

Poedervormige bacterie preparaten versus vloeibare bacterie preparaten.

Auteurs: Jan Stienstra, Rob Heyboer, Siep Nagengast.

Ref: V2007/20

Inleiding

Onderzoek is uitgevoerd om te kunnen begrijpen hoe een bacterieel proces in vijverwater tot stand komt. Deze materie is complex maar we proberen het op een voor de koi-liefhebber begrijpelijke manier weer te geven.

In een eerder artikel (Koiwijzer editie 1-maart 2004 blz 112) is verslag gedaan van een vergelijkend onderzoek naar de werking van verschillende vloeibare bacterie producten. Daarbij waren de namen van de verschillende bacterie stammen niet bekend. Naar aanleiding van dat artikel is de vraag gesteld of ook de poedervormige bacterie substanties onderzocht konden worden. House of Kata heeft voor dit onderzoek bacterie substanties in poedervorm geleverd met de bijbehorende nutriënt en een bioreactortje. De resultaten worden toegelicht in dit artikel.

Vervolgens zijn in een praktijk situatie, Biogro producten gebruikt. Biogro levert drie verschillende flesjes vloeibaar bacteriën. Het betreft hier hoofdzakelijke bacteriën uit de stammen *Bacillus Subtilis*.sp.p. De resultaten van dit deel van het onderzoek worden in een volgend artikel gepresenteerd.

Naast de Biogro en Kamiac producten zijn er een breed scala aan andere bacterie producten zoals Ecotreat, Micro-belift, Bacta-Totaal, Bactoplus, Takazumi en Bacta-pur. Niet elk van deze producten is onderzocht. Het is wel mogelijk dat deze bacterie producten ook de stammen *Bacillus Subtilis*.sp.p bevatten zodat de gepresenteerde resultaten voor die producten ook geldig kunnen zijn.

Bacteriën als 'medewerkers' van de koi-liefhebber

Bacteriën spelen een cruciale rol in elke koi vijver bij het op peil houden van de kwaliteit van het vijverwater en de gezondheid van de vissen. Bacteriën zijn verantwoordelijk voor de afbraak van schadelijk stoffen waaronder het ammonium dat door de vissen afgescheiden wordt en de vervuiling die ontstaat door niet gegeten voer, plantenresten en uitwerpselen.

In de literatuur begint dit natuurlijke proces altijd met de (chemo) heterotrofe bacteriën en vervolgens komen de autotrofe bacteriën aan bod. Tussen die twee of meerdere groepen bacteriën ontstaat een samenspel dat symbiose¹ heet.

¹ Met de term symbiose wordt het samenleven aangeduid van twee ongelijksoortige organismen tot wederzijds voordeel. Een voorbeeld is het samenspel tussen bepaalde planten met bacteriën waarbij de plant zorgt voor de opname van ammonium, nitriet en nitraat terwijl de bacteriën voor de verwerking van die stoffen zorgen.

De biologische stappen die hierbij optreden zijn bekend. De eerste stap van nitrificatie wordt bijvoorbeeld gevormd door Nitrosomonas / Nitrococcus bacteriën die het ammonium omzetten en vervolgens nitriet uitscheiden. De tweede stap is daarna dat de Nitrobacter / Nitrospira bacteriën op hun beurt dit nitriet omzetten en dan nitraat uitscheiden.

In een vereenvoudigde vorm wordt dit als volgt weergegeven:

Eerste stap → Tweede stap → eindproduct.
 Nitrosomonas e.d. → Nitrobacter e.d. → eindproduct nitraat.
 NH_4^+ (ammonium) → NO_2 (nitriet) → NO_3 (Nitraat)

Dat is de algemene formule voor het nitrificatie proces. Nitrosomonas is obligaat chemo-autotroof en zuurstof behoevend terwijl Nitrobacter chemolithoautotroof is².

Naast de nitrificatie volgt mogelijk het denitrificatie³ proces waarbij het nitraat weer teruggevormd wordt naar nitriet dat vervolgens tot stikstofgas wordt omgezet. Nitraat is een oxidator en is een instabiele verbinding. De competitie van de bij denitrificatie betrokken bacteriën is enorm groot!

We krijgen het dan het volgende schema voor het gehele proces:

Eerste stap nitrificatie → Tweede stap nitrificatie → Denitrificatie
 Nitrosomonas e.d. → Nitrobacter e.d. → Denitrificerende bacteriën
 NH_4^+ (ammonium) → NO_2 (nitriet) → NO_3 (nitraat) → NO_2 (nitriet) → N_2 (stikstofgas)

Er is een lange waslijst van betrokken denitrificeerders: de heterotrofe Pseudomonas sp.p, Aerosomonas sp.p, Mycobacteriën, Vibrio bacteriën en de Flavobacteriën. In die groepen heterotrofe bacteriën zitten de meeste ziekte verwekkende bacterie stammen. De hamvraag is echter: welke bacteriën zijn het die het denitrificatie proces beheersen.

We hebben dus te maken met deze heterotrofe bacteriën die leven in een zuurstofarme omgeving. Dergelijke bacteriën vinden we in de algemeenheid in de biofilmlaag op diverse soorten dragermateriaal of diep onderin in de sliblagen van de natuurvijvers.

Echter, zoals het al in het begin werd beschreven, hebben we ook met een ander heterotrofe familie te maken, en dat zijn de Chemo-Heterotrofe bacteriën. Hun rol is in het volgende schema aangegeven:

Chemo-Heterotroof → Nitrosomonas e.d. → Nitrobacter e.d. → [nitraat (denitrificerende (heterotrofe) bacteriën) → NO_2 → N (gas)]^{3,4}.

² Sinds kort is vastgesteld dat ook Nitrobacter in staat is ammonium af te breken.

³ Afgekort DN (DeNitrificatie).]

⁴ Deze biologische lijn is niet nieuw en was binnen de koiwereld al hier en daar bekend.

Alle biologische processen in het water beginnen met de Chemo-heterotrofe bacteriën, pas later gaan de autotrofe bacteriën een rol spelen en nog veel later de heterotrofe denitrificerende bacteriën. Bij het opstarten van een vijver moet je daar rekening mee houden. De Chemo-heterotrofe bacteriën hebben zuurstof nodig, het zijn als het ware zuurstof slurpers. Hier ligt één van de verschillen tussen Chemo-heterotrofe bacteriën die zuurstof behoevend (aëroob) zijn en de heterotrofe bacteriën die betrokken zijn bij de denitrificatie proces. Deze laatste zijn zuurstof beminnend (anaëroob). We hebben het dus over twee soorten verschillende groepen die samen aangeduid worden als heterotrofe bacteriën. Wij mogen de chemo-heterotrofe bacteriën niet uit het waterleven uitsluiten. Zij horen thuis in het waterleven, zowel in de natuur als in de vijver.

Nitrificerende bacteriën.

Nitrificerende bacteriën zijn autotroof. Het is niet mogelijk om autotrofe bacteriën in poedervorm te verhandelen. De nitrificerende bacteriën koop je daarom altijd als vloeibaar product. Nitrificerende bacteriën kunnen een bepaalde tijd overleven zonder zuurstof. Hoe lager de omgevingstemperatuur is des te langer kunnen de bacteriën zonder zuurstof. Bij een gemiddelde temperatuur van 15 °C is de levensduur van de bacteriën in een afgesloten flesje ongeveer 5 tot 7 maanden.

In het verleden is men er vaak van uit gegaan dat deze klassieke nitrificerende bacteriën de enige bacteriën zijn die de kwaliteit van ons vijverwater bepalen. We moeten vandaag de dag echter constateren dat er meer dan 3600 betrokken bacteriën in de natuur aanwezig zijn, die allemaal op de een of andere manier meedoen aan de stikstofcyclus. Veel van deze bacteriën hebben nog geen naam gekregen. Het onderzoek naar deze onbekende bacteriën vergt nog jaren onderzoekswerk.

Chemo-heterotrofe bacteriën.

De chemo-heterotrofe bacteriën worden in verband met hun unieke eigenschappen toegepast in diverse industrieel toegepaste biologische 'productie' processen. In dit artikel heeft de nadruk gelegen op de rol van de chemo-heterotrofe bacteriën bij de aller eerste biologisch stappen in de vijver.

Chemo-Heterotrofe zijn sporevormer. De sporen zijn resistent tegen uitdroging, kunnen dus in poedervorm verhandeld worden. De sporen verspreiden zich via de lucht, over de grond (bijvoorbeeld via schoenzolen), en via water. Deze bacteriën halen hun energie uit organisch materiaal, dat is hun voedsel.

Uitleg van enkele termen

Wellicht is het goed om enkele gebruikte termen toe te lichten, wat verstaan we onder Heterotroof en Chemo-heterotroof, en wat is organisch?

Een organisme is Heterotroof als het zijn organische celmateriaal opbouwt uit organische stoffen, gemaakt door andere organismen. Het heterotrofe organisme is dus afhankelijk van andere organismen: het dissimileert moleculen die door autotrofe organismen geassimileerd zijn. Het betreft een breed scala aan organismen, de simpelste heterotrofen zijn gisten. Maar ook de mens is heterotroof en wel chemo-organoheterotroof. Het woord "heterotroof" is afkomstig uit het Grieks en betekent letterlijk "zich van anderen voedend" (*heteros* - "vreemd", "een andere"; *troof* - "voeding"). Heterotroof is het tegenovergestelde van autotroof. De meeste planten zijn autotroof en kunnen met behulp van zonlicht, kooldioxide uit de lucht en mineralen groeien.

Een chemoheterotroof organisme is een organisme die energie verkrijgt via biologische redoxreacties tussen anorganische stoffen. Vaak wordt ook in levensprocessen energie onder de vorm van redoxreacties opgeslagen en omgezet. De energiegeneratie (het katabolisme) is meestal een redoxreactie. Deze energie wordt gebruikt voor groei. Indien dezelfde stof gedeeltelijk wordt geoxideerd en gedeeltelijk gereduceerd spreekt men van fermentatie. Een chemotroof organisme is een autotroof of heterotroof organisme dat de benodigde energie verkrijgt door oxidatie van chemische verbindingen oftewel chemosynthese. Deze verbindingen kunnen zowel organisch als anorganisch zijn. De naamgeving stamt uit het Grieks. *Chemo* betekent "chemisch" en *troph* means "voeding". *Auto* betekent "zelf" en *hetero* staat voor "andere". Chemotrofe organismen die geheel of gedeeltelijk leven van organische verbindingen worden chemo-heterotroof, chemo-organotroof, of organotroof genoemd en die leven van anorganische verbindingen chemoautotroof, chemolithotroof, lithotroof of chemo-litho-autotroof.

Organisch is de term waarmee verbindingen aangeduid worden die zowel koolstofatomen als waterstof atomen bevatten en in levende wezens voorkomen. Het tegenovergestelde zijn de anorganische of minerale verbindingen zoals bijvoorbeeld ammonium, nitriet en nitraat. Koolstof, de basis van alle organische verbindingen, is maar één van de 92 natuurlijke elementen, maar de verbindingen van koolstof (doorgaans met waterstof, zuurstof, stikstof, zwavel e.d.) zijn toch veel talrijker dan die van alle andere elementen tezamen.

Chemoautotrofe (of chemotrofisch autotrofe) organismen, die hun energie door chemische reacties uit anorganische verbindingen verkrijgen, maken alle benodigde organische verbindingen uit kooldioxide. De meeste zijn bacteriën of archaea, die onder extreme omstandigheden leven. Wetenschappers geloven dat deze organismen als eersten de aarden koloniseerde en als bijproduct zuurstof leverden. *Bacillus subtilis* is een voorbeeld van een bacterie die onder extreme omstandigheden kan leven. *Bacillus subtilis* is non-pathogeen en is de meest bekende chemo-heterotrofe sporevormer, grampositief bacteriën.

Het zijn aërobe bacteriën (zuurstof behoevende bacteriën) die voorkomen in de grond, het water, de lucht, in planten, in dieren en zelfs in de mens. *Bacillus subtilis* is ook de grootste in kaart gebrachte bacteriënstam ter wereld. Het is de meest onderzochte, en dus geplaagde, bacteriën op de aarde. Zelfs een tripje rondom de planeet mars is onderdeel van het onderzoek geweest. Deze bacteriën worden voornamelijk uit grond gewonnen dat via bio-industriële verwerking tot grote hoeveelheden worden geproduceerd. Het wordt gebruikt voor de farmaceutische, agrarische en levensmiddelen industrie, als slibverwijderaar bij waterzuiveringsinstallaties, en het wordt ook gebruikt voor koivijvers. Japan en Amerika zijn de grootste producenten van *Bacillus subtilis* sp.p. stammen. Er bestaan 18 verschillende *Bacillus subtilis* sp.p. stammen, waarvan 3 stammen sporevormend zijn.

Uit literatuur onderzoek blijkt *Bacillus subtilis* sp.p bijzonder eigenschappen te bezitten. Het is een werkpaard en kan meer dan 7 soorten basen (eiwitten c.q enzymen) uitscheiden, en nog meer soorten sacchariden. Polysacchariden zijn koolhydraten die zijn opgebouwd uit een groot aantal monosaccharide-eenheden. Lipo-sacchariden bestaan voornamelijk uit vetten en oliën. De uitgescheiden stoffen worden in de farmaceutische industrie gebruikt bij het maken van medicinale producten (bijv. vaccin, wasmiddelen, insuline, antibiotica, probiotische middelen, en medicijnen) Daarnaast is men in de onderzoekscentra bezig met het ontrafelen van de bijzondere gevormde eiwitten (enzymen, SPase) die deze bacterie kan produceren.

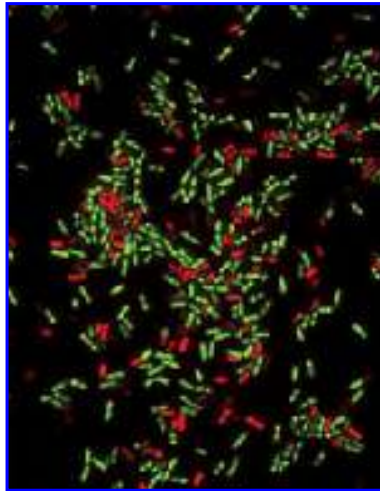
“In veel organismen komt maar één SPase voor. Harold Tjalsma ontdekte dat B. subtilis maar liefst zeven SPasen bezit. Belangrijke ontdekking is dat deze enzymen met een schijnbaar identieke functie betrokken zijn bij verschillende cellulaire processen. Drie SPasen bleken essentieel voor de levensvatbaarheid van B. subtilis cellen. Verrassend genoeg vertoonde een van de niet essentiële SPasen een grote gelijkenis met enzymen die voorkomen in hogere organismen zoals de mens. Hierdoor is in de toekomst dit type SPase in een relatief eenvoudig bacterieel model systeem aan nader onderzoek te onderwerpen. Bron: RUG - Groningen.”

Bacillus subtilis, een bijzonder sterke bacteriën.

Bacillus subtilis is bestand tegen (radioactieve) straling en UVC stralingen, hoge temperatuur (tot 120 °C) en lage temperatuur (4 °C) en is immuun tegen bepaalde chemische stoffen o.a. zout en KP behandeling!. Ze kunnen ook tegen flinke pH schommelingen. Daarnaast kunnen deze bacteriën ook gebruikt worden bij de verwerking van verschillende metallische verontreinigingen. Zijn broertje *Bacillus licheniformis* zorgt voor de nitraat verlaging.

Bacillus subtilis kent ook nog een andere meer lugubere eigenschap. Het is namelijk een kannibaal, ontbreekt het aan specifieke voedingsstoffen, dan spuit de *bacillus subtilis* antibiotica af, eet vervolgens zijn eigen familie op, en gaat slapen.

Groene *Bacillus subtilis*
Rode *Bacillus subtilis*
eten de rode bacteriën



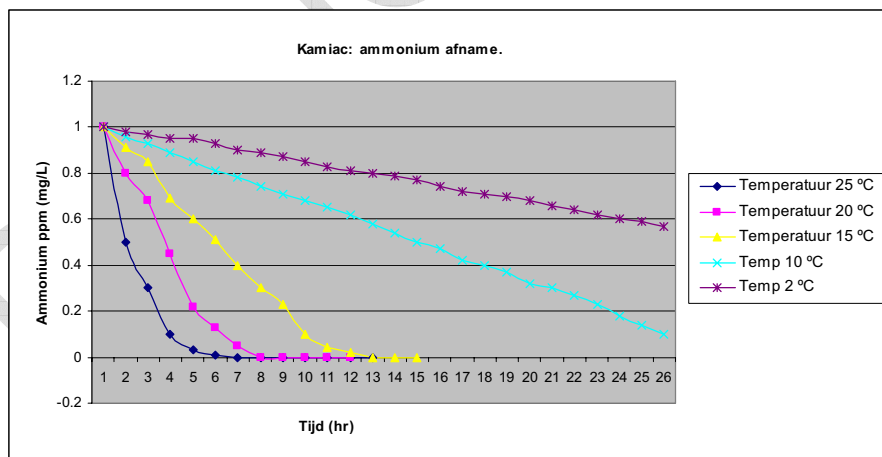
zijn levensvatbare bacteriën.
zijn levenloze bacteriën. Groene
op, en gaat daarna slapen.

Bron: José E. González- Pastor, Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain.

Wat doet *Bacillus subtilis* met ammonium in onze vijverwater.

Bacillus subtilis is ubiquitar (algemeen voorkomend in de natuur) onttrekt als stikstofbinder stikstof (N) uit de lucht, het water, de grond en planten.

Bacillus subtilis breekt geen ammonium af, maar bindt het aan één of meerdere van de 7 uitgescheiden enzymen via een ingewikkelde biochemische omzetting. Al deze biochemische reacties geven biochemische stoffen af, die nodig zijn bij de groei van o.a. planten. Ammonium wordt bij deze biochemische reacties zeer snel afgebroken.



Bijgaande grafiek toon de ammonium afname bij verschillende temperaturen.

Bij het opstarten van een vijver worden deze *Bacillus subtilis* sp.p toegepast. Bij de opstart zijn er geen autotrofe bacteriën aanwezig. Dat komt doordat er na een korte tijd geen stikstof voedingsbodan beschikbaar meer is voor de ontwikkeling van autotrofe bacteriën. Er zijn ook biochemische middelen die in dit geval als nutriënt voldoende om een autotrofe

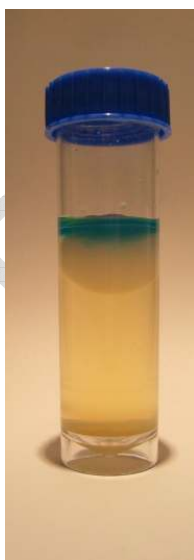
bacteriën te ontwikkelen. De stikstofhoudende verbindingen zoals NO_2^- -N (nitriet-stikstof), worden middels een reductor geoxideerd naar de hogere verbinding nitraat. Een reductor is een chemische stof die in een chemische reactie elektronen kan afstaan. De stof die de elektronen opneemt heet oxidator. Niet alleen het in het water opgeloste stikstof (lucht dat door het vijverwater geborrelt wordt bevat 20% zuurstof en 80% stikstof) maar ook het stikstof dat naast koolstof als glucose en fosfaat in organische materiaal aanwezig is vormt een bron van voedingsstoffen voor de bacillus *subtilis*, om te groeien. Organisch materiaal kan bestaan uit plantenresten, afgedode bacteriën, overtollig koivoer restanten en feces. Maar ook vrij zwevend levende microorganismen.

We onderscheiden twee vormen van aanwezige bacteriën in koivijvers.

- Vrij zwevende bacteriën
- Bacteriën die opgesloten zijn in biofilms.

Vrij zwevende bacteriën, zijn bacteriën die vrij “rondzwemmen” in het water. Wanneer we watermonsters nemen, dan zal dat watermonster vrij zwevende bacteriën bevatten. Ook de nitrificerende bacteriën kan vrij zwevend in het water aanwezig zijn. Er zijn veel onderzoeken gedaan naar de Bacillus *subtilis* in relatie met de nitrificerende bacteriën. Immers er wordt vanuit gegaan dat chemo-heterotrofe bacteriën de competitie aangaan en de autotrofe bacteriën verdringen. Hieronder wordt aangetoond hoe de bacillus subtilis deze vrij zwevende nitrificerende bacteriën verdringen.

Bij de inmiddels “overleden” Koibedrijf Amikoi is het water van een basin met een flinke visbezetting onderzocht. Het water van dit basin werd gefilterd over Japanse matten.



DBI test toont na 4 dagen.
een Heterotrofe activiteit



DBI test toont eerste stap
Nitrificerende activiteit aan



Nitriet detektie
via Hanna Instrument

De DBI test laat hier een voorbeeld van de eerste stap nitrificatie (omzetting van ammonium naar nitriet) zien. Op de linker foto geeft de heterotrofe activiteit aan na 4 dagen. Dat dit 4 dagen duurde geeft aan dat er maar weinig heterotrofe bacteriën aanwezig waren en dat de autotrofe bacteriën dominant zijn. Met de heterotrofe test kan niet bepaald worden welke heterotrofe bacteriën het betreft. De praktijk heeft uitgewezen dat de *Bacillus subtilis* sp.p het ammonium zeer snel omzetten. Hieronder staan afbeeldingen van een soortgelijke test uitgevoerd na een incubatie tijd van 5 dagen aan hetzelfde vijverwater, maar na toevoeging van *Bacillus subtilis* bacteriën en beluchting.



Heterotrofe activiteit na 3 hr omslag



Geen eerste stap nitrificerende bacteriën aanwezig



Geen nitriet

De resultaten tonen aan dat de chemo-heterotrofe bacteriën de nitrificerende bacteriën hebben verdrongen. Toch is het nitriet geheel verdwenen, hetgeen werd bevestigd door Hanna water analyse metingen uitgevoerd aan beide wateroplossingen.

De hierboven beschreven resultaten leidt tot het volgende schema voor de nitrificatie van het vijverwater:

Voor vrij zwevende bacteriën:

Chemo-Heterotroof → ~~Nitrosomonas e.d~~ → Nitrobactor e.d → [nitraat (denitrificerende (heterotrofe) bacteriën) → NO₂ → N (gas)].

Door de toevoeging van *Bacillus subtilis* is de eerste stap nitrificerende bacteriën in vrij zwevende vorm niet meer aanwezig.

Wat er nu mogelijk overhoudt is:

Chemo-Heterotroof → Nitrobactor e.d → [nitraat (denitrificerende (heterotrofe) bacteriën) → NO₂ → N (gas)].

U zult zich dan afvragen, nitrificerende bacteriën zijn toch belangrijk voor onze vijvers, want ze zorgen toch voor de eerste stap van de nitrificatie. Dat klopt maar ze komen voornamelijk voor in biofilms en niet in vrij zwevende vorm. Denk u maar eens in uw eigen praktijksituatie,. Wanneer uw vijverwater de UVC buis passeert of als u een ozon installatie toepast. Overleven de vrij zwevende bacteriën dat? *Bacillus subtilis* overleven wel.

Maar de eerste stap nitrificerende bacteriën dan? Is dat misschien de reden dat er nitriet in het water zit als er zwevende *Nitrosomonas* aanwezig is? En betekent dit, dat de tweede stap van de nitrificatie waarbij de nitriet omgezet wordt naar nitraat, ontbreekt? Dat zijn de vragen die het voorafgaande kan oproepen.

Daarom is vervolg onderzoek uitgevoerd. Dit onderzoek is mede mogelijk gemaakt door de faculteit Mikrobiologie aan de Radboud Universiteit te Nijmegen. In een volgend artikel omtrent de tweede stap nitrificatie onderzoek, is BWB dragermateriaal K1 en K3 en onderzocht. Hierbij werd als opstart bacteriën het product Biogro toegepast. Patrick Scheepers heeft al eens geschreven dat “de biofilm het ‘bruine goud’ van de koihouder is.” Dit wordt dan ook de titel voor het volgende artikel dat hierbij wordt opgedragen aan Patrick Scheepers.

Bacteriën in biofilm.

Het registreren van de eerste en de tweede stap nitrificerende bacteriën in een biofilm kan alleen met biochemische analysetechnieken in combinatie met FISH microscopie, Elektronen Microscopie of andere complexe analyse systemen. Over het algemeen wordt verondersteld dat vrijwel alle nitrificerende bacteriën zich het beste thuisvoelen in een biofilm. De chemo-heterotrofe *Bacillus subtilis* (BS) bacteriën worden vrij zwevend aan het water toegevoegd en verdringen weliswaar de vrij zwevende nitrificerende bacteriën maar niet de in de biofilm aanwezige nitrificerende bacteriën. Hierover volgt later meer.

Voorlopig geven we de processen in de biofilm schematisch aan als:

(Chemo-Heterotroof) → ~~(*Nitrosomonas* e.d)~~ → *Nitrobacter* e.d → nitraat (denitrificerende (heterotrofe) bacteriën) → NO₂ → N (gas).

Meer hierover volgt zoals gezegd in een volgende artikel.

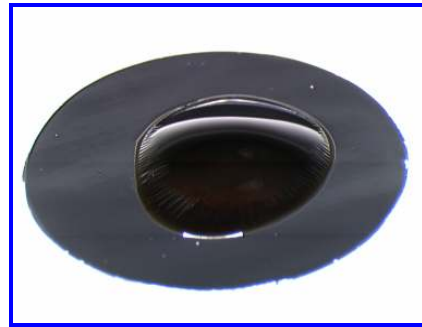
Sacchariden.

De *bacillus subtilis* scheiden stoffen af in de vorm van poly-sacchariden en of liposacchariden. Of de combinatie van beiden. Polysacchariden zijn onoplosbaar in water.

Deze gelei-achtige substanties komen we tegen in biofilm. Bijgaande foto's demonstreerd de vorming van deze stoffen bij het product Kamiac van House of Kata.



Klein druppeltje Kamiaac bacteriën oplossing wordt op een voedingsbodem Geplaatst



Binnen 2 hr is een gelei-achtige afzetting gevormd.



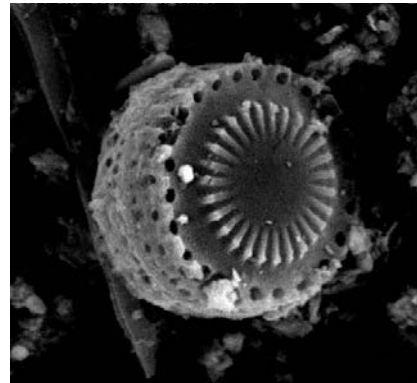
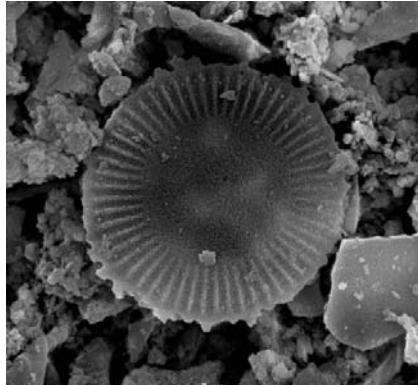
In filtermaterialen komt men deze producten ook tegen, zo is bij Siporax filtermedium (Foto: links) is het glibberige laag goed te zien en ook bij Kaldnes K1 (foto rechts) is duidelijk een kleurloze afzetting te zien. Met het blote oog zijn deze kleurloze geleiachtige lagen moeilijk te zien. Bij beide filtermedia zijn 3 weken nodig om deze geleiachtige laag te vormen om vervolgens te ontwikkelen tot biofilm.

Kamiaac poedervormige substantie.

House of Kata brengt een poedervormige “bacteriën” met nutriënt op de markt.

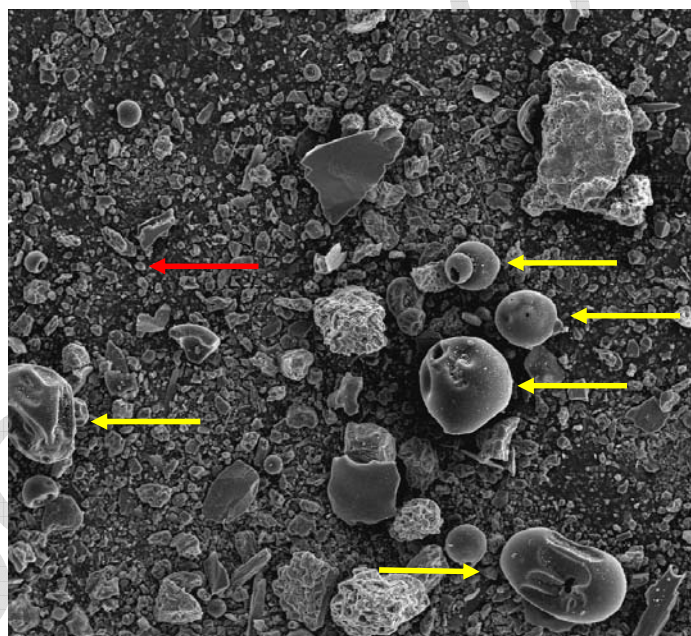
We sluiten het niet uit dat er meerdere merken zijn, die deze poedervormige “bacteriën” bevatten. Bacteriën hebben we tussen aanhalingstekens gezet omdat er twijfels bestonden rondom dat product. Die twijfels zijn na grondig onderzoek en bestudering weggenomen en vastgesteld is dat het om een sporenvormende *Bacillus subtilis* stammen gaat. Hoe gaat dat te werk en zien we dat dan ook? Hiervoor is de Scanning Elektronen Microscop (SEM) toegepast waarmee de stappen van de sporevormen bacteriën vanaf de “geboorte” tot de “uitgroei” vastgelegd kon worden. Verder is een kweektest uitgevoerd op specifieke voedingsbodems.

Tijdens het SEM onderzoek zijn diatomeeën gevonden (zie onderstaande beelden).



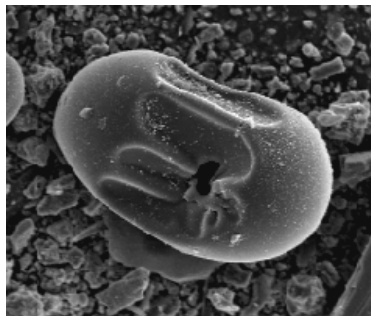
Dit betekent dat we te maken hebben met een zuiver natuurlijk produkt. Diatomeeën worden gevonden in de grond en of in het waterleven.

Onderstaande foto toont een overzicht van het Kamiac produkt.



Kamiac

Naast de cyst, een gesloten “schelpachtige” omhulsel (gele pijlen) bevatte het poedermonster calcium rijke mineralen (het hele kleine gruis aangegeven met de rode pijl).



Kamiac produkt

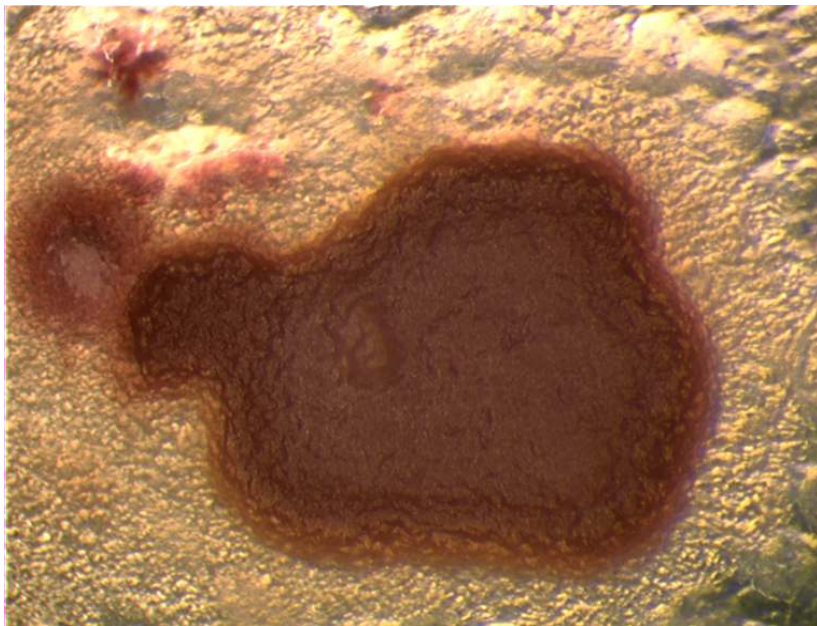
Hierboven wordt een uitvergroting getoond van een cyst met daaronder op de achtergrond, de calcium rijke mineralen (kalk). Deze cyst is ongeveer 0.1 mm lang.

Hierna is met een kweektest gekeken naar het ontstaan van “ bacteriën” uit zo’n cyst.



Kamiac

Een geïsoleerde cyst die op een voedingsbodem geïncubeerd is. De cyst zwelt van 0.1 mm naar ± 0.5 mm en barst aan de onderzijde open. De sporevormen bacteriën komen dan vrij op de voedingsbodem (zie rode krans aantekening rondom de cyst).



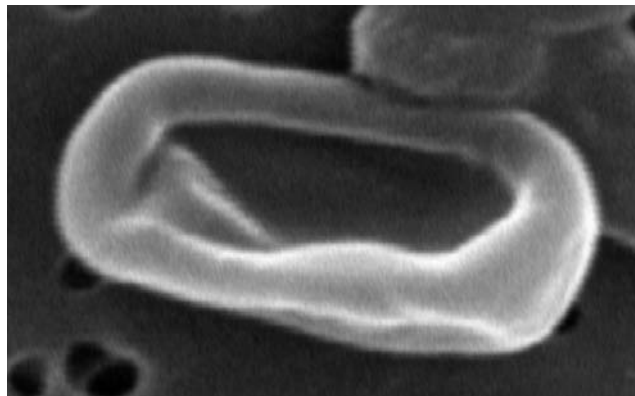
Kamiac

Tenslotte verdwijnt de cyst en laat een kolonie van de BS sp.p. stammen achter.



Kamiac

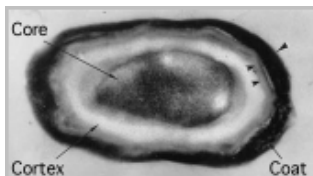
SEM opname van de opengebarsten cyst waar de spore al 'uitgekomen' zijn. Deze opname is 200 x vergroot.



Kamiac

Uitvergroting van een spore afkomstig uit de cyst (vergroting 60.000x!)

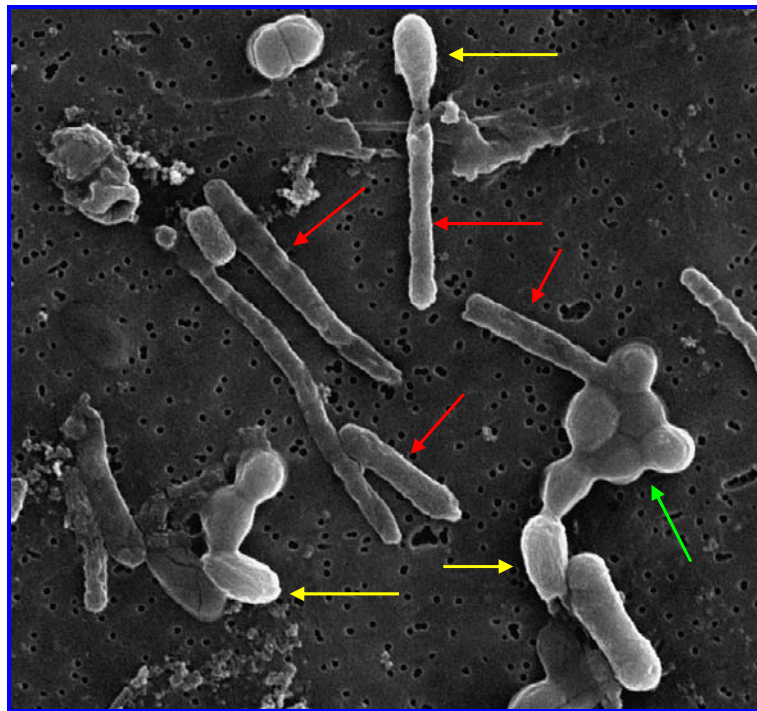
Literatuur informatie



Opbouw van een *Bacillus subtilis* spore. Foto rechts de *bacillus subtilis* die een reis heeft gemaakt naar de mars. (Bron: Charles P. Moran, Jr., Emory University School of Medicine.)

De spore bestaat uit een binnenwand, de zogenaamde cortex of schors; een zeer dikke laag van een speciaal soort mucopeptide. Deze laag biedt weerstand aan de zeer hoge druk die op de celmembraan staat. Die hoge druk wordt veroorzaakt door het lage watergehalte in de sporeprotoplast. Door diffusie willen watermoleculen naar binnen en heeft de sporeprotoplast de neiging om uit te gaan zetten, deze "uitzettende kracht" moet door de cortex tegengehouden worden. Het lage watergehalte is mede verantwoordelijk voor de hitteresistentie. Eiwitten gaan zonder water moeilijker kapot. Daarnaast zijn de eiwitten in het protoplasma "steviger" dus hittebestendiger gebouwd dan in een normale cel.

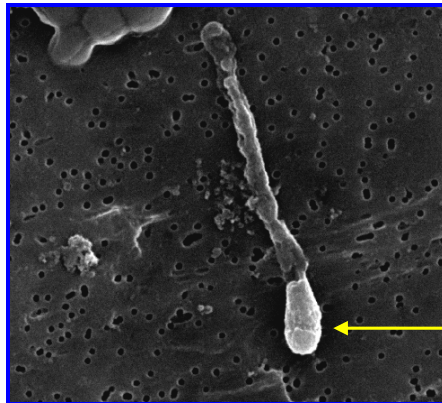
De buitenste laag is de sporecoat welke uit een keratineachtig eiwit bestaat. Deze coat is verantwoordelijk voor de resistentie tegen chemicaliën zoals desinfecteermiddelen, maar ook exo-enzymen van andere bacteriën in de omgeving (waardoor de spore niet voortijdig vergaat). Wanneer de sporecoat gevormd krijgt de cel zijn lichtbrekende eigenschappen. De hitteresistentie ontstaat pas nadat het protoplasma grote hoeveelheden dipicolinezuur (een stof die in normale cellen niet voorkomt) heeft gevormd en veel calciumionen heeft opgenomen.



Kamiac

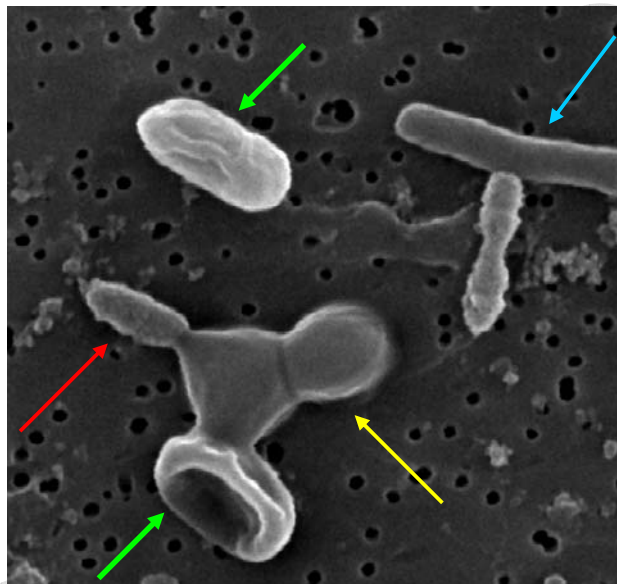
De gele pijlen geven de sporevormer aan. De rode pijlen geven de (staafvormige) vegetatie aan. De groene pijl wijst naar uitgescheiden enzymen. "Activering van de sporevormer gebeurt als de omgeving voor de bacterie gunstiger wordt. Na de activering volgt de kieming en uitgroei (voortplanting, vegetatie). De activering treedt waarschijnlijk op door verhitting Calcium, dipicolinezuur en stukjes mucopeptide worden uitgescheiden en de schors wordt afgebroken." Bron: Wikipedia.

Sommige gram-positieve bacteriën vormen als reactie op voedselgebrek sporevormer. Het proces van sporevorming duurt 10 uur. Een tekort aan Guaninenucleotiden in het cytoplasma van de vegetatieve bacteriecel zorgt voor een tweedeling van het protoplasma met aansluitend een endocytose-achtig proces, dat de spore vormt. Het DNA wordt gerepliceerd en het membraan of sporeseptum begint zich door instulping van het moedercelmembraan tussen een DNA-molecuul en de rest van de cel met het andere DNA-molecuul te vormen. Het plasmamembraan van de moedercel omgeeft het sporeseptum en vormt een dubbelmembraan om het DNA. De nu gevormde structuur wordt een voorspore genoemd. Tijdens het voorgaande proces wordt calciumdipicolinaat in de voorspore gevormd. Tot slot wordt de schors gevormd en de rest van de vegetatieve bacteriecel afgebroken. De sporevormer bevat nog maar 10 tot 30 % water in vergelijking met een bacteriecel.



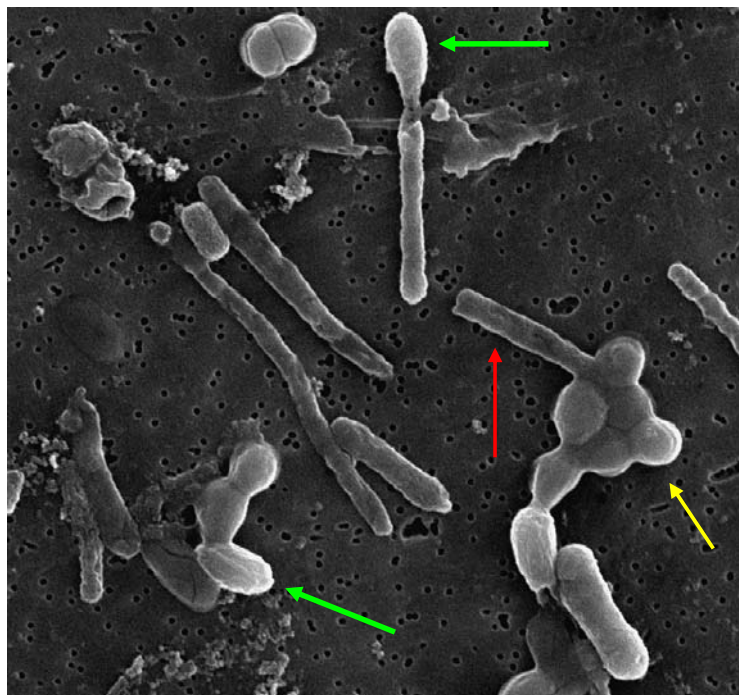
Kamiac

Sporeseptum begint met instulping (gele pijl)



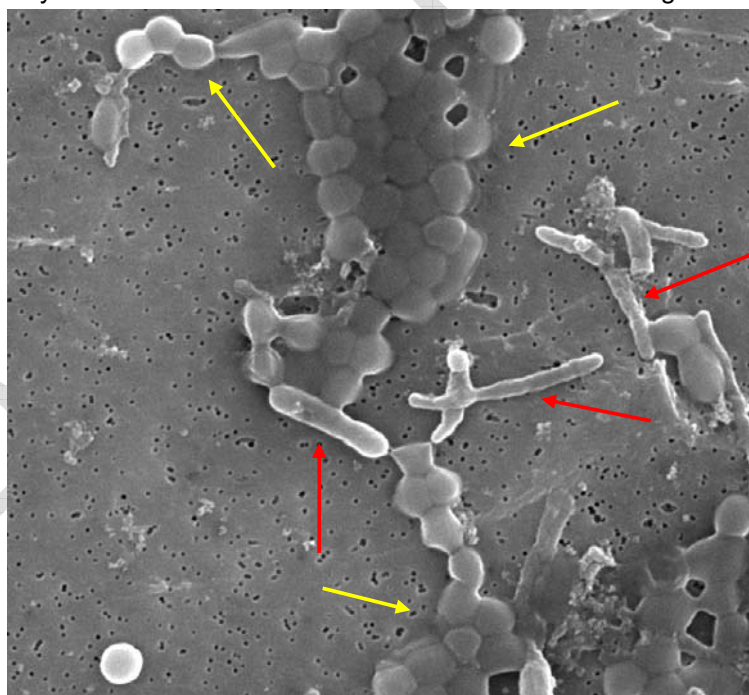
Kamiac

De groene pijlen zijn de sporevormer. De gele pijl geeft een uitgescheiden enzym aan. De rode pijl zijn de vegetatieve bacteriën, zeg maar jonkies. De blauwe pijl wijst naar een verder gegroeide vegetatieve bacterie.



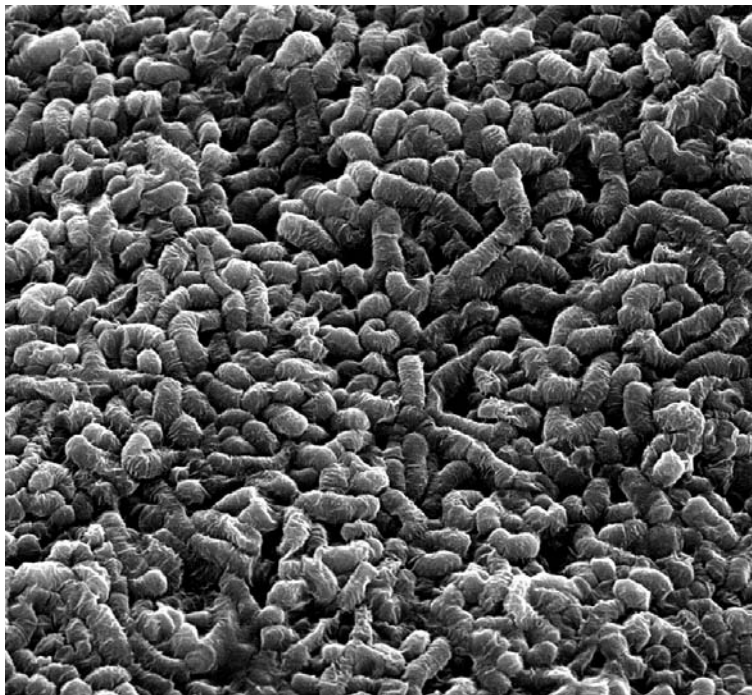
Kamiac

De rode pijl wijst naar de vegetatieve bacteriën. De gele pijl geeft de uitgescheiden enzymen aan. Bij de groen pijlen ontstaan nieuwe sporevormen door instulping vanuit de vegetatieve bacterie. Dat cyclus herhaalt zich continue zodra voldoende voedingsstoffen aanwezig zijn.



Kamiac

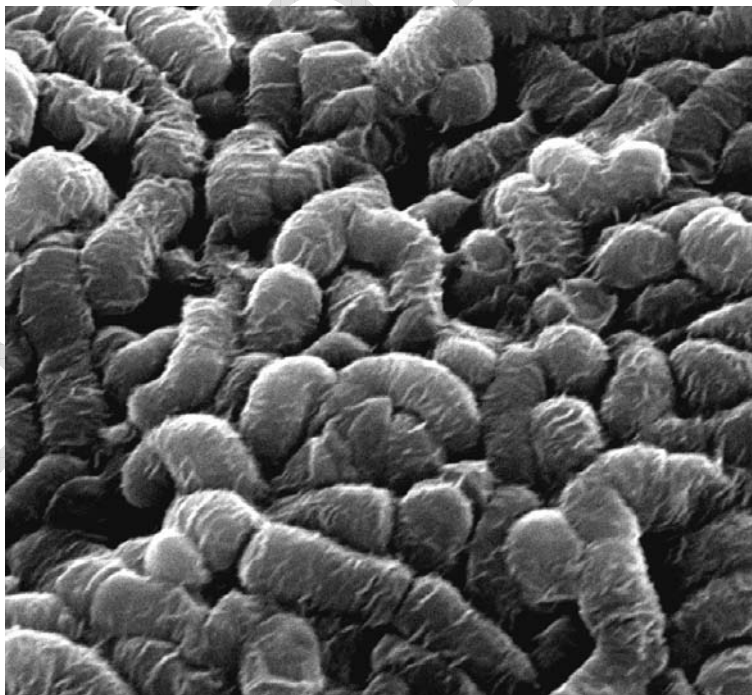
De rode pijlen wijzen naar de bacteriën in de vegetatieve toestand. De gele pijlen wijzen naar de uitgescheiden enzymen die door de bacteriën zelf zijn geproduceerd.



Kamiaac

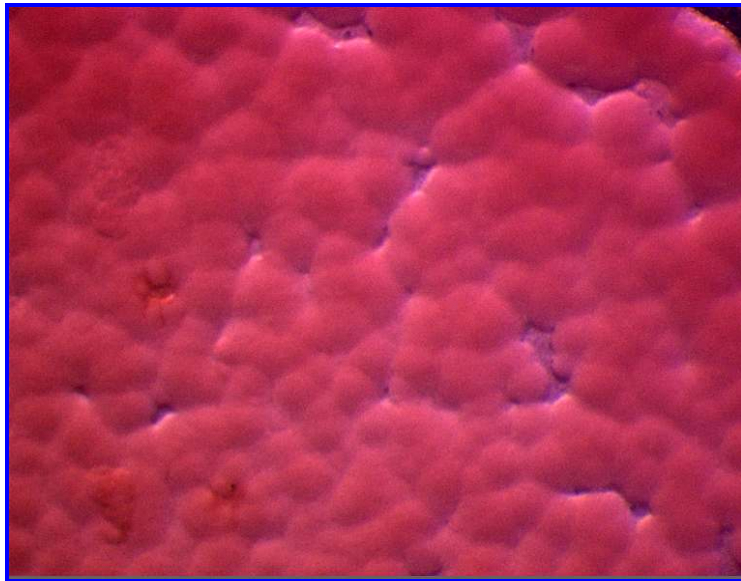
V= 24000 X

Bij volledig aanbod van voedingsstoffen gaan de vegetatieve bacteriën zich verder groeien naar een totale uitgroei. Bovenstaande SEM beeld toont de totale uitgroei van de *Bacillus subtilis* sp.p. bacteriën stammen.



Kamiaac produkt

V=50.000 X. Detail van de staafvormige lichamen *Bacillus subtilis* sp.p.

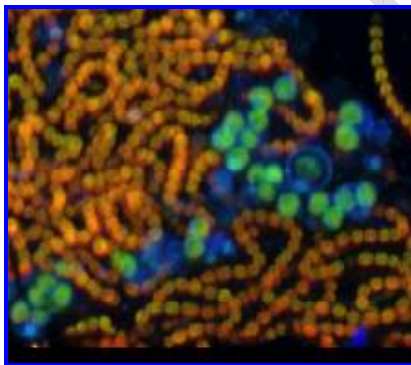


Kamiac produkt

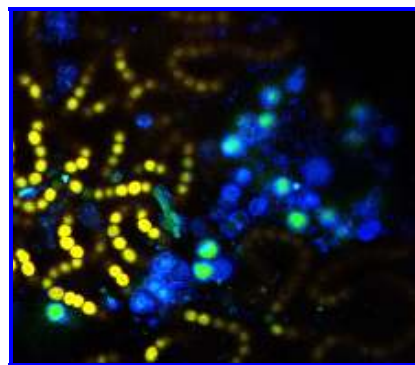
Bovenstaande foto toont de volgroeide kolonie *Bacillus subtilis* bacteriën die zich ontwikkeld heeft op een specifieke agar (voedingsbodem) voor *Bacillus subtilis* bacteriën.

Algen vermindering door *Bacillus subtilis* bacteriën.

Zoals bekend scheiden de *Bacillus subtilis* verschillende enzymen af. Die enzymen kunnen tot verbranding en/of andere biochemische reactie leiden. Het toont aan dat deze *Bacillus subtilis* een bijdrage kan leveren bij het beperken van algengroei. De onderstaande beelden zijn met de confocale laserscan microscopie gemaakt.



De oranje/bruin gekleurde parelsnoeren zijn algen. De cysyt zijn blauw/groen gekleurd.

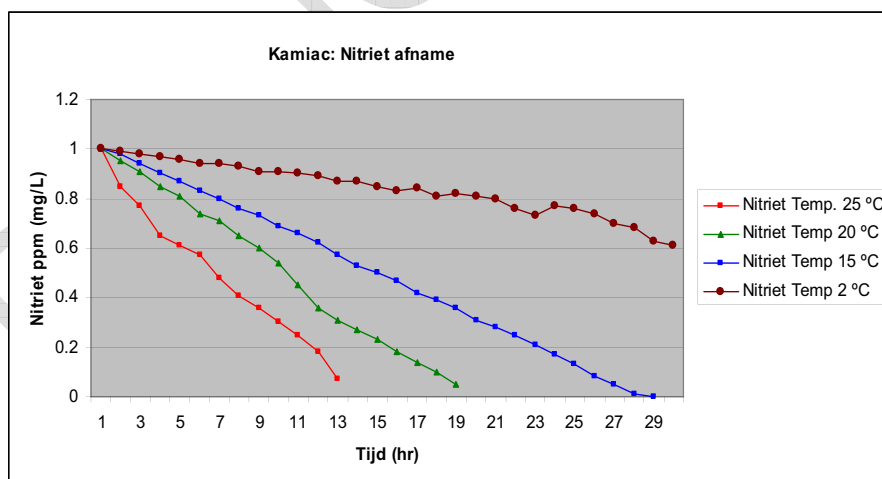


Opname 2 uur later, de hoeveelheid algen is verminderd. De blauw/groen gekleurde cysts bevat holle ruimtes, de spores zijn dus vrijgekomen en beginnen te activeren.

Het effect van KP behandeling op het bacteriële leven:

De Koi hobbyisten die aan de hand van een deskundige diagnose een Kalium Permanganaat (KP) behandeling moeten toepassen kunnen zelf de *Bacillus subtilis* sp.p. bacteriën zien reactiveren in hun vijver. Binnen het beschreven onderzoek is het product Kamiac van House of Kata gebruikt na een KP behandeling. Bij een KP behandeling ontstaat na 6 uur een bruine kleur in het water waarbij soms ook geoxideerd organisch materiaal aan het wateroppervlak komt drijven. Vervolgens wordt, als dat nodig is, na ongeveer 6 uur een extra herhalingdoses toegepast om de kuur af te maken. Normaliter is de KP behandeling na 12 hr uitgewerkt. Dan wordt veelal waterstofperoxide gebruikt om het vijverwater te ontkleuren. Wanneer u niet met waterstofperoxide nabehandeld, dan duurt het ongeveer 1.5 tot 2 weken voordat het water enigszins helderder wordt. Maar wanneer u bijvoorbeeld in plaats van waterstofperoxide het bacteriën product Kamiac van House of Kata volgens de gebruiksaanwijzing toepast dan ziet u binnen 12 uur geleidelijk het water kraakhelder worden.

Bacillus subtilis stam(men) scheiden o.a Peroxydase af. Peroxydase (POD) is een enzym (niet te verwarren met de chemische verbinding van waterstofperoxide). Hydrolase, Lyase, Isomerase, Ligase, Amylase, Transferase en Oxidoreductase, e.d. (in de enzymenleer komt men veelvuldig de uitgang – ase- tegen) zijn enzymen die betrokken zijn bij biochemische reacties. Peroxydase enzym werkt als een katalysator bij de vorming van vrije radicalen (bijvoorbeeld een zuurstofradicaal die als oxidant kan optreden). De bacteriën hebben wel even tijd nodig om tot een voldoende grote populatie te vermenigvuldigen (via een delingsproces). Maar 12 uur na de KP behandeling is hetzelfde effect bereikt als in het geval dat men waterstofperoxide toegevoegd had. De genoemde vrije radicalen transformeren ook het nitriet via oxidatie naar de hogere verbinding nitraat.



Grafiek nitriet afname bij verschillende temperaturen.

De enzym peroxydase komt voor in:

- hogere planten
- Ananas
- Aardappelen
- Peulvruchten
- Granen
- Suikerbieten
- Vijgen
- en bacteriën, zoals de bovengenoemde *Bacillus subtilis* bacteriën.

Bij een Kamiac toevoeging zou de UVC en Ozon in principe aan mogen blijven staan. Dit omdat normaliter de dosering van ozon en de bestralingsdosis van UVC aan de lage kant staat. De vrijzwevende *Bacillus subtilis* sporevormen en de volgroeide bacteriën in het waterkolom kunnen tegen Ozon en UVC. De vrijkomende enzymen zullen echter wel worden geoxideerd waardoor het effect van peroxidase teniet wordt gedaan. Meestal wordt daarom geadviseerd om de ozon, uvc en de eiwitschuimer gedurende 48 uur toch af te zetten zodat de enzymen heel blijven. Wie een ozon installatie met geïntegreerde redoxmeter heeft kan de ozon vorming tijdelijk onderbreken en toch de redoxwaarde aflezen. Normaliter liggen de redoxwaarden van het vijverwater in een doorsnee koivijver bij gebruik van UVC tussen 130 – 160 mV. Bij toevoegingen van Kamiac bacteriën zal de redoxwaarde eerst dalen naar 120-140 mV. Na ongeveer 12 uur later stijgt de redoxwaarde vervolgens tot een waarde tussen de 230-280 mV, mits de UVC en ozon uitstaan.

Bacillus subtilis produceren enzymen die een probiotische werking hebben. Uit meerdere families kan een specifieke stam geïsoleerd worden en hun enzymen die vervolgens in een vloeibare oplossing kan worden bewaard. Hierbij worden specifieke bio-chemische oplossingen gebruikt die de enzymen niet aantasten en de levensvatbaarheid van de enzymen / bacteriën kunnen verlengen. Dit kan echter alleen wanneer het sporevormen bacteriën zijn en dergelijke producten zijn alleen succesvol als ze in vijvers toegepast worden waar meerdere voedingsbodems aanwezig zijn.

In een volgende artikel "De biofilm is het 'bruine goud' van de koihouder" worden de resultaten van een 2 jarig onderzoek gepresenteerd dat uitgevoerd is bij het Koipaleis Arnhem. Hierbij is het BWB systeem van Nexus onderzocht. De Nexus systemen zijn in de eerste jaar met Bacta-Totaal en later met Biogro opgestart. Bij dit onderzoek was het met name cruciaal om te weten of er sprake is van een totaal afbraakproces binnen de biofilm op het dragermateriaal Kaldnes type K1 en K3.

Arnhem 25-september 2007.

© Copyright vlg. de Europese richtlijnen.

Overdracht van de informatie aan derden zonder schriftelijke toestemming is verboden. Hetzelfde geldt voor het kopiëren (elektronische kopieën inbegrepen) van het document of een gedeelte daarvan.