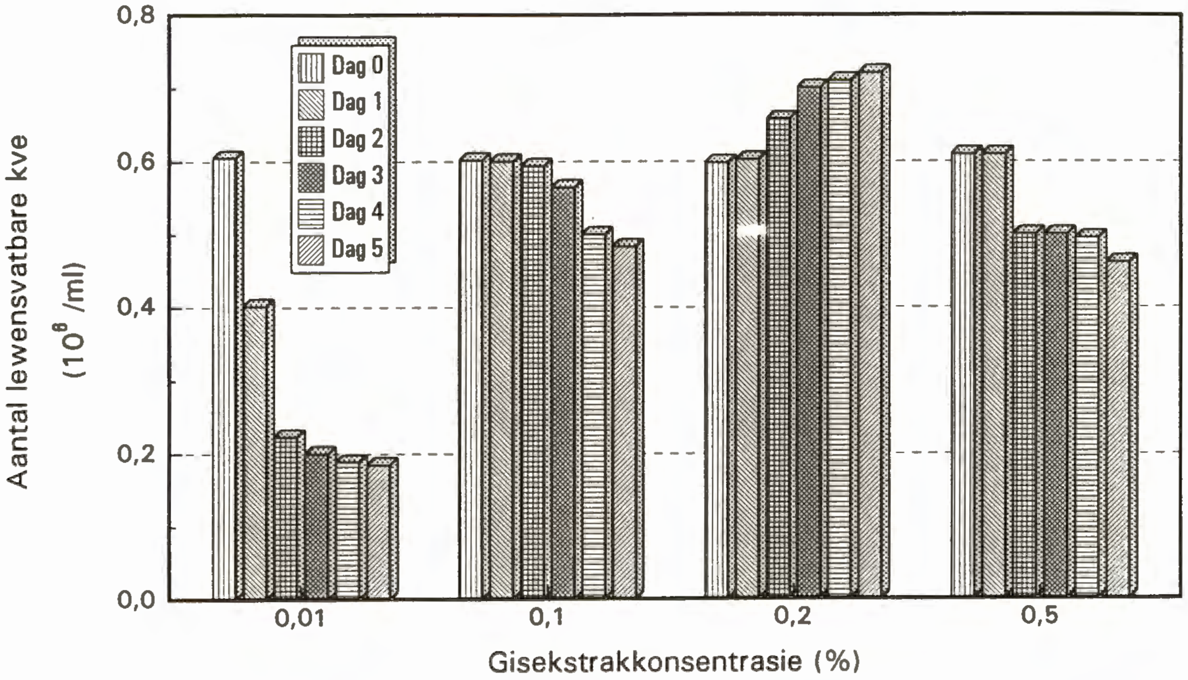


Tabel 36: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas pickettii* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	598 000	600 000	588 000	580 000
Dag 1	285 000	700 000	650 000	510 000
Dag 2	210 000	900 000	800 000	490 000
Dag 3	100 000	925 000	965 000	350 000
Dag 4	58 000	940 000	1 050 000	300 000
Dag 5	50 000	965 000	1 130 000	260 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 37: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

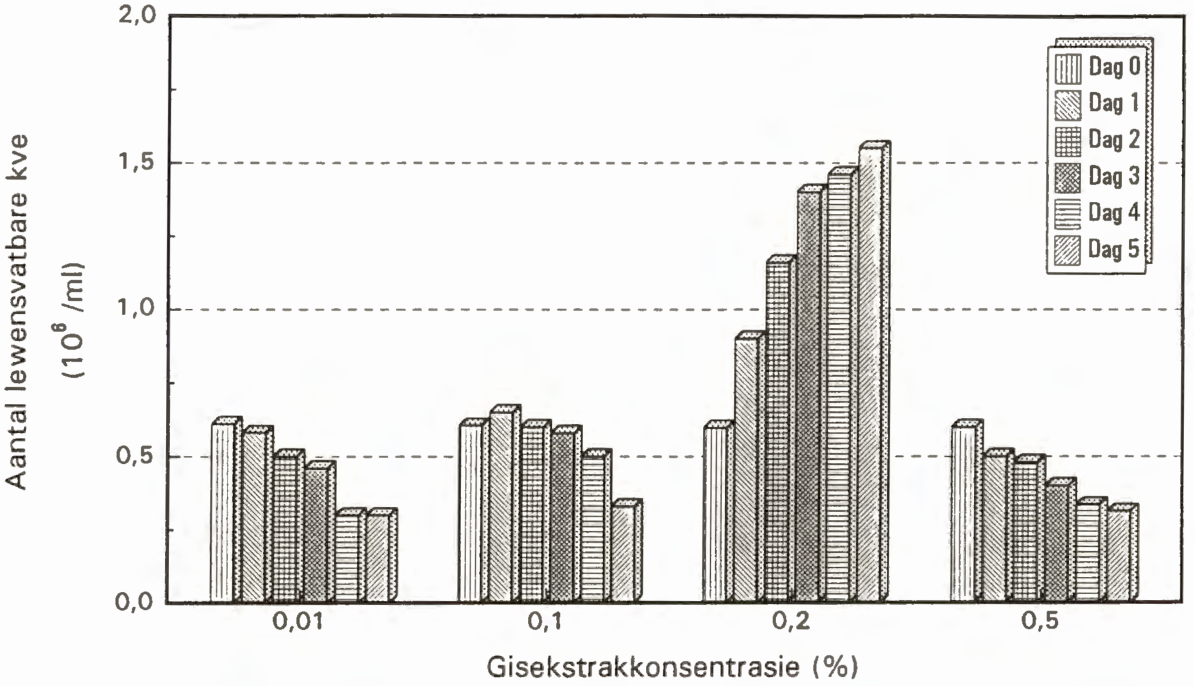


Tabel 37: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas gladioli* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	605 000	602 000	589 000	610 000
Dag 1	402 000	600 000	603 000	610 000
Dag 2	223 000	594 000	658 000	500 000
Dag 3	200 000	565 000	701 000	500 000
Dag 4	189 000	500 000	711 000	495 000
Dag 5	185 000	483 000	721 000	461 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 38: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

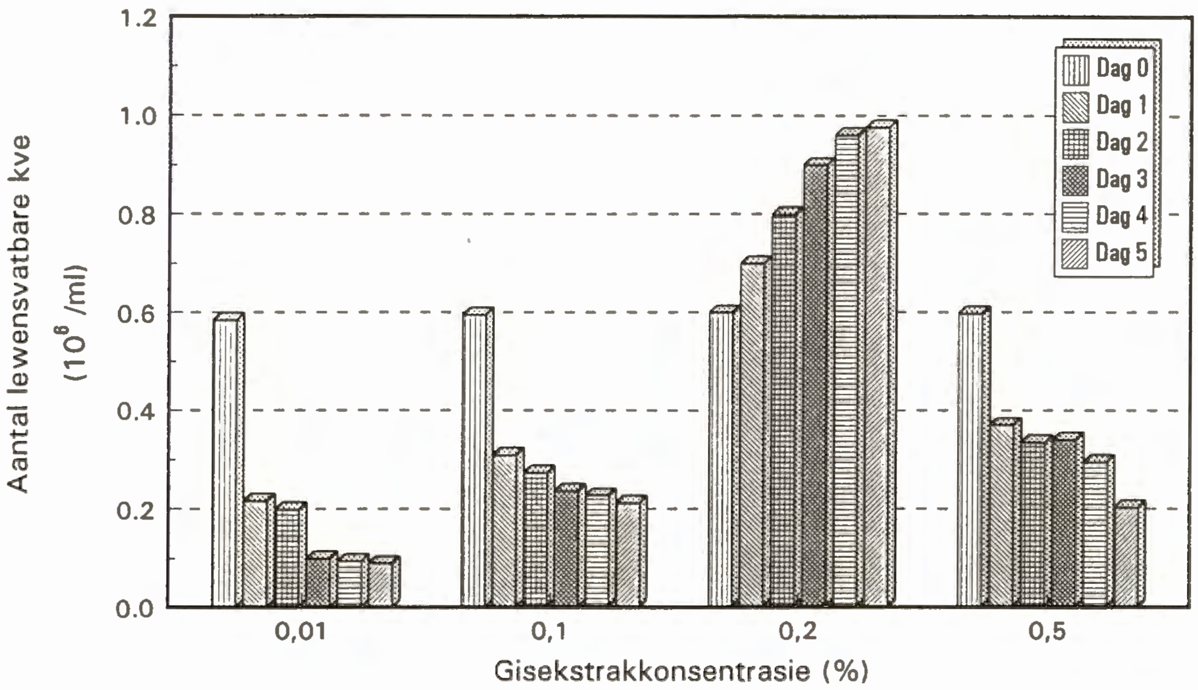


Tabel 38: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van *Pseudomonas stutzeri* by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	610 500	605 000	598 000	600 000
Dag 1	581 000	650 000	900 000	500 000
Dag 2	500 000	600 000	1 160 000	480 000
Dag 3	460 000	580 000	1 400 000	400 000
Dag 4	300 000	500 000	1 460 000	335 000
Dag 5	300 000	330 000	1 550 000	313 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

Figuur 39: Verandering in die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende gisekstrakkonsentrasies



Tabel 39: Tellings van die aantal lewensvatbare kolonievormende eenhede van 'n *Pseudomonas* spesie by verskillende gisekstrakkonsentrasies

	GISEKSTRAKKONSENTRASIE (%)			
TYD IN DAE	**0,01**	**0,1**	**0,2**	**0,5**
Dag 0	585 500	595 000	600 000	598 000
Dag 1	217 000	310 000	700 000	370 000
Dag 2	200 000	274 000	800 000	335 000
Dag 3	100 000	237 000	900 000	340 000
Dag 4	95 000	228 000	960 000	295 000
Dag 5	90 000	213 000	976 000	203 000

Temperatuur = 22°C
pH = 7,00
Statiese kulture

HOOFSTUK 5

GEVOLGTREKKINGS

5.1 ALGEMEEN

Atlas en Bartha, (1980 : 2) stel dat mikro-organismes as gevolg van hul noodsaaklike aktiwiteite op organiese en anorganiese substrate, 'n kernposisie in die geordende vloei van materie en energie dwarsdeur die globale ekostelsel, beklee. Die weerstandbiedendheid van verskeie sintetiese chemikalieë en plastiek, besoedelingsmiddels, eutrofikasie, suur myndreinering, nitraatbesoedeling van putwater, metilering van kwik en 'n menigte ander omgewingsprobleme reflekteer ongunstige en nie-opsetlike interaksies van die mens se aktiwiteite met die mikrobiese komponent van die globale ekostelsel. Mikro-organismes is egter net so belangrik om sommige van ons omgewings- en ekonomiese probleme op te los. Sulke probleme behels onder andere wegdoen van verskillende vloeistof- en soliede afval, verligting van stikstofbemestingtekort, voedsel-, voer- en brandstofproduksie vanaf neweprodukte en afval, herwinning van metaal vanuit laegraadse erts, biologiese beheer van peste, ens.

Die bevolkingsontploffing, verslegting van die omgewing en vinnige uitputting van nie-hernubare natuurlike bronne het navorsing op die ontginning van bestaande natuurlike bronne, noodsaaklik gemaak.

5.2 DIE INVLOED VAN TEMPERATUUR

Die navorsing toon dat verskillende bakteriese spesies verskillende temperature waarby aktiwiteite plaasvind, verkies. ***Bacillus brevis***, byvoorbeeld, verkies 'n groeitemperatuur van 20 °C, ***Kurthia gibsonii*** verkies 30 °C, terwyl 'n ***Streptomyces*** spesie, asook die ***Pseudomonas*** spesies 20 °C verkies. Die feit

dat al die bakteriese isolate 'n mesofiele temperatuurreeks (20-30 °C) verkies, kan toegeskryf word aan die omgewing waaruit die bakteriee geïsoleer is.

5.3 DIE INVLOED VAN pH

Die pH van die groeimedium het duidelik 'n invloed op bakteriese groei, soos aangetoon by ***Bacillus brevis*** waar geen groei by pH 3,00 plaasgevind het nie. Die isolate is verteenwoordigend van bakterieë wat 'n neutrale pH vir groei verkies en wat nie drastiese veranderinge in pH gedurende groei veroorsaak nie.

5.4 DIE INVLOED VAN SUURSTOF

Volgens Deobald (1992 : 115) word lignien deur 'n verskeidenheid aërobe bakterieë en fungi afgebreek, asook steenkool wat as die enigste koolstof- en energiebron gebruik word. Beter resultate kan dus deur belugting verkry word deurdat mikrobiese groei verbeter word of deurdat steenkool moontlik verander word omdat aromatiese steenkoolverbindings afgebreek word.

Die invloed van suurstof het duidelik na vore gekom. ***Bacillus brevis***, ***Kurthia gibsonii***, ***Pseudomonas gladioli***, ***Pseudomonas stutzeri*** en 'n ***Pseudomonas*** spesie verkies 'n suurstofkonsentrasie van 2,07 mg O_2/dm^3, terwyl 'n ***Streptomyces*** spesie en ***Pseudomonas pickettii*** 'n suurstofkonsentrasie van 0,87 mg O_2/dm^3 verkies.

5.5 DIE INVLOED VAN GISEKSTRAK

Beskikbaarheid van voedingstowwe is een van die belangrikste faktore wat mikrobiese groei kan beïnvloed (Focht, 1988 : 15). Die invloed van gisekstrak op die groei van die bakteriese isolate is waargeneem nadat die gesuiwerde bakterieë op steenkoolagarplate wat met 0,2% gisektrak gesupplementeer is, uitgestreep is. Uit die resultate blyk dit dat 0,2% gisekstrakkonsentrasie optimaal vir groei van al

die isolate was.

5.6 SLOTSOM

Hierdie ondersoeke vorm 'n basis vir verdere navorsing om die meganisme van die bioprosessering (of strukturele verandering) van Suid-Afrikaanse steenkool te ondersoek en die biodegradering te optimiseer. Die vraag bly: het die isolate die steenkool gedegradeer of as bron van voedingstowwe benut, of het hulle net op die gisekstrak gegroei? Die vinnige afsterwing van selle dui moontlik aan dat steenkool antibakteriese aktiwiteite het. Hierdie onbeantwoorde vrae is 'n goeie basis vir opvolgstudies in hierdie navorsingsveld. Ekonomiese evaluering sal uiteindelik die aanwending van biotegnologie in die ontginning en omsetting van steenkool bepaal, tesame met die implementering van omgewingsvriendelike prosesse in die wêreld.

BIBLIOGRAFIE

ATLAS, R.M. & BARTHA, R. 1980. Microbial ecology: fundamentals and applications. New Jersey: Addison Wesley. 560p.

BΦVRE, K. & HENDRIKSEN, S.D. 1976. Minimal standards for description of new taxa within the genera ***Moraxella*** and ***Acinetobacter***: proposal by the subcommittee on ***Moraxella*** and allied bacteria. *International journal of systematic bacteriology*, 26: 92-96.

BROCK, T.D., SMITH, D.W. & MADIGAN, M.T. 1984. Biology of micro-organisms. 4th ed. New Jersey: Prentice Hall. 847p.

BROCK, T.D. & MADIGAN, M.T. 1988. Biology of micro-organisms 6th ed. New Jersey: Prentice Hall. 896p.

CLOWES, R.C. & HAYES, W. 1968. Experiments in microbial genetics. Oxford: Blackwell Scientific. 244p.

COUCH, G.R. 1988. Recent progress in coal bioprocessing research. *Resources, conservation and recycling*, 1 : 207-221.

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

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

CRUICKSHANK, R., DUGUID, J.P., MARMION, B.P. & SWAIN, R.W.A. 1975. Medical microbiology. Vol. 2. 12th ed. New York: Churchill Livingstone. 587p.

DEOBALD, L.E. 1992. Reductive metabolism of coal and coal substructure model compounds by anaerobic bacteria. (*In* Crawford, D.L., *eds.* Microbial transformations of low rank coals. Florida: CRC Press. 223p).

ESTERHUYSEN, H.A. 1988. An investigation of obligate aerobic chemo-organotrophic bacteria involved in the activated sludge process of sewage purification. Potchefstroom: PU for CHE. (Dissertation - D.Sc.). 181p.

BIBLIOGRAFIE - (Vervolg)

FALCON, R.M.S. & SNYMAN, C.P. 1986. An introduction to coal petrography: atlas of petrographic constituents in the bituminous coals of Southern Africa. 1st ed. Johannesburg: The Geological Society of South Africa. 27p.

FAISON, B.D. 1992. The chemistry of low rank coals and its relationship to the biochemical mechanisms of coal biotransformation. (*In* Crawford, D.L., *eds.* Microbial transformations of low rank coals. Florida: CRC Press. 223p).

FAKOUSSA, R.M. 1991. Function of active compounds in biological coal conversion. (*In* Third Simposium on Biotechnology of Coal and Coal-derived Substances. Abstract volume, 23-24 September 1991. Essen, Duitsland).

FOCHT, D.D. 1988. Performance of biodegradative microorganisms in soil: xenobiotic chemicals as unexploited metabolic niches. (*In* Omenn, G.S., *ed.* Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology. Vol. 45. New York: Plenum Press. p. 15-29.)

GERHARDT, P., MURRAY, R.G.E., COSTILOW, R.N., NESTER, E.W., WOO, W.A., KRIEG, N.R. & PHILIPS, G.B. *eds.* 1981. Manual of methods for general bacteriology. Washington: American Society for Microbiology. 524p.

GRANT, W.D. & LONG, P.E. 1981. Environmental microbiology. London: Blackie. 215p.

GREENBERG, A.E., TRUSSEL, R.R. & CLESCERI, L.S. 1985. Standard methods: for the examination of water and wastewater. 16th ed. Washington: American Public Health Association. 1134p.

HAENEL, M.W. 1991. Aspects of coal structure. (*In* Third Simposium on Biotechnology of Coal and Coal-derived Substances. Abstract volume, 23-24 September 1991. Essen, Duitsland).

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

BIBLIOGRAFIE - (Vervolg)

HUGO, P.J. 1986. Operating and developing coal mines in R.S.A. Johannesburg: Department of Mineral and Energy affairs, Information Management Subdivision. 32p.

ISBISTER, J.D. WYZA, R.E., LIPPOLD, J., DESOUZA, A. & ANSPACH, G. 1988. Bioprocessing of coal. (*In* Omenn, G.S., *ed.* Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology. New York: Plenum Press. Vol. 45. p. 281-293).

KEMP, F. 1986. Die verband tussen reflektiwiteit-oppervlakeienskappe en veredelings-gedrag van steenkool. Potchefstroom: PU vir CHO. (Verhandeling - M.Sc.) 105p.

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

LIU, Y.A. 1982. Physical cleaning of coal: present and developing methods. New York: Marcel Dekker. 551p.

MERCK. 1985. Handbook culture media. Darmstadt: E. Merck. 188p.

NARAYAN, R. & HO, N.W.Y. 1988. Objectives of coal bioprocessing and approaches. *Abstracts of papers of the American Chemical Society,* 196: 487-495.

OLSON, G.J. & BRINCKMAN, F.E. 1986. Bioprocessing of coal. *Fuel,* 65: 1638-1645.

OPPERMAN, D.P.J. 1994. Persoonlike mededeling. Sasolburg: Sastech.

OXOID. 1990. The manual. 6th ed. Basingstoke: Unipath Ltd. 331p.

PRESCOTT, L.M., HARTLEY, J.P. & KLEIN, D.A. 1990. Microbiology. Dubuque, USA: Wm. C. Brown. 883p.

QUIGLEY, D.R. 1992. The enzymology and chemistry of coal biosolubilization. (*In* Crawford, D.L., *eds.* Microbial transformations of low rank coals. Florida: CRC Press. 223p.

BIBLIOGRAFIE - (Vervolg)

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

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.

SOUTH AFRICA (Republic), Department of Foreign Affairs. 1985. Official yearbook of the Republic of South Africa. 11th ed. Cape Town: CTP Book Printers. 831 p.

SOUTH AFRICA (Republic), Department of Foreign Affairs. 1989-1990. Official yearbook of the Republic of South Africa. 15th ed. Cape Town: CTP Book Printers. 842p.

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

STANIER, R.Y., INGRAHAM, L.J., WHEELIS, M.L. & PAINTER, P.R. 1987. General microbiology. 5th ed. Hong Kong: MacMillan. 689p.

STARR, M.P., STOLP, H., TRÜPER, H.G., BALOWS, A. & SCHLEGEL, H.G. *eds.* 1981. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol.1. New York: Springer-Verlag. 1102p.

SUID-AFRIKAANSE STEENKOOLVERWERKINGSVERENIGING. 1977. Steenkoolvoorbe-reidingskursus vir aanlegoperateurs. Kaapstad: Kaap & Transvaal Drukkers. 334p.

THERON, W. *eds.* 1994. Sasol facts. Johannesburg: Corporate communications department of Sasol Limited. 44p.

TINNEY, C.B. 1992. Energy minerals: coal. (*In* South Africa's Mineral Industry. Johannesburg: Department of Mineral and Energy Affairs. 123p).

VAN NIEROP, P. 1988. Die invloed van oppervlak-eienskappe van steenkool op skuimflottasie. Potchefstroom: PU vir CHO. (Proefskrif - D.Sc.) 197p.

BIBLIOGRAFIE - (Vervolg)

WILLIAMS, S.T., SHARPE, M.E. & HOLT, J.G. *eds.* 1989. Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol 4. Baltimore: Williams & Wilkins. 2648p.