

'N NUWE TOETSMEDIUM VIR EKO-TOKSIKOLOGIESE STUDIES
MET EISENIA FETIDA (OLIGOCHAETA).

H. BOUWMAN

DEPT. DIERKUNDE

POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR CHO

VERHANDELING VOORGELEË TER GEDEELTELIKE NAKOMING VAN DIE
VEREISTES VIR DIE GRAAD MAGISTER SCIENTIAE AAN DIE
POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR CHRISTELIKE HOËR ONDERWYS.

LEIER: PROF. A.J. REINECKE B.PROC.D.SC

POTCHEFSTROOM

MEI 1984

ABSTRACT

The need for a defined testmedium to determine the sublethal effects of pesticides on earthworms, was felt after it became apparent that the materials used up to now, were of a varying and unreproducible nature. The aim of this project was the development of a defined medium suitable for longterm exposure of agro-chemicals to an earthworm Eisenia fetida.

MCU-vermiculite (commercially obtainable) and various chemically defined food components were selected. Juvenile earthworms (age 20 days) reached maturity and cocoon production started 30 days after introduction. The worms can successfully be monitored for a period up to 60 days.

The sublethal effects of carbofuran was studied. Lethality occurred at exposure levels well below those reported in literature. The LD₅₀ value determined in the present study lies somewhere between 0,2 and 2,0 mg kg⁻¹. At the 2,0 mg kg⁻¹ level weight loss occurred and no cocoons were produced. No significant differences were measured between the control and 0,2 mg kg⁻¹ level. It was concluded that lower exposure levels than expected, had detrimental effects on the earthworms. It was also concluded that the medium developed in the present study, was successful.

In addition, other soil mesofauna and fungi were present in the medium. Various possible future study areas were identified. The microbiological component was identified as the main unknown factor in the medium, requiring further work.

INHOUDSOPGAWE

1	Inleiding	1
2	Materiaal en metodes	5
2.1	Die keuse van <u>Eisenia fetida</u> as proefdier	5
2.2	Die keuse van karbofuraan as gifstof	11
2.3	Die keuse van vermikuliet as matriks	18
2.4	Statistiese metodes gebruik in hierdie ondersoek	21
3	Prosedures en oorwegings vir, en die ontwikkeling van 'n geskikte medium	22
3.1	Seleksie van 'n geskikte vermikulietgraad as matriks vir die groeimedium	22
3.2	Die ontwikkeling van 'n groeimedium vir <u>Eisenia fetida</u>	26
3.3	Die ontwikkeling van ekstraksieprosedures vir karbofuraan	51
4	Bepaling van subletale effekte van karbofuraan op <u>Eisenia fetida</u>	56
4.1	Oorwegings en beplanning van 'n protokol	56
4.2	Die invloed van karbofuraan op die groeikoers van <u>Eisenia fetida</u> asook die bio-akkumulering van karbofuraan	59
4.3	Die invloed van karbofuraan op die ontwikkelingskoers van klitellums by <u>Eisenia fetida</u>	66
4.4	Die invloed van karbofuraan op die kokonproduksie en die kokonmassa van <u>Eisenia fetida</u>	68
4.5	Die invloed van karbofuraan op die uitbroeisukses en die nakomelingskap van <u>Eisenia fetida</u>	71
4.6	Die invloed van karbofuraan op die nematoodbevolking in die medium	74
4.7	Die fisiese veranderinge in die medium	77
4.8	Ander waarnemings	83
5	Die bruikbaarheid van die medium vir toksikologiese en biologiese studies	85
6	Opsomming	93
7	Bedankings	95
8	Literatuurverwysings	96
9	Bylaag	105

1 INLEIDING

1.1 Omskrywing van die probleemarea

Die raamwerk van ondersoek waarin die huidige studie onderneem is, is omgewingsvergiftiging. Dit is 'n uiters gekompliseerde raamwerk want by die verstommende kompleksiteit van wisselwerkings tussen al die biotiese en abiotiese komponente wat die totale omgewing uitmaak, word nog 'n faktor, nl. xenobiote, bygevoeg. Vanweë die vreemde aard van die verbindings, skep dit as't ware 'n nuwe dimensie van wisselwerking met al die natuurlike komponente. Xenobiote word normaalweg as omgewingsvreemde stowwe beskou, maar na mate die aanwendingspotensiaal van gesintetiseerde middels, soos die persisterende DDT, verminder, word weer eens na die natuur vir inspirasie gekyk. Met die gebruik van natuurlike produkte neem die gevaar egter nie af nie. Trouens, dit kan potensieel net soveel gevaar, alhoewel meer subtiel van aard, inhou. Die bestaan van hierdie gevaar moet vooraf bepaal word. Ons mag nie weer in 'n slagvat soos DDT en TCDD trap nie.

Laasgenoemde stelling impliseer dat alle verbindinge, voor registrering vir kommersiële gebruik, behoorlik as potensieële omgewingskontaminante geëvalueer moet word. Die rede dat dit nie vroeër gedoen is nie, is deels prakties en deels ekonomies van aard. Prakties was die beskikbare kennis oor wat waar beïnvloed word, asook die implikasies daarvan, nie betroubaar genoeg nie. Die ekonomiese probleem is dat die produk so gou moontlik op die mark gebring moet word. Evaluering van so 'n produk neem tyd in beslag en alhoewel daar oorsee vordering met die bio-evaluering van plaagbestryders op vertebrate en artropode gemaak is, bly daar tog 'n aansienlike mate van onsekerheid oor die produk bestaan. Die onsekerheid is veral daarin geleë dat subletale effekte van die verbinding op nie-teikenorganismes, en in baie gevalle selfs voordelige invertebrate, in die oorgrote meerderheid van gevalle nie bepaal word nie. Hierdie tekort aan kennis moet deels toegeskryf word aan die gebrek aan betroubare bio-evalueringmetodes en deels aan onkunde aangaande die biologie en belang van die diere wat met die xenobiot in aanraking kom.

Die noodsaaklikheid van die evaluering van subletale parameters kan in die biologiese belang van die onversteurde parameters vir die organisme gesoek word. Versteuring in die gedrag kan voedselverkryging benadeel en kan die bevolking sodanig negatief affekteer dat die voortbestaan van die bevolking bedreig kan word. Voortplanting is 'n ander belangrike parameter wat, indien versteur word, nadelige gevolge vir die bevolking kan inhou. Dit is dus duidelik dat veral die subletale bio-evaluering van diere (hetsy voor- of nadelig) van net so 'n groot belang as die bekende LD₅₀ ondersoek is. Hierdie data kan nie na subletale vlakke geëkstrapoleer word nie, aangesien die dier vir 'n geruime tyd vir ander parameters as net mortaliteit gemonitor moet word.

1.2 Die noodsaaklikheid van gestandaardiseerde metodologie

Die studie wat onderneem is, is 'n poging om metodes te standardiseer sodat betroubare data i.v.m. die subletale effekte van xenobiote op grondorganismes ingewin kan word. Aan die hand

van enkele studies wat reeds onderneem is, kan die rasionaal van die benadering verduidelik word.

Erdwurms speel 'n belangrike rol in die omgewing (Edwards & Lofty, 1977, p.190-199, Edwards, 1980, p.10, Hayes, 1983, p.19-33). Aangesien die oorgrote meerderheid van xenobiote met die matriks waarin die erdwurm lewe in aanraking kom, sal die erdwurm noodwendig ook in kontak met die verbindings kom. Heelwat veldstudies is al oor die invloed van landbouchemikalieë op erdwurms gedoen (Thompson & Sans, 1974, p.305-308, Fuhremann & Lichtenstein, 1978, p.605-610, Beyer & Gish, 1980, p.295-307, Atlavinyte, Lagauskas & Kilikevicius, 1980, p.13-24, Lofs-Holmin, 1981, p.141-147), maar onderlinge vergelykbaarheid is vanweë die aard van veldstudies nie moontlik nie.

Gronde toon 'n oneindige variasie van baie eienskappe soos pH, klei-inhoud, organiese inhoud en vog. Al hierdie variasies oefen 'n ewe komplekse invloed op die erdwurm asook op die invloed van die gifstof (afbreekkoers, biologiese beskikbaarheid en adsorpsie) op die organisme uit. Dit moet beklemtoon word dat data verkry met veldstudies nie onbelangrik is nie, maar dat ekstrapolasie na ander gronde slegs met voorbehoud gedoen kan word (Lofs-Holmin, 1980, p.26). Die rede is dat die faktore wat 'n rol speel nie beheer kan word nie, en die onderlinge wisselwerking slegs met groot moeite bepaal of beskryf kan word.

Die behoefte aan 'n kontroleerbare toetsmedium is maar enkele jare gelede besef. Die behoefte word ook deur Venter (1983, p.25) gemeld. Vordering na 'n meer kontroleerbare toetsmedium is reeds deur enkele outeurs gemaak. Edwards (1978, p.1-7) beskryf 'n protokol vir die evaluering van gifstowwe op Eisenia fetida (as 'n biologiese monitor) vir gebruik deur E.E.G-lande by die monitering van grondbesoedeling. Die medium wat die outeur voorstel word uit 70 % sand, 20 % kaoliniet klei en 10 % spagnummos saamgestel. Edwards (1978, p.4) stel dat E. fetida vir lang periodes in die medium sal bly lewe. Hy stel voor dat mortaliteit en massaverandering van die wurms na 7 en 14 dae bepaal, en dat die periode opsioneel na 28 dae verleng kan word. Die herhaalbaarheid van die samestelling van die medium kan egter bevraagteken word. Alhoewel die samestelling van elke komponent, waar moontlik, gegee word, sal laboratoriums wat nie toegang tot bv. dieselfde sand en spagnummos as Rothamsted Experimental Station het nie, nie dieselfde medium kan voorberei nie. Lofs-Holmin (1980, p.27) het met grond en mis in 1:1 en klei, mis en mos in 1:1:1 verhoudings gewerk. Alhoewel sy nie met E. fetida gewerk het nie, het sy met die mediums goeie resultate in haar studies oor die invloed van gifstowwe op verskeie biologiese parameters van vier erdwurmspesies oor periodes van 60 tot 120 dae verkry. Die moeilik herhaalbare aard van die komponente van die medium, veral in 'n ander land, spreek vanself. Karnak & Hamelink (1981, p.216-222) stel 'n medium soortgelyk aan die van Edwards (1978) voor maar gebruik 50 gram konynmis vir elke 100 gram sand-leem grond. Hulle het Lumbricus terrestris as biologiese indikator gebruik. Venter (1983, p.29) het suiwer beesmis as medium vir die bepaling van subletale effekte van dieldrien op E. fetida gebruik.

Die moeilik-herhaalbare aard van veral die biologiese komponent

van die gemelde mediums, is duidelik. Spagnummos, mos, beesmis en konynmis is moeilik om te standardiseer. Die faktore wat die samestelling van die produkte die meeste beïnvloed, is seisoen en lokaliteit en in die geval van bees- en konynmis is veral voedselverskeidenheid vir die produsent ook van belang.

Al die bogenoemde outeurs het die belangrikheid van 'n gestandaardiseerde toetsmedium besef. Die mediums wat hulle gebruik het, kan net as gedeeltelik gestandaardiseer beskou word. Die studie is onderneem in 'n poging om hierdie tekortkoming te probeer oorkom.

Die medium wat benodig word en ontwikkel moet word, moet aan die volgende eienskappe voldoen:

1 Al die komponente moet verkieslik kommersieel beskikbaar wees. Die komponente moet suiwer en so ver as moontlik gedefinieer wees. Hoë kwaliteit laboratoriumchemikalieë is verkieslik. Herhaalbaarheid word hierdeur verseker.

2 Die medium moet so ver moontlik veldtoestande simuleer.

3 Die medium moet die organismes vir 'n periode van minstens 30 dae sonder nadelige effekte kan onderhou.

4 Voldoende biologiese parameters moet as indikator van subletale effekte beskikbaar wees. Hierdie parameters moet verkieslik oor die hele periode van blootstelling gemonitor kan word.

5 Die geskiedenis van die xenobiot wat geëvalueer word, moet in beide die medium en indikatororganisme bepaal kan word.

1.3 Benadering tot die ondersoek

Vanuit die bogenoemde eienskappe waaraan die medium moet voldoen, kan die benadering vir die ondersoek afgelei word. Die ondersoek kan in twee duidelike fases verdeel word.

Eerstens berus die ontwikkeling van 'n aanvaarbare groeimedium op 'n ondersoek na veral die voedselbehoefte van E. fetida, die wurm geselekteer as primêre biologiese indikator vir die huidige studie. Verskeie ondersoeke is al na voedselbehoefte gedoen, maar die doel van die ondersoek impliseer dat al die toegevoegde komponente chemies gedefinieer moet wees. So 'n ondersoek is deur Neuhauser, Kaplan, Malecki & Hartenstein (1980, p.45) gedoen, maar geen noemenswaardige sukses is behaal nie. Die waarskynlike redes hiervoor sal dan deur 'n indringende studie uitgewys kan word.

Tweedens sal die sukses van 'n medium wat aan die voorskrifte voldoen, afhang van die bruikbaarheid van die medium om subletale effekte, veroorsaak deur die toevoeging van 'n xenobiot, te bepaal. Dit behels dus die ontwerp van 'n geskikte protokol vir blootstellingstudies. Nie net die effekte op die indikatororganismes nie, maar ook die geskiedenis (ekstraksie en analise van die oorspronklike verbinding sowel as die afbraakprodukte daarvan) moet gevolg kan word.

Die aanbieding van die resultate word duidelikheidshalwe as volg
gedoen. Die ontwikkelingswerk vir 'n groeimedium behels verskeie
eksperimente waarvan die interpretasie van 'n eksperiment direk
tot die bepaling van die volgende eksperiment aanleiding gee.
Die bespreking van elke eksperiment word dus direk na die
resultate gegee. Hiermee word gepoog om die redenasiegang in 'n
logiese en kronologiese volgorde aan te bied. Aan die hand van
die data wat tydens die tweede fase verkry is, kan die
bruikbaarheid en tekortkominge van die medium en protokol afgelei
word.

2 MATERIAAL EN METODES.

2.1 DIE KEUSE VAN EISENIA FETIDA AS PROEFDIER

2.1.1 Agtergrond

Eisenia fetida (Savigny, 1826) behoort aan die filum Annelida, klas Oligochaeta, familie Lumbricidae en subfamilie Diporodrilinae (Easton, 1983,p.480). Die ou benaming "Eisenia foetida" het verval (Easton, 1983,p.480). Die wurm kom wydverspreid in al die kontinente asook op heelwat eilande voor. Die wurm kom ook wydverspreid in Suid-Afrika voor. Dit is juis hierdie kenmerke (algemene verspreiding en habitat) wat van E. fetida 'n geskikte eksperimentele dier maak. 'n Belangrike voorvereiste vir die voorgestelde en soortgelyke eksperimente, is dat genoegsame kennis oor die biologie van die eksperimentele dier beskikbaar moet wees. 'n Literatuurstudie oor die onderwerp ruim hierdie twyfel uit die weg, aangesien heelwat kennis i.v.m. erdwurms in die algemeen en E. fetida in die besonder beskikbaar is. Die verskeidenheid en hoeveelheid werk wat reeds gedoen is, is baie omvangryk. Die een eienskap wat almal in gemeen het, is dat die outeurs saamstem dat al die moontlikhede nog lank nie uitgeput is nie.

Die werk wat al gedoen is, sluit navorsing vanuit alle subdissiplines van die biologie in. Die eerste moderne navorsing kan teruggevoer word na die einde van die vorige eeu met die werk wat Darwin gedoen het en wat gelei het tot die publikasie van sy bekende boek in 1881. Sedertdien is 'n verstommende hoeveelheid werk oor die taksonomie, fisiologie, ekologie en biochemie gedoen. Die studieveld van eko-toksikologie is een van die jongste toevoegings en het onlangs nuwe momentum verkry met die besluit van die EEG (Europese Ekonomiese Gemeenskap) om erdwurms (spesifiek E. fetida) as verteenwoordiger van die terrestriële omgewing te gebruik om grondbesoedeling te monitor (Edwards,1978,p.1).

*2.1.2 Beskrywing van die wurm.

Die identifikasie van die spesie gebruik in hierdie ondersoek is deur Reinecke gedoen (persoonlike kommunikasie). E. fetida is 'n kleinerige, rooi gekleurde wurm wat algemeen in komposhope, mis en organiesryke grond voorkom. Hierdie voorkeur was van groot belang vir die ontwikkeling van die toetsmedium. Heelwat aanduidings oor die aard van die medium kon hieruit afgelei word.

Die wurms weeg gemiddeld 0,5 gram, maar massas van meer as een gram is al gemeet. Die gemiddelde kokonproduksie per wurm is ongeveer 0,5 kokonne per dag onder optimale kondisies. Die inkubasieperiode van die kokonne wissel tussen drie en vyf weke met 'n gemiddelde nakomelingskap van ongeveer 2,5 wurmpies. Die massas van die pas uitgebroeide wurmpies verskil baie en die groter wurmpies het 'n vinniger groeikoers as die kleintjies (Venter,1983,p.13). Dit is 'n natuurlike variasie waarmee rekening gehou moet word. Geslagsrypheid (ontwikkeling van klitellums) word onder optimale kondisies 40 dae na uitbroeiingbereik. Dit moet egter beklemtoon word dat hierdie waardes nie as konstantes gebruik kan word nie, maar a.g.v. moontlike kondisieveranderinge,

moet parallelverlopende kontroles uitgevoer word
(Venter, 1983, p.11-12).

E. fetida is vanweë bogenoemde eienskappe uitstekend geskik vir studie, veral ook aangesien die groei en aanwas van die dier in vergelyking met ander erdwurmspesies vinnig is en dus baie bruikbare en meetbare parameters bied (Venter, 1983, p.112). Dit impliseer 'n hoë aktiwiteit van die wurm om genoegsame energie en dus voedsel te bekom. Die verdere implikasie hiervan is dat die medium goed deurwerk word sodat die wurm met alle stowwe, hetsy natuurlik of xenobioties van aard, in aanraking kom.

2.1.3 Die aanhou en teel van eksperimentele diere

Wurms is op 'n kontinue basis in die laboratorium in asbesbakke geteel. Die bakke is in 'n Convicon klimaatkabinet gehou waar 'n konstante temperatuur van 25 °C en 'n relatiewe humiditeit van 75% gehandhaaf is. Dit was dan ook die kondisies wat tydens die eksperiment gehandhaaf is. Voedsel in die vorm van gedroogde beesmiskoeke is periodiek bygevoeg. Hierdie bakke is gebruik as bron van kokonne. Kokonne met 'n helder geel kleur is hieruit versamel. Die rede hiervoor is dat kokonne wat onlangs geproduseer is, heldergeel van kleur is en gevolglik kan kokonne van ongeveer dieselfde ouderdom herken word. Die wurmpies broei dan binne 'n korter tydspan uit en meer wurmpies van dieselfde ouderdom kan dan verkry word. Twee kokonne is per sel, wat met gedistilleerde water gevul is, in multiselhouers geplaas. Die houers is periodiek ondersoek en wurmpies wat uitgebroei het, is verwyder en in 'n vermikuliet medium wat met soutoplossing benat is, geplaas. Vir die samestelling van die soutoplossing kyk 3.3.

Die vermikulietmedium het geen voedsel bevat nie, maar is andersins nie nadelig nie, sodat die wurmpies sonder probleme vir 'n week of twee daarin kon bly lewe. Indien die wurmpies vir langer as twee weke daarin gehou word, kan 'n skielike vernietigende swamgroeï die wurmpies laat vrek. Die faktore wat die swamgroeï inisieër is onbekend, maar kultuur is al langer as vier weke suksesvol aangehou. Sodra genoeg wurmpies versamel is, is die kultuur tesame met die vermikuliet in 'n voorbereide mismedium geplaas. Die voorbereiding behels die week van miskoeke in water totdat dit sag is. Hierna word dit met die hand fyngemaak en in 'n lagie van ongeveer drie sentimeter in 'n vlak metaalbak geplaas. Tydens weking (ongeveer vier dae) het die mikrobiese aktiwiteit toegeneem sodat verdere kondisionering nie nodig was nie. Na byvoeging van die wurmpies is die bak in 'n swart plastieksak geplaas om vogverlies te bekamp. Die bak is dan vir twintig dae onversteurd in die klimaatkabinet gelaat.

'n Periode van twintig dae is gekies omdat die wurmpies dan ongeveer 0,05-0,1 gram weeg wat hantering heelwat vergemaklik het. Dit verminder ook die moontlikheid van beskadiging tydens hantering, terwyl beskadiging ook duideliker waarneembaar is as wanneer met pas uitgebroeide wurmpies gewerk word. 'n Mate van seleksie kon in die twintig dae plaasgevind het. So sal wurmpies, wat a.g.v. 'n genetiese defek of beskadiging tydens die uitbroeiproses abnormaliteite vertoon, nie vir eksperimentele doeleindes geselekteer word nie. Die wurmpies wat abnormaliteite

toon, gaan of tot niet of ontwikkel nie. Aangesien alle nakomelinge gebruik is en seleksie ook plaasgevind het, kan beweer word dat met verteenwoordigende organismes gewerk is. In die natuur vind daar ook seleksie plaas en dit word waarskynlik op hierdie manier in die laboratorium tot 'n mate gesimuleer.

Waarnemings in die laboratorium het getoon dat waterinhoud 'n groot rol by groei en voortplanting van E. fetida speel. Groei of voortplanting, of beide, word nadelig deur 'n oormaat of tekort beïnvloed (ongepubliseerde resultate). Die voginhoud van die medium wat gebruik is om die wurmpies vir 20 dae aan te hou, was ongeveer 72% en die plastieksak het vogverlies tot 'n minimum beperk. Dieselfde medium is gebruik om as medium vir die kontrole te dien. Dit het verseker dat die aanpassingsperiode wat andersins sou gevolg het om by 'n nuwe medium aan te pas, uitgeskakel is. Al wat dus gebeur is dat die wurms in 'n sekere ontwikkelingsstadium, in hierdie geval na 20 dae, geweeg is en toe in dieselfde medium maar in 'n ander houer teruggeplaas is. Dit is gedoen om die invloed wat die kunsmatige medium op veral die aanvanklike, maar ook die latere ontwikkeling van die wurms het, te kan bepaal.

Ondersoeke deur ander outeurs verskil oor die mees geskikte voginhoud. Kriel (1980,p.9) het by 'n voginhoud van ongeveer 80% gewerk, Venter (1983,p.17) het by 50% gewerk en Neuhauser et al. (1980,p.349) beveel 'n voginhoud van tussen 70 en 85% aan. Dit dui weer eens op die inherente probleme verbonde aan 'n ongestandaardiseerde medium. Die waterinhoud is in die finale eksperiment elke 10 dae bepaal. Ongeveer 30 gram van die medium is in 'n glas petribakkie afgeweeg, waarna die voginhoud op die konvensionele oonddroogmetode (80 °C vir 24 uur) bepaal is.

'n Probleem wat wel opgeduik het, is dat die flesse vir wegings en ondersoek uit die klimaatkabinet verwyder en die medium deursoek moes word. Dit bring outomaties die vraag na vore of die invloed van versteuring op die medium enige nadelige gevolge vir die medium of die wurm of enige ander komponente (biologies of fisies) kan inhou. Dit is 'n faktor wat in gedagte gehou moet word. 'n Voorbeeld van 'n moontlike versteuring is dat in enige medium mikrohabitatte voorkom wat mag verskil van die res van die medium (Rice & Paul,1971,p.1055). Fakultatiewe anaerobe mikroörganismes (bv. Clostridium pasteurianum) kan 'n subhabitat skep waarin die atmosferiese kondisies van die res van die medium verskil. Blootstelling van die subhabitat aan lig of lug of beide kan versteuring, wat voor- of nadelig mag wees, veroorsaak. Die moontlikheid is nie uitgesluit dat sulke mikrohabitatte 'n voordeel vir erdwurms mag inhou nie. Ander organismes wat teenwoordig is, mag ook met blootstelling aan lig beïnvloed word. Vrylewende nematode, en moontlik ook Enchytraeidae kom in baie substrate voor (Wallwork,1970,p.66) en alhoewel die biologiese wisselwerking nie bekend is nie, is dit heel waarskynlik dat versteuring van 'n biologiese komponent die erdwurm mag bevoordeel of benadeel. Dit is ook so dat die invloed van versteuring kan verskil na gelang van die medium wat gebruik is. In 'n poging om hierdie probleem te omseil, is daar aanpassings in die finale eksperiment gemaak (kyk 4.1). In die finale eksperiment is die nematoodgetalle gemonitor. Die ekstraksietegniek van Jenkins (1964,p.692) is gebruik.

2.1.4 Hantering van die erdwurms

Dit is vanselfsprekend dat eksperimentele diere versigtig behandel moet word. Tog is daar sekere aspekte wat uitgelig moet word om kontinuïteit in prosedures te verseker.

*Eerstens sluit fisiese hantering van die wurms die moontlikheid van beskadiging nie uit nie. Daar moet seker gemaak word dat alle voorwerpe waarmee die wurm in aanraking kom nie met chemikalieë gekontamineer mag wees nie. Spatels en weegbakkies wat vir die afweeg van chemikalieë gebruik word, is apart van die gebruik vir die hantering van wurms, gehou. Hande is gewas voordat die wurms enigsins gehanteer is. Chemikalieë (veral oplosmiddels) is nie in die omgewing van die diere gebruik nie.

*Die medium is m.b.v 'n breë spatel deursoek, aangesien ondervinding geleer het dat dun en smal spatels die wurms maklik beskadig. Sommige van die mediums het taai en klontkerig vertoon en die deursoek hiervan vir kokonne en wurms was moeilik, aangesien die klonte gebreek moes word en die wurms hierin maklik beskadig is. Na verwydering van die wurms uit die medium is die wurms in gedistilleerde water, met dieselfde temperatuur as die medium (25 °C), geplaas. Die materiaal wat nog aan die wurm kleef, is hierdeur verwyder. Hierna is die wurm op filtreerpapier gedroog. Ondervinding het geleer dat filtreerpapier wat droog is meer water opneem as filtreerpapier wat na 'n paar wegings klam geword het. Een vel kladpapier (Whatman no. 3, 15 cm deursnee) is gevolglik met gedistilleerde water klamgemaak en onder 'n droë vel filtreerpapier geplaas. Vog het die boonste vel klam gehou sodat droging van die wurms nie uitdroging veroorsaak het nie. Die wurm is dan na 'n weegbakkie met gedistilleerde water (25 °C) op die pan van die balans oorgedra en die massa is genoteer. Alle wegings is met dieselfde balans (Sauter AR 100) gedoen.

Wanneer die medium vir kokonne deursoek is, is die houer op 'n skinkbord omgekeer, die wurms dadelik verwyder, en in dieselfde houer teruggeplaas. Die medium is twee keer met 'n spatel deurgewerk en kokonne is apart in 'n sel van 'n multiselhouer, gevul met gedistilleerde water, geplaas. Die medium is dan weer in die houer teruggeplaas sodat die hele prosedure nie langer as vyf minute duur nie. In die finale eksperiment is die massa van elke kokon bepaal. Dieselfde prosedure as die vir die bepaling van die wurmmassa is gevolg. Versteuring van die wurms vind wel plaas, maar dit is onvermydelik. In die finale eksperiment is gepoog om hierdie invloed te minimaliseer deur slegs twee of drie flesses vir monsterneming te gebruik en die res onversteurd te laat (kyk 4.1). Die houters met die kokonne is in dieselfde klimaatkabinet geplaas en is gereeld vir pasuitgebroeide wurmpies deursoek. Hierdie nakomelinge is getel en verwyder.

2.1.5 Die aard en beskikbaarheid van voedsel vir E. fetida

Die aard en beskikbaarheid van voedsel is die aspek waarvan die sukses van die studie grotendeels afgehang het. Die voorkeurhabitat van E. fetida is ryk aan organiese materiaal van plantaardige oorsprong. Aangesien sellulose 'n hoofkomponent van

plante is (Neuhauser, Hartenstein & Connors, 1978, p.431), het Neuhauser, Kaplan & Malecki (1980, p.53) eksperimente gedoen om die invloed van suiwer koolhidraatbronne te bepaal. In 'n medium van suiwer sellulose het die wurms dit wel ingeneem maar 'n massa-afname getoon. In sellulose gemeng met rioolslik, het die wurms egter 'n normale groeikoers getoon. Dit blyk uit bogenoemde outeurs se waarnemings dat teenwoordigheid van meerdere voedselkomponente noodsaaklik vir volgehoue groei van die wurms is. Edwards & Lofty (1977, p.99) noem dat E. fetida twee proteases en een amilase-ensiem in die spysverteringskanaal afskei. Sellulase en chitinase is ook gevind, maar is waarskynlik gevorm deur simbiotiese bakterië of protosoë soos in ander invertebrate.

Die vermoede bestaan dat erdwurms nie op sellulose alleen voed nie, maar wel grotendeels op sellulolitiese bakterië wat sellulose as koolhidraatbron benut. Neuhauser et al. (1980, p.46) het ook bevind dat toevoeging van sekere bakterië (bv. Pseudomonas fluorescens), fungi (bv. Aspergillus niger) en protosoë (bv. Euclena gracilis) 'n betekenisvolle massatoename (10-25%) by E. fetida teweeg bring. Dit blyk dus duidelik dat die mikrobiëse komponent, asook die aard hiervan, van groot belang is. Alhoewel 'n ondersoek na die samestelling van die mikrobiëse komponent van belang is, en selfs gewens is, is net 'n voorlopige ondersoek i.v.m. die samestelling daarvan gedoen.

Aangesien proteïene ook in plante voorkom, moes 'n stikstofbron in die medium voorsien word. Weer eens speel die mikrobiëse komponent 'n besliste rol deurdat koolhidrate metabolies na proteïene verwerk word, wat dan weer deur die wurm vir verdere metabolisme benut kan word.

DNA en RNA wat ook van plantreste afkomstig is, kom ook in die grond voor. Dit is nie bekend of erdwurms dit kan metaboliseer nie maar die afbraakprodukte a.g.v. die werking van nuklease, geproduseer deur grondorganismes, sluit verbindings soos puriene, purimidiene, ribosesuikers en anorganiese ortofosfaat in (Cortez & Schitzer, 1981, p.173). Een of meer van hierdie komponente kan sekerlik deur die erdwurm benut word.

Ander verbindings wat in die grond teenwoordig is, is wasse, fosfolipiede, en kutiene wat na quinoïede strukture afgebreek kan word. Dit komplekseer in die grond met ander eenvoudige verbindings, veral aminosure en aminosuikers, maar ook met ander C-, H-, O-, N-, P- en S-bevattende verbindings, om groot polimere strukture, genaamd humussure, te vorm. Die basiese ketting van die polimeer is polifenole afkomstig van die fenole van plantreste (Sivapalan, 1981, bl.331, Hayes, 1983, p.21). Biologiese aktiwiteit kan hierdie verbindings afbreek na kleiner verbindings wat deur ander organismes, soos erdwurms of ander grondinvertebrate, gebruik kan word (Hartenstein, 1982, p.598).

Die pH van die voedingsmedium is van uiterste belang. E. fetida verkies 'n pH tussen 7 en 8 (Edwards & Lofty, 1977, p.149). Erdwurms is baie gevoelig vir die waterstofioonkonsentrasie. Enige verandering in die pH moet dus klein wees. Die pH speel ook 'n groot rol in die adsorpsie van verbindings op klei. In die finale

eksperiment is die pH van die medium op 'n gereelde basis bepaal. Presies 10 gram van die medium is in 'n bekertjie afgeweg en 0,05 dm³ gedistilleerde water is bygevoeg en geroer. Die pH is dan met 'n Labion pH-meter, gekalibreer met 'n buffer van pH 7,0, bepaal.

Anorganiese soute is ook aanwesig en speel 'n rol in osmose, adsorpsie en as bron van spoorelemente. Die elemente Na, K, Ca, Mg en P is deur die Grondkundeseksie van die Landbou Navorsing Instituut te Potchefstroom gedoen. Vir die bepaling van P is 'n auto-annaliseerder gebruik en die ander elemente is met 'n Varian AA 775 atoomabsorpsiemeter bepaal.

2.1.6 Ander eienskappe

'n Besondere eienskap van E. fetida is dat die wurm 'n geel vloeistof afskei wanneer dit versteur word. Deur metanoldampe oor die wurm te blaas kan die geel vloeistof maklik verkry word. Hierdie vloeistof is geanaliseer en een van die komponente hiervan is riboflavin (Wenig & Kubista, 1949, p.73). Die doel van die afskeiding is nie bekend nie maar dien waarskynlik as 'n afskrikmiddel, kommunikasiemiddel, of dit het 'n moontlike bakteriostatiese of bakteriosidiese funksie (Roch, Valembos, Davant & Lassegues, 1981, p.829). Die metaboliese voorganger van riboflavin in gisselle is guanisien, 'n komponent van DNA en RNA. Riboflavin word net in plante, mikroorganismes en gisselle geproduseer, nie in diere nie. Riboflavin word gebruik vir die sintese van FAD (flavin-adenien-dinukleotied) en FMN (flavin-mononukleotied) (White, Handler & Smith, 1973, p.729 en 1158).

'n Ander interessante aspek is die voorkoms van twee verskillende asetielcholinesterases in die senuweestelsel van die wurm. Dit kan die weerstandbiedendheid van erdwurms teen sekere asetielcholinesterase-inhiberende gifstowwe (bv. karbofuraan) verklaar, deurdat net een van die twee geïnhibeer kan word terwyl die ander een nog relatief aktief kan bly. Alhoewel die uitwerking nie letaal is nie, kan subletale veranderinge wel voorkom wat dan die ekologie kan versteur.

2.2 DIE KEUSE VAN KARBOFURAAN AS GIFSTOF

2.2.1 Geskiedenis

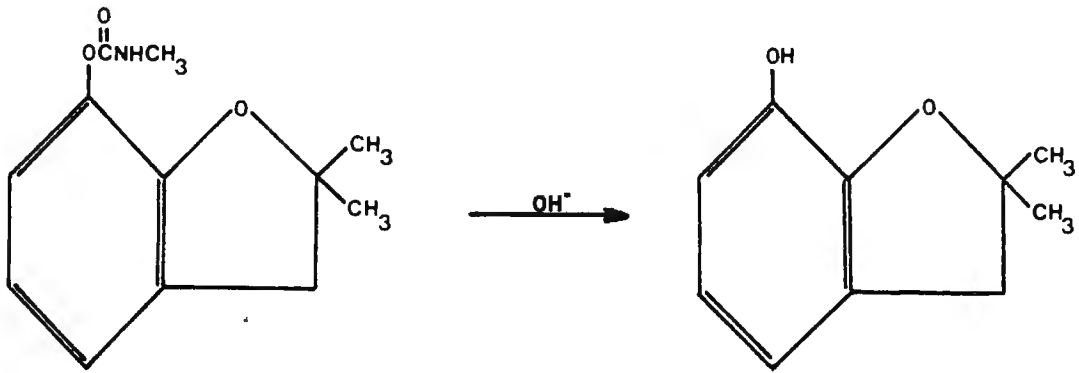
Die ontstaan van karbamaatgifstowwe is te danke aan 'n gebruik van Wes-Afrikaanse stamme in die 17de en 18de eeue om toordokters te straf. Hulle is gedwing om 'n moes van calabarbone (Physostigma venosum) te drink. Indien die arme drommel gelukkig was, het hy die moes uitgebraak en sodoende sy onskuld bewys. Die "skuldiges" het 'n vinnige, maar pynlike dood gesterf. In die middel van die 18de eeu is die plant vir studie na Skotland geneem en die aktiewe bestanddeel is as 'n alkaloid geïdentifiseer. In 1870 is bevind dat atropien 'n effektiewe teenmiddel is, maar dit het ook geblyk dat die alkaloid self 'n teenmiddel teen kurarevergiftiging was. Die naam van die alkaloid was fisostigmien, en dit is later gebruik om glaukoma, oogaandoenings en ander siektes te help genees. Daar is later vasgestel dat fisostigmien, asetielcholinesterase inhibeer. Oor die meganisme sal later uitgebrei word. Dit is hierdie eienskap wat die ontwikkeling van analoë verbindings gestimuleer en uiteindelik na die sintese van pestisiede gelei het. Karbariel is in 1953 vrygestel en is die eerste karbamaat wat in groot hoeveelhede bemark is. Karbariel is 'n N-metielkarbamaat wat as insektisied aangewend is. 'n Ander gifstof wat in Suid-Afrika van belang is, is karbofuraan wat as breëspektrum plaagdoder en nematisied aangewend word. Karbofuraan is ook 'n N-metielkarbamaat, maar het 'n sistemiese werking wat karbariel nie het nie (Khur & Dorrough, 1976, p.2-7).

Karbofuraan word in Suid-Afrika gebruik vir die bestryding van nematode op mielies en suikerriet, diamantmotte op Cruciferae stamoorwurms op mielies en sorghum en kewers op tabak (Bot & Hollings, 1981, pp.22, 113, 134, 189 en 200). Vanweë die algemene gebruik van die pestisied, asook die belangstelling wat plaaslik bestaan a.g.v. die werk wat op plantparasitiese nematode gedoen word, is karbofuraan as evalueringsgifstof gekies. Die ekstraksie en analise van karbofuraan is ook redelik eenvoudig. Aangesien slegs 'n elektronvangsdetektor beskikbaar was, moes derivatisering na 'n bepaalbare verbinding moontlik wees. Karbarielstandaarde was moeilik bekombaar en die wat beskikbaar was, was oud en gekontamineer. Die ekstraksie- en analiseprosedure word in 3.3 bespreek.

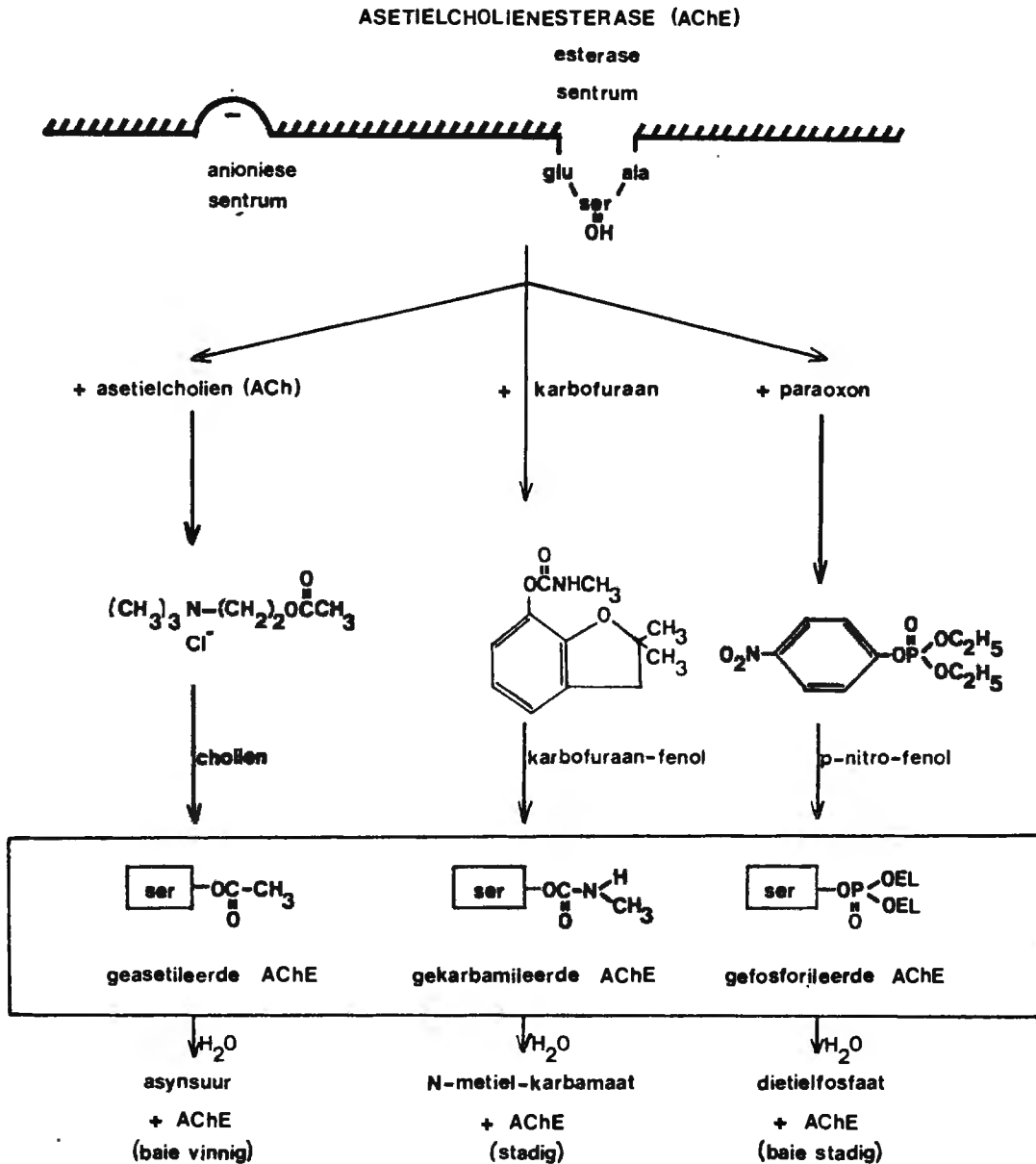
2.2.2 Algemene beskrywing en aanwending van karbofuraan

Die volledige chemiese naam van karbofuraan is 2,3-dihidro-2,2-dimetiel-7-besofuraniel N-metielkarbamaat. Die struktuurformule word in figuur 1 gegee. Die formulاسies van karbofuraan word onder die name Curater (10%, Bayer) en Furadan (2%, 3%, 5% of 10% aktiewe bestanddeel, Niagara Chemical Division) bemark. Produksie van karbofuraan in die VSA was in 1971 3,63 miljoen kilogram teenoor die 24,9 miljoen kilogram vir karbariel.

Karbofuraan is 'n breëspektrum insektisied en nematisied met 'n relatiewe lang halfleef tyd in grond (ongeveer 30 tot 60 dae). Karbofuraanaktiwiteit word verkry deur kontak, inname of sistemiese toediening. Die orale LD₅₀ vir rotte is 11 mg kg⁻¹, maar



Figuur 1. Die struktuurformule van karbofuraan en die produk van alkaliese hidrolise, karbofuraan-fenol (aangepas uit Kuhr & Dorough, 1970.p.16)



Figuur 2. Asetielcholiënesterase-inhibisie met karbofuraan en paraoxon. Inhibering is die gevolg van kompetisie van die xenobiote met asetiëcholin (links) (aangepas uit Mummel 1990 p. 620)

vir konyne is die dermale LD₅₀ meer as 10000 mg kg⁻¹. Probleme a.g.v. kontak deur gewerwede diere is dus min, maar 'n wesentlike gevaar met orale inname of inaseming bestaan wel (Khur & Dorough, 1976, pp. 7 en 18).

2.2.3 Chemiese eienskappe en reaksies

Karbofuraan is 'n wit kristallyne stof en het 'n molekulêre massa van 221. Dit het 'n effense fenoliese reuk, 'n smeltpunt van 153-154 °C en 'n dampdruk van $2,719 \times 10^{-4}$ kg m⁻² by 33 °C. Dit het 'n digtheid van 1,180 kg dm⁻³ by 20-25 °C en 'n wateroplosbaarheid van 0,07% (Khur & Dorough, 1976, p.18).

Die hoë smeltpunt en lae dampdruk maak van karbofuraan 'n ideale laboratoriumreagens. Karbofuraan is oor die algemeen stabiel alhoewel hoë temperature en pH 'n vinnige afbraak in waterige oplossings veroorsaak. Karbofuraan is geredelik oplosbaar in die meeste organiese oplosmiddels maar is baie min oplosbaar in water. Direkte analise m.b.v. gaschromatografie is moeilik, aangesien afbraak by die vereiste temperature voorkom. Chemiese stabilisering is dus noodsaaklik.

Karbofuraan ondergaan baie maklik alkaliese hidrolise (ook in die omgewing) en die produk van die reaksie is die ooreenstemmende fenol (sien fig 1). Die rede vir die persisterendheid van karbofuraan is die substituent op die karbamaatstikstofatoom. Substitusie deur 'n metielgroep (-CH₃) stabiliseer die karbamaat-esterband meer as etiel-, feniel- of n-propielsubstitusie. Die groepe op die fenielring lewer ook 'n groot bydrae tot die stabiliteit van die verbinding. Groepe wat elektrone in alkaliese medium onttrek, veroorsaak 'n resonanseffek wat elektrone aan die karbamaat-esterband onttrek en sodoende alkaliese hidrolise bevorder. Hierdie gegewens voorspel 'n eerste-orde reaksie vir die afbraak van karbamate, d.w.s. die waterstofioonkonsentrasie en die karbamaatkonsentrasie speel 'n rol in die reaksiekinetika. Hierdie voorspelling is deur konsentrasieveranderinge bewys (Khur & Dorough, 1976, p. 20).

Die voorgestelde meganisme vir afbraak behels die verwydering van die N-proton deur die hidroksielioon om 'n onstabiele intermidiêre produk te lewer wat ontbind na N-metielkarbamaatsuur en die fenol. Die N-metielkarbamaat reageer met water en vorm metielamien (CH₃-NH₂). Hierdie eienskap vorm die grondslag vir die chemiese stabilisering van karbofuraan na 'n gaschromatografies bepaalbare verbinding (kyk 3.3).

Die afbraak van karbamate is baie stadig onder suur toestande en die meganisme is nog onbekend (Khur & Dorough, 1976, p.20-21).

2.2.4 Die werking van karbofuraan

Die sensuweestelsel is die teikengebied van die meeste gifstowwe. Verstoring in hierdie belangrike reguleringstelsel kan slegs vir 'n baie kort periode oorleef word. Dit is dus duidelik dat die sensuweestelsel die aangewese teiken is. Alhoewel die meganisme van sinapsoordraging by die teiken- en nie-teiken organismes grotendeels ooreenstem, is daar wel biochemiese en fisiologiese

verskille wat selektiwiteit tot gevolg het. Die bestudering van hierdie selektiwiteit is belangrik, omdat dit tot die ontwikkeling van nuwe en ekologies-veiliger gifstowwe kan lei. Dit verbreed ook ons kennis van die plaagorganisme sodat beter en effektiewer beheer toegepas kan word.

In die liggaam van die meeste organismes kom twee tipes sinapse voor. Die verskil is die gevolg van die tipes oordragstowwe wat by elk funksioneel is. Die somatiese sisteem word deur die cholinergiese tipe oordragstowwe bedien, terwyl die outonome stelsel deur adrenergiese oordragstowwe bedien word. Wanneer 'n impuls die sinaps bereik, moet dit na die volgende sel oorgedra word. Oordragstof word vrygestel en depolariseer die postsinapsmembraan. Na depolarisasie moet die werking van die oordragstof geïnhibeer word om kontinue depolarisering te voorkom. In die sinapsspleet kom 'n ensiem, asetielcholinesterase, by cholinergiese sinapse en monoamienoksidase by die adrenergiese sinapse, wat die onderskeie oordragstowwe afbreek, voor.

Die aktiewe sentrum van die karbamaatgifstowwe is waarskynlik die cholinergiese sinapse. Die gifstof inhibeer die werking van asetielcholinesterase, sodat katabolisme van asetielcholin na cholien en metielkarboksielsuur nie plaasvind nie. Kontinue depolarisering vind plaas totdat die senuwee of effektorsel ingee. By erdwurms word die lengte- en dwarsspiere, die laterale harte en die viserale spiere deur cholinergiese sinapse bedien. Die voorkoms van twee verskillende (E1 en E2), maar verwante cholinesterases mag egter wel die weerstand teen gifstowwe verhoog, aangesien een minder vatbaar as die ander kan wees. Karbariel inhibeer bv. net E1 en nie E2 nie, terwyl by 'n tipiese vertebrata asetielcholinesterase en 'n ander cholinesterase beide geïnhibeer word (Stenersen, 1981, p.7-8).

Nog 'n rede waarom karbamate minder giftig vir vertebrate is, is die teenwoordigheid van meer esterases in die plasma en lewer van vertebrate as in die hemolimf van insekte. Detoksifisering vind dus baie gouer plaas. Esterases is dan ook een van die belangrikste detoksifiseringsensieme aangesien verbindings afgebreek word na onaktiewe en meestal hidrofiliese verbindings wat maklik uitgeskei kan word. Verbindings soos DDT en TCDD besit nie sulke biologies aktiewe groepe nie, vandaar die moontlikheid van bio-akkumulering. Insekte besit nie hierdie ensieme nie en is dus baie meer vatbaar vir die werking van gifstowwe (Khur & Dorough, 1976, p.1-45 ; Ariëns, Simonis & Offermeier, 1976, p.45).

Die werking van karbofuraan word in figuur 2 uiteengesit. Die ensiem asetielcholinesterase bind omkeerbaar met die gifstof en kan dus of dissosieer na die oorspronklike, of onomkeerbaar na 'n stabiele gekarbamileerde ensiem en die karbofuraan-fenol (hidrofilies) verander. Die veranderde ensiem kan weer hidroliseer na die vry ensiem en metielkarbamaatsuur (ook hidrofilies). Die gifstof is dus 'n kompeterende inhibeerder van die ensiem aangesien dit met die substraat (asetielcholin) kompeteer. In die geval van organofosfate is die gefosforileerde ensiem heelwat minder vatbaar vir hidrolise en is die uitwerking dus langduriger. Herstel na karbamaatvergiftiging is dus moontlik, aangesien die halfleeftyd van die gekarbamileerde ensiem 30 tot 40 minute is.

Alhoewel die ensiem omkeerbaar geïnhibeer word, word die gifstof onomkeerbaar verander. Die affiniteitswaarde van asetielcholinesterase vir asetielcholin is ongeveer twee keer laer as vir die karbamate. Die gifstof het dus 'n hoër affiniteit vir die ensiem as die asetielcholin. Dit is nodig dat die finale stap (hidrolise) vinnig moet wees, maar na karbamilering is die hidrolise na die vry ensiem stadiger met die gevolg dat die konsentrasie van die vry ensiem daal. Die hidrolisekoers van gefosforileerde ensieme is dan ook heelwat laer as vir die gekarbamileerde ensiem en dit dui op 'n groter affiniteit. Fosforilering het dus 'n meer permanente invloed as karbamilering soos ook in figuur 2 aangedui word.

2.2.5 Toksikologie van karbofuraan

Die akute toksisiteit van karbamate is oor die algemeen in dieselfde orde as die van die gehalogeneerde en organofosfaatpestisiede. Anders as in die geval van gehalogeneerde pestisiede, wissel die persistering van organofosfate en karbamate van 'n paar dae tot 'n paar maande. Dit is die persistering, gekoppel aan die affiniteit vir die ensiem, wat die toksisiteit en ekologiese uitwerking bepaal. Om die effektiewe dosis vir 'n spesifieke plaag te bepaal, is ekstrapolasie vanaf die waardes van ander spesies nie moontlik nie. Die LD_{50} verskil tussen spesies. So bv. is die LD_{50} (dermaal) van karbariel vir die huisvlieg 500 mg kg^{-1} en vir die mieliewortelwurm is dit 6 mg kg^{-1} . Die waardes vir karbofuraan is onderskeidelik 7 en 5 mg kg^{-1} .

Die roete van inname speel ook 'n groot rol en meestal is dermale toediening minder effektief as orale toediening. Sistemiese gifstowwe is dus meer effektief teen plantparasiete wat in die plant voed as nie-sistemiese gifstowwe wat grotendeels as kontakmiddel optree. Karbariel is as nematisied dus minder effektief as karbofuraan wat wel sistemies is.

Die stadium van ontwikkeling van die dier wat met die gifstof in aanraking kom, speel ook 'n groot rol. Inseklarwes is dikwels baie weerstandbiedend teen gifstowwe wat wel effektief teen die volwasse vorm is. Die omgekeerde is ook by sommige insekte gevind nl. 'n toename in weerstandbiedendheid met 'n toename in ouderdom, soms selfs honderdvoudig. Al hierdie faktore moet dus in ag geneem word. Soos in 2.1 uiteengesit is, is wurms van dieselfde ouderdom gebruik. Ander faktore soos geslag en dieet speel ook 'n rol in die doeltreffendheid van die gifstof. Die orale LD_{50} waarde is die mees algemeen gebruikte indeks vir toksisiteit. Dermale toediening is meestal nie effektief nie en dit geld veral vir die karbamate.

Die orale LD_{50} van karbariel vir rotte is 850 mg kg^{-1} , terwyl die dermale LD_{50} meer as 4000 mg kg^{-1} is. 'n Uitsondering is aldikarb met 'n orale LD_{50} van 0,8 en 'n dermale LD_{50} van 3 mg kg^{-1} . Isolan het omgekeerde waardes (oraal 32 mg kg^{-1} , dermaal $5,6 \text{ mg kg}^{-1}$) sodat die kriterium van orale LD_{50} nie geëkstrapoleer kan word nie. Vergelyking van LD_{50} en ED_{50} (dosis waarby 50% van die organismes stuiptrekkings toon) gee 'n beter beeld van die subletale effekte. Die verhouding tussen die twee waardes verskil tussen die organofosfate en karbamate (LD_{50} / ED_{50}) in die sin dat die verhouding groter is by die karbamate as by die organofosfate.

Hierdie verskil is die gevolg van die verskillende kinetiese waardes (hoe groter die affiniteit, hoe kleiner is die verhouding, kyk fig.2) betrokke by die ensiemreaksies (Al die bostaande gegewens verkry uit Ariëns et al. 1978, p.125 en Khur & Dorough, 1976, p.103-109).

Oor die toksikologie van karbamate m.b.t. erdwurms is al heelwat navorsing gedoen, maar oor karbofuraan spesifiek is daar nie veel bekend nie. Stenersen, Gilman en Vardanis (1973, p.166-171) het bevind dat die LD₅₀ (120 uur) vir Lumbricus terrestris met inspuiting 1,3 mg kg⁻¹ is en met grondtoediening is dit 12,2 mg kg⁻¹.

Gilman & Vardanis (1974, p.625-628) het bevind dat indien karbofuraan ingespuut word, dit ses keer meer toksies vir Lumbricus terrestris as vir E. fetida is. Die LD₅₀ (120 uur) vir Lumbricus is 2,43 mg kg⁻¹ en vir E. fetida is dit 13 mg kg⁻¹. Wanneer karbofuraan in grond toegedien word, was die LD₅₀ vir vyf dae 13,2 en 24,5 mg kg⁻¹ respektiewelik. Gilman en Vardanis voer waarskynlik aan dat die konsentrasie van karbofuraan in die wurm gelykstaande aan die LD₅₀ waarde is. Die outeurs is onduidelik oor die konsentrasie karbofuraan in die grond, maar dit is blykbaar in beide gevalle 4 mg kg⁻¹. Gilman en Vardanis het beide spesies onder dieselfde kondisies aangehou, hoewel die optimale kondisies vir E. fetida en L. terrestris verskil. Ook is die medium nie optimaal vir E. fetida nie, en die resultate kan dus net met voorbehoud vergelyk word. Wat wel in die studie na vore kom, is die waarskynlikheid dat E. fetida karbofuraan chemo-reseptories kan waarneem en ook van gekontaminateerde streke kan wegbeweeg (Gilman & Vardanis, 1974, p.625-628).

Stenersen (1979a, p.66-74) het nege gifstowwe op vier erdwurms getoets en bevind dat E. fetida die mees weerstandbiedende spesie is. Die ander drie spesies is Allolobophora caliginosa, Allolobophora chlorotica en Lumbricus rubellus. Aldikarb was die giftigste vir al die spesies, maar LD₅₀ waardes word nie gegee nie. In die geval van E. fetida was by konsentrasie van tot 64 mg kg⁻¹ vir karbariel en karbofuraan geen letaliteit na 14 dae te bespeur nie, maar by 16 mg kg⁻¹ aldikarb was 50% na 14 dae dood.

In die eerste twee studies was die medium wat gebruik is skynbaar dieselfde, maar die medium van die derde studie het verskil. Die eerste twee het uit 'n mengsel van 20% spagnummos en 80% leemgrond bestaan, en die derde uit 'n mengsel van veenmos en klei in 'n onbekende verhouding. Die LD₅₀ waardes (karbofuraan) vir L. terrestris is 12,2 en 13,2 mg kg⁻¹ onderskeidelik. Die LD₅₀ waardes vir E. fetida is 24,5 en meer as 64 mg kg⁻¹. Die invloed van die medium kom dus duidelik na vore. In die laaste geval was die medium 50 % klei, terwyl die eerste 80% leemgrond bevat het.

2.2.6 Biologiese beskikbaarheid en afbraak

'n Groot gedeelte van alle xenobiote kom met die grond in aanraking waar dit aan verskeie prosesse en faktore onderworpe is. Dit sluit ligafbraak, adsorpsie, uitloging, verdamping, chemiese reaksies, mikrobiële metabolisme, opname deur plant en dier, voggehalte, pH en temperatuur in. Soos reeds vermeld, speel pH 'n groot rol en die xenobiot kan dus vinnig afbreek, maar

gronddeeltjies kan die stof adsorbeer en vir lang periodes bind, sodat die afbraak heelwat stadiger kan wees. Dit is nie bekend of hierdie gebonde stowwe deur biologiese aktiwiteit vrygestel kan word nie, hetsy in die oorspronklike of in 'n veranderde vorm. Daar is nog nie oor die aard van die adsorpsie eenstemmigheid bereik nie. In 'n onlangse artikel (Mingelgrin & Gerstl, 1983, p.1) het geblyk dat nóg adsorpsie (konsentrasie van die opgeloste stof op die oppervlak a.g.v. die termodinamiese eienskappe van die oppervlak) nóg partisie (verdeling van die opgeloste stof tussen twee fases nadat ewewig bereik is) uitsluitlik 'n rol speel, maar eerder 'n kombinasie van die twee.

Vir kommersiële gebruik is karbofuraan geformuleer om relatief lank in grond aktief te wees. 'n Toediening van 10 mg kg⁻¹ veroorsaak na 90 dae nog 97% mortaliteit onder koolvliegglarwes. Variasie in aktiwiteit a.g.v. grondtipes kom voor. Na 45 weke is daar nog 60% karbofuraan in een tipe leemgrond oor, maar in 'n ander leemgrond is daar 50% na 4 weke oor. Die verskil kan in sommige gevalle deur die pH van die grond veroorsaak word (Khur & Dorough, 1976, p.218).

In die bespreking oor die invloed van verskillende grondkomponente op die adsorpsie van gifstowwe, meld Mingelgrin & Gerstl (1983, p. 4) dat organiese materiaal en kleie 'n belangrike rol speel. Die bewering wat voorheen gemaak is (Lord, Briggs, Neale & Manlove, 1980, p.407), dat die adsorpsie van 'n gifstof 'n funksie van die organiese komponent in die grond is, is nie algemeen geldig nie, aangesien daar 'n wisselwerking tussen die klei- en organiese fraksies bestaan. In sommige gevalle komplekseer die organiese materiaal met die kleifraksie en benadeel adsorpsie sodat in hierdie gevalle verwydering van die organiese fraksie, adsorpsie verbeter. Al hierdie wisselwerkings is so kompleks dat voorspellings baie bemoelik word. Die gifstof kan, nieteenstaande adsorpsie of partisie vir 'n langer of korter periode onveranderd in die grond bly. Hierdie probleem word in 2.3 meer breedvoerig in die konteks van wisselwerking tussen klei en organiese materiaal bespreek.

Om die probleem nog verder te kompliseer, is daar ook nog 'n mikrobiële faktor. Die herhaalde gebruik van dieselfde tipes gifstowwe stimuleer die groei van die deel van die mikrobiële komponent wat 'n spesifieke tipe verbinding (bv. esterbande) metaboliseer. Die effektiewe leeftyd kan dan in sommige gevalle van 'n paar maande tot 'n paar dae afneem. 'n Mikroörganisme wat een tipe verbinding afbreek, kan maklik aanpas om 'n verwante verbinding te metaboliseer (Kaufman, 1983, p.1-5). Williams, Pepin & Brown (1976, p.244-247) het bevind dat veral Actinomycetes karbofuraan kan metaboliseer. Ander mikroörganismes wat karbamate afbreek, is Pseudomonas en Achromobacter spesies (Laveglia & Dahm, 1977, p. 503-507).

Die belangrikste afbraakprodukte van karbofuraan is 3-hidroksi-karbofuraan en karbofuraanfenol. In plante kom 3-oxokarbofuraan ook voor (Turner & Caro, 1973, p.246). E. fetida en L. terrestris metaboliseer karbofuraan na 3-hidroksie-karbofuraan, 3-keto-karbofuraan, 3-hidroksie-karbofuraan-fenol en karbofuraan-fenol. Die 3-hidroksie-karbofuraan is die primere

metabool wat deur E. fetida gevorm word (Gilman en Vardanis, 1974, p. 627). In die huidige studie is egter nie na die afbraakprodukte gekyk nie.

Uit die voorafgaande blyk dit dus dat grond 'n baie ingewikkelde komponent van die omgewing uitmaak. Fisiese, chemiese en biologiese faktore speel 'n rol, maar die omvang van elk varieer van plek en seisoen, sodat ekstrapolasie baie moeilik is.

2.3 Die keuse van vermikuliet as matriks

Die probleem soos gestel in die inleiding, is aan die begin van 1980 geïdentifiseer. Gesprekke oor hoe hierdie probleem opgelos kon word, het grotendeels gehandel oor die keuse van 'n geskikte matriks. Vorige probeerslae het misluk (Neuhauser et al., 1980, p. 45).

Vermikuliet, in die vorm van pakmateriaal wat gebruik is om glashouers teen skokke te beskerm, is as moontlike matriks oorweeg. Hierdie materiaal was sponsagtig van aard. Die oorsprong van die materiaal was egter nie bekend nie. Daar is voortgegaan om die bruikbaarheid hiervan te bepaal. Die materiaal is fyngemaal en klam gemaak voordat wurms ingesit is. Die wurms het die vermikulietdeeltjies sonder enige nadelige gevolge geïngesteer.

Die volgende stap was om 'n betroubare bron van vermikuliet te vind. Micronized Products van Johannesburg verwerk vermikuliet, wat by Phalaborwa ontgin word, tot 25 verskillende grade en bemark dit plaaslik en oorsee. Die produkte word vir 'n groot verskeidenheid toepassings o.a. verwe, plastiek, sement, veevoer, draers vir farmaseutiese produkte en filters gebruik.

Die vermikuliet neerslae is van die suiwerste in die wereld. Ander vermikulietneerslae kom as 'n mengsel van vermikuliet en ander kleie voor en is moeilik om te suiwer. Die toepassingsmoontlikhede verg baie goeie kwaliteitskontrole en die produk sal dus, indien 'n aanvaarbare formule ontwikkel kan word, uiters geskik vir die voorgename studie wees (Weissenberg, 1983, Persoonlike mededeling).

2.3.1. Struktuur en eienskappe van vermikuliet

Die naam vermikuliet is van die Latynse woord "vermiculare" afgelei wat beteken "om wurms te teel". Vermikuliet bestaan uit trioktohedrale mikaplate, geskei deur twee lae watermolekules. Die mikaplate bestaan uit Mg, Ca, Si, Al en Fe. Die spasie tussen die mikaplate is 4,98 Å. Vinnige verhitting tot 300 °C verander die water wat tussen die lae is na stoom en die druk wat ontstaan dryf die plate van mekaar tot 'n permanente sponsagtige struktuur. Weking van die vermikuliet in waterstofperoksied veroorsaak ook 'n permanente uitdrying van die waterlae met 'n gevolglike sponsagtige struktuur. Deur verskillende prosedures te volg en die kondisies te verander kan verskeie vorme van die vermikuliet berei word (Grim, 1968, p. 104-113).

Een van die uitstaande eienskappe van vermikuliet is die hoë kationuitruilingsvermoe. Van al die kleie is vermikuliet die beste uitruiler. Die kation word op die rand van 'n plaatjie in

'n uitruilbare posisie gehou sodat dit weer met ander katione uitgeruil kan word. Die rede vir hierdie binding is dat die molekules van die latwerk op die rande van die plate nie versadig is nie, maar vry is. Dit beteken dus ook dat deeltjiegrootte 'n groot rol speel aangesien die kleiner deeltjies meer rande vir kationuitruiling beskikbaar stel (Grim,1968,pp.185-195). Vir die medium is 'n vaste en konstante deeltjiegrootteprofiel dus van groot belang om 'n kontinue en gedefinieerde medium te verseker.

Die twee lae watermolekules kan deur organiese molekules verplaas word. So bv. kan dit deur een laag gliserol vervang word. Dit moet egter wel genoem word dat die polariteit van die molekules 'n groot invloed het. 'n Hoër polariteit vergemaklik die indringing tussen die plate, terwyl die grootte van die molekule indringing kan teenwerk veral waar die molekule te groot is. Indien die molekule dus 'n ruimte beslaan wat groter as die opening tussen die plate is, kan die molekule nie indring nie en bly dit op die buitekant. Metaan, asetoon en asetonitriël (m.a.w. organiese oplosmiddels) toon net 'n geringe mate van indringing. Oor die algemeen is die indringing van organiese molekules beperk. Die reaksie met pestisiede sal dus beperk bly tot die rande en oppervlaktes waar dit wel vir biologiese aktiwiteit beskikbaar kan wees. In die geval van nie-polêre verbindings behoort die opervlakaktiwiteit nog minder te wees. Die biologiese beskikbaarheid van nie-ioniese pestisiede word eerder deur die organiese as deur die kleifraksie van die grond bepaal (Grim,1968, p.230-231,381-382).

Die meerderheid van die organiese fraksie in die grond is humusverbindingse waarvan die aard en eienskappe nog nie ten volle bekend is nie. Humusverbindingse het funksionele groepe soos karboksiel-, amino- en fenoliese hidrokksielgroepe. Hierdie groepe maak waterstofbinding moontlik en veroorsaak pestisiedadsorpsie en verhoogde persistering (Edwards,1975,p.49).

Adsorpsie vind hoofsaaklik op die blootgestelde oppervlaktes plaas. Humussuur en proteïene word deur kleie gefikseer met 'n gevolglike reduksie in kationuitruiling asook beskikbare aktiewe groepe vir adsorpsie (Grim,1968,p.353). Marshman & Marshall (1981,p.127) het die beskikbaarheid van verskillende proteïene vir bakteriese groei op twee kleie getoets. Alhoewel hulle nie met vermikuliet gewerk het nie, is die resultate wat hulle verkry het, baie insiggewend. Die resultate dui op twee verskillende adsorpsietipes (d.i. of beskikbaar of nie beskikbaar vir biologiese werking nie) wat deur die klei, proteïen en die protease gedefinieer word. Dit beteken dat die biologiese beskikbaarheid van die proteïen wat geadsorbeer is, afhanklik is van die proteolitiese ensiem. Die eienskappe van die ensiem bepaal of die geadsorbeerde proteïen deur die proteolitiese werking verwyder kan word. Indien dit die geval met mikroorganismes is, kan proteolitiese ensieme van invertebrate moontlik ook hierdie proteïene verwyder en metaboliseer. Dit kan veral in die geval van erdwurms moontlik wees aangesien die dier die medium met gronddeeltjies en al ingestee en dit in die spysverteringskanaal met die ensieme meng. Soos reeds vermeld produseer E. foetida twee proteases (Edwards & Lofty,1977,p.99).

Cortez en Schitzer (1981,p.176) het die adsorpsie van nukleïensure op kleie bepaal. Hulle het bevind dat adsorpsie veral by lae pH plaasvind en afneem met 'n toename in pH. Montmorilloniet gemeng met fulviensuur ('n organiese grondkomponent) het minder adsorpsie as die klei alleen getoon. Die adsorpsie deur die klei word dus deur die pH en die teenwoordigheid van ander organiese materiaal bepaal.

Organiese verbindings met aktiewe polêre groepe kan dus deur die klei geadsorbeer word. Baie gifstowwe, soos die karamate, val in die groep. Die geadsorbeerde molekule word op die oppervlak van die plate gerangskik sodat dit 'n hoek met die vlak van die plaat maak. Adsorpsie is, soos ons reeds gesien het, 'n kompeterende proses. Water is 'n polêre verbinding, en die voginhoud van die grond (of medium) bepaal die aantal beskikbare posisies waar pestisiede kan adsorbeer. Hoe meer water in die grond aanwesig is, hoe minder adsorpsieposisies is daar vir minder polêre verbindings beskikbaar is (Edwards,1975,p.53). Oor die aard van adsorpsie is daar, soos reeds genoem, nog geen eenstemmigheid bereik nie.

Sommige kleie kataliseer organiese reaksies en dus kan moontlike afbraak van pestisiede nie uitgesluit word nie (Grimm,1968,p.353-369). In hierdie studie word daar egter net na die totale afbraak gekyk, aangesien mikrobiële afbraak definitief 'n rol speel. Wat wel ingedagte gehou moet word, is dat die afbraakprodukte heelwat meer polêr as die oorspronklike gifstof is en dus 'n hoër adsorpsieaktiwiteit aan die rande of aan die oppervlak van die deeltjies sal toon. In die literatuur word na hierdie fraksie as die nie-ekstraheerbare fraksie verwys, aangesien die binding (adsorpsie) sodanig is dat die gevolgde prosedure dit nie verwyder nie. Hierdie fraksie neig om met tyd te vergroot soos meer van die gifstof gemetaboliseer word. Die toksisiteit van die produkte sal dan ook van die biologiese beskikbaarheid afhang (Lichtenstein & Anderegg,1977,p.43-47).

2.4 Statistiese metodes gebruik in hierdie ondersoek

In hierdie studie kom heelwat parameters ter sprake en uit die aard van die saak is interpretasie van die resultate slegs moontlik met akkurate statistiese ontledings. Dit is veral die geval met die eksperimente wat heelwat data opgelewer het. Data wat verkry is met die aanvanklike loodseksperimente (kyk 3.1.3 tot 3.2.6) kan slegs gebruik word om tendense te identifiseer, nie die kwantifisering daarvan nie. Dit volg dus dat statistiese analise hiervan nie gesofistikeerde tegnieke vereis het nie.

Eenvoudige statistiese metodes is vir die identifisering van sekere tendense vir die loodseksperimente gebruik. Dit het nie meer as die berekening van massaverandering, uitgedruk as persentasie van die oorspronklike massa, behels nie. 'n Literatuurstudie toon aan dat verskeie outeurs (o.a. Neuhauser et al., 1980) massaverandering as persentasie van die oorspronklike uitdruk. Die meerderheid van outeurs maak egter van gemiddelde massa en standaardafwyking gebruik. Vir die loodseksperimente is van persentasie verandering van die oorspronklike gebruik gemaak aangesien die monstergrootte te klein was. Vir die eksperimente wat heelwat data opgelewer het, is vir die interpretasie hoofsaaklik van gemiddelde massa gebruik gemaak. Hierdie data is met rekenaarprogramme deur die Statistiese konsultasie diens van die PU vir CHO verwerk. Die programme wat gebruik is, is van die BMDP- reeks, veral BMDPAM, BMDP7D en BMDP2V met 'n hersieningsdatum van April 1982. Verdere inligting i.v.m. die programme wat internasionaal aanvaar word, kan verkry word van Dixon (1981). Die programme is deur die "Health Science Computing Facility (HSCF) by die University of California, Los Angeles met 'n borg deur "NIH Special Research Resources Grant RR-3" ontwikkel.

Die BMDPAM program doen 'n skatting van data wat nie geneem is nie. Hierdie program is gebruik by 3.2.8 en 3.2.9 waar van sommige data, a.g.v. die beskadiging van wurms, nie geneem is nie. Die skatting is gemaak deur van gemiddeldes gebruik te maak.

Die BMDP2V program bepaal die variansie en kovariansie van herhaalde lesings van dieselfde veranderlike. Massaverandering van wurms oor 'n sekere tydsverloop en die statisties betekenisvolle verskil (P-waardes) tussen verskillende behandelings word deur die program bepaal. Die Bonferroni-toets is gebruik om 'n paarsgewyse vergelyking van alle pare van gemiddeldes na aanpassing van die meervoudige vergelyking van alle pare van gemiddeldes (P-waarde) te doen. Die program is vir eksperimente 3.2.7, 3.2.8 en 3.2.9 gebruik. Vir eksperimente 3.2.8 en 4.1 is die waardes soos genereer deur die BMDPAM program gebruik.

Die BMDP7D program is in eksperiment 3.2.7 gebruik om 'n analise van die data te kry en daarvolgens is besluit om 'n logtransformasie te doen. Die getransformeerde data is hierna deur BMDP2V verwerk.

BMDP3S is in eksperiment 3.2.9 vir 'n analise van gegewens i.v.m. kokonproduksie en -massa gebruik. Die program gebruik die Mann-Whitney toets om 'n tweekantige P-waarde te bereken.

3 PROSEDURES EN OORWEGINGS VIR, EN DIE ONTWIKKELING VAN 'N GESKIKTE MEDIUM

3.1 Die seleksie van 'n geskikte vermikulietgraad as matriks vir die groeimedium

3.1.1 Doelstelling en oorwegings

Na samesprekings met verteenwoordigers van Micronized Products is vyf verskillende vermikulietgrade bekom. Hierdie grade het almal verskillende deeltjiegroottes en adsorpsieeienskappe. Die eerste oogmerk was om 'n geskikte graad of mengsels van grade te selekteer om as standaard matriks vir verdere studie te dien. Verskeie parameters is met die keuse van so 'n graad in ag geneem. Hiervan is die belangrikste seker die deeltjiegrootteprofiel, pH en waterhouvermoë. Die prosedure wat gevolg is, was daarop gemik om die matriks te kies waarop die wurms die beste groei (in terme van massa) vertoon en nie noodwendig die matriks te selekteer waarvan die fisiese eienskappe die meeste met die van beesmis of grond ooreenstem nie.

3.1.2 Die bepaling van die deeltjiegrootteprofiel van vermikuliet

Die natuurlike habitat van E. fetida is ryk aan plantaardige materiaal. In 3.2.1 word veral na die belangrikheid van die deeltjiegrootte van die stowwe wat ingeneem word, verwys. Aangesien dit die oogmerk was om die voedingstowwe in hierdie studie op die deeltjies neer te lê, moes E. fetida die deeltjies kon inneem. Neuhauser et al. (1980, p.59) meld die moontlikheid dat kleiner deeltjies, a.g.v. 'n groter oppervlak, 'n hoër mikrobiële afbraak bevorder, en daardeur meer voedsel vir E. fetida beskikbaar stel. Die bepaling van die deeltjiegrootteprofiel is goedgunstiglik deur die Landbounavorsingsinstituut van Potchefstroom gedoen. Die resultate word in tabel 1 weergegee.

Tabel 1. Deeltjiegrootteprofiel van vyf verskillende grade van vermikuliet en 'n grondmonster. Verspreiding word in persentasie uitgedruk

Grootte ($m \times 10^3$)	2,0-0,5	0,5-0,2	0,2-0,02	0,02-0,002	>0,002
<u>Graad</u>					
PLV500	-	-	-	-	-
PLV200	0,0	0,0	1,0	75,4	23,6
MCF	27,5	9,6	65,9	16,4	7,2
RSU	27,5	61,1	7,6	1,5	2,3
MCU	4,1	56,1	31,9	3,2	4,8
Grond	8,3	16,5	56,3	4,1	14,8

Die bepaling van die deeltjiegrootteprofiel van PLV500 was nie moontlik nie, aangesien die deeltjies so fyn is dat weging nie moontlik is nie. Dit gee alreeds 'n aanduiding dat die graad nie geskik sal wees nie. PLV200 is ook baie fyn, maar MCF, RSU en MCU het, net soos grond, 'n verspreiding oor die hele spektrum getoon. Dit wil voorkom asof MCU die meeste met grond ooreenstem.

3.1.3 Bepaling van die waterhouvermoë van vermikuliet en beesmis.

Dit het uit die praktyk geblyk dat die hoeveelheid water wat in die medium teenwoordig is, van groot belang vir die voortplanting van E. fetida is. Te veel of te min onderdruk of inhibeer kokonproduksie en het ook 'n besliste invloed op die groeikoers van E. fetida. 'n Waterinhoud van 80% van die versadigingswaarde (veldkapasiteit) is gekies. Dit het verseker dat die medium nie modderig word nie, maar eerder klam vertoon. Voorlopige eksperimente het ook getoon dat vermikuliet minder water absorbeer as in die geval van beesmis. 'n Vogwaarde van 80% sou na alle waarskynlikheid verseker dat genoeg water in die omgewing beskikbaar sal wees.

Vir die bepaling is van 'n eenvoudige metode gebruik gemaak. Vyf gram van elke monster is afgeweg en in 'n klein skeitregter, wat van 'n glasveselprop en 'n lagie sand voorsien is, gevoeg. Gedistilleerde water is hierna bygevoeg en die hoeveelheid water geabsorbeer is bepaal deur die volume water wat deur die skeitregter beweeg het, met die massa van die materiaal in die regter te vergelyk.

Tabel 2. Die waterhouvermoë van beesmis en van die verskillende grade vermikuliet. Die oorspronklike data word in tabel 9.1 van die bylaag gegee.

Monster	dm ³ g ⁻¹
PLV500	0,00174
PLV200	-
MCF	0,00080
RSU	0,00054
MCU	0,00048
Beesmis	0,00230

Die resultate van die ondersoek word in tabel 2 weergegee. Bepaling van die waterhouvermoë van PLV200, was nie moontlik nie aangesien byvoeging van water die vorming van 'n ondeurdringbare prop tot gevolg gehad het. Die resultate van die ander vier grade was naastenby in dieselfde orde, maar was baie laer as die waarde vir beesmis. Hierdie waardes is gebruik om die effek van die teenwoordigheid van die klei op E. fetida te bepaal.

3.1.4 Bepaling van die invloed van vermikuliet op die groeikoers van E. fetida.

Die invloed van die kleie op die wurms, asook verandering in pH is m.b.v. die waardes in tabel 2 bepaal. Die uitgangspunt was dat die medium waarin E. fetida die beste groei vertoon het, die geskikste behoort te wees. Aangesien mengsels van vermikuliet moontlik beter resultate kon oplewer, is 'n aantal hiervan ook voorberei.

Nege verskillende mengsels is aangemaak tot 'n totale massa van 20 gram elk. Die hoeveelheid gedistilleerde water benodig om 80% van die waterhouvermoë van elke medium te verkry, is volgens die resultate van eksperiment 3.1.3 bereken en bygevoeg. Twee wurmpies van dieselfde ouderdom (38 dae) is afgeweg en in die medium

Tabel 3. Protokol wat gebruik is vir die bepaling van die invloed van verskillende samestellings van vermikulietgrade op die groei van E. fetida en vir die bepaling van die verandering van die pH.

Graad	MCU	MCF	RSU	PLV500	PLV200	mis	H ₂ O(dm ³)
Nr							
1	90	-	-	-	-	10	0,1060
2	-	90	-	-	-	10	0,0152
3	-	-	90	-	-	10	0,0115
4	-	-	-	90	-	10	0,0288
5	45	-	45	-	-	10	0,111
6	30	30	30	-	-	10	0,0124
7	-	30	30	30	-	10	0,0120
8	40	-	40	-	10	10	0,0118
9	40	40	-	-	10	10	0,0135
10	-	-	-	-	-	100	0,0460

Tabel 4. Invloed van verskillende samestellings van vyf vermikulietgrade op die massaverandering van E. fetida. Die pH-verandering van die medium word ook weergegee. Massaverandering word as persentasie van die oorspronklike gegee. Die kontrole (nr. 10) het uit 100 % beesmis bestaan.

Nr	Massaverandering (%)	pH(0)	pH(20)
1	+102	7,20	7,02
2	+ 30	7,60	7,14
3	+ 74	7,85	7,39
4	+ 18	8,26	7,76
5	+ 26	7,77	7,47
6	+ 39	7,86	7,48
7	+ 19	8,39	7,78
8	+ 25	8,10	7,69
9	+ 31	7,98	7,66
10	+262	7,79	7,60

geplaas. Die massas van die wurmpies asook die pH na twintig dae is met die oorspronklike waardes vergelyk. Die pH is gemeet deur een gram medium in 0,010 dm³ gedistilleerde water te plaas en die pH na 60 min. met 'n Labion pH-meter te bepaal. Die protokol in tabel 3 is in enkelvoud opgestel.

Tabel 4 bevat die resultate van eksperiment 3.1.4. Die wurms in medium 1 het verreweg die beste groei getoon. Die wurms in die ander mediums het ook positiewe groei getoon en die pH-waardes was na 20 dae almal tussen 7 en 7,8. Dit blyk dus dat vermikuliet nie 'n noemenswaardige negatiewe uitwerking op E. fetida het nie, alhoewel die groeikoers in alle gevalle met wisselende grade onderdruk word. Die resultate i.v.m. die pH was bemoedigend, aangesien geen groot verandering plaasgevind het nie.

MCU is as matriks vir die medium gekies. Van al die grade het die grootste massatoename in die MCU voorgekom en die pH het met die van die beesmiedmedium ooreengestem. Die waterhouvermoë het egter aansienlik van die van beesmis verskil.

3.2 DIE ONTWIKKELING VAN 'N GROEIMEDIUM VIR EISENIA FETIDA

3.2.1. Oorsig en benadering

Die voedselbehoefte van E. fetida is van 'n komplekse aard. Die teenwoordigheid van verskeie voedseltipes is noodsaaklik vir groei. Neuhauser et al. (1980,p.58) het bevind dat E. fetida nie massatoename toon indien sellulose, koerantpapier, saagsels en kleie as voedsel aangebied is nie. Ander voedselkomponente soos albumien, kaseïen en sukrose is toksies vir die wurm, waarskynlik a.g.v. die verrotting wat dit in grond ondergaan. Hulle meld egter dat die wurms wel sellulêre materiaal as voedselbron kan benut. Bakterië, fungi, alge, en protosoë kan as voedselbron benut word. Ook kan voedselafval of die mikroorganismes wat hiermee geassosieer word, as voedsel dien. Miles (1963,p.409) en Hartenstein (1981,p.157) meld dat protosoë heelwaarskynlik 'n vereiste in die dieet van E. fetida is. Dit is te wagte, aangesien protosoë, veral die flagellate en ciliate, in groot hoeveelhede in die organiese medium voorkom.

Neuhauser et al. (1980,pp.43-59) het 'n hele reeks eksperimente i.v.m. die voedselbehoefte van E. fetida gedoen. Die resultate word verder in diepte bespreek, maar dit is belangrik om vooraf te meld dat hulle met wurms van onbekende ouderdomme en met wurms met massas wat wissel tussen 150 tot 300 mg, gewerk het. Eerstens het hulle suiwer voedingstowwe getoets deur dit op die medium (grond of veenmos) te strooi. Die outeurs het elf verskillende proteïene getoets en 'n geweldige massa-afname van ongeveer 70 % en 'n oorlewing van 25 % is waargeneem. Hulle het sewe verskillende olies getoets en het 'n gemiddelde massa-afname van 10 % en oorlewing van 73 % getoon. Drie koolhidrate is getoets en het 'n gemiddelde massa-afname van 2,6 % en oorlewing van 93 % getoon. Mengsels van proteïene (20 % tot 59 %) met sellulose (in die afwesigheid van 'n anorganiese substraat) het 'n massa-afname van 7 tot 18 % en 'n oorlewing van 36 tot 78 % getoon. Mengsels van sellulose (80 tot 95 %) met kaseïen het 'n massaverandering van -2 tot +7 % en 'n oorlewing van 88 tot 90 % getoon.

In nog 'n eksperiment het Neuhauser et al (1980,pp.43-59) kaseïen ('n melkproteïen) met Buss Bed-ting ('n mengsel van klei en koerantpapier) in konsentrasies van 0,5 tot 2,5 % gemeng. Die wurms het sonder die proteïen 'n toename na 14 dae van 33,8 %, met 0,1% kaseïen 'n toename van 47 % en met 1,0 % kaseïen 'n afname van 20,5 % getoon. Met 2,5 % het almal na 14 dae gevrek. Al die ander proteïene (albumien, gelatien, laktalbumien, pepton, gishidrolisaat en visproteïen) was 100 % toksies in konsentrasies van 0,5 % en hoër. Sukrose in 'n konsentrasie van 1 % was ook toksies.

Bogenoemde outeurs het ook twee bakterie-, twee protosoon- en drie fungusspesies getoets. In Bus Bed-ting het kontrolegroepe massa-afname (15 tot 24 %) getoon. Met byvoeging van lewendige kulture het die wurms na 14 dae by al die groepe massatoename in die koers van 7 tot 25 % getoon. Met die byvoeging van dooie kulture het die wurms 'n kleiner massatoename getoon en in sommige gevalle selfs 'n massa-afname.

Indien suiwer sellulose as voedsel en medium gebruik is, het E. fetida dit geredelik ingeneem en verwerk, maar geen massatoename getoon nie. E. fetida het ook koerantpapier tot 'n mate ingeneem, maar kon dit nie as 'n suiwer voedselbron benut nie. Dit stem met plaaslike waarnemings ooreen, aangesien E. fetida wat vir 'n paar dae op klam filtreerpapier gehou is, die vesels aan die rande geïngesteer en verwerk het. Mengsels van sellulose en koerantpapier met geaktiveerde rioolslik het geen nadelige invloed op massatoename getoon nie. Oor die algemeen blyk uit die werk van Neuhauser et al (1980, pp.43-59) dat voedsel in korrelvorm die beste resultate lewer. Gemaalde rysdoppies (deursnee kleiner as 0,5 mm) het 'n baie goeie massatoename tot gevolg gehad, terwyl ongemaalde rysdoppies 'n massa-afname tot gevolg gehad het. Rioolslik (baie fyn), koerantpapier en sellulose met grond gemeng het beter resultate gelewer as mengsels van rioolslik met koerantpapier of sellulose. Resultate wat reeds met perdemis van verskillende deeltjiegroottes verkry is, word in tabel 5 gegee.

Tabel 5. Invloed van die deeltjiegrootte van perdemis gemeng met 'n mengsel van 85 % grond en 15 % Bus Bed-ding op die massa van E. fetida na 14 dae (Neuhauser et al.1980,p.56).

Deeltjiegrootte	Massaverandering (%)	Standaardafwvking
mis (1 mm)	+20,9	7,3
mis (0,5 mm)	+24,5	10,2
mis (0,3 mm)	+45,2	21,9
mis (ongemaal)	+8,0	6,1
geen mis	-16,9	2,3

Oor die algemeen kan aanvaar word dat, indien 'n stof deur E. fetida as voedsel gebruik kan word, daar wel 'n matriks vir die optimale benutting hiervan aanwesig moet wees. Bees- en perdemis is reeds in 'n granulêre vorm en kan net so benut word. Ander voedingstowwe is volgens bovermelde outeurs voordeliger indien dit met grond of sand gemeng word.

Hartenstein (1982,p.295-298) het die invloed van fenoliese produkte, afkomstig van plante, en die polimere hiervan (humussure), op E. fetida ondersoek. Hiedie verbindings besit fenoliese hidroksiel-, primêre alkohol-, aldehid-, metoksiel-, metiel- en karboksielgroepe wat toksies vir diere mag wees. Hy het bevind dat ligniene en humussure, met konsentrasies wat wissel tussen 1 en 16 %, geen invloed op die groei koers van E. fetida het nie. Hy het ook bepaal dat hoë konsentrasies van die monomere van hierdie verbindings wel toksies vir die erdwurm is. Daar is volgens hom 'n waarskynlike wisselwerking tussen die mikroorganismes wat die polimere stadig na die monomere afbreek, en die invertebrate wat dit inneem, sodat toksiese vlakke van monomere nie bereik word nie. Verstoring van die ewewig kan dus 'n wanbelans veroorsaak en sal die wurm nadelig beïnvloed.

Kaplan, Hartenstein, Neuhauser & Malecki (1980,p.347) het bevind dat konsentrasies van oplosbare soute hoër as 0,5 % toksies vir E. fetida is. Hulle het ook bevind dat die anorganiese matriks groei bevorder. Ook word die ontwikkeling tot geslagsrypheid

gestimuleer. Die klitellaatstadium word in sommige gevalle twee weke vroeër bereik (Kaplan et al., 1980, p.351). Weer eens is die ouderdom van die eksperimentele diere onbekend.

Die invloed van pH is ook deur Kaplan et al. (1980, p.351) ondersoek en hulle het bevind dat die beste beginwaarde 'n pH van 7 was, wat na 14 dae na 6,4 verander het. Hoër of laer aanvangswaardes het geneig om na die optimum terug te keer.

Cole, Sanborn & Metcalf (1976, p.583) en Cole, Metcalf & Sanborn (1976, p.7) het met behulp van mikro-ekosisteme die bio-akkumulering van aldrin, DDT, fonofos en metoksichloor (Eng. metoxychlor) in plante en diere o.a. erdwurms (L. terrestris) ondersoek. As matriks het hulle vermikuliet gebruik, maar of dit verwerk is, is nie vermeld nie. Wat wel vermeld word, is die soutkonsentrasie (0,4 % in gedistilleerde water) en -samestelling wat as standaard gebruik is. Hierdie samestelling word in 3.2.2 gegee. Geen voedsel is bygevoeg nie, maar plante is wel aangeplant. Die erdwurms het in hierdie medium bly lewe indien hulle nie deur die ander organismes opgevreet is nie. Inligting i.v.m. massaveranderinge word nie gegee nie. Aangesien min ander inligting i.v.m. die soutsamestelling in die natuurlike omgewing van E. fetida bekend is, is hierdie samestelling vir al die eksperimente gebruik.

3.2.2 Die bruikbaarheid van die verskillende voedingskomponente wat vir die studie beoog is.

Die voorafgaande ondersoeke het getoon dat MCU die geskikste vorm van vermikuliet vir E. fetida behoort te wees. In hierdie eksperiment is die bruikbaarheid van die basiese komponente wat vir die studie beoog word, bepaal. In voorlopige eksperimente is Pro Nutro, Sustagen en semels onsuksesvol as organiese materiaal aan die medium toegevoeg. Die komponente wat in hierdie studie gebruik is, is sellulose, kaseïen en 'n soutoplossing. Eerstens, is die soutoplossing met gedistilleerde water vergelyk. Die bruikbaarheid van sellulose en van 'n kombinasie van sellulose met kaseïen is ook ondersoek. Hierdie eksperiment is as 'n voorlopige eksperiment beplan en is dus op klein skaal uitgevoer. Volwasse wurms van dieselfde ouderdom is gebruik. Om die mikrobiiese komponent van die oorspronklike medium (beesmis) te simuleer, is 'n ekstrak (0,001 dm³) van die beesmismedium (gemaak deur 'n paar gram beesmis in water op te skud) aan elke fles, behalwe nr. 1 en 2, toegedien. Die volgende komponente is gebruik: MCU vermikuliet, sellulose (Merck, art. 2330), kaseïen (BDH, 44018) en die volgende soutoplossing in 1 dm³ gedistilleerde water (pH 7).

MgSO ₄	36,4	mg
K ₂ SO ₄	0,135	"
CaCl ₂	14,0	"
NaHCO ₃	25,0	"
NH ₄ NO ₃	3,0	"
K ₂ HPO ₄	0,78	"
CaCO ₃	57,5	"
NaSiO ₃	23,6	"
FeCl	0,81	"

Tabel 6. Protokol wat gebruik is om die bruikbaarheid van verskillende komponente te bepaal. Massas word in gram aangedui.

Nr	MCU	Sel- lulose	Ka- seien	H ₂ O(dm ³)
1	30,0	0,0	0,0	0,012(dist)
2	30,0	0,0	0,0	0,012(sout)
3	29,5	0,5	0,0	0,012 "
4	29,0	1,0	0,0	0,012 "
5	29,5	0,5	0,1	0,012 "
6	29,0	1,0	0,1	0,012 "

Tabel 7. Die massaverandering van twee wurms van dieselfde ouderdom in verskillende voedingsmediums word as persentasieverandering van die oorspronklike gegee. Die oorspronklike data word in tabel 9.3 van die bylaag gegee.

Nr	Massaverandering (%) 20 dae
1	-67
2	-58
3	-33
4	- 1,5
5	+18,6
6	+14,5

Tabel 8. Samestelling van die mediums wat gebruik is om die invloed van vitamieene op E. fetida te ondersoek. Massas is in gram uitgedruk.

Nr	MCU	sel- lulose	ka- seien	vita- miene	H ₂ O(dm ³)
1	29,5	0,5	0,1	0,00	0,012
2	29,0	1,0	0,1	0,00	0,012
3	29,5	0,5	0,1	0,16	0,012
4	29,0	1,0	0,1	0,16	0,012

Tabel 9. Die vergelyking van die aan- of afwesigheid van vitamieene in die medium op die massaveranderinge van E. fetida. Die massaverandering is as persentasie van die oorspronklike uitgedruk. Die oorspronklike data van die eksperiment word in tabel 9.4 van die bylaag gegee.

Tydsverloop (dae)	3	7	11
	Massaverandering (%)		
1	-9,0	-15,0	+11,1
2	-4,4	-11,8	+ 8,24
3	-2,6	+ 7,5	+ 9,9
4	-1,0	+ 2,1	+ 2,7

Uit die resultate in tabel 7 is die volgende afleidings gemaak:

1 Dat die gebruik van die soutoplossing i.p.v. gedistilleerde water, massa-afname verminder.

2 Dat die toevoeging van sellulose, massa-afname verminder en in die geval van nr. 4 het feitlik geen massa-afname plaas gevind nie.

3 Dat kaseïen in kombinasie met sellulose, massatoename tot gevolg gehad het.

Hierdie eksperiment het getoon dat die komponente wat gebruik is, voordelig vir E. fetida is. Die soutoplossing is vir alle verdere eksperimente gebruik. Die oplossings is in 2,5 dm³ hoeveelhede opgemaak en in die klimaatkabinet gestoor. Geen mikrobiëse groei is waargeneem nie en vars oplossings is aangemaak soos benodig. Dit het ook duidelik geblyk dat 'n kombinasie van sellulose en kaseïen voordelig vir E. fetida is. Sellulose alleen is voordelig in die opsig dat massa-afname minder is as wanneer dit nie teenwoordig is nie. Die toevoeging van die beesmiskstrak is as standaardprosedure in alle verdere eksperimente gebruik.

3.2.3 Die moontlikheid van vervanging van die proteïen, kaseïen, met 'n mengsel van aminosure.

Proteïene in lae konsentrasies is toksies vir E. fetida (Neuhauser et al. 1980, pp.43-59). Dit kan moontlik die gevolg van die eienskappe van die proteïen wees. Gevolglik is die proteïen met 'n mengsel van aminosure vervang. Twee wurms van dieselfde ouderdom is per fles in die mediums geplaas. Van die volgende aminosure is 100 mg elk gemeng en 0,1 gram van die mengsel is aan vier mediums toegedien. Alanien, arginien, aspartiënsuur, glutamien, glutamiënsuur, glisien, histidien, lisien, leusien, isoleusien, tirosien, treonien, triptofaan, prolien, hidroksieprolien, metionien, serien, sisteïen en valien is gebruik.

Alhoewel in alle gevalle net 0,1 gram aminosuurmengsel in dieselfde konsentrasie as die kaseïen in eksperiment 5 (nr. 4 en 5) bygevoeg is, was 'n konsentrasie van 0,35 % aminosuurmengsel toksies vir E. fetida. Na een dag het die wurms tipiese vergiftigingsimptome getoon en na twee dae was almal dood. Kaseïen is dus vir al die volgende eksperimente as proteïen gebruik. Interessantheidshalwe, is ook na ander verbindings wat moontlik 'n invloed mag uitoefen, gekyk.

3.2.4 Die invloed van vitamieë op die groeikoers van E. fetida

Vitamieë is noodsaaklike voedingstowwe vir baie diere. Alhoewel die invloed van vitamieë op E. fetida nog nie bepaal is nie en dit ook nie bekend is of E. fetida dit benodig nie, kom vitamieë wel in die natuurlike omgewing van die wurms voor (Baya, Boethling & Ramos-Cormenzana, 1981, p.527). Soos reeds vermeld, kom daar 'n groot hoeveelheid mikroörganismes in die natuurlike omgewing voor. Hierdie organismes produseer klein hoeveelhede vitamieë. Twee wurms van dieselfde ouderdom is in die mediums, soos uiteengesit in tabel 8, geplaas. Askorbiënsuur, nikotienamied en tiamonumdichloried is wateroplosbare vitamieë en 10 mg van elk is in 0,025 dm³ opgelos. Hiervan is 0,0002 dm³ (0,16 mg vitamieë) per fles toegedien.

Tabel 10. Protokol vir die bepaling van die optimum sellulosekonsentrasie vir die onderhouding van E. fetida in die toetsmedium. Massas word in gram aangedui. Vitamiene (0,16 mg) is in elke fles toegedien.

Nr	MCU	Sel- lulose	Ka- seien	H ₂ O (dm ³)
1	29,5	0,5 (1,7%)	0,1	0,012
2	29,0	1,0 (3,5%)	0,1	0,012
3	28,0	2,0 (7,1%)	0,1	0,012
4	27,0	3,0 (11,1%)	0,1	0,012

Tabel 11. Resultate van eksperiment 3.2.5 om die optimum sellulosekonsentrasie vir die medium te bepaal. Massaverandering word as persentasie uitgedruk. Oorspronklike data word in tabel 9.5 van die bylaag gegee.

Tydsverloop (Dae)		3	8	14	19	31
Nr	%sel	Massaverandering (%)				
1	1,7	-1,0	+8,3	+3,9	+3,3	+6,8
2	3,5	+22,2	+10,2	+2,9	-3,9	-15,0
3	7,1	-6,4	-4,8	-7,9	-31,4	-52,2
4	11,1	-5,3	-6,3	-7,2	+13,4	+17,2

Tabel 12. Protokol vir die bepaling van die invloed van cholesterol en RNA op die groeikoers van E. fetida. Massas word in gram aangedui.

Nr	MCU	Sellu- lose	Ka- seien	RNA	Choles- terol	H ₂ O (dm ³)
1	29,0	1,0	0,1	0,0	0,0	0,012
2	29,0	1,0	0,1	0,05	0,0	0,012
3	29,0	1,0	0,1	0,07	0,0	0,012
4	29,0	1,0	0,1	0,0	0,1	0,012
5	29,0	1,0	0,1	0,0	0,2	0,012

Tabel 13. Invloed van RNA en cholesterol op die massaverandering (as persentasie van die oorspronklike uitgedruk) van E. fetida. Die oorspronklike data word in tabel 9.6 van die bylaag gegee.

Nr	RNA	Choles- terol	Tydsverloop (dae)				
			3	8	14	19	31
			Massaverandering				
1	nee	nee	+22,2	+10,2	+2,9	-3,9	-15,0
2	ja	nee	-0,3	-0,3	+6,5	+41,1	+46,9
3	ja	nee	+54,0	+71,8	+95,0	+98,0	+53,4
4	nee	ja	+81,3	+75,6	+73,3	+83,2	+74,3
5	nee	ja	+9,6	+17,5	+22,8	+29,7	+23,8

Die resultate van hierdie ondersoek word in tabel 9 weergegee. Dit het voorgekom asof toevoeging van vitamien die aanpassingsfase oorbrug het, aangesien die massa-afname van die wurms baie groter in die afwesigheid van vitamien was. Dit het ook voorgekom asof die sellulosekonsentrasie van 1,7% voordeliger vir groei is as 'n konsentrasie van 3,5%. Alhoewel verdere waarnemings gemaak is, het die wurms maer voorgekom, hulle was donker van kleur en het na 31 dae skaars 'n massatoename van 40 % getoon. Dit kan dus afgelei word dat, die sellulosekonsentrasie of te laag was, of dat daar nog 'n komponent bygevoeg moes word. Die bepaling van die optimumkonsentrasie sellulose was die voor die hand liggende volgende stap.

3.2.5 Die invloed van die sellulosekonsentrasie op die groeikoers van E. fetida.

In die vorige ondersoek is die optimum konsentrasie sellulose vir groei nie bepaal nie. In hierdie eksperiment is die sellulosekonsentrasie t.o.v die medium gevarieer. Die protokol in tabel 6 is gevolg en twee wurms van dieselfde ouderdom is in elk van die mediumsamstellings geplaas.

Die resultate van hierdie ondersoek word in tabel 11 weergegee. Die resultate word moeilik geïnterpreteer. Konsentrasies van 1,7% en 11,1% het beter resultate as 3,5% en 7,1% opgelewer. Die enigste afleiding wat gemaak kan word, is dat die medium nog heelwat verbeter sal moet word om aanvaarbare massatoenames by die wurms te verkry. Sels massatoenames van 17,2% na 31 dae is onaanvaarbaar klein. RNA en cholesterol is toevoegings tot die medium wat oorweeg is.

3.2.6 Die invloed van RNA en cholesterol op die groeikoers van E. fetida.

In 3.2.5 is melding van die kleur van die erdwurms gemaak. Almal het donkerrooi vertoon. In 2.1.6 is melding van die hoë riboflavininhoud van die erdwurms gemaak. Die riboflavin kom in die vorm van 'n geel vloeistof voor. Die metaboliese voorganger van riboflavin is guanisien wat in RNA of DNA voorkom. Byvoeging hiervan kan die groeikoers van E. fetida moontlik beïnvloed. 'n Klein hoeveelheid (180 mg) RNA is verkry en in hierdie studie gebruik. Lipiede is ook 'n moontlikheid wat ondersoek is. Cholesterol was egter die enigste lipied wat in 'n analitiese graad beskikbaar was. Cholesterol is dierlik van oorsprong, 'n komponent van selmembrane en dien ook as basiese struktuur vir hormoonsintese (De Wet & Opperman, 1980, pp.182-197). Dit is egter nie bekend of cholesterol vir erdwurms van belang is nie. Hierdie ondersoek is volgens die protokol in tabel 12 gedoen. Twee wurms van dieselfde ouderdom is per fles gebruik.

Die resultate van die ondersoek word in tabel 13 weergegee. Dit is duidelik dat die teenwoordigheid van RNA of cholesterol in die medium die groeikoers van E. fetida positief beïnvloed het. Hier is slegs 'n moontlike aanduiding van 'n invloed, aangesien die hoeveelhede, veral van die RNA, te klein was. Hierdie en die voorafgaande ondersoek, het egter duidelik getoon dat 'n

omvangryke studie om beter herhaalbaarheid en gekontroleerdheid te verseker, lonend sou wees. Die vorige ondersoeke kan as loodseksperimente beskou word om sekere tendense te bepaal. Nuwe tegnieke is ook beproef. Daar is o.a. bevind dat lugsirkulasie noodsaaklik is. Deur 'n klein opening in die deksel te maak, is hierdie probleem oorkom. Venter (1983,p.32-34) het van 'n groter opening wat met gaas bedek was, gebruik gemaak. Aangesien in hierdie studie aansienlik minder water in die medium teenwoordig was, is 'n klein opening in die deksel gebruik sodat waterverlies nog beperk kon word. Dit het ook later geblyk dat hierdie metode heel suksesvol was. In een geval het die humifiseerder van die klimaatkabinet ingegee, maar die droë lug wat vir 'n kort periode aanwesig was, het die medium skaars uitgedroog.

3.2.6 Die bruikbaarheid van die medium, soos dit tot dusver ontwikkel is, op 'n groter skaal

Gebruik van die medium soos beoog, impliseer dat 'n standaard protokol voorgestel moet word. In die vorige studies is van onsflesse as houers gebruik gemaak. Dit is kleinvolume flessies wat slegs 'n beperkte hoeveelheid medium en wurms kan bevat en dus net vir kort periodes gebruik kan word. Die oogmerk van die studie was om 'n langtermynstudie te kan onderneem. As mikpunt vir so 'n studietermyn is 'n periode van 30 dae gestel. Aangesien die hoeveelheid voedsel in die beoogde medium persentasiegewys baie laer as die beskikbare hoeveelheid voedsel in beesmis is, sou die tydperk wat die beskikbare voedsel volgehoue groei kan onderhou, heelwaarskynlik korter as die van beesmis wees. Vorige studies soos bv. die van Venter (1983) het die invloed van dieldrien op E. fetida oor 'n periode van 90 dae bestudeer. Lofs-Holmin (1980,p.28) het met periodes van 90 en 120 dae gewerk maar het ander spesies met 'n relatiewe stadige massatoename gebruik. Die resultate van Venter (1983,pp.54,56,57,58) toon egter wel aan dat invloede van xenobiote, in die geval dieldrin, wel na 30 dae merkbaar is. Pondflesse (500ml) soos gebruik deur Venter (1983,p.32) is gebruik. Hierdie houers het 'n wye nek en 'n breë bodem en vorige studies het die bruikbaarheid van die houers bewys.

Hierdie eksperiment is met 20 dae oue wurmpies uitgevoer. Die aanvanklike oogmerk van die studie was om 'n medium vir volwasse wurms te ontwerp. Die resultate van die vorige eksperimente het egter duidelik getoon dat hierdie medium nog nie voldoende en bevredigende groei kon onderhou nie. Volgehoue kokonproduksie kon dus nog nie verwag word nie, en kon dus ook nie as parameter gebruik word nie. Jong wurmpies groei egter baie vinnig en bied 'n geskikte parameter vir die vergelykende bepaling van die suksesvolheid van die verskillende mediums wat ondersoek is. Nadat genoegsame inligting verkry is, kan die beste medium vir verdere studie geselekteer en die bruikbaarheid vir volwasse wurms bepaal word.

Vanweë finansiële redes is DNA en nie RNA as guanisienbron gebruik. DNA is in 10 en 25 gram hoeveelhede beskikbaar (Merck,nr 42027), alhoewel dit nie analities suiwer is nie. Vyf 20 dae oue wurms is 'n dag na benutting van die medium in elke fles geplaas. Twee herhalings van elke medium is van elke samestelling berei

volgens die protokol van tabel 14. Die eksperimentele opstelling is sodanig dat een samestelling met meer as een ander samestelling vergelyk kan word.

Tabel 14. Protokol gebruik vir die bepaling van die bruikbaarheid van die medium oor langer periodes en op 'n groter skaal. Alle massas is in gram behalwe vitamien wat in mg aangedui word.

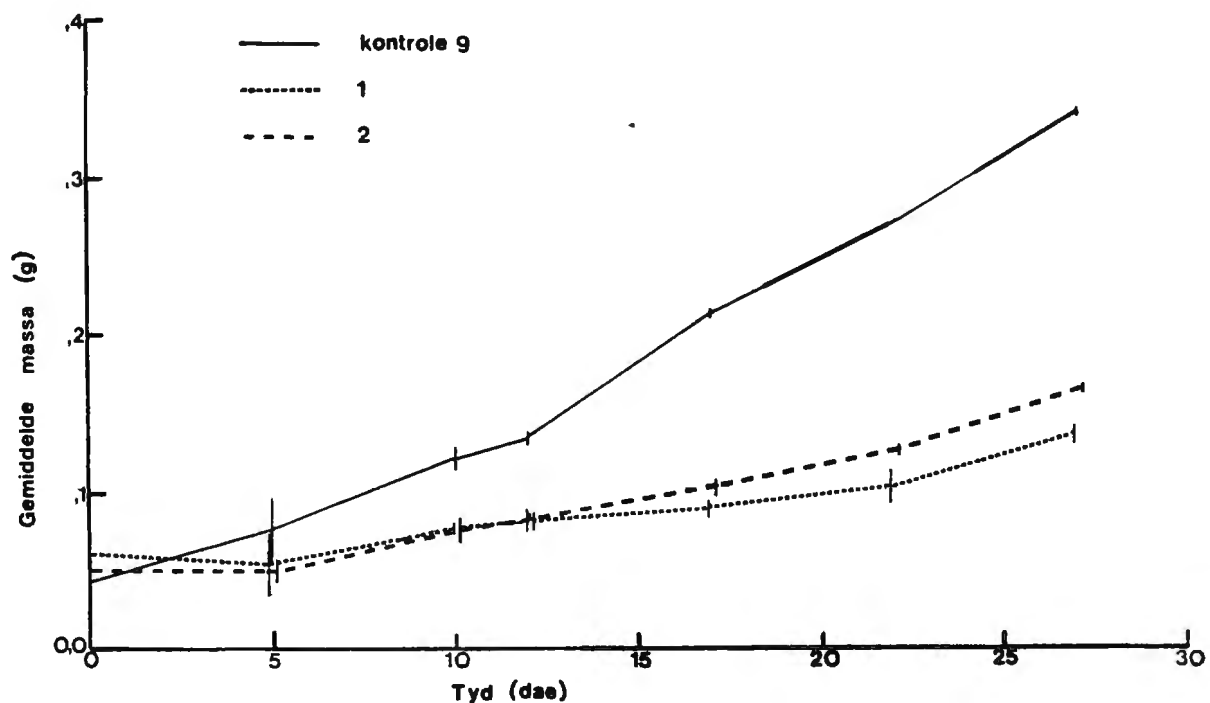
Nr	MCU	sel- lulose	kas- eïen	DNA	choles- terol	vita- miene	H ₂ O(dm ³)
1	193	7,0	0,7	0,0	0,0	0,0	0,080
2	193	7,0	0,7	0,0	0,0	1,2	0,080
3	193	7,0	0,7	0,4	0,0	1,2	0,080
4	193	7,0	0,7	0,8	0,0	1,2	0,080
5	193	7,0	0,7	0,4	0,5	1,2	0,080
6	193	7,0	0,7	0,8	1,0	1,2	0,080
7	193	7,0	0,7	1,6	2,0	1,2	0,080
8	186	14,0	0,7	0,8	1,0	1,2	0,085
9	beesmiskontrolle (200 gram)						

Die resultate van al die wegings word in bylaag tabel 9.7 gegee. Dit was egter van die begin af duidelik dat die standaardafwyking baie hoog sou wees. Dit was veral opvallend in die flesses wat goeie massatoename getoon het. In die meeste van die gevalle het vier van die vyf wurms goeie groei getoon, terwyl die vyfde een geen of net 'n geringe massatoename getoon het. Statistiese verwerking met 'n BMDP7D program het getoon dat die gebruik van al die waardes die tendense wat wel teenwoordig was, verberg het. In tabel 9.7 van die bylaag is die waardes wat as uitskieters beskou is, aangetoon. Daar is toe met 'n BMDP2V statistiese program 'n analise uitgevoer en die resultate word in figure drie tot agt gegee. Die data van die verwerking word in tabel 9.8 van die bylaag gegee.

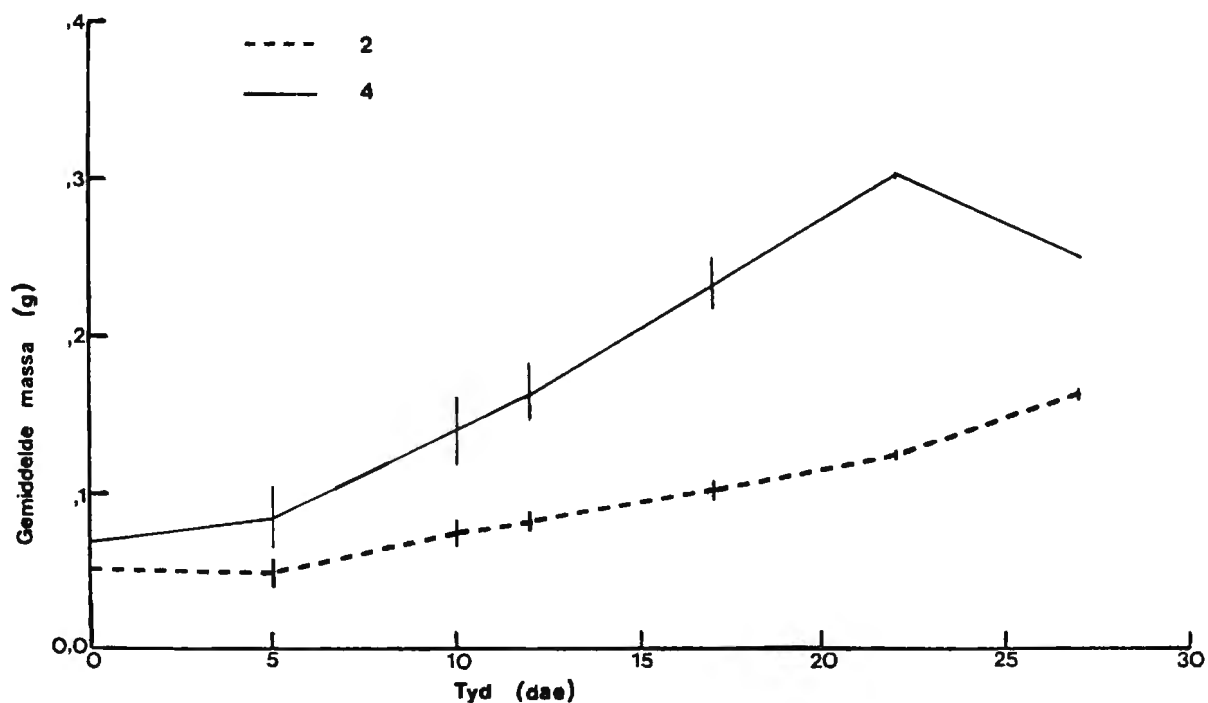
Figuur 3 toon die effek van die aan- of afwesigheid van vitamien aan. Medium een het geen vitamien nie, medium twee wel. Beide hierdie mediums bevat nie DNA of cholesterol nie. Die aanwesigheid van vitamien het moontlik 'n geringe invloed gehad. Beide het aanvanklik 'n massa-afname getoon maar na vyf dae het die medium met vitamien 'n feitlik konstante massatoename getoon. Al twee het egter ten opsigte van die kontrolle baie swak vertoon. Die gevolgtrekking wat gemaak kan word is dat die byvoeging van 'n klein hoeveelheid vitamien 'n klein, maar merkbare invloed op die massaverandering gehad het.

Die effek van die aan- of afwesigheid van DNA word in figuur 4 aangetoon. Al die ander faktore is konstant gehou. Medium twee het geen DNA gehad nie. Dat DNA 'n invloed op massatoename het, is nie te betwyfel nie.

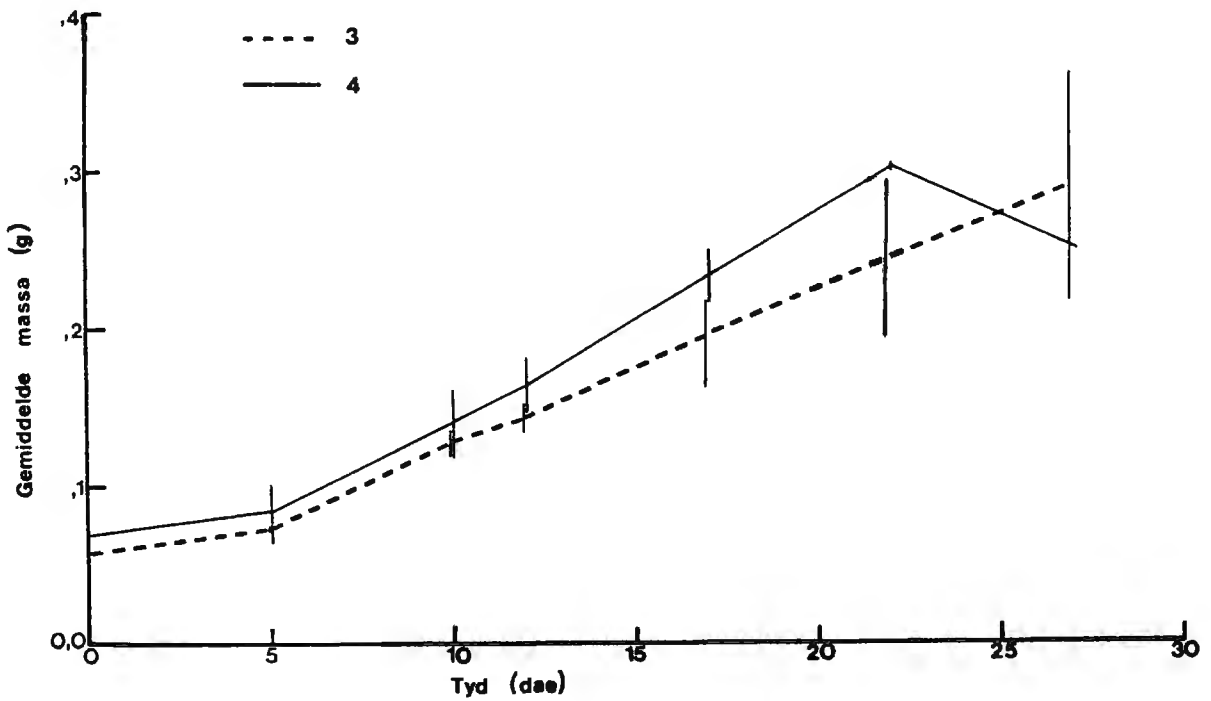
Daar is drie moontlike redes vir die positiewe invloed van DNA:
 1. Dit kan direk vir die metabolisme van riboflavin deur mikroorganismes gebruik word en die wurms direk bevoordeel, of die verhoogde riboflavinproduksie kan die omgewing meer gunstig vir die wurm maak.



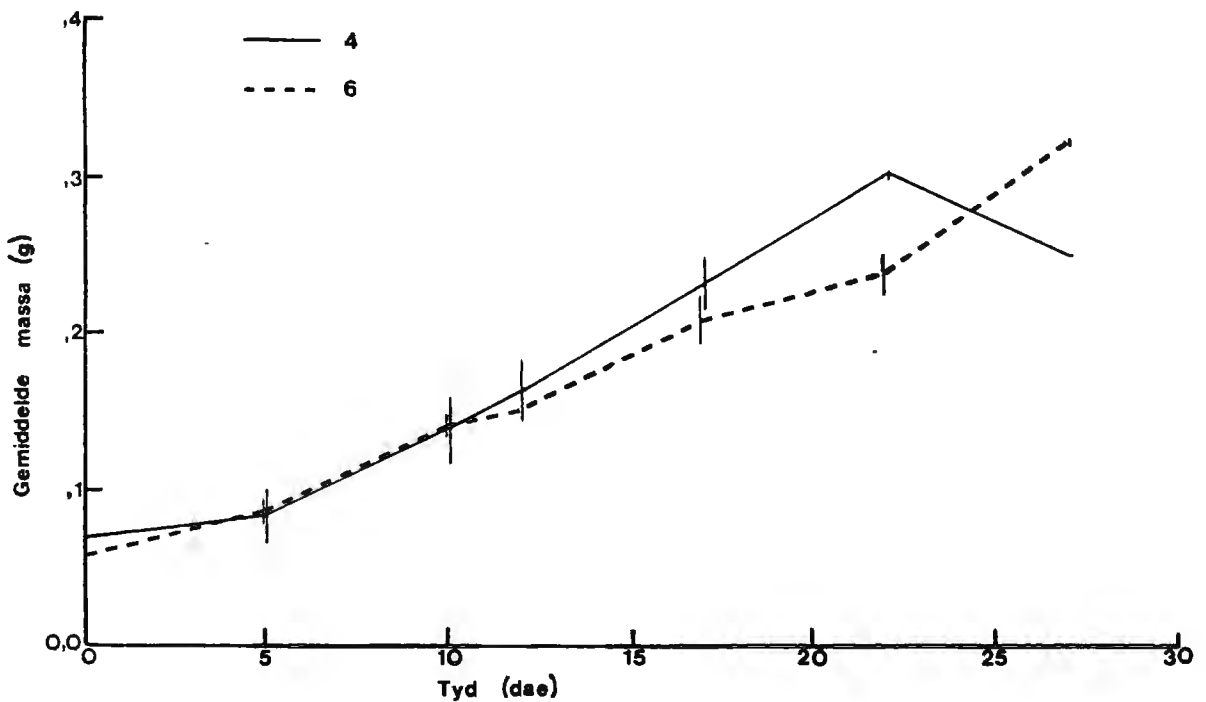
Figuur 3. Die invloed van vitamieene op die massaverandering van E. fetida. Die groeikromme van kontrollewurms in beesmisk word ook gegee. 1- Geen vitamieene, 2- met vitamieene en 9- kontrolle.



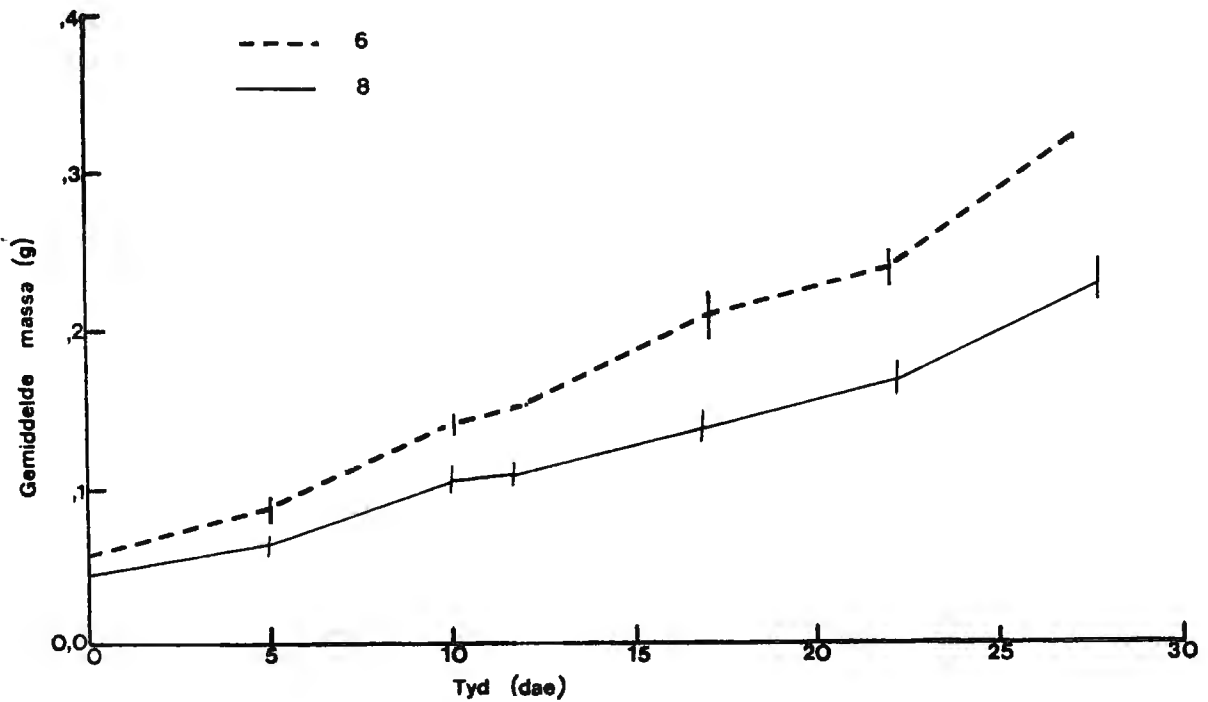
Figuur 4. Die invloed van DNA op die massaverandering van E. fetida. 2- 0,0 Gram DNA, 4- 0,8 gram DNA.



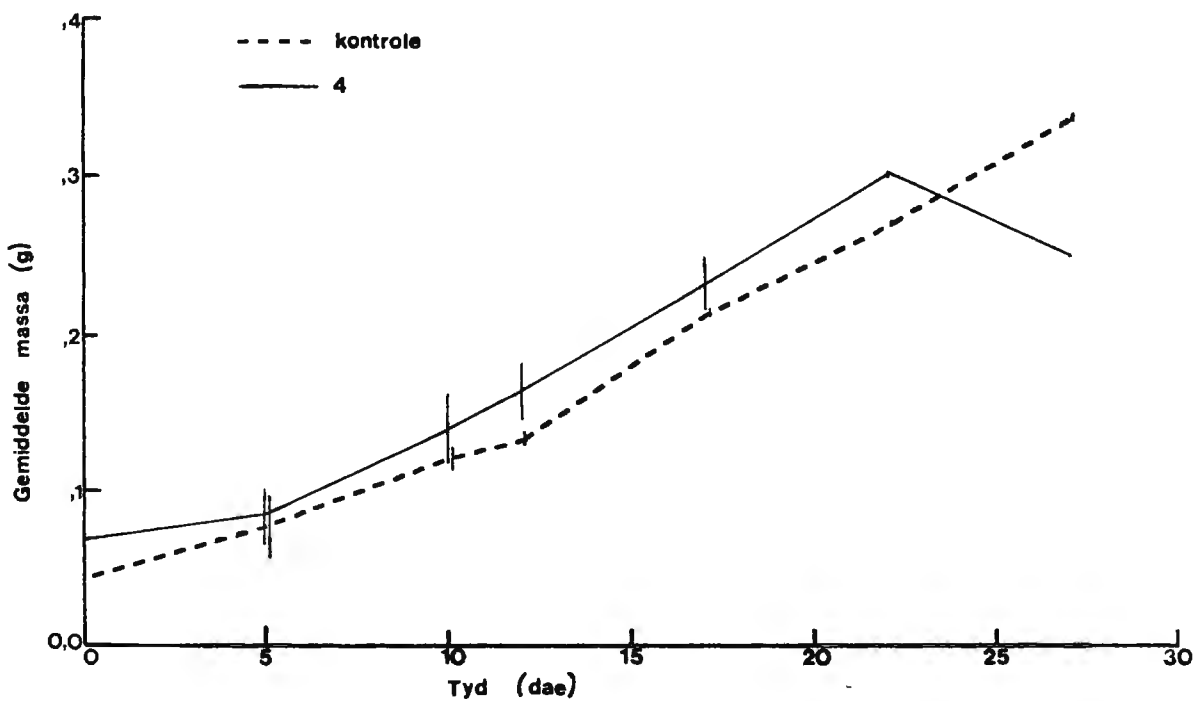
Figuur 5. Die invloed van verskillende hoeveelhede DNA op die massaverandering van *E. fetida*. 3- 0,4 Gram DNA, 4- 0,8 gram DNA.



Figuur 6. Die invloed van cholesterol op die massaverandering van *E. fetida*. 4- 0,0 Gram cholesterol, 6- 1,0 gram cholesterol.



Figuur 7. Die invloed van 'n dubbele hoeveelheid sellulose op die massaverandering van E. fetida. 6- 7,0 Gram sellulose, 8- 14,0 gram sellulose.



Figuur 8. Die medium waarin die wurms die beste massatoename getoon het (medium 4) in vergelyking met die kontrolle in beesmis.

2. Die tweede moontlikheid is dat die blote teenwoordigheid van DNA, mikrobiëse groei of samestelling kan beïnvloed.

3. Die derde moontlikheid is dat die DNA as bron van soute (bv. fosfate) of as addisionele energiebron (ribose) benut kan word. 'n Kombinasie van die drie is ook moontlik. Toevoeging van DNA het egter baie voordelig vir die erdwurms geblyk te wees.

Die massa-afname na 24 dae by medium vier was moontlik die gevolg van 'n onverklaarbare siekte. Hierdie afname in massa is nie by die ander mediums waargeneem nie. Dit kan nie 'n voedseltekort wees nie, aangesien wurms in ander mediums na 60 dae geslagsrypheid bereik het en selfs kokonne geproduseer het.

Figuur 5 dui die verskil in massatoename tussen mediums met verskillende hoeveelhede DNA aan. Medium drie het 0,4 g, en medium vier 0,8 g DNA. Daar was nie veel tussen hierdie twee te kies nie. Indien na die standaardafwykings gekyk word, vertoon die wurms in medium drie 'n stygende waarde. Net op dag 22 oorvleuel die standaardafwykings nie, en vertoon die wurms in medium 4 effens beter. Die beste medium kan as die een met 0,8 gram (medium 4) DNA beskou word.

Figuur 6 toon die invloed van cholesterol aan. Medium drie het geen cholesterol nie, terwyl medium ses 1,0 g bevat het. Medium ses toon 'n baie goeie massatoename aan, maar dit lyk asof die massatoename in vergelyking met medium drie, effens onderdruk word. Dit is veral die geval na 10 dae, maar dit lyk asof die groeikoers na 22 dae weer toeneem. Dit wil dus voorkom dat cholesterol groei onderdruk. In die volgende eksperiment is die invloed van cholesterol op volwasse wurms bepaal.

Figuur 7 toon die invloed van die byvoeging van 'n dubbele hoeveelheid sellulose aan. Alhoewel meer water aan die medium toegevoeg is (tabel 14), het medium 8 droog en taai vertoon. Om die medium minder taai te maak, is later klein hoeveelhede water toegevoeg. Dit wil ook voorkom dat die tendens van massatoename dieselfde as vir medium drie is, maar net onderdruk. Indien die waterinhoud van die medium verhoog sou word, kan goeie resultate dalk verkry word. Toeveging van meer water by die aanvang van die eksperiment sou nie die gewenste resultate oplewer nie aangesien die medium dan oorversadig met water sou wees. Na die terminering van die eksperiment is die twee flesse verder bestudeer maar geen lesings is geneem nie. Na ongeveer 45 dae het die wurms volwassenheid bereik en kokonne geproduseer. Ses maande na die afloop van die eksperiment het die wurms nog geleef en heelwat klein wurmpies was in die medium teenwoordig. Dit sal dus wenslik wees om mediums met 'n konsentrasie van 7 % sellulose ook in verdere studies te ondersoek.

Figuur 8 toon die groeikrommes van die wurms van die kontrole en van medium vier aan. Medium vier het van al die toetsmediums, groei die beste onderhou. Die groeikoers van die wurms van medium drie is tot by dag 22 beter as by die kontrole, maar die lae gemiddelde beginmassa moet ook in aanmerking geneem word. Die kontrolemedium gee ook 'n baie kleiner standaardafwyking as medium drie, wat daarop dui dat lg. medium nie 'n optimale medium is nie. Dit beteken dat die verskille tussen die wurms van dieselfde

bevolking onder 'n drukspanning (bv. voedsel- of watertekort) na vore gebring word, terwyl dit nie onder optimale kondisies die geval hoef te wees nie.

Die vorige resultate het 'n aanduiding gegee dat 'n belowende benadering gevolg is. Medium drie het baie belowend geblyk en daar is besluit om vir eers op hiedie samestelling te konsentreer. Volgens die protokol is 193 gram MCU in elke fles geplaas. Dit is gedoen om sewe gram sellulose (3,5%) te kan byvoeg om 'n totale massa van 200 g te verkry. Die ander byvoegings is so min dat die persentasie toevoeging uit 'n totaal van 200 gram bereken kan word.

Net om seker te maak is die eksperiment hierbo herhaal, maar met verskillende verhoudings cholesterol en DNA. Daar is met drie volwasse wurms (63 dae oud) per fles gewerk. Die wurms het baie vinnig weens 'n onbekende oorsaak gevrek. Die eksperiment is weer herhaal en alles is goed gekontroleer, maar dieselfde resultate is verkry. By nadere ondersoek het geblyk dat die cholesterol wat vir die twee mislukte pogings gebruik was, baie oud was en reeds vergalster het. Vanweë die vorige aanduidings, nl. dat dit lyk asof cholesterol die groeikoers mag benadeel, is besluit om nie verder met cholesterol te werk nie maar met meer natuurlike produkte wat wel in die grond voorkom.

3.2.8 Verdere ontwikkelinge en aanpassings aan die medium

Twee nuwe verbindings is vervolgens vergelyk met die medium wat tot dusver (medium 3, eksperiment 9) ontwikkel is. Daar is ook van net drie wurms per fles gebruik gemaak. Volwasse wurms is gebruik om tyd te bespaar aangesien die oogmerk van die studie die ontwikkeling van 'n aanvaarbare medium vir volwasse wurms was. Die twee nuwe verbindings is humussuur en pektien en is afsonderlik en in kombinasie getoets. Die humussuur is verskaf deur Dr. J.O. Oliver van die USDA, Maryland, VSA en die pektien is verkry van die Dept Plantkunde, PU vir CHO. In hierdie eksperiment is veral gekyk na kokonproduksie, maar die eksperiment sou langer duur aangesien die gegewens van die vorige eksperimente daarop dui dat die medium vir langer periodes as wat aanvanklik beoog is, gebruik kon word. Die protokol soos gebruik vir die ondersoek word in tabel 15 weergegee.

Dit was van die begin af duidelik dat die wurms nie in die mediums kon aanpas nie. Hulle het lusteloos vertoon en die medium is glad nie, soos in die vorige eksperiment, deurgewerk nie. Alhoewel die wurms wat aanvanklik ingesit is, almal klitellums gehad het en definitief in produksiestadium was, is slegs enkele kokonne in die eerste 20 dae na die aanvang van die eksperiment geproduseer. Na dag 20 is geen enkele kokon meer geproduseer nie (kyk tabel 16). In die medium wat geen humussuur en pektien bevat het nie (medium een) is slegs een kokon geproduseer. Die mediums soos dit hier aangewend is, is dus nie geskik vir kokonproduksie deur volwasse wurms nie.

Van die wurms het tydens die eksperiment gevrek. In alle mediums het vrektes voorgekom (kyk tabel 17), maar in medium vier (2,0 gram humussuur en pektien) is die eerste vrekte eers na 41 dae waargeneem. In mediums twee, drie en vyf is die eerste vrektes

TABEL 15. Protokol gebruik vir die bepaling van die invloed van humussuur en pektien op drie volwasse wurms.

Nr	sel- lulose	DNA	humus- suur	pek- tien	H ₂ O(dm ³)	Getal herhalings
1	7,0	0,8	0,0	0,0	0,080	3
2	7,0	0,8	2,0	0,0	0,080	2
3	7,0	0,8	0,0	2,0	0,080	2
4	7,0	0,8	2,0	2,0	0,080	2
5	7,0	0,8	2,0	0,2	0,080	

Tabel 16. Kokonproduksie van die wurms in die verskillende mediums. Die geakkumuleerde totaal word gegee. Die gemiddelde produksie word vir 25 dae per wurm gegee.

Nr	Dag	1	4	10	14	20	25	Gemiddeld
1		0	0	0	0	1	1	0,0044
2		0	2	6	11	13	13	0,0866
3		0	0	0	1	1	1	0,0044
4		0	0	0	4	6	6	0,0480
5		0	4	14	14	14	14	0,0933

Tabel 17. Vrektes onder die wurms het voorgekom. Die geakkumuleerde totale word gegee. "*" Dui aan dat die eksperiment getermineer is.

Nr	Dag	25	31	37	42	47
1		0	0	0	1	9
2		0	1	6	*	-
3		0	3	*	-	-
4		0	0	0	0	1
5		0	4	*	-	-

reeds na 31 dae waargeneem. Hierdie vrektes in al die mediums toon aan dat, net soos die kokonproduksiewaardes reeds die vermoede laat ontstaan het, nie een van die mediums vir volwasse wurms geskik was nie.

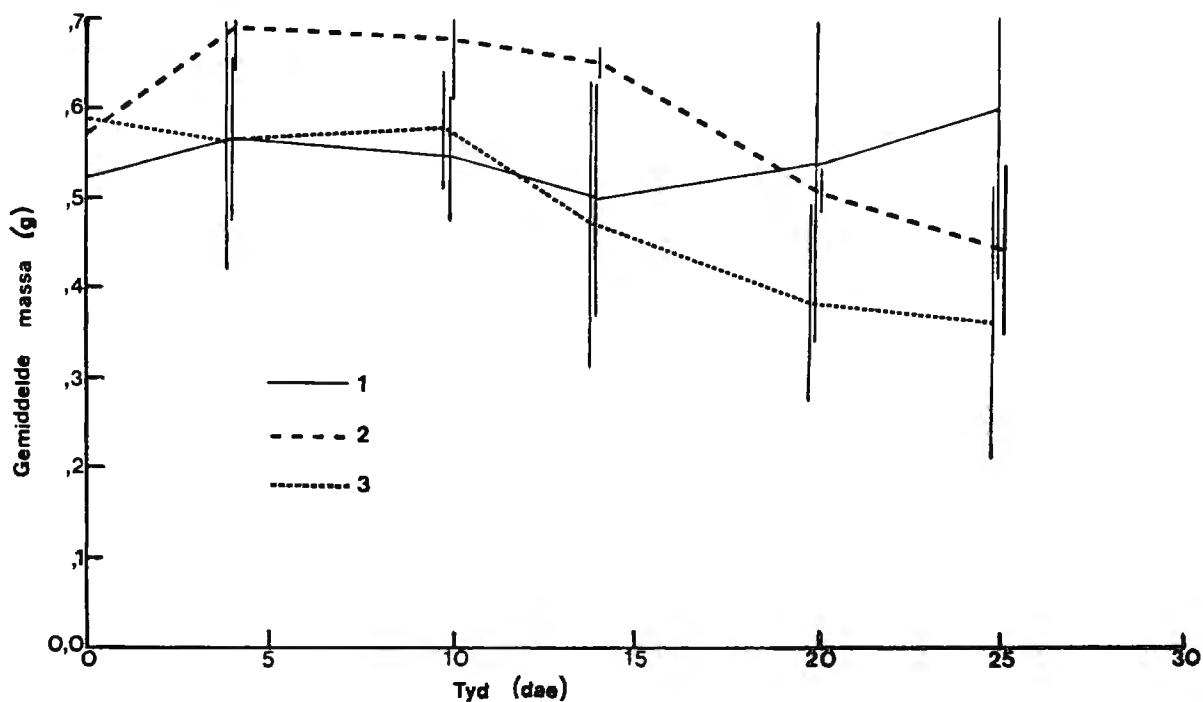
Figuur 9 dui die gemiddelde massaverandering van die wurms in medium een (geen humussuur of pektien), twee (2 gram humussuur) en drie (2 gram pektien) aan. Net die eerste 25 dae is deur die rekenaar vir verwerking in ag geneem, aangesien die datastelle a.g.v. vrektes onder die wurms onvolledig was. Onvolledige datastelle a.g.v. beskadiging is met 'n statistiese program aangevul (kyk 2.4). Dit is net die wurms in medium een wat geen resulterende massaverlies op die gemiddelde massa oor 25 dae toon nie, maar die standaardafwyking was te groot om enige uitsprake hieroor te kan maak. Dit is wel duidelik dat die wurms in mediums twee en drie, nadat die waardes konstant vir ongeveer 10 dae gebly het, 'n geleidelike massa-afname getoon het en dat die standaardafwyking ook groter geword het. Dit wil ook voorkom of die toevoeging van pektien (medium drie) nie voordelig vir die wurms was nie aangesien 50 % van die wurms reeds na 31 dae dood was en die massa-afname die grootste in die medium was. Dit sou dus raadsaam wees om vir eers minder pektien te gebruik.

Figuur 10 toon die gemiddelde massaverandering van die wurms in mediums vier (2 gram humussuur en pektien) en vyf (2 gram humussuur en 0,2 gram pektien) aan. Hier het by die die wurms in albei mediums 'n definitiewe massa-afname plaasgevind. Wat wel opvallend is, is die standaardafwyking wat dwarsdeur die eksperiment, relatief t.o.v. die ander mediums, konstant gebly het.

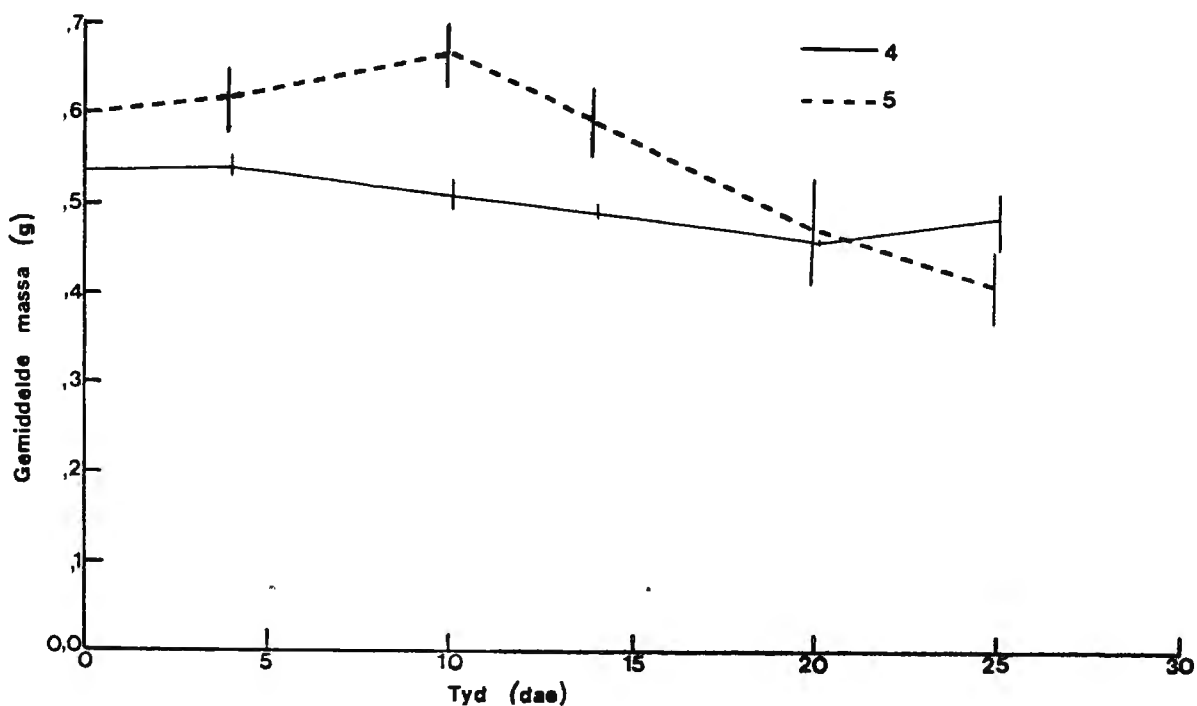
Dit is dus duidelik dat 'n protokol gebaseer op hierdie mediums en met volwasse wurms nie 'n oplossing vir die doelstelling van die ondersoek is nie. Die rede vir die nie-aanvaarding van die medium deur volwasse wurms is nie bekend nie, maar 'n waarskynlike rede is dat die wurms, wat vir 'n geruime tyd (116 dae) in beesmis gevoed het, nie in die nuwe medium kon aanpas nie. Dit het 'n paar interessante implikasies. Wat laat jong wurms, na slegs 20 dae in beesmis, wel suksesvol in die ander medium aanpas? Daar is twee moontlike verklarings wat, soos baie keer die geval in die biologie is, mekaar nie noodwendig uitsluit nie, maar selfs kan aanvul.

Die eerste moontlikheid is dat die wurms op 'n vroeë stadium die potensiaal het om by verskillende omstandighede (bv. verandering in die aard van die beskikbare voedsel) te kan aanpas en dat hierdie potensiaal met verloop van tyd verminder (of verander). Dit impliseer dat die wurms fisiologies (heelwaarskynlik die spysverteringsensiensistees) kan aanpas. Parallele voorbeelde in die natuur kom voor. Soos reeds in 2.2.5 van melding gemaak is, is daar verskeie organismes wat in sekere stadiums van ontwikkeling beter in staat is om in sekere toestande (bv. toksiese omgewings) te kan oorleef as in ander stadiums van ontwikkeling.

Die tweede moontlikheid is dat die simbiotiese mikrobiiese bevolking in die spysverteringskanaal van die erdwurm nie die potensiaal het om by drasties veranderde omstandighede aan te pas



Figuur 9. Die invloed van humussuur en pektien op die massaverandering van volwasse E. fetida. 1- Geen humussuur of pektien, 2- 2 gram humussuur, 3- 2 gram pektien.



Figuur 10. Invloed van kombinasies van humussuur en pektien op die massaverandering van volwasse E. fetida. 4- 2 Gram humussuur en pektien, 5- 2 gram humussuur en 0,2 gram pektien.

nie. Alternatiewelik kan 'n verandering van die simbiotiese bevolking, wat wel kan plaasvind, nadelig vir die wurm wees aangesien die simbiotiese verhouding reeds vir 'n geruime tyd bestaan het. Die moontlike wisselwerking tussen die twee aspekte is duidelik.

Daar was nou twee benaderings wat gevolg kon word. 'n Medium, wat aanvaarbaar vir volwasse wurms is, kon ontwikkel word of die ondersoek kon met jong wurms voortgesit word. Die voordeel wat laasgenoemde benadering inhou is dat meer parameters vir die bepaling van die subletale effekte beskikbaar is. Hierdie parameters sluit klitellumontwikkeling en aanvang van kokonproduksie in. Verder moet die jong wurms in massa toeneem en indien 'n xenobiot 'n invloed het, sal dit waarskynlik ook in die massaverandering weerspieël word. Volwasse wurms toon nie groot massaveranderinge in voordelige mediums nie, aangesien die maksimum massa vir optimale kondisies reeds bereik is. Invloede van xenobiot sal dus net in massa-afname weerspieël word. Om volwasse wurms in hierdie medium kokonne te laat produseer impliseer die ontwikkeling van 'n optimale medium wat nie die oogmerk van hierdie studie was nie. Sodanige ontwikkeling sal noodsaaklik wees aangesien massa-afname andersins die gevolg van, of die medium, of die xenobiot sowel as die medium sal wees. Identifisering van tendense sou dus op grond van massaveranderinge moeilik wees.

Jong wurms het verder die voordeel dat, indien die eksperiment vir 'n bevredigende periode, groei tot volwassenheid kan onderhou, die invloed van die xenobiot op beide die jong en die volwasse kokonproduserende diere gedoen kon word. Dit het reeds geblyk (kyk 3.2.7) dat jong wurms volwassenheid in die medium kan bereik, alhoewel dit 'n geruime tyd kan duur. Die ondersoek is dus gekonsentreer op die verdere ontwikkeling van die medium sodat jong wurms binne 'n aanvaarbare periode volwassenheid kan bereik.

3.2.9 Evaluering van humussuur en pektien op die groeikoers van jong wurmpies.

Uit eksperiment 3.2.8 het geblyk dat volwasse diere nie in die medium kan aanpas nie maar dat jong wurms gebruik moet word. Dit het neergekom op 'n herhaling van die vorige eksperiment, maar met 'n maksimum van 0,1 % pektien. In 3.2.8 is daar weens die gebrek aan volwasse wurms nie 'n kontrolegroep in beesmis in die eksperiment ingesluit nie, maar aangesien hier met jong wurms gewerk is, is daar wel 'n kontrole ingesluit. Die probleem wat direk opgeduik het, was die hoeveelheid mis wat gebruik moes word. Eenvoudigheidshalwe is 280 gram benatte beesmis (oorspronklike groeimedium) gebruik en die volume het ongeveer ooreengestem met die vermikulietmedium wat ook ongeveer 280 gram geweeg het. Hier hou die ooreenkoms op aangesien die mis grotendeels organies is en die medium ongeveer 4-8 % organiese materiaal bevat het. Drie wurms (20 dae oud) is in elke fles gesit. Die uitleg van die eksperiment word in tabel 18 gegee.

Die oorspronklike data word in tabelle 9.10 en 9.11 van die bylaag gegee. Dit het reeds na 'n paar dae geblyk dat 'n wye verskeidenheid van response vewag kon word. Soos reeds in die

Tabel 18. Protokol gebruik vir die bepaling van die invloed van humussuur en pektien op die groei koers van 20 dae oue wurms. Massas is in gram.

Nr	sel- lulose	DNA	humus- suur	pek- tien	H ₂ O (dm ³)	Herhalings	Getal wurms
1	7,0	0,8	2,0	0,2	0,080	3	9
2	7,0	0,8	2,0	0,0	0,080	3	9
3	7,0	0,8	0,0	0,0	0,080	3	9
4	7,0	0,8	0,0	0,2	0,080	3	9
5	14,0	0,8	2,0	0,2	0,080	3	9
6	Beesmis kontrole 280 gram					3	9

Tabel 19. Betekenisvolle verskil van die massaverandering van die wurms in die verskillende mediums. Groepe wat onderstreep is, verskil betekenisvol (op die 95 % vlak) van mekaar.

Nr	4	3	1	2	5	6

Tabel 20. Kokonproduksie van die wurms in verskillende mediums. Die geakkumuleerde totale word gegee.

Nr	Dag	19	25	30	36	40	48	56	Gemiddeld
1		0	0	0	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0	0	0	0
3		0	0	0	0	0	0	0	0
4		0	0	0	0	0	0	0	0
5*		0	0	0	7	22	44	71	0,239
6		2	12	43	92	128	158	182	0,546

* Een wurm is op dag 14 beskadig en verwyder.

Tabel 21. Kokonproduksie van mediums vyf en ses. Die berekenings is gedoen vir die intervalle soos aangetoon.

Nr	Intervalle (dae)						
	14-19	19-25	25-30	30-36	36-40	40-48	48-56
5	0,000	0,000	0,000	0,146	0,469	0,344	0,422
6	0,044	0,185	0,467	0,907	1,00	0,417	0,333

bespreking van 3.2.8 genoem is, het die wurms in al die mediums 'n massatoename getoon. Van die mediums is goed deur die wurms deurwerk, ander glad nie. Die wurms in die kontrolemedium het 'n baie vinnige groei getoon. Tabel 19 toon dat mediums vyf en ses betekenisvol van die ander verskil. Hierdie verskil word ook deur die ander parameters uitgewys.

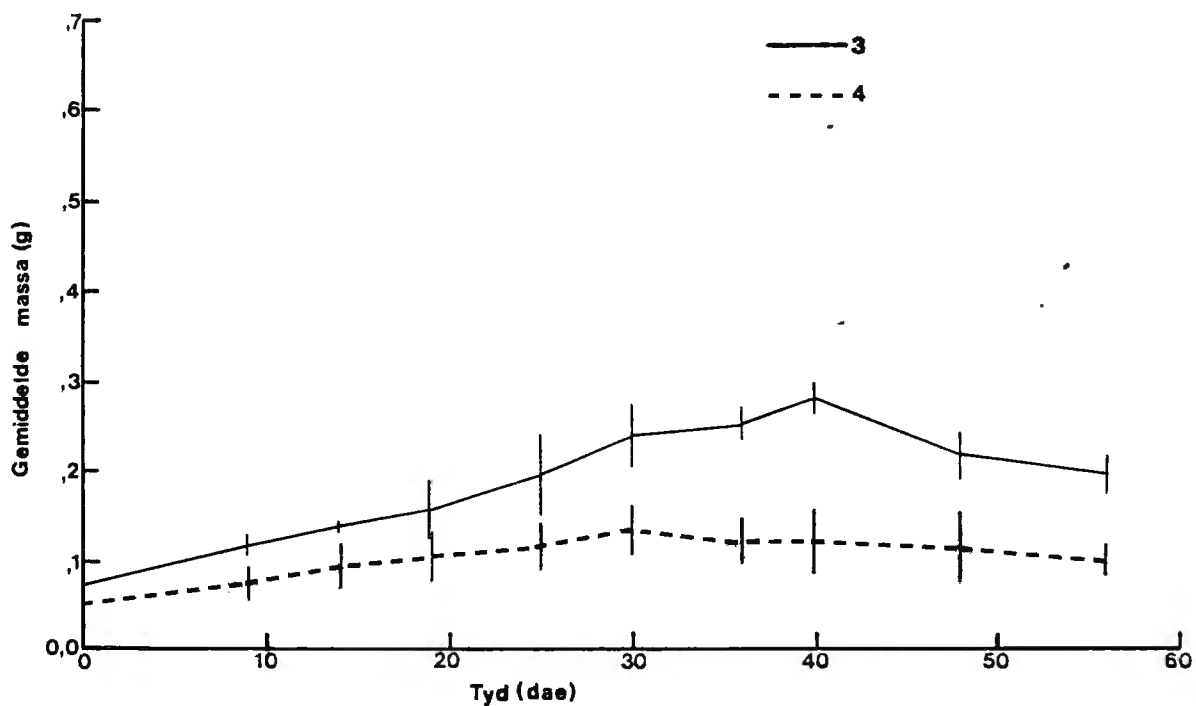
Die wurms was skaars 40 dae oud toe die eerste kokonne in die kontrolemedium geproduseer is (kyk tabel 20). Dit is in ooreenstemming met die bevindinge van Venter (1983,p.64). Die kokonproduksie was egter hoër as die wat deur Venter (1983,p.65) vermeld word nl. 0,4 per wurm per dag vir 50 dae terwyl 0,54 in die kontrole van hierdie ondersoek oor 'n periode van 39 dae na aanvang van produksie (kyk tabel 21) waargeneem is. Die produksiekoers het 'n maksimum na 40 dae bereik toe in 'n periode van 4 dae die gemiddelde kokonproduksie een kokon per wurm per dag was. Die maksimum produksiekoers wat Venter waargeneem het, was 0,5 per wurm per dag. Die verskil is waarskynlik die gevolg van die lae bevolkingsdigtheid in die kontrole van die huidige ondersoek. Venter (1983,p.32) het 10 wurms op 'n medium, wat 100 gram droë mis as voedsel bevat, aangehou, terwyl drie wurms in 280 gram nat mis (72 % vog) vir die huidige ondersoek gebruik is. Die produksiekoers het afgeneem na 0,33 teen dag 56 wat ooreenstem met die geringe massa-afname na dag 40 (kyk fig. 15 en tabel 21).

Die enigste ander medium, behalwe die kontrole, wat kokonne geproduseer het, was vyf wat 7 % sellulose bevat het. Kokonproduksie het eers 36 dae na aanvang van die ondersoek begin. Bereken oor 'n periode van 20 dae was die kokonproduksiekoers per wurm 0,443 per dag. Vir vergelyking met medium 6 is die kokonproduksie ook vanaf dag 19 bereken (kyk tabel 21). Die produksiekoers het egter, in ooreenstemming met die volgehoue massatoename, geen duidelike afname getoon nie, soos dit wel by die kontrolegroep die geval was (kyk fig. 15 en tabel 21). 'n Interessante waarneming is dat geen noemenswaardige massaverandering tussen dag 40 en 48 plaasgevind het nie en dat die kokonproduksiekoers effens (van 0,469 na 0,344) gedaal het. Dit is weer gevolg deur 'n massatoename met 'n gevolglike styging in die kokonproduksiekoers. Dit wil dus op grond van 'n vergelyking van die kokonproduksie voorkom dat medium vyf (14 gram sellulose en 2 gram humussuur) die aangewese medium vir verdere evaluering is.

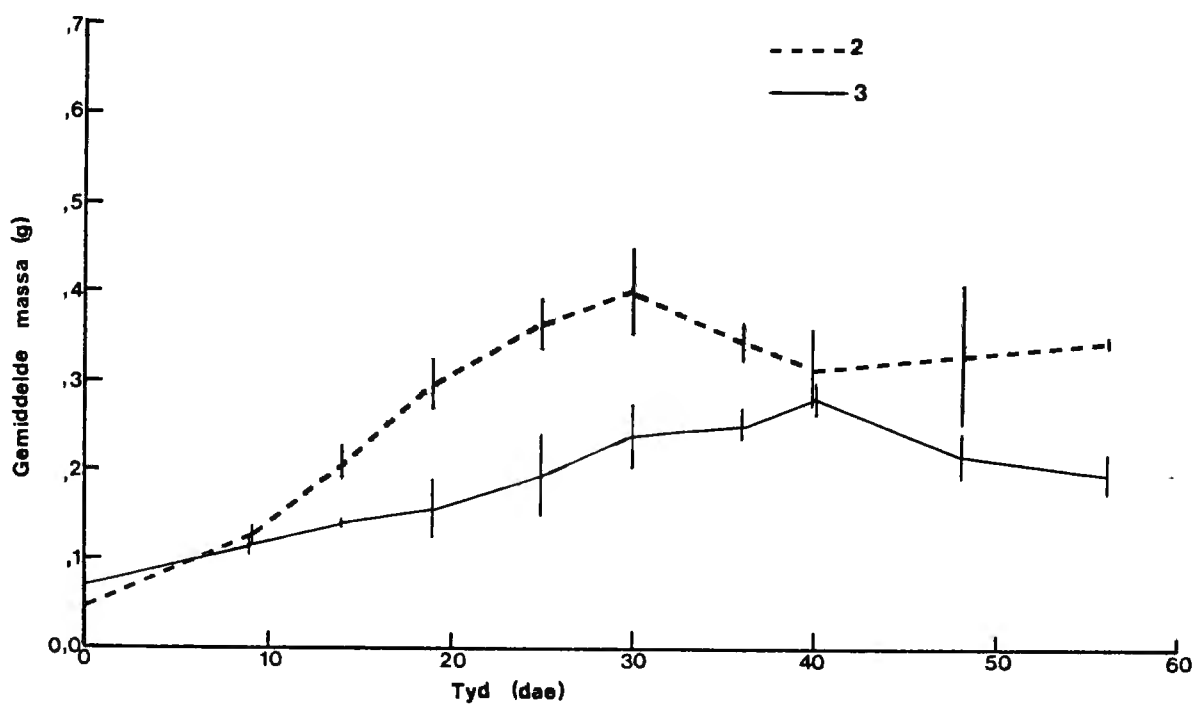
Figuur 11 toon die invloed van pektien op die massaverandering van E. fetida. Medium vier bevat 0,2 gram pektien en medium 3 geen. Die negatiewe invloed van die pektien word duidelik geïllustreer. Dit dui weer eens op die aanpasbaarheid van jong wurms in vergelyking met die van volwasse wurms, soos in 3.2.8 gebruik is.

Die invloed kom hier baie duidelik na vore terwyl net 'n vermoede in 3.2.8 uitgespreek kon word. Pektien is dus op grond van hierdie bevinding nie meer in die volgende eksperimente gebruik nie.

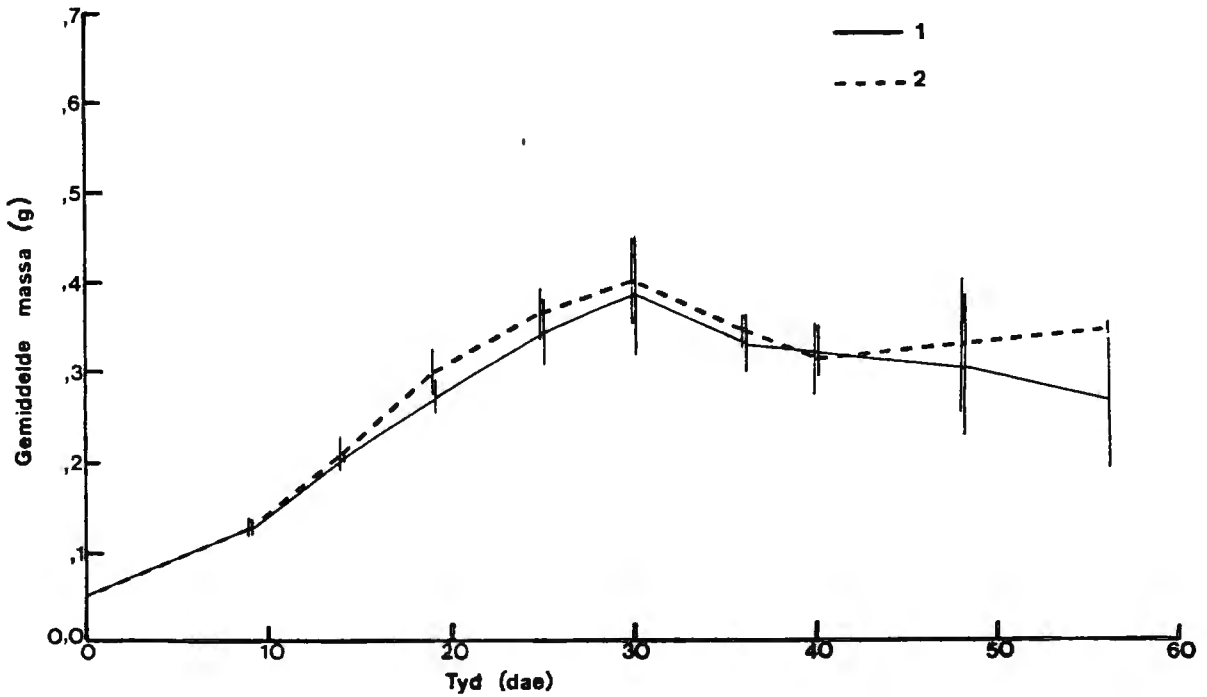
Figuur 12 toon die invloed van humussuur op die groeikoers van die wurms aan. Medium twee het 2 gram humussuur en medium drie het geen humussuur bevat nie. Weereens kom 'n baie duideliker beeld as in 3.2.8 te voorskyn. Humussuur het 'n definitiewe voordelige



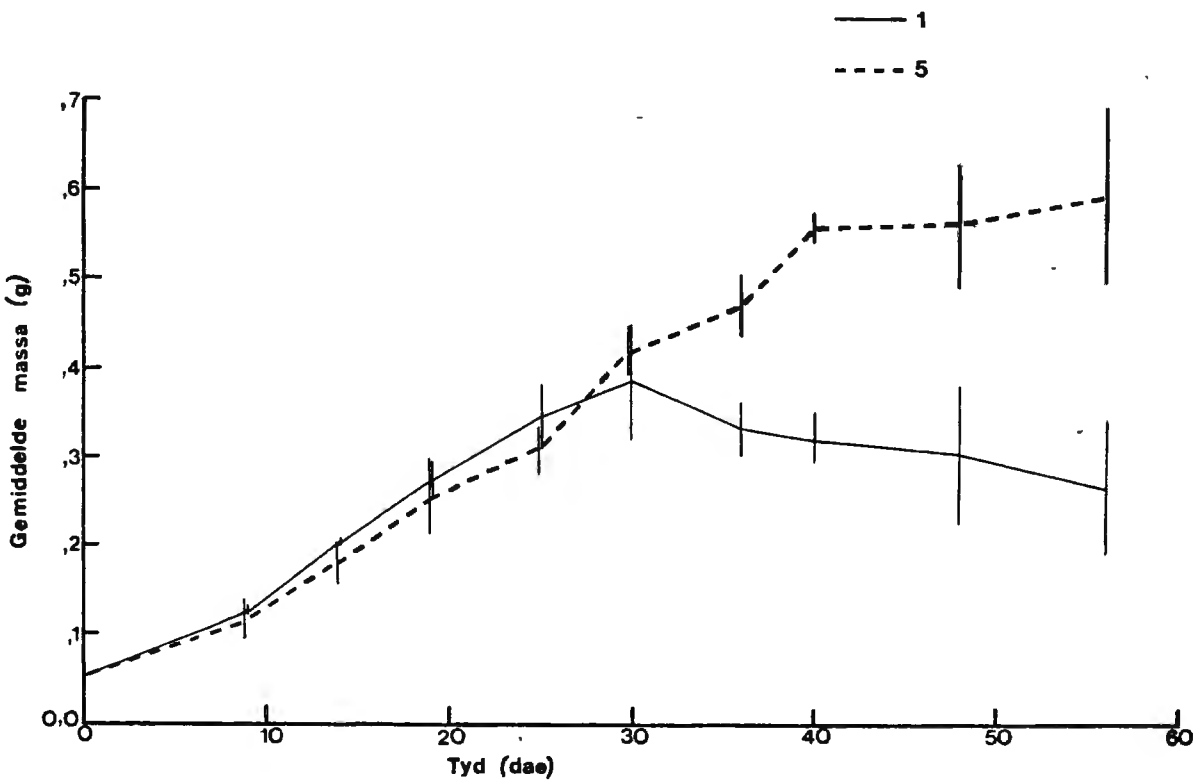
Figuur 11. Invloed van pektien op die massaverandering van *E. fetida*. 3- Geen pektien, 4- 0,2 gram pektien.



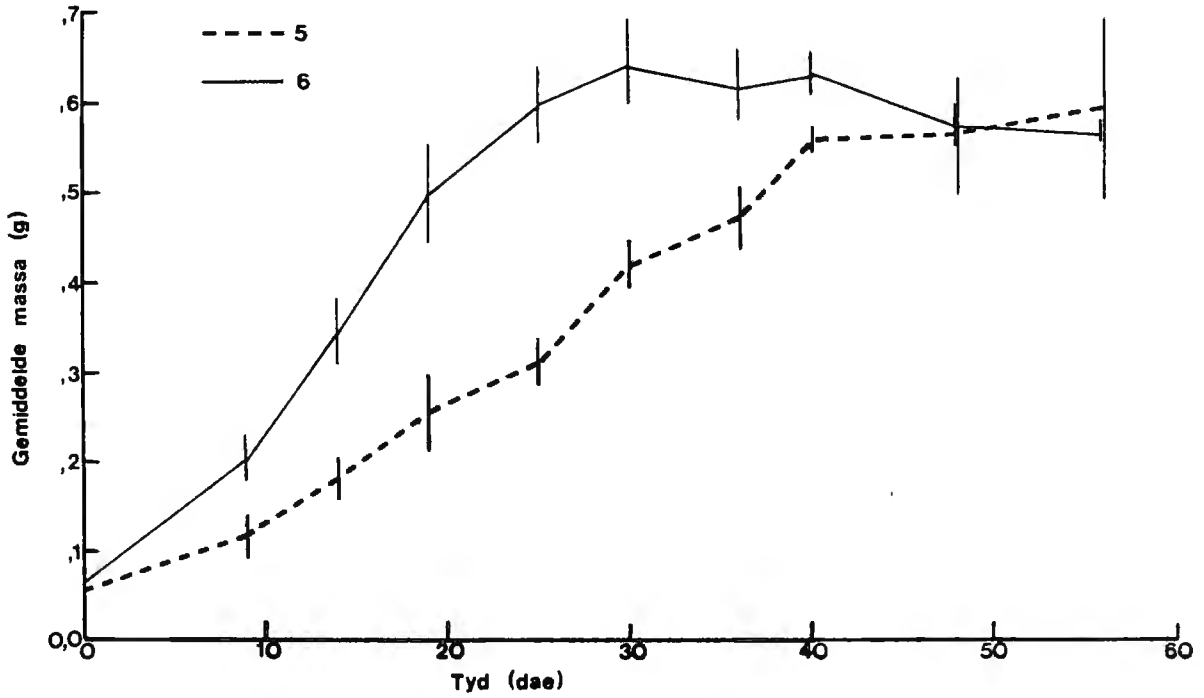
Figuur 12. Invloed van humussuur op die massaverandering van *E. fetida*. 2- 2 Gram humussuur, 3- geen humussuur.



Figuur 13. Invloed van humussuur en humussuur met pektien op die massaverandering van E. fetida. 1- 2 Gram humussuur en 0,2 gram pektien, 2- 2 gram humussuur.



Figuur 14. Invloed van verskillende hoeveelhede sellulose op die massaverandering van E. fetida. 1- 7 Gram sellulose, 5- 14 gram sellulose.



Figuur 15. Vergelyking van die massaverandering van die wurms in die medium (medium 5, 14 gram sellulose) wat die beste groei onderhou het, met die massaverandering van die wurms in die beesmiskontrolle (medium 6).

uiwerking op die groeikoers van die wurms gehad. Die massa-afname van die wurms in medium kon aan voedseltekort toegeskryf word.

Figuur 13 toon aan dat daar nie veel te kies is tussen 'n medium wat humussuur en pektien (medium een) en 'n medium wat net humussuur (medium twee) bevat nie. Dit wil dus voorkom dat pektien in hierdie geval geen invloed het nie en dus nie noodsaaklik in die medium is nie.

Figuur 14 gee 'n baie goeie beeld van die invloed van die uitputting van 'n voedselbron op die groeikoers van die wurms. Aanvanklik was die groeikoers dieselfde, maar na 30 dae het die wurms in medium een (7 gram sellulose) 'n massa-afname tot gevolg gehad, terwyl die in medium vyf (14 gram sellulose) op geen stadium 'n massa-afname getoon het nie. Hierdie tendens is slegs by mediums vyf en ses (kontrole) waargeneem. Die ander mediums het almal tussen dag 30 (mediums een, twee en vier) en 40 (medium drie) 'n geleidelike massa-afname begin toon.

Spekulasies oor hierdie waarnemings kan nou in die lig van die bevindinge van Hartenstein (1980, p.295-298) gemaak word (kyk 3.2.1). Hy het geen noemenswaardige effek met die teenwoordigheid van humussuur aangetoon nie, maar die medium waarmee hy gewerk het, nl. geaktiveerde rioolslik, het reeds humussuur bevat. Die humussuur wat hy gebruik het, is hieruit geëkstraheer. Die verskil tussen die groei van die wurms in aan- en afwesigheid van humussuur soos met 3.2.9 vasgestel is, is sodanig dat afgelei kan word dat die teenwoordigheid van humussuur, indien nie noodsaaklik nie, voordelig vir die wurms is om 'n volgehoue en bevredigende groei te kan verseker. Die rede is moontlik dat humussuur 'n noodsaaklike komponent vir groei bevat soos deur Hartenstein geïmpliseer is. Of is die teenwoordigheid van humussuur voordelig in die sin dat voordelige mikrobiële groei gestimuleer word sodat 'n meer voordelige milieu ontstaan bloot vanweë die teenwoordigheid van die humussuur? Of is dit dalk dat 'n spesifieke mikrobiële bevolking geskep word, wat die noodsaaklike komponent uit die humussuur kan vrystel? Of is dit 'n kombinasie van enige van die drie? Hierdie vrae moet noodwendig eers onbeantwoord gelaat word omdat die huidige studie nie daarop antwoorde kan verskaf nie.

Figuur 15 toon die verskil aan in die groeikoers tussen die wurms van die kontrole en die medium wat die beste vertoon het (medium vyf) aan. Medium vyf het 'n feitlik liniêre groei vir die eerste 40 dae vertoon terwyl die kontrolegroep 'n skerper maar ook liniêre toename vir die eerste 30 dae getoon het. Medium vyf was ook die enigste ander medium waarin die wurms kokonne geproduseer het (kyk tabel 20). Na 30 dae het die kontrolegroep 'n plato bereik en selfs 'n massa-afname getoon terwyl die wurms in medium vyf stadiger in massa toegeneem het. Die verskille tussen die twee mediums is dat die wurms a.g.v. die meer voordelige aard van die kontrolemedium 'n vinniger groei as die wurms in medium vyf getoon het. Die massa-afname kan moontlik aan die baie hoë kokonproduksiekoers toegeskryf word aangesien die medium nog nie uitgeput kon gewees het nie. Medium vyf het 'n laer groeikoers vertoon maar dit was altyd positief en die kokonproduksie was ook relatief konstant. Die enigste werklike ooreenkoms tussen medium

vyf en die kontrole kan duidelik in figuur 15 gesien word, nl. die ooreenstemming in die biomassa na bereiking van volwassenheid.

Uit hierdie eksperiment kan afgelei word dat jong wurms die beste aanpas in 'n medium met 7 % sellulose, maar dat pektien liefs vermy moet word. Die aangewese medium was in hierdie stadium dus medium vyf, maar sonder die pektien.

3.3 DIE ONTWIKKELING VAN EKSTRAKSIEPROSEDURES VIR KARBOFURAAN

3.3.1 Oorwegings vir analise

Die algemene gebruik van chemiese metodes om peste en plaë te bestry, het noodwendig tot die ontwikkeling van analitiese metodes gelei, om die vlakke van die chemiese stowwe in die omgewing te bepaal. In die oorgrote meerderheid van gevalle is die vlakke van kontaminasie baie laag en word spesiale analitiese metodologie vereis. Gaschromatografie is sekerlik die mees geskikte analitiese tegniek en verreweg die meeste analyses word hiermee gedoen. Die geskiktheid van hierdie tegniek is geleë in die feit dat goeie kwantitatiewe resultate teen 'n redelike koste verkry kan word (Sonchik, 1982, bl 402).

'n Deel van die doel van die studie was om die invloed van karbofuraan op E. fetida te bepaal. Dit is duidelik dat interpretasie van die korrelasies tussen die konsentrasies in die wurm en medium met die waargenome biologiese response net moontlik is, indien die konsentrasie gifstof in elk noukeurig bepaal kan word.

In 2.2.3 is van die termiese onstabiliteit van karbofuraan melding gemaak. Die analitiese prosedure moes daarby aangepas word sodat die karbofuraanmolekule op 'n chemiese wyse na 'n meer stabiele verbinding verander kon word. Hierdie proses word derivatisering genoem. Daar is 'n hele paar tegnieke vir hierdie reaksie ontwikkel en die meerderheid hiervan behels die hidrolise na die fenol gevolg deur die binding van 'n gehalogeneerde verbinding aan die hidroksielgroep. Die produk is dan termies stabiel en kan m.b.v. 'n elektronvangsdetektor of 'n NP-detektor (stikstof-fosfor) bepaal word.

Die analise van 'n monster behels die volgende stappe.

1. Monsterneming en storing.
2. Homogenisering van monster.
3. Byvoeging van standaard indien nodig.
4. Ekstraksie van gifstof uit monster.
5. Skoonmaak van ekstrak.
6. Derivatisering van gifstof.
7. Opmaak tot geskikte volume.
8. Analise van ekstrak.
9. Verwerking van resultate.

Aan die hand van hierdie skema sal die prosedures verduidelik word. Alhoewel 'n hele paar analitiese prosedures vir karbofuraan in die literatuur beskikbaar is, vereis die implementering van sulke prosedures verskeie aanpassings om plaaslike omstandighede in ag te neem. Die grootste veranderinge word noodsaak deur die aard van die monster. Die gevolg is dat die ekstraksie- en skoonmaakprosedures hiervolgens aangepas moet word. Die werk van verskeie outeurs kan dan geraadpleeg word, maar elke stap moet steeds afsonderlik getoets word.

3.3.2 Eksperimenteel

Die implementering van 'n nuwe prosedure gaan gepaard met heelwat

proeflopies. Met die ontwikkeling van 'n analitiese prosedure vir karbofuraan is 'n sekere benadering gevolg. Die aard van die werk is chemies en 'n breedvoerige uiteensetting hiervan sal nie hier gegee word nie.

Eerstens is aan die analise van die gifstof aandag geskenk. Dit is noodsaaklik om die analise eerste te doen, sodat ekstraksiedoeltreffendheid van verskillende ekstraksieprosedures bepaal kan word. 'n Standaardoplossing van karbofuraan is opgemaak en verskeie tegnieke is geprobeer. Derivatisering met trichloro-asynsuur is volgens 'n metode van Butler & McDonough (1970,p.496-7) gedoen. Dit was egter nie suksesvol nie. Derivatisering met 1-fluoro-2,4-dinitrobenseen (FDNB) is gedoen (aangepas volgens die metodes van Cohen, Norcup, Ruzicka & Wheals,1969,p.252 en Holden, Jones & Beroza,1969,p.57) en na heelwat pogings is sukses behaal. Optimisering van die prosedure t.o.v. reaksietye en konsentrasies het gevolg en dit het tot 'n bevredigende prosedure met 'n goeie herhaalbaarheid gelei. Eers hierna kon met die ontwikkeling van 'n ekstraksieprosedure begin word.

Vir die ekstraksie van karbofuraan uit vermikuliet is verskeie ekstraksieprosedures uitgetoets. Die eerste prosedure wat ondersoek is, is aangepas vanaf Gordon & Dahm (1981,p.630). Dit het berus op die protonering van karbofuraan met 0,25N HCl, gevolg deur ekstraksie met etielasetaat en hekasaan (1:9). Opbrengste van 50% is verkry en verdere aanpassings is gemaak. Net etielasetaat is as oplosmiddel gebruik en 'n gemiddelde opbrengs van 82% met 'n standaardafwyking van 2,646 is verkry. Dit is 'n redelike opbrengs en hierdie metode is voorlopig gebruik.

Die volgende stap was die ekstraksie van karbofuraan uit E. fetida. Dit het 'n bykomstige skoonmaakprosedure vereis, aangesien heelwat meer lipiede en ander lipofiliese materiaal in die wurm voorkom. Hierdie stowwe sou saam met karbofuraan in die organiese fase (etielasetaat) skei en die analise onmoontlik maak. Die stowwe kon saam met die derivaat van die kolom elueer of dit kon die kolom kontamineer of oorlaai en bepaling onbetroubaar maak. Florisil word algemeen as pakmateriaal vir kolomme gebruik om ekstrakte van lipiede en pigmente met vloeistofchromatografie te suiwer. Die metodes wat Argauer (1969,p.888) en Gorder en Dahm (1981,p.630) gebruik het, is aangepas en 'n bevredigende prosedure is ontwikkel. Slegs 'n geringe verlies op die Florisilkolom is waargeneem.

Na die optimisering van die Florisilstap, is die ekstraksie van karbofuraan uit erdwurms volgens die ekstraksiemethode wat vir vermikuliet ontwikkel is, aangepak. Die metode was egter nie suksesvol nie. 'n Stabiele emulsie het gevorm en niks kon dit oplos nie. Ekstraksie sonder die HCl het belowend gelyk en 'n reeks eksperimente waardeur die doeltreffendheid van verskillende oplosmiddels ondersoek is, is gedoen. Dit blyk toe dat chloroform en etielasetaat dieselfde opbrengste lewer. Gevolglik is besluit om met chloroform as oplosmiddel te werk, aangesien dit goedkoper is en vinniger ingedamp kan word. Die metode is ook gebruik om karbofuraan van vermikuliet te ekstraheer en het goeie resultate gelewer. Die volledige ekstraksieprosedure word hieronder uiteengesit.

Glasware is as volg skoongemaak. Gebruikte glasware is oornag in 'n Ekstranbad by 50 °C geplaas. Die volgende oggend is dit met kraanwater afgespoel, gelaat om lugdroog te word en gespoel met chroomsuur. Hierna is dit weer met kraanwater gewas, gevolg deur asetoon.

3.3.3 Volledige ekstraksieprosedures

3.3.3.1 Apparaat en reagense

A. Gaschromatografie

Gaschromatograaf: 'n Carlo Erba reeks 2150 met 'n Ni⁶³-elektronvangs detektor is gebruik.

Kolom: glas, 4 mm binnedeursnee, 1 m of 1,5 m lank, gepak met 3% OV 17 op Gaschrom Q.

Kondisies: inspuitpoort 300 °C, oond 260 °C, detektor 275 °C.

Stikstofdraergas met 'n vloeï van 0,030-0,040 dm³ per minuut.

Kwantifisering: Piekhoogtes is gemeet en standaardkrommes is gebruik om konsentrasie te bereken.

B. Reagense

1. Florisil met 60-100 US. maasgrootte. Florisil is voorberei volgens Hall (1971, p.1349). Vir 15 min met warm gedistilleerde water gewas, water is afgedekanteer en die Florisil is vir 6 ure by 130 °C gedroog. Vir 2,5 ure by 680 °C geheraktiveer en daarna by 130 °C gehou.

2. 1-Fluoro-2,3-dinitrobenseen. Verskaf deur BDH, gebruik soos ontvang, 1% oplossing in asetoon (v/v), gestoor in 'n yskas.

3. Glisien. Verskaf deur BDH (10119), versadigde oplossing in gedistilleerde water.

4. Kaliumhidroksied. 0,5 N oplossing in gedistilleerde water, gestoor in 'n yskas.

5. Natriumsulfaat (anhydries). Vir 12 ure by 400 °C gedroog en in 'n glasfles gestoor.

6. Natriumtetraboraat. 5% oplossing in gedistilleerde water (m/v), gestoor in yskas.

7. Vermikuliet, MCU. Micronized Products, Johannesburg, Suid-Afrika, gebruik soos ontvang.

8. Gewasde seesand. Merck, gebruik soos ontvang.

9. Karbofuraan. 99% suiwer, oplossings in heksaan en asetoon.

10 Oplosmiddels. Asetoon, chloroform en dichlorometaan is in glas gedistilleer voor gebruik. Etiel-asetaat is gebruik soos ontvang.

3.3.3.2 Ekstraksie van karbofuraan uit vermikuliet en E. fetida

Ongeveer 5-10 gram van die medium is in 'n telflessie afgeweg. Hierna is 0,010 dm³ chloroform bygevoeg en in 'n ysbad teen 'n lae spoed vir vyf min. met 'n Virtis "45" homogenseerder gehomogeniseer. Die doppie is opgeskroef en die flessie is teen 1750 r.p.m. met 'n geskikte sentrifugeerder gesentrifugeer. Die chloroform is gedekanteer en die ekstraksie is herhaal. Die ekstrakte is in 'n rondeboomfles (0,050 dm³) gekombineer en met 'n draaiverdamper met die waterbad by 30 °C ingedamp. Hoër temperature kon tot verliese lei, aangesien die oplosmiddel 'n lae dampdruk het en "bumping" by hoër temperature voorkom. Direk na indamping is 0,005 dm³ van die 1:9 mengsel bygevoeg. Skoonmaak met Florisil het hierna gevolg.

'n Wurm waarvan die massa bekend is, is met 5 gram sand in 'n porseleinkroesie fyngehaal. Die materiaal is na 'n telflessie oorgedra en 0,010 dm³ chloroform is bygevoeg. Ekstraksie is verder soos vir vermikuliet gedoen. Na indamping is 0,005 dm³ van 'n 1:9 mengsel van etielasetaat en hekasaan bygevoeg en liggies geskud. Hierna het die skoonmaak met Florisil gevolg. Die kolom is as volg gepak. In 'n 0,005 dm³ gegradeerde pipet is van onder na bo die volgende gevoeg. 'n Glasvesel proppie, 'n laagie sand en 1 gram Florisil. Die kolom is as volg gewas. Eers 0,005 dm³ dichlormetaan, 0,005 dm³ waterversadigde dichlormetaan gevolg deur 0,005 dm³ van die 1:9 mengsel, is met 'n spuit deur die kolom gestuur. Die oplosmiddels is nie verder gebruik nie. Die ekstrak is versigtig op die kolom oorgedra en die fles is met 'n verdere 10 dm³ 1:9 mengsel gewas, wat ook op die kolom oorgedra is. Die kolom is met 'n verdere 0,020 dm³ 1:9 mengsel geëluëer. Al die eluaat is in 'n rondeboomfles opgevang. Dit is weer eens ingedamp en 0,005 dm³ aseton is bygevoeg. Hierna is met derivatisering voortgegaan.

Vir die bepaling van die ekstraksiedoeltreffendheid is 'n bekende hoeveelheid karbofuraan by die monster gevoeg en vir 'n paar minute laat staan. Hierna is met die ekstraksieprosedure voortgegaan.

3.3.3.3 Derivatisering van karbofuraan.

Na byvoeging van 0,005 dm³ aseton is 0,010 dm³ gedistilleerde water, 0,002 dm³ 0,5 N KOH en 0,0002 dm³ 1% FDNB is in die volgorde bygevoeg. Die prop is opgesit en met 'n rubberpypie vasgemaak. Die fles is vir 10 min. met 'n meganiese skudmasjien geskud en hierna vir 60 min in 'n verhittingsmantel by 80 °C verhit. Die fles is in 'n lopende waterbad afgekoel en 0,001 dm³ glisien oplossing is bygevoeg. Die prop is weer opgesit en die fles is vir 'n verdere 10 minute geskud. Die mengsel is na 'n 0,1 dm³ skeitregter oorgedra en die fles is vervolgens met 0,005 dm³ aseton en 0,010 dm³ hekasaan gewas. Dit is ook na die skeitregter oorgedra. Die skeitregter is vir 30 sekondes geskud en die fases is toegelaat om te skei. Die waterige fase is in die rondeboomfles geskei en die hekasaanfase is deur 2 gram Na₂SO₄ gedroog. Die waterige fase is weer geëkstraheer en die hekasaanekstrakte is gekombineer, ingedamp en na 'n geskikte volume, meestal met 0,002 dm³ hekasaan, in 'n telflessie opgemaak. Hierna is die analise met die gaschromatograaf gedoen.

Standaard is voorberei deur 'n bekende hoeveelheid karbofuraan in 'n rondeboomfles te voeg, die oplosmiddel af te damp, en te derivatiseer soos beskryf is. Nuwe standaard is daagliks opgemaak.

3.3.3.4 Bespreking

Derivaatvorming was kwantitatief en die herhaalbaarheid was baie goed. Met die elektronvangsdetektor is geen oorvleuelende pieke gekry nie. Glisien is gebruik om die FDNB wat nie gereageer het nie, uit die reaksiemengsel te verwyder, want dit sou andersins met die derivaatpiek ko-elueer. Die resultate in tabel 22 is verkry.

Enkelbepalings van $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ karbofuraan in E. fetida en $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ in vermikuliet het 100 % opbrengs gelewer en geen agtergrondprobleme is met die gaschromatografiese analise ondervind nie.

Filtrering van die ekstrakte soos deur Bowman & Beroza (1967,p.894) en Caro, Freeman & Turner (1974,p.860) deur filtreerpapier was nie nodig nie, aangesien die sentrifugering die deeltjies effektief vasgehou het. Klein vermikulietdeeltjies wat in die ekstrakte teenwoordig was, is effektief deur die Na_2SO_4 verwyder en het geen invloed op die opbrengs gehad nie. Die tyd wat die metode inbeslag geneem het, was kort genoeg om in 'n dag se tyd die ekstraksie en analise van ses monsters te voltooi.

Tabel 22. Triplikaatbepalings van die ekstaksiedoeltreffendheid van karbofuraan uit vermikuliet en E. fetida.

Nr	Karbofuraan	Piekhoopte	Opbrengs	%Opbrengs
<u>1. Vermikuliet</u>				
1	5 μg	158 mm	4,550 μg	91
2	5 μg	156 mm	4,500 μg	90
3	5 μg	164 mm	4,750 μg	95
		Gemiddeld	92%	
		Standaardafwyking	2,646	
<u>2. Wurm</u>				
1	5 μg	145 mm	4,765 μg	95,3
2	5 μg	145 mm	4,765 μg	95,3
3	5 μg	147 mm	4,900 μg	98,0
		Gemiddeld	96,2	
		Standaardafwyking	0,078	

4 BEPALING VAN DIE SUBLETALE EFFEKTE VAN KARBOFURAAN OP EISENIA FETIDA

4.1 Oorwegings en beplanning van die protokol

4.1.1 Inleiding

Aangesien 'n bevredigende medium ontwikkel is, is die bruikbaarheid van die medium om die subletale effekte van karbofuraan op E. fetida te bepaal, ondersoek. In hierdie ondersoek is gepoog om enkele oorwegings en probleme wat in die voorafgaande werk na vore gekom het, te vermy. Die belangrikste hiervan is die kwessie van versteuring van die medium. Alhoewel dit nie voorheen gedoen is nie, is 'n aangepaste metode gebruik om versteuring van die medium tot 'n minimum te beperk. Die wurms is net twee keer gedurende die ondersoek geweeg en die medium is tydens die blootstelling glad nie versteur nie. Dit word gedoen deur twee flesses per monsterneming (elke 10 dae) per konsentrasie te gebruik.

Daar is besluit om met drie vlakke van karbofuraan te werk maar die literatuur oor die toksisiteit van karbofuraan vir E. fetida is, soos in 2.2.5 uiteengesit, nie uitgebreid en duidelik nie. Stenersen (1979a, pp.66-47) het bevind dat vlakke tot 64 mg kg^{-1} geen letale uitwerking op E. fetida het nie. Hierdie vlakke is egter besonder hoog in vergelyking met vlakke wat met landbougebruik geassosieer word (Kuhr & Dorough, 1976, p.217). Gilman & Vardanis (1974, pp.625-628) het 'n waarde van 4 mg kg^{-1} as LD_{50} vasgestel. In die lig hiervan is besluit om met meer realistiese konsentrasies te werk. Die doel is in elk geval die bestudering van subletale effekte. Aanvanklik is beoog om met konsentrasies van 0,2, 2,0 en 20 mg kg^{-1} te werk, maar die 20 mg kg^{-1} is later na 10 mg kg^{-1} verminder. Die protokol van die eksperiment word in tabel 23 uiteengesit. Drie wurms met 'n ouderdom van 20 dae is per fles gebruik.

Tabel 23. Protokol vir die bepaling van die geskiktheid van die medium vir langtermyn toksikologiese studies. Opstelling is vir een kontrole- en drie blootstellingsgroepe.

Dag	Getal flesses per groep				Getal flesses	Getal wurms
1	1	1	1	1	4	12
10	2	2	2	2	8	24
20	2	2	2	2	8	24
30	2	2	2	2	8	24
40	2	2	2	2	8	24
50	2	2	2	2	8	24
60	2	2	2	2	8	24
Tot	13	13	13	13	52	156

Die volgende parameters is gemeet:

- 1 Massaverandering
- 2 Klitellum ontwikkeling
- 3 Kokonproduksie

- 4 Kokonmassa
- 5 Getal nakomelinge per kokon
- 6 Uitbroeipersentasie
- 7 pH van die medium
- 8 Nematoodbevolking
- 9 Waterinhoud van die medium
- 10 Verandering van 4 soutkonsentrasies en fosfor in die medium
- 11 Karbofuraankonsentrasie in die medium
- 12 Karbofuraankonsentrasie in die wurms.

Al die flesse is saam voorberei. Karbofuraan is in ongeveer 0,005 dm³ hoeveelhede aseton aan die droe medium toegedien, goed vermeng en vir twee dae laat staan sodat die oplosmiddel kon verdamp. Die kontrole flesse is met 0,005 dm³ skoon aseton behandel. Van die soutoplossing is 0,080 dm³ toegedien gevolg deur 0,001 dm³ beesmis ekstrak. Die medium is weereens goed vermeng en vir 'n dag laat staan. Daarna is die wurms, drie in elke fles, toegedien. Terselfdertyd is monsters van elke konsentrasie (een fles elk) geneem vir waardes van dag 1. Hierdie prosedure is elke 10 dae met twee flesse uit elke konsentrasie herhaal. Aangesien heelwat gedoen moes word is die monsterneming oor twee dae as volg versprei.

Dag 1

1 Die wurms is verwyder en geweeg terwyl die klitellum ontwikkeling ook genoteer is.

2 Die wurms is direk na weging op klam filtreerpeapier in 'n plastiek Petribakkie geplaas en vir 24 uur in die klimaatkabinet gelaat totdat die spysverteringskanaal leeg is.

3 Submonsters uit elke medium is afgeweeg vir die volgende:

3.1 Ongeveer 30 gram vir waterbepaling in 'n glas Petribakkie. Hierdie bakkies is in 'n oond by 80 °C vir 24 uur gedroog.

3.2 Twee submonsters per fles van ongeveer 8 gram medium in telflessies vir karbofuraanontleding. Die is in 'n vrieskas gestoor.

3.3 Ongeveer 12 gram medium van elke fles is in 'n onsflessie afgeweeg vir nematoodtellings. Die is by 'n temperatuur van ongeveer 9 °C gestoor.

3.4 Presies 10 gram medium is in 'n bekertjie afgeweeg vir pH bepalings. Die bepalings is so gou moontlik hierna gedoen.

4 Die medium is hierna op 'n metaal skinkbord omgekeer om kokonne te verwyder. Die kokonne is elkeen geweeg en in 'n sel van 'n multiselhouer geplaas. Die rede hoekom die medium na stap 3 deursoek is, is dat die waterinhoud van die medium sal verander tydens die deursoekprosedure van die medium. Verandering in die natmassa kan 'n verandering in al die parameters wat in stap 3 bepaal is, veroorsaak.

Dag 2

1 Een fles van elke konsentrasie is na die grondkundeseksie van die Landbounavorsingsinstituut te Potchefstroom geneem vir konsentrasiebepalings van kalium, kalsium, magnesium, natrium en fosfor. In een geval is 'n triplikaat monster (vooraf goed vermeng en weer in drie gedeel) laat ontleed om 'n aanduiding van die noukeurigheid te bekom.

2 Die waterinhoud is daarna bepaal deur die Petribakkies vir waterbepaling (stap 3.1) te weeg.

3 Die wurms in die Petribakkies is geweeg om die massa vir karbofuraanbepalings te verkry. Dit is gedoen omdat die medium wat in die spysverteringskanaal teenwoordig is, nog karbofuraan bevat en dus nie deel van die karbofuraankonsentrasie in die wurm uitmaak nie. Die wurms is daarna afsonderlik in telflessies geplaas en in 'n vrieskas bewaar vir analise.

4.2 Die invloed van karbofuraan op die groei koers van Eisenia fetida asook die bio-akkumulering van karbofuraan

4.2.1 Resultate

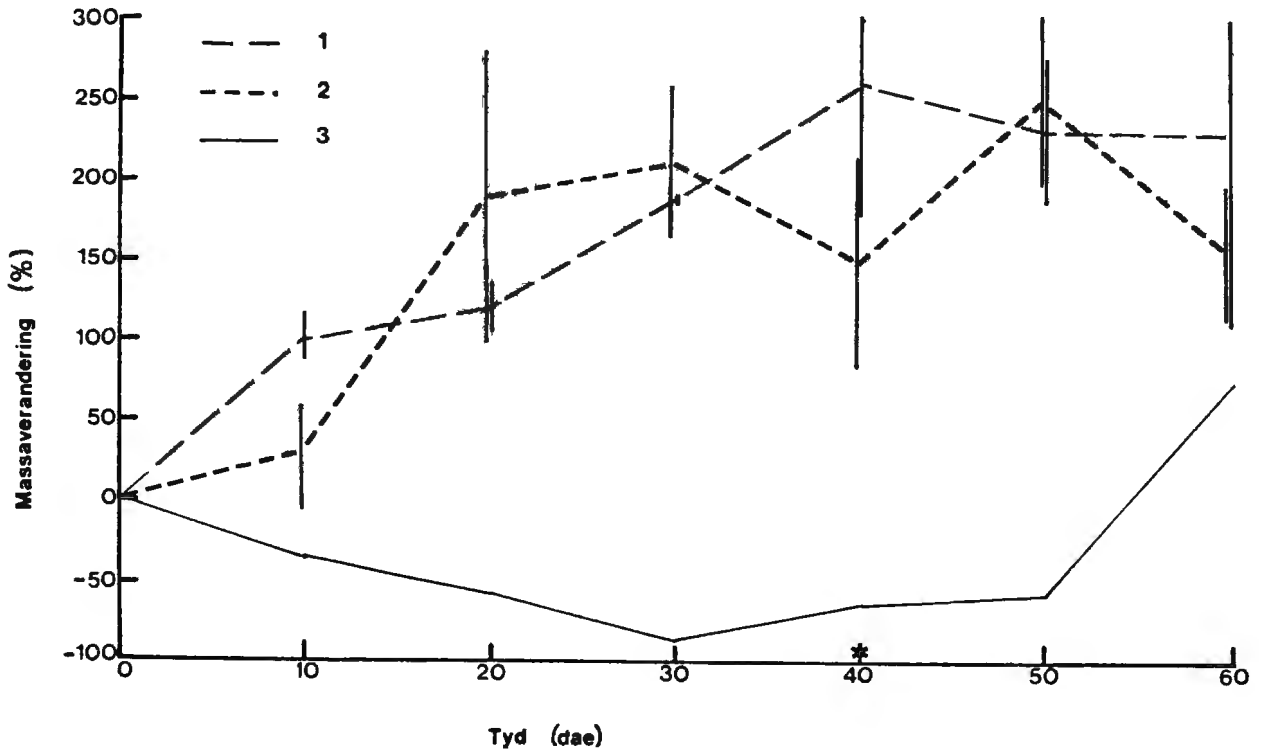
Figure 16 en 17 is grafiese voorstellings van die resultate. Figuur 16 gee die persentasie massaverandering van die wurms in die verskillende mediums en figuur 17 gee die afname in die konsentrasie van die karbofuraan in die medium aan.

4.2.1.1 Letale effekte van karbofuraan op E. fetida

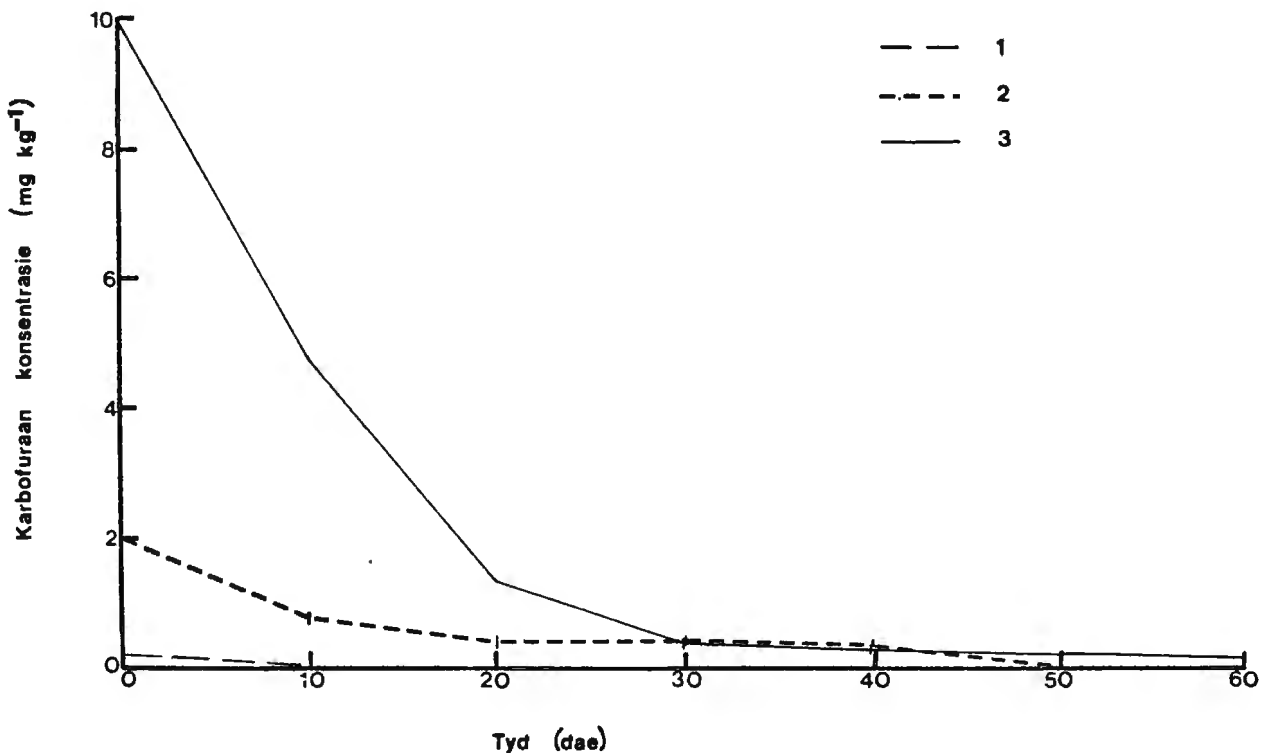
Eerstens het 'n konsentrasie van karbofuraan hoër as $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ mortaliteit tot gevolg. Al die wurms in die 10 mg kg^{-1} behandeling, met een uitsondering, het binne vier dae gevrek. In ooreenstemming met die waarnemings deur Stenerson (1979a,p.68) was die wurms nie in staat om in die medium in te beweeg nie en het ook geen pogings aangewend om in te grawe nie. Na 'n dag het heelwat van die wurms hidrostatische druk verloor, alhoewel van hulle nog lewe in die voorste segmente getoon het. Stenerson (1979a,p.68) meld dat E. fetida tot op vlakke van 64 mg kg^{-1} karbofuraan geen waterverlies getoon het nie. In die huidige studie het sommige van die wurms wel uitdroging getoon in so 'n mate dat die integument styf begin word het. Die integument van die ander wurms het tydens die verwydering uitmekaar geval maar nie die van die wurms wat uitgedroog het nie. Die moontlikheid bestaan dus dat meer as een meganisme van letaliteit hier optree.

Stenersen (1979,p.28) meld dat waterverlies by insekte moontlik 'n rol as verdedigingsmeganisme speel deurdat van die gifstof hierdeur verwyder kan word. Dit is reeds deur Gilman & Vardanis (1974,p.625), Stenersen (1979b,p.35) en Stenersen (1980,p.339) vasgestel dat parathion, oksamiel (Eng. oxamyl) en karbofuraan, wat in die wurm ingespuet is, vinnig deur E. fetida uitgeskei word. Venter (1983.b199) meld dat 'n hoë persentasie van die dieldrien in die liggaamsvloeistowwe van E. fetida voorkom vanwaar dit deur die dorsaalporieë uitgeskei kan word.

Die groot verskil van die resultate van Stenersen is die letaliteitsvlakke. Soos reeds in 4.1 genoem, was die keuse van konsentrasies 'n probleem. Stenersen meld geen letaliteit by vlakke van tot 64 mg kg^{-1} karbofuraan vir E. fetida nie, maar in die huidige studie is 97 % letaliteit by 10 mg kg^{-1} verkry. By die $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ behandeling het 69,7 % van al die wurms gevrek. Die vrektes het in die eerste 7 dae van die toediening voorgekom en dit was opvallend dat, met die uitsondering van drie flesses, al die wurms in flesses waar vrektes voorgekom het, gevrek het (sien tabel 9.13 van die bylaag). Wurms wat gevrek het, is in alle gevalle so gou as moontlik verwyder. By die 10 mg kg^{-1} behandeling was dit maklik aangesien die wurms bo bly lê het. By die $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ behandeling was dit moeiliker omdat van die wurms wat gevrek het, reeds in die medium inbeweeg het. Dit wil dus voorkom asof vrektes in die medium nadelig vir die oorlewende wurms mag wees. In al die gevalle wat waargeneem is, het 'n verlies aan hidrostatische druk die letaliteit voorafgegaan en is uitdroging nie hier waargeneem nie. Dit wil dus voorkom asof waterverlies as verdedigingsmeganisme by hoë konsentrasies verwag kan word. In



Figuur 16. Persentasie massaverandering van wurms by verskillende karbofuraankonsentrasies. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹.



Figuur 17. Afname van die karbofuraankonsentrasies in die verskillende behandelings. 1- 0,2 mg kg⁻¹, 2- 2,0 mg kg⁻¹, 3 10,0 mg kg⁻¹.

geeneen van die bogenoemde gevalle is herstel van verlies aan hidrostatiese druk waargeneem nie.

'n Opvallende verskynsel is by die enkele individu wat by die 10 mg kg⁻¹ behandeling oorleef het, asook by die wurms in die 2,0 mg kg⁻¹ behandeling, waargeneem. Al die wurms was kleiner as by die aanvang van die eksperiment en opvallend dikker en korter as normaal. Direk na verwydering was dit besonder opvallend dat ongeveer die laaste 10 segmente van die wurm omgekrul was. Dit is by al die wurms waargeneem. Die wurms is hierna vir 24 uur op filtreerpapier gelaat en na die periode was die wurms meer aktief, het 'n meer normale liggaamsvorm getoon en die krul in die agterste segmente is nie meer sigbaar nie. Hier moet egter gemeld word dat alhoewel die waarnemings nie gekwantifiseer kan word nie, die outeur reeds 'n paar jaar met E. fetida gewerk het.

Moontlike redes vir die verskil in die vermelde en verkrygte letaliteitsvlakke kan aan twee redes toegeskryf word. Die biologiese beskikbaarheid van die giftof sal na gelang van die aard van die medium verskil. Intraspesifieke verskille tussen die bevolkings van die wurms waarmee gewerk is, kan 'n groot rol speel. Die seleksie faktore aanwesig in Suid-Afrika en Noorweë (Stenersen) kan drasties verskil en vanwee die geografiese skeiding kan sekere eienskappe van die bevolkings verskil.

Tabel 24. Die P-waardes van betekenisvolheid tussen groepe asook die paarsgewyse vergelyking van die persentasie massaverandering. Laasgenoemde waardes is volgens die Bonferroni toets bepaal.

Dag	P-waarde (groep)	Paar		P-waarde (paarsgewys)	
		Nr	Nr		
10	0,0089	1	2	0,0933	*
		1	3	0,0401	*
		2	3	0,1422	*
20	0,0315	1	2	0,4002	*
		1	3	0,1535	*
		2	3	0,0895	*
30	0,5625	1	2	0,5625	**
40	0,2734	1	2	0,2734	**
50	0,7520	1	2	0,7520	**
60	0,1738	1	2	0,4931	*
		1	3	0,2905	*
		2	3	0,5340	*

* = Betekenisvolheid op die 95 % vlak word deur 'n waarde kleiner as 0,016667 aangedui

** = Betekenisvolheid op die 95 % vlak word deur 'n waarde kleiner as 0,0500 aangedui

4.2.1.2 Invloed van karbofuraan op die massaverandering van E. fetida

Figuur 16 toon die invloed van die konsentrasie karbofuraan op E. fetida aan. In vergelyking met die P-waardes in tabel 24 kan gestel word dat $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ karbofuraan geen noemenswaardige invloed op die groei koers van die wurms gehad het nie. Die moontlike rede vir die verskil t.o.v. die maksimum massas wat bereik is in vergelyking met die waardes verkry in 3.2.9 is dat die jong wurms onbeesmis aangehou is, wat nie van dieselfde lokaliteit afkomstig is as die wat in die vorige eksperimente gebruik is nie. Dit is reeds 'n ooglopende tekortkoming van die eksperimentele opstelling. Nie net was die aanvangsmassas hoër as in 3.2.9 nie, die omvang van die aanvangsmassas van die individuele wurms was ook heelwat groter. Die aanvangsmassas het gewissel tussen $0,3654$ en $0,0385$ gram wat beslis nie optimaal is nie. Die probleem is dat persentasie massaverandering verskil in klein en groot wurms. Meer hieroor in 4.2.2.

Die opvallende van die grafiek is die respons van die wurms in die 2 mg kg^{-1} behandeling. Die wurms wat nie gevrek het nie, het vir 'n periode van 30 dae kontinue massaverlies getoon. Dit is gevolg deur 'n periode van 20 dae waar die biomassa geleidelik toegeneem het. Oor die laaste 10 dae het die biomassa vinniger toegeneem, tot 'n massa hoër as die van die aanvangsmassa bereik is. Dit is die opinie van die outeur dat oor 'n langer periode die wurms volwassenheid sou bereik het en moontlik kokonne sou kon produseer. Die wurms het die medium merkbaar minder as die wurms in die kontrole en in die $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ behandeling deurgewerk. Die konsentrasie van die karbofuraan (figuur 17) in die 2 mg kg^{-1} behandeling het reeds na 40 dae tot onder 'n waarneembare vlak gedaal en dus kan aanvaar word dat die gifstof in die medium na die periode nie meer 'n faktor was nie. Die kontinue massaverlies oor die eerste 30 dae is bes moontlik nie die effek van die karbofuraan in die medium nie, maar eerder die gevolg van die skade opgedoen in die eerste paar dae toe die konsentrasievlakke skadelik was. Die passiwiteit wat die wurms tydens verwydering getoon het, is moontlik hieraan toe te skryf. Die probleem wat hierdie verklaring egter minder aanvaarbaar maak, is dat na 24 uur op filtreer papier, die wurms meer aktief voorgekom het. 'n Moontlike verklaring hiervoor is die subletale toksiese effekte van die afbraakprodukte van karbofuraan wat na verwydering van die wurms uit die medium nie meer in die omgewing teenwoordig is nie.

In figuur 16 is die massaverandering van die enkele individu, wat in 10 mg kg^{-1} behandeling oorleef het, gestip. Die "*" verteenwoordig 'n persentasie massaverandering van -82% van die oorspronklike gemiddelde massa van die drie wurms tydens die aanvang van die eksperiment. Hierdie enkele wurm het baie swak vertoon. Die wurm is in die boonste laag van die medium gevind en die medium is nie deurgewerk nie. Die vermoede is dat die wurm in 'n toestand van turpor verkeer alhoewel 'n klein hoeveelheid medium op die filtreerpapier geëkskretieer is. Die wurm het dus wel gevoed maar nie aktief die medium deurwerk nie. Die moontlike rede is dat die wurm op een plek gebly het aangesien die gifstofkonsentrasie in die onmiddellike omgewing vanweë metabolisme

deur die wurm self verlaag het. Oor die moontlikheid dat die wurm in 'n later stadium kon herstel het, word geen uitspraak gelewer nie.

Dit is wel duidelik dat bokant 'n sekere konsentrasie die karbofuraan 'n kritiese effek op die erdwurmbevolking sal he. Alhoewel van die wurms in die 2 mg kg⁻¹ behandeling herstel getoon het, is dit geensins seker dat die wurms onder natuurlike toestande sou oorleef het nie. In hierdie eksperiment is van die eksterne kondisies soos temperatuur en voggehalte kunsmatig op 'n optimale vlak gehou. Fluktuasies van hierdie faktore buite die optimale sal moontlik, in die toestand waarin die wurms verkeer, letaal kan wees aangesien die wurm hierdie fluktuasies minder effektief sal kan vermy (kyk ook Lofs-Holmin, 1980,p.33).

Veldstudies oor die invloed van karbofuraan op erdwurms is al gedoen. Tomlin & Gore (1974,p.491) berig 'n afname van 94,2 % in die getal wurms 21 dae na toediening van 3,4 kg karbofuraan per hektaar met 'n gepaardgaande afname in biomassa van 93,6 %. Die toediening van die karbofuraan (10kg/Ha = 5 mg kg⁻¹, verwerk volgens Talekar et al. 1977,p.340) verteenwoordig 1,7 mg kg⁻¹ karbofuraan. Die waardes vir benomiël (Eng. benomyl) stem baie ooreen nl. 94,6 en 91,3 % afname respektiewelik. Thomson & Sans (1974,p.,306) meld 'n statisties betekenisvolle verskil (P-waarde < 0,05) in erdwurmgetalle en biomassa drie weke na 'n toediening van 4,48 kg karbofuraan per hektaar (2,24 mg kg⁻¹ volgens bogenoemde verwerking). Na 'n jaar het die getalle en biomassa herstel. Hulle meld 'n afname van 60,4 % in die biomassa en 82,7 % afname in die getalle van erdwurms 21 dae na toediening van karbofuraan. Soortgelyke data is verkry met endrien (Eng. endrin) en karbariel.

4.2.1.3 Akkumulering van karbofuraan in E. fetida

Geen karbofuraan is in die lewende wurms waargeneem nie. Die enigste uitsondering was die enkele individu wat die 10 mg kg⁻¹ behandeling oorleef het. Daar is egter net spoorhoeveelhede in die wurm waargeneem en kwantifisering hiervan was nie moontlik nie. Die resultate stem ooreen met die van Stenersen (1979b,p.108). Hy het bevind dat na inspuiting van gemerkte karbofuraan in E. fetida, nagenoeg 100 % van die radioaktiwiteit binne 24 uur uitgeskei word. Dit beteken dat indien metabolisme van die karbofuraan in vivo plaasgevind het, die metaboliete ook verwyder is. Die resultate stem ook ooreen met die van Yu et al. (1974,p.434) wat ook geen oorspronklike karbofuraan in verskeie lewende diere in 'n mikro-ekosisteem waargeneem het nie. In veldeksperimente het Thomson & Sans (1974,p.307) geen karbofuraan in erdwurms ogespoor nie. Die analise van die gifstof in die huidige ondersoek, het net die bepaling van die oorspronklike gifstof in die lewende wurms behels, nie die analise van dooie wurms of metaboliete nie. Stenersen (1973,p.18) en Gilman & Vardanis (1974,p.627) het aangetoon dat metabolisme van karbofuraan wel in L. terrestris en E. fetida plaasvind. Akkumulering van gifstowwe in erdwurms word bepaal deur die aard van die gifstof. Dieldrien en ander gehalogeneerde pestisiede is persisterend van aard en kan nie maklik deur die erdwurm afgebreek word nie. Vanweë die lipofiliese aard van die stabiele verbindings sal dit in die erdwurm kan persister en akkumuleer (Beyer &

Gish,1980,p.303). Venter (1983,p.114) meld dat dieldrien nie in vlakke hoër as in die medium in die erdwurm geakkumuleer het nie.

Massaverlies is by al die wurms wat vir 24 uur op filtreerpapier gelaat is, waargeneem. In die huidige studie is 'n gemiddelde waarde van 18,12 % verkry (kyk tabel 24). Haretenstein, Hartenstein & Hartenstein (1981,p.19) het bevind dat in mis of rioolslik in die afwesigheid van grond, die spysverteringskanaalbelading 3 tot 5 % is. In grond alleen is die waarde 30 tot 70 % en waardes tussenin omgekeerd eweredig aan die slik konsentrasie bygevoeg tot die grond. Dit wil dus hieruit voorkom asof, soos reeds voorspel, die voedingswaarde van die medium nie van dieselfde waarde as die van mis is nie. Hierdie interpretasie word egter bemoeilik indien in aanmerking geneem word dat die wurm tydens die 24 uur periode vog in die vorm van slym afskei. Dit kan duidelik op die filtreerpapier waargeneem word. Hierdie afskeidings bevat waarskynlik ook van die gifstof en metaboliete. In die huidige studie is nie na die voorkoms van gifstof in of op die filtreerpapier gekyk nie. Die ekskreta van die wurms kan ook vir die teenwoordigheid van karbofuraan ondersoek word.

Tabel 24 Massaverlies van ses groepe van drie wurms elk na 24 uur op klam filtreerpapier om die spysverteringskanaal leeg te maak. Massas word in gram uitgedruk.

Dag	Groep	Aanvangs- massa	Eind- massa	Persentasie- verskil
30	1	1,2325	1,1023	- 11
30	2	1,7352	1,3646	- 21,4
30	2	1,0365	0,8771	- 15,4
60	1	1,2414	1,0317	- 16,9
60	2	1,6639	1,3547	- 18,6
60	2	1,5182	1,1333	- 25,4
\bar{X}				- 18,12
S.A.				4,97

4.2.1.4 Afname van die karbofuraan konsentrasie in die medium

Die opvallende kenmerk van figuur 17 is die vinnige afbraak van die gifstof in die mediums. Die meeste outeurs meld langer afbraaktye. Talekar, Sun, Lee & Chen (1977,p.350) meld 'n halfleeftyd van ongeveer 85 dae in 'n subtropiese grond met 'n pH van 8,5. Caro, Freeman, Glotfelty, Turner & Edwards (1973) berig 'n halfleeftyd van 46 tot 117 dae in gronde met 'n pH tussen 6,35 en 5,20. Williams et al. (1976,p.248) berig 'n halfleeftyd van 28 dae in leemgrond met 'n pH van 6,0 by 'n konstante temperatuur van 20 °C. Die aanvanklike konsentrasie was 1,0 mg kg⁻¹. Soos reeds in 2.2.6 gemeld is, is die afbraak toegeskryf aan mikrobiëse aktiwiteit. In teenstelling met die vorige outeurs berig Gorder, Dahm & Tollefson (1982,p.641) halfleeftye van 7 tot 9 dae in Kenyon-, Floyd-, Canisto- en Webstergronde met pH-waardes van 6,0, 6,0 7,6 en 7,8 respektiewelik. Die gronde het 27,5 mg kg⁻¹ karbofuraan bevat en die waterinhoud was 50 %. Die temperatuur is

tussen 22 en 27 °C gehou. In Clariongrond (pH 5,1) was die halfleeftyd ongeveer 14 dae. Die outeurs skryf die langer halfleeftyd aan die lae pH-waarde, wat moontlik die mikrobiëse aktiwiteit benadeel het, toe.

Bestudering van die bostaande data benadruk net weer die feit dat afbraak van karbofuraan, asook enige ander gifstof, nie aan 'n enkele faktor, of selfs 'n kombinasie van faktore, gekoppel kan word nie. Die kort halfleeftyd van karbofuraan in die huidige studie hou heelwaarskynlik verband met die aard van die medium. Die pH is effens alkalies, die voggehalte is meer as 40 %, 'n definitiewe mikrobiëse aktiwiteit is waargeneem en heelwat mesofuana soos myte, nematode, Enchytraeidae en rotifere is in die medium teenwoordig (kyk 4.6 en 4.7). Edwards (1975,p.51) meen dat die teenwoordigheid van addisionele energiebronne die afbraak van gifstowwe in grond versnel. So bv. sal toediening van glukose die afbraak van parathion versnel en toediening van beesmis die afbraak van DDT. In die huidige studie was 14 gram sellulose in die medium en die teenwoordigheid hiervan kon 'n hoër mikrobiëse aktiwiteit onderhou wat die afbraak van die gifstof kon versnel het.

4.2.2 Voorstelle vir veranderings aan die protokol

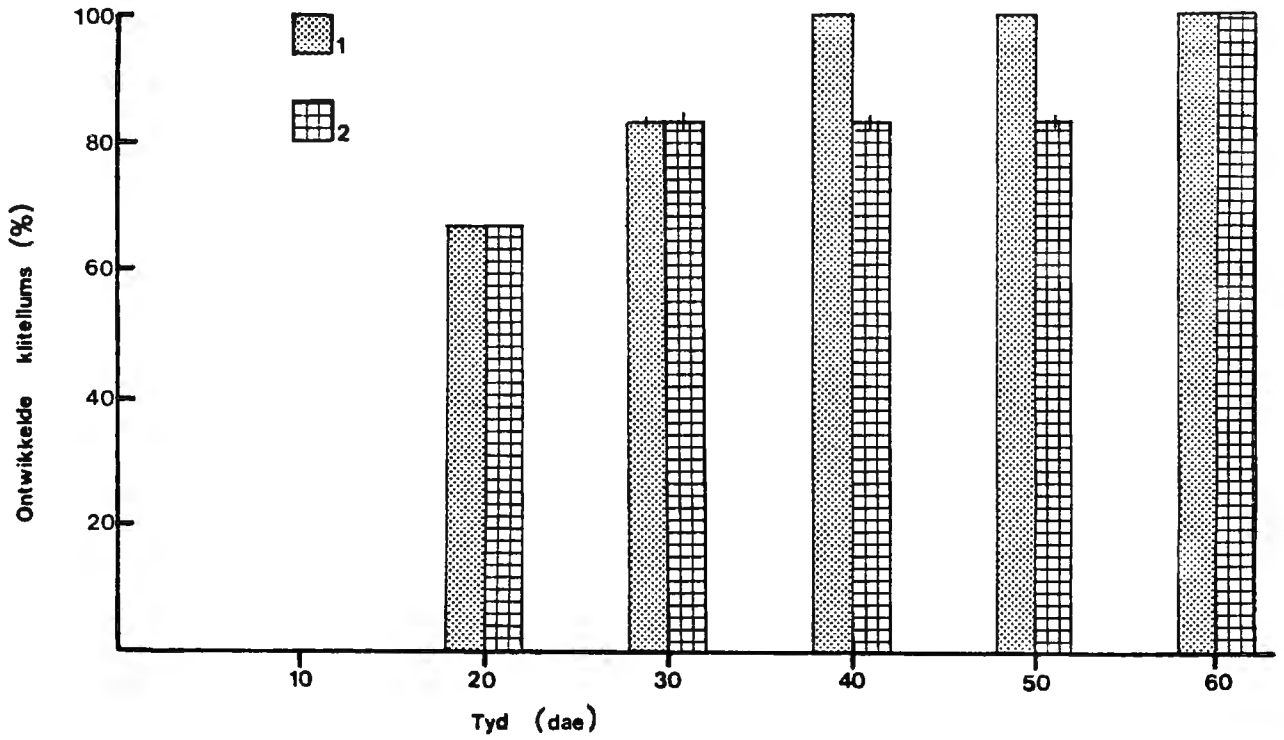
Die grootste nadeel van die protokol soos in hierdie ondersoek gebruik is, is die feit dat net twee wegings vir elke wurm gedoen is. Tesame met die groot variasie in die aanvangsmassa van die wurms, is waarskynlik 'n mate van die resoluëie op die statistiek van die eksperiment prys gegee. Die idee van die opstelling nl. om versteuring van die medium tot 'n minimum te beperk, het in retrospeksie, meer na- as voordele ingehou. In vergelyking met die respons van die wurms in medium vyf van 3.2.9, kan gestel word dat hierdie versteuring min, indien enige, invloed op die wurms sal hê. Deurlopende monitering van dieselfde wurms sal beter resultate lewer. Dit impliseer dat meer mediums vir so 'n studie gebruik sal moet word. Vir elke blootstellingskonsentrasie kan 11 mediums opgemaak word. Die wurms in vier van die flesse kan deurlopend (bv. elke vyf dae) vir massaverandering gemonitor word, terwyl elke 10 dae een van die ander flesse vir ekstraksie en annalise gebruik word. Die inherente nadeel van hierdie protokol is dat direkte korrelasie van die xenobiootparameters (akkumulasie en afbraak) nie met die biologiese parameters (massaverandering, kokonproduksie, ens) moontlik is nie.

'n Kleiner variasie op die aanvangsmassas van die wurms is gewens. Dit kan waarskynlik oorbrug word deur die wurms vir die eerste 20 dae op die ontwikkelde medium te laat voed. Die vraag is net of die wurmoëies in die medium sal kan aanpas. Andersins kan 'n medium wat vir 'n periode (bv. 20 dae) deur ouer wurms deurgewerk is, as groeimedium gebruik word. Dit het ook die verdere nadeel dat, om genoeg jong wurmpies te verkry, heelwat meer kokonne vooraf versamel sal moet word. Uit ervaring kan gesê word dat ten minste een kokon vir elke wurm versamel moet word. Kennis oor die faktore wat 'n rol in die uitbroeisukses van kokonne speel, is dus noodsaaklik. Hierdie ondersoek is terloops ook een van die probleemareas, wat geïdentifiseer is tydens die "Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues" (Carmody,1981,p.299).

4.3 Die invloed van karbofuraan op die ontwikkelingskoers van klitellums by Eisenia fetida

Figuur 18 gee 'n grafiese voorstelling van die ontwikkelingskoers van klitellums in die kontrole en die 0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan medium. Venter (1983,p.60) het klitellumontwikkeling reeds by wurms met 'n ouderdom van 30 dae gekry. By 'n ouderdom van 41 dae was 60 % van die wurms in die kontrolegroep reeds klitelaat terwyl 'n waarde van 90 % teen dag 61 verkry is. In vergelyking met die waardes wat in die huidige ondersoek verkry is, is die verskil toe te skryf aan die verskille in die ontwerpe van die eksperimente. Waar Venter (1983,p.44) 10 wurms (in 100 gram beesmis) gebruik het, is in 4.1 drie wurms (in 200 gram medium) gebruik. Soos dit reeds in 3.2.7 na vore gekom het, kan enige medium net 'n sekere getal wurms onderhou. Dit kan moontlik die oorsaak wees waarom in Venter (1983) se opstellings, die medium nie meer as 90 % van die wurms tot by klitelaatstadium kon onderhou nie. In die huidige studie is die getal wurms reeds vanaf vyf na drie verminder om die digtheid van die wurms te verlaag. Dit verklaar dat reeds 100 % klitelaat wurms by 'n ouderdom van 60 dae voorgekom het.

Die tendense in figuur 18 kan maklik verkeerd geïnterpreteer word. Dit lyk asof karbofuraan die ontwikkeling van klitellums vertraag aangesien die wurms in die 0,2 mg kg⁻¹ behandeling eers na 60 dae almal klitellaat is. Die verskil is egter toe te skryf aan net een wurm uit elke ses (by dag 30, 40 en 50) wat nie 'n klitellum ontwikkel het nie. Dit is nie noodwendig die gevolg van die invloed van karbofuraan nie, aangesien die massatoename en kokonproduksie nie hierdie tendens weerspieël nie (kyk 4.4). Dat karbofuraan wel 'n invloed op die ontwikkelingskoers van klitellums het, kan gesien word in die feit dat geen klitellumontwikkeling in die 2,0 mg kg⁻¹ behandeling waargeneem is nie. Die afleiding kan dus gemaak word dat bokant 'n sekere vlak tussen 0,2 en 2,0 mg kg⁻¹ karbofuraan, die ontwikkeling van klitellums vertraag of geïnhiber sal word. Om die vlak met groter sekerheid te bepaal sal opvolgekperimente gedoen moet word. Net soos in 4.1 gemeld is, sou 'n groter toetsgroep waarskynlik kleiner standaardafwykings verseker het.



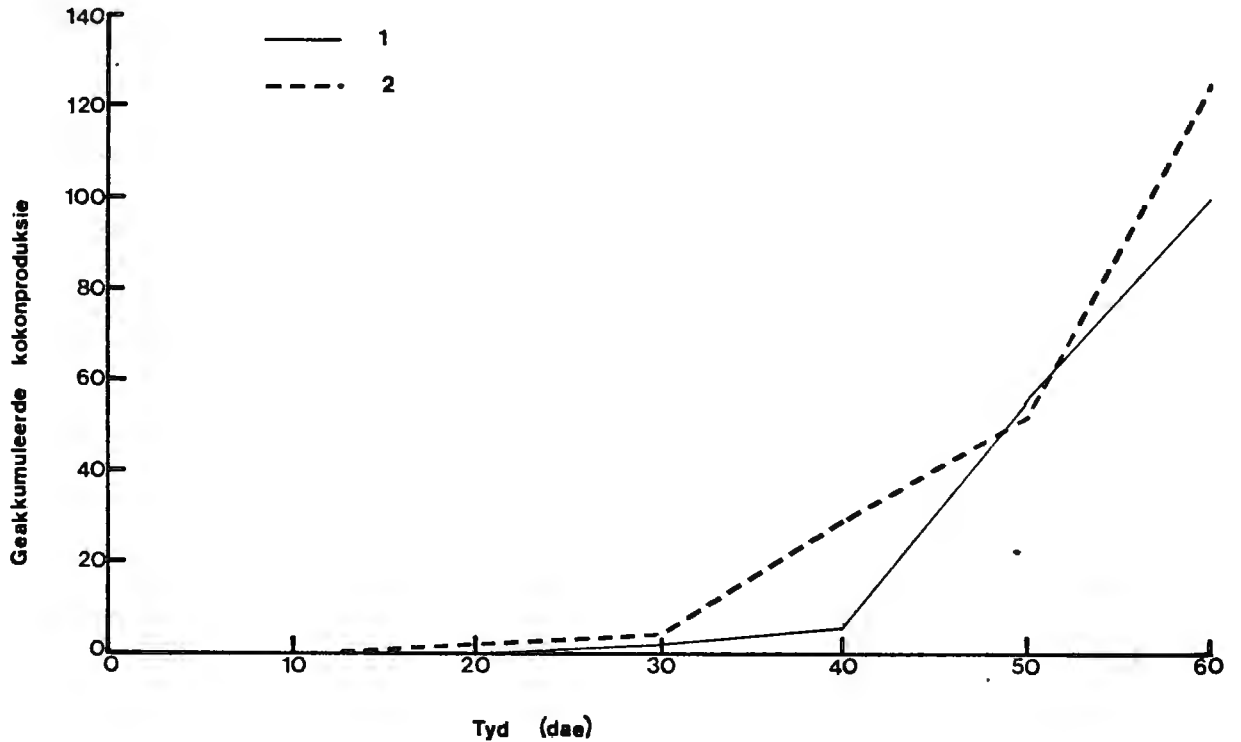
Figuur 18. Die invloed van karbofuraan op die ontwikkelingskoers van klitellums by E. fetida, 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan.

4.4 Die invloed van karbofuraan op die kokonproduksie en die kokonmassa van E. fetida

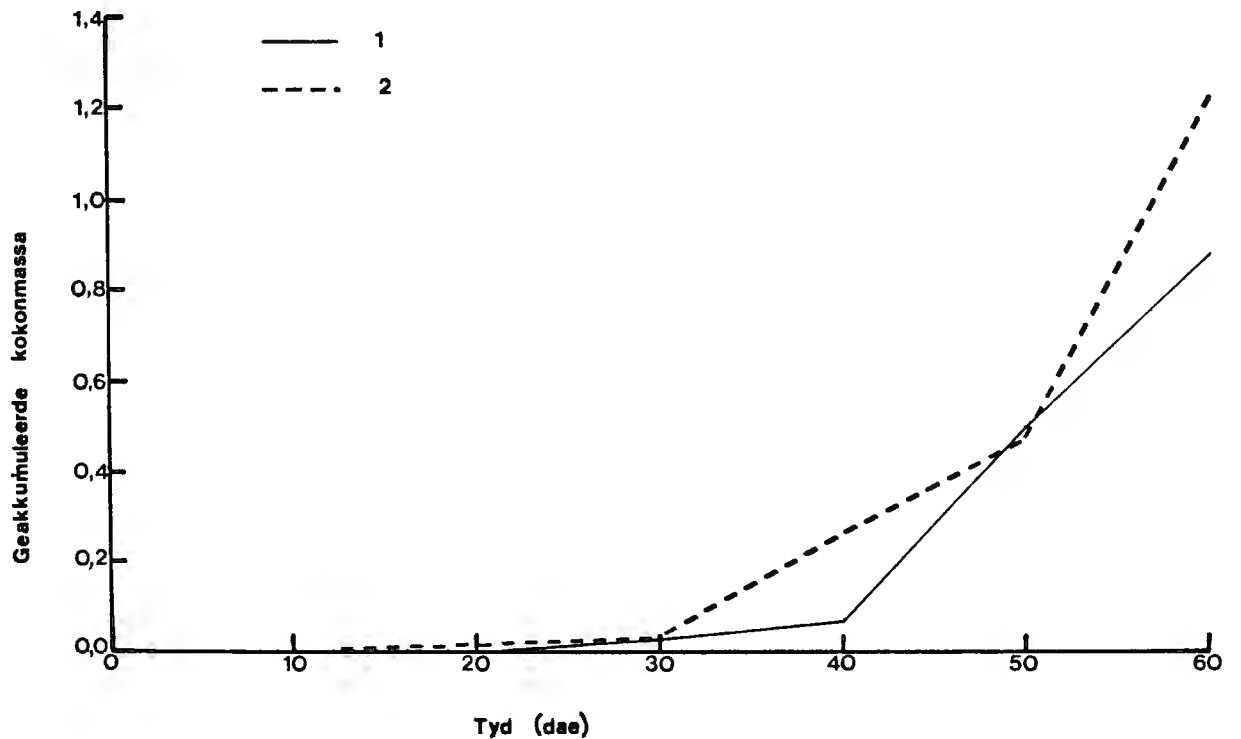
In tabelle 25 en 26 word 'n samevatting en in figure 19 en 20 word 'n grafiese voorstelling van die geakkumuleerde kokonproduksie en kokonmassa gegee. Daar is 'n onvallende ooreenstemming tussen die twee grafieke in die sin dat, alhoewel die grootte van die eenhede op die y-asse van figure 19 en 20 verskil, dieselfde tendense by altwee voorstellings voorkom. Dit impliseer dat beide kokonmassa en kokonproduksie as parameter kan dien aangesien daar waarskynlik 'n direkte verband tussen die twee bestaan. Dit het 'n verdere implikasie dat indien 'n gifstof 'n invloed op die kokonmassa sou hê, sonder dat die kokonproduksie as sodanig geaffekteer sou word, die invloed duidelik uit so 'n vergelyking waargeneem kan word. Soos dit ook reeds uit tabel 26 blyk, kon geen subletale effekte van karbofuraan op die kokonproduksie en kokonmassa op die $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ vlak aangetoon word nie. By 'n vlak van $2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ is egter geen kokonne geproduseer nie. Dit kan direk aan die invloed van karbofuraan toegeskryf word, aangesien 63,8 % van die wurms in die behandeling gevrek het, terwyl geen vrektes onder die kontrole en $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ behandelings voorgekom het nie.

Verdere statistiese verwerkings was nodig om te bepaal of daar enige statisties betekenisvolle verskille tussen die kontrole en $0,2 \text{ mg kg}^{-1}$ behandelings was. Die resultate van die ondersoek word tabelsgewys in tabel 26 gegee. Hiervoor is BMDP3S gebruik. Hierdie program voer 'n nie-parametriese tweekantige analise van variansie op die data uit. Die resultate kan opgesom word deur die vlakke van betekenisvolheid te bestudeer. Hierdie waardes is in werklikheid P-waardes en dus kan gesien word dat geen betekenisvolle verskil by die kokonproduksie (P-waarde = 0,8728) en kokonmassa (P-waarde = 0,3367) verkry is nie.

In vergelyking met die werk wat Venter (1983,p.69) gedoen het, is dit opvallend dat hy in alle gevalle 'n hoër gemiddelde kokonmassa verkry het. Met waardes wat wissel tussen 139 (kontrole) en 123 mg (50 mg kg^{-1} dieldrien) met standaardafwykings van 24 en 26 mg respektiewelik, is dit duidelik dat in die geval van eksperiment 4.1 die gemiddelde massa baie laer is met 'n waarde van 95,2 mg en 'n standaardafwyking van 18,0. Met hierdie vergelyking moet wel in gedagte gehou word dat Venter (1983,p.69) die waardes vir die eerste 75 kokonne van elke groep bereken het, terwyl in die geval van eksperiment 4.1 al die kokonne in berekening gebring is. Dit wil dus voorkom dat alhoewel die standaardafwykings oorvleuel, die medium tog 'n remmende effek op die kokonmassa het. Dit kan moontlik toegeskryf word aan die feit dat die wurms (vanwee verskillende aanvangsmassas) nie die biomassa soos in 3.2.9 bereik het nie. Volgens Hartenstein et al. (1979,p.329) is daar 'n verband tussen die massa van die wurm en die kokonmassa, in die sin dat groter wurms groter kokonne produseer.



Figuur 19. Invloed van karbofuraan op die geakkumuleerde kokonproduksie van E. fetida. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan.



Figuur 20. Invloed van karbofuraan op die geakkumuleerde kokonmassa. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan.

TABEL 25 Samevattende tabel van die kokonproduksie en -massa van eksperiment 4.1. Kokonproduksiekoers is vanaf dag 40 bereken.

Dag	Totale produksie	S.A	Geakkumuleerde totaal	Geakkumuleerde massa(mg)	Kokonproduksie koers
<u>kontrole (1)</u>					
10	0	0	0	0	-
20	0	0	0	0	-
30	2	1,41	2	284	-
40	4	2,21	6	683	0,06
50	49	6,36	55	4950	0,41
60	44	1,41	99	8706	0,24
<u>0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan (2)</u>					
10	0	0	0	0	-
20	2	1,41	2	146	-
30	2	1,41	4	330	-
40	25	0,71	29	2609	0,5
50	23	6,36	52	4735	0,23
60	72	11,31	124	12145	0,40
<u>2,0 mg kg⁻¹ karbofuraan (3)</u>					

Geen kokonne geproduseer nie.

Tabel 26 Statistiese verwerking van die kokonproduksie en -massa gegewens. Waardes vanaf dag 40 is gebruik.

	kontrole	0,2 mg kg ⁻¹
Gemiddelde kokonproduksie	16,16	20,00
Standaard-afwyking	0,5	0,5
Mann-Whitney toetswaarde	17	
Vlak van betekenisvolheid	0,8728	
Gemiddelde kokonmassa	95,208	95,200
Standaard afwyking	18,0	18,0
Mann-whitney toetswaarde	12	
Vlak van betekenisvolheid	0,3367	

4.5 Die invloed van karbofuraan op die uitbroeisukses en die nakomelingskap van Eisenia fetida

Die waardes vir al twee die groepe in tabel 27 is besonder laag. Kriel (1980,p.55) meld 'n uitbroeisukses van kokonne van E. fetida van 92 %. Venter (1983,p.92) het 'n waarde van 58 % vir die eerste 75 kokonne geproduseer deur 30 wurms in 'n beesmiskontrolle verkry in vergelyking met 'n waarde van 76 % van dieselfde groep in 'n later stadium. Venter (1983,p.92) waag geen definitiewe uitspraak oor die rede hiervoor nie. In 'n voorlopige eksperiment meld Venter (1983,p.90) ook 'n hoër uitbroeisukses wat met vorige waarnemings van die outeur ooreenstem. Tomlin & Miller (1980,p.673) het waardes tussen 41,2 en 90 % gekry. Venter (1983,p.50) en Kriel (1980,p.14) het dieselfde metodes vir versameling en monitering van nakomelingskap gevolg. Die huidige studie verskil van die laasgenoemde twee outeurs in die opsig dat versameling van kokonne net eenmalig in elke houer gedoen is. Dit is gedoen om, soos in 4.1 uiteengesit is, die versteuring tot 'n minimum te beperk. Dit het tot gevolg dat van die kokonne wat teen dag 60 versamel is, reeds 'n geruime tyd in die medium kon wees. Ten tye van versameling was daar reeds 'n drastiese verskil in die ouderdom van die kokonne. Hierdie verskil in ouderdom mag beslis 'n invloed op die uitbroeisukses van die kokonne hê. Enkele gegewens van die uitbroeisukses van die kokonne van die huidige studie word in tabel 28 gegee.

Tabel 27. Verwerkte resultate van tabel 9.14 van die bylaag. Die persentasie kokonne wat nakomelinge opgelewer het, word vir elke dag van monsterneming gegee. Die monstergrootte word tussen hakies gegee.

Groep	Kontrolle	0,2 mg kg ⁻¹	
Dag			
10	-	-	
20	-	0,0	(2)
30	0,0	(2)	50,0 (2)
40	25,0	(4)	60,0 (25)
50	24,5	(49)	65,2 (23)
60	11,7	(44)	52,8 (72)
Totaal	17,2	(99)	53,2 (124)

*Op grond van die bogenoemde waarnemings word 'n hipotese wat die verskynsel verklaar voorgelê. Kokonne wat pas geproduseer is, is sag en taai. Na verloop van tyd (na skatting minder as 24 uur) word die omhulsel hard, droog en liggeel. Dit is die algemene voorkoms van die kokonne wat versamel word. 'n Wisselwerking tussen die kokon en die omringende medium ontstaan. Die kokon is nie baie weerstandbiedend teen uitdroging nie, en dus kan water relatief maklik deur die kokonwand beweeg. Kokonne wat pas na produksie versamel is, het die potensiaal om die mate van wisselwerking met die omgewing te kan reguleer. Die potensiaal neem dan met verloop van tyd af, maar die kokon is nog steeds in wisselwerking met die medium. Indien die omgewingstoestande binne perke bly, kan die kokon normaal funksioneer. Indien 'n drastiese verandering in die medium intree, sal die bestaande wisselwerking

aangepas moet word. Indien dit nie moontlik is nie, of nie vinnig genoeg kan geskied nie, sal die embryos in die kokon beskadig en selfs vernietig word. Tydens die studie is die omgewing in twee opsigte dasties verander. Die kokon word in 'n 100 % water omgewing geplaas en die osmotiese waarde word na hipo-osmoties ten opsigte van die oorspronklike medium verander. Dit skep twee moontlikhede. Opgeloste stowwe kan uit die kokon na die omringende medium diffundeer of water kan vanuit die medium in die kokon in beweeg. Die inbeweeg van water sal egter die mees waarskynlike proses wees.

Hierdie hipotese word deur enkele waarnemings gesteun. Heelwat van die kokonne wat in gedistilleerde water geplaas is, het vinnig begin bars en van die wit materiaal het uitgepeul. Mikrobiiese groei het baie vinnig hierna begin. Die beskermende funksie van die kokon is dus vernietig. Nie alle kokonne het gebars nie, maar by heelwat van die oorblywende kokonne kon die wit materiaal duidelik deur die wand gesien word, in teenstelling met kokonne wat elke tweede dag versamel is. By kokonne wat reeds in 'n gevorderde stadium van ontwikkeling was (donker geel), het die wurms na inplasing baie vinnig uit die kokon gekruip. Dit was opvallend dat dit by al die ouer kokonne die geval was. Die meeste wurms wat uitgebroei het, het dan ook binne die eerste week na oorplasing uitgekruip. Nie veel wurms het na die periode uitgebroei nie. In baie gevalle, veral tydens die laaste helfte van ontwikkeling, kan die ontwikkelende embryos in die kokon gesien word. Veral die harte is duidelik sigbaar. Heelwat van die kokonne wat reeds in ontwikkeling was, is versamel, en het na oorplasing in die gedistilleerde water geen verdere tekens van ontwikkeling getoon nie. Die harte was na verloop van tyd nie meer sigbaar nie, net 'n wit massa kon waargeneem word. In enkele gevalle het wurms wat duidelik nog nie gereed vir uitbroeiing was nie, wel uitgebroei. Die wurms het wit, sag en pap voorgekom. Hulle het nie lank oorleef nie.

Hiedie hipotese sal egter met meer doelgerigte studie nagegaan moet word. Uitbroeisukses van kokonne is trouens as 'n navorsingsveld tydens die "Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues" (Carmody, 1981, p.300) geïdentifiseer.

Dit is duidelik dat uitsprake oor die resultate weergegee in tabel 27 net oor die algemene onsuksesvolheid van uitbroeiing gedoen kan word. Die verklaring dat die teenwoordigheid van karbofuraan 'n positiewe invloed op die uitbroeisukses mag uitoefen, kan op grond van die massatoename en kokonproduksie van die wurms as onbevredigend beskryf word. Die lae uitbroeisukses kan nie as 'n weerspieëling van die werklike uitbroeisukses beskou word nie, maar eerder as 'n gebrek inherent aan die protokol van die eksperiment (kyk 4.2.2). Slegs 'n herhaling van die eksperiment sal uitsluitel oor die betroubaarheid van die resultate kan lewer. Die lae uitbroeisukses, moontlik as gevolg van die ouderdom van die kokonne, is definitief 'n tekortkoming in die protokol, aangesien die doel van die studie betroubare monitering van die nakomelingskap impliseer.

Tabel 28. Enkele verwerkings van die uitbroeisukses van die kokonne.

Parameters	Groep	
	kontrole	0,2 mg kg ⁻¹
Getal kokonne	99	124
Getal kokonne uitgebroei	17	66
Getal nakomelinge	36	118
Gemiddelde getal nakomelinge van totale getal konne	0,55	0,95
Gemiddelde getal nakomelinge vir uitgebroeide kokonne	2.1	1,8

4.6 Die invloed van karbofuraan op die nematoodbevolking in die medium.

Figuur 21 het betrekking op die bespreking. Seker die opvallendste eienskap van die grafiek is die groot standaardafwykings. Dit kan aan drie moontlike oorsake toegeskryf word. Eerstens is die outeur nie vertrouwd met die ekstraksieprosedure nie (Jenkins, 1964, p. 692). Die eksperimentele fout is dus 'n onbekende faktor. Die ander moontlike oorsaak is dat die monsterneming en storing daarvan 'n invloed op die resultate kon gehad het. Tweedens is dit moontlik dat 'n nie-eweredige verspreiding van nematode in die medium kon voorgekom het. Nematode toon verspreiding t.o.v. verskeie faktore soos plantmateriaal en beskikbare fosfor (Yeates, 1980, p. 126). Dit is egter nie tydens die monsterneming in aanmerking geneem nie en die monsters (ongeveer 8-12 gram) is lukraak uit die medium verwyder. Die monsters is by 9°C gestoor en indien tyd beskikbaar was, is van die monsters ontleed. Sommige monsters is dus voor ander monsters bepaal. Die tydsverloop kon moontlik 'n invloed op die tellings gehad het. Derdens kan natuurlike fluktuasie in die bevolking voorkom. Die skommeling hoef nie noodwendig in fase in verskillende flesses te wees nie wat natuurlik ook 'n oorsaak vir die groot standaardafwykings kan wees.

In die eerste ekstraksies is enkele plantparasitiese nematode in die medium waargeneem. Hierdie nematode (Genus Pratilenchus, Heyns, 1971, p. 107) is natuurlik van die beesmis afkomstig, maar is na 10 dae nie meer in die ekstrakte waargeneem nie. Ook is verteenwoordigers van die Genus Rhabditis waargeneem (Heyns, 1971, p. 27). Die identifikasie is deur prof. Loots van die Departement Dierkunde aan die PU vir CHO gedoen. Rhabditis, 'n saprofaag, is 'n baie algemene spesie in die gronde van Suid-Afrika. Yeates (1980, p. 126) spekuleer dat spesieverskeidenheid met die heterogeniteit van die grondstruktuur gekorreleer kan word. Aangesien die medium homogeen van aard is, is dit 'n moontlike verklaring vir die enkele genus wat in die medium kon vestig.

Figuur 21 gee die gemiddelde getal nematode per gram medium oor die verloop van 60 dae in die verskillende behandelings. Dit is eerstens duidelik dat 'n skerp getaltoename direk na inokulasie vanuit die beesmis ontstaan. Alhoewel die mate van toename by elkeen verskil, is dit nie korreleerbaar met die karbofuraankonsentrasie nie. Die kontrole (1) en die 10 mg kg⁻¹ (4) behandelings toon toenames van dieselfde orde. Die 0,2 mg kg⁻¹ behandeling (2) toon twee maksima (dag 10 en 30) en die 2 mg kg⁻¹ behandeling (3) toon 'n maksimum baie laer as die ander. Vanweë die groot standaardafwykings is dit duidelik dat hierdie afleidings nie betroubaar is nie. Wat tentatief uit die grafiek afgelei kan word, is dat 'n aanvanklike skerp toename gevolg word deur 'n afname tot 'n vlak waar dit stabiliseer vir die res van die eksperiment. Die stabiliseringsvlak is ongeveer dieselfde vir al die behandelings nl. agt nematode per gram van die medium.

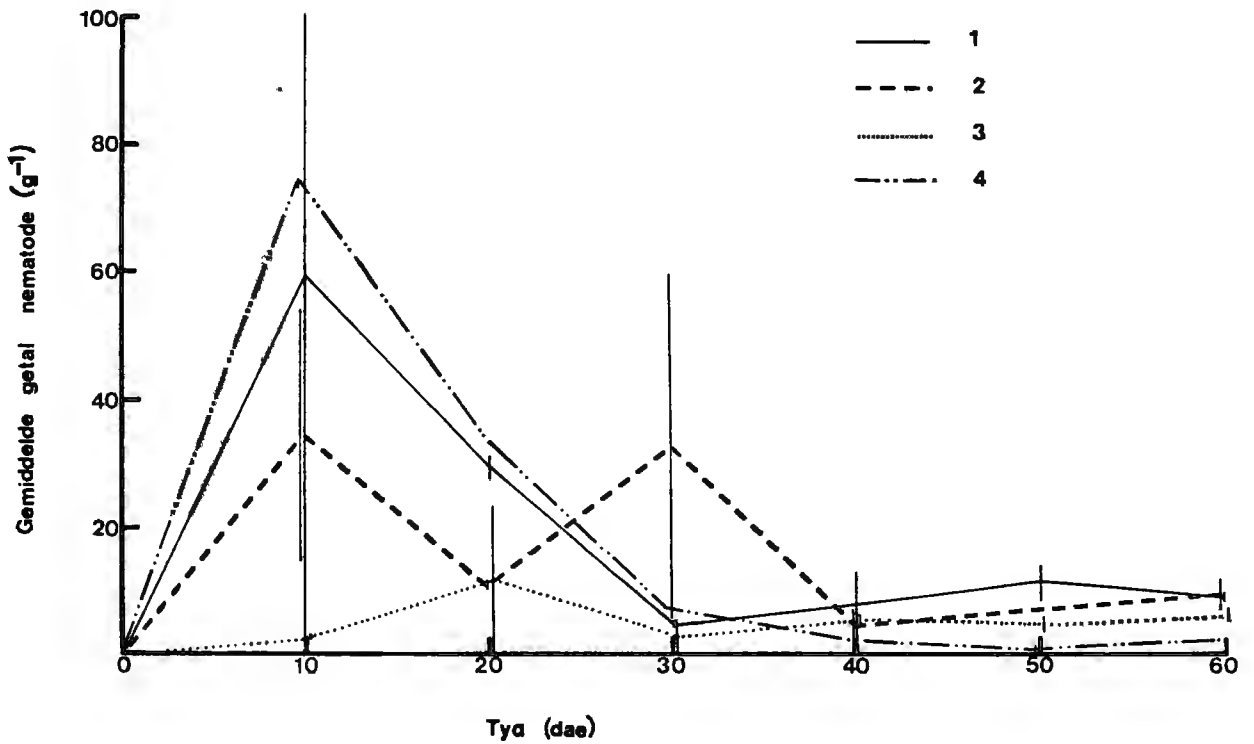
Enkele faktore mag bydra tot die waargenome tendense. Die natuurlike bevolkingsdinamika van die nematode kan, alhoewel nie in die huidige studie ondersoek nie, sodanig wees dat by

inokulasie van 'n nuwe medium, getalle sal skommel tot 'n ewewig bereik word. Die erdwurms wat in biomassa toeneem, kan met die nematode kompeteer, maar in die huidige studie is geen aanduidings hiervan gekry nie aangesien die 10 mg kg^{-1} (geen erdwurms) en die kontrolebehandeling ongeveer dieselfde tendens volg.

Ander organismes wat ook deur die inokulum oorgedra is, kan 'n invloed uitoefen. Kompeterende Enchytraeidae en astigmatiese myte kan, vanweë 'n moontlike langer generasietyd as die van die nematode, eers later 'n getalsterkte bereik wat die nematode beïnvloed. Enchytraeidae en astigmatiese myte asook rotifere is in die medium waargeneem. Dit was veral in die laaste helfte van die eksperiment duidelik dat die biomassa van die Enchytraeidae en rotifere heelwat hoër as die van die nematode was. Hierdie waarneming is nie gekwantifiseer nie, maar Enchytraeidae is heelwat groter as nematode en het in groot getalle voorgekom. Dit sal dus nodig wees om die bevolkingsdinamika tussen hierdie groepe diere te bestudeer. Die nematoodparasiterende fungus, Arthrobotrys (tentatiewe identifikasie), is vanuit die medium geïsoleer. Hierdie fungus word deur die teenwoordigheid van nematode gestimuleer om met die hifes strukture te vorm wat nematode kan vang. Die haustoriums groei dan binne in die nematood in en vertering vind plaas (Pelczar, Reid & Chan, 1977, p.309). Die aanduidings is dat heelwat van hierdie fungus in die medium teenwoordig was.

Dit wil egter voorkom of karbofuraan geen invloed op die getalle van vrylewende nematode het nie. Die verdwyning van die plantparasitiese nematode kan ook nie aan die gifstof toegeskryf word nie, aangesien hulle ook uit die kontrolemedium verdwyn het. Die verdwyning kan waarskynlik toegeskryf word aan die aard van die medium. Die medium kan ongunstige faktore bevat of 'n ander moontlikheid is dat geen sellulere plantmateriaal as voedingsbron in die medium teenwoordig was nie.

Die aanduiding dat karbofuraan in hierdie ondersoek geen invloed op die nematoodgetalle gehad het nie, stem nie met die waarnemings van Stanton, Allen & Campion (1981, bl.422) ooreen nie. Hulle het 'n veldstudie oor die invloed van karbofuraan op plantparasiete en saprofiete gedoen en bevind dat beide groepe baie sterk afnames toon na behandeling met $6,72 \text{ mg kg}^{-1}$ karbofuraan. Direkte vergelyking is natuurlik onmoontlik aangesien die studie op 'n gevestigde natuurlike bevolking en op ander spesies gedoen is. Verdere inligting i.v.m. die invloed van gifstowwe op vrylewende nematode is nie beskikbaar nie.



Figuur 21. Invloed van karbofuraan op die nematoodgetalle. 1- Kontrol, 2- 0,2 mg kg , 3- 2,0 mg kg , 4- 10, 0 mg kg karbofuraan.

4.7 Die fisiese veranderinge in die medium

Dit is veral tydens die ontwikkeling van nuwe prosedures van belang dat al die moontlike veranderlikes wat nie direk betrekking op die eksperiment het nie, gemonitor moet word. Die rede hiervoor is dat a.g.v. biologiese aktiwiteit veranderinge in die fisiese eienskappe van die medium kan voorkom, sodanig dat die verandering nadelig vir die erdwurm mag wees. Groot verandering in pH of 'n tekort aan sekere elemente moet bekend wees sodat die medium nog verder verbeter kan word. In hierdie afdeling gaan veranderinge in enkele parameters wat tydens die eksperiment gemeet is, beskou word.

4.7.1 Verandering in die waterinhoud van die medium

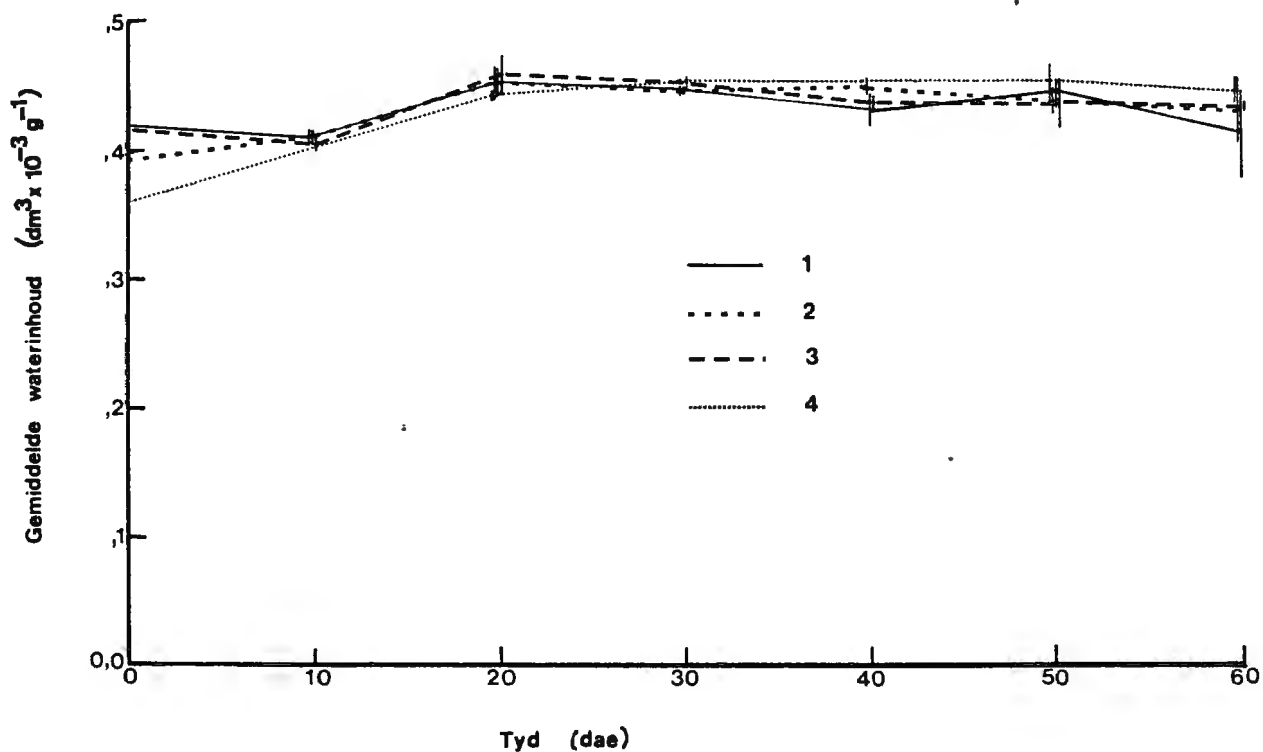
Die verandering in die waterinhoud word grafies in figuur 22 weergegee. Dit blyk duidelik dat geen noemenswaardige verandering van hierdie parameter tydens die duur van die eksperiment voorgekom het nie. Daar is 'n effense opwaartse neiging te bespeur, maar in verhouding met die skaal kan die verandering as van minder belang beskou word.

4.7.2 Verandering in die pH van die medium

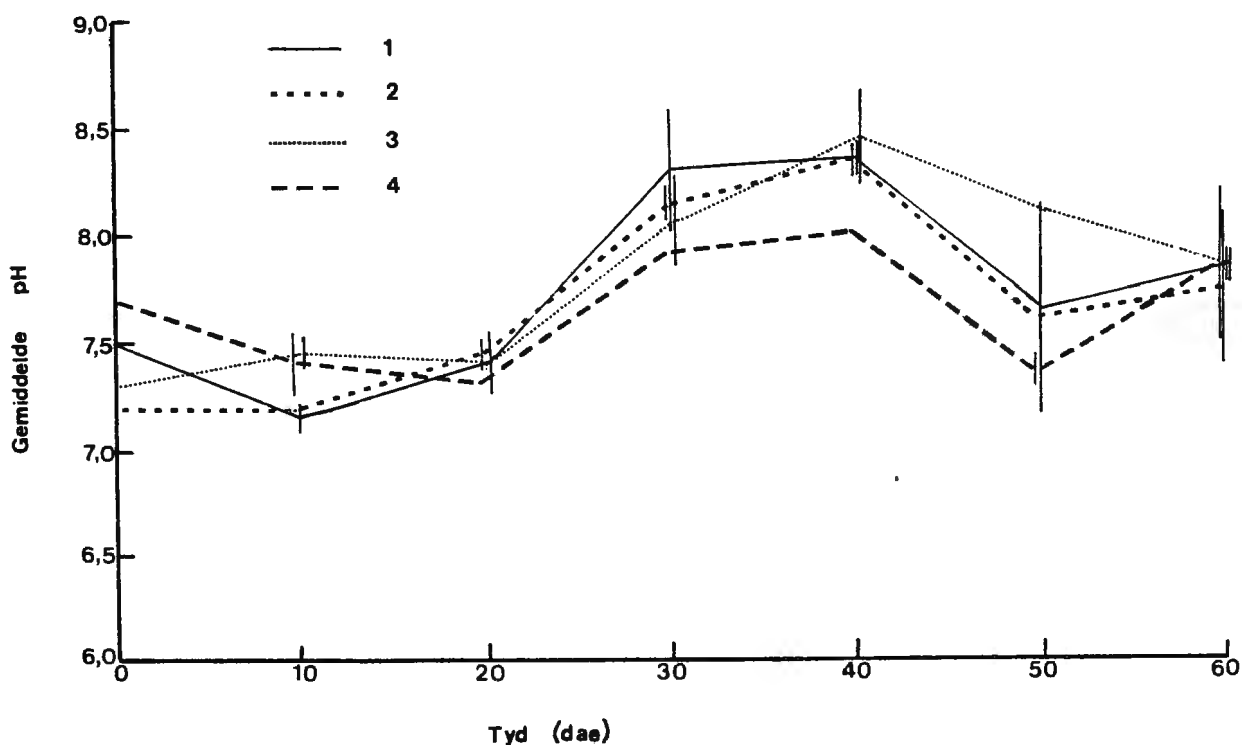
In figuur 23 word die resultate grafies voorgestel. Dit is duidelik dat daar 'n besliste fluktuasie in al die mediums voorgekom het. Dit wil voorkom of die pH eers relatief konstant in die orde van 7,5 gebly het en na 20 dae 'n styging na 'n waarde van ongeveer 8,3 getoon het. Na dag 40 het die pH weer na 'n vlak van net onder 'n waarde van 8 afgeneem. Dit is opvallend dat die fluktuasies by al vier die gifstofkonsentrasies waargeneem is, alhoewel die fluktuasie in die 10,0 mg kg⁻¹ behandeling kleiner van omvang was. Dit is ook opvallend dat in die kontrole en in die behandeling met 0,2 mg kg⁻¹ karbofuraan, die fluktuasies baie met mekaar, soos ook die geval met massaverandering was, ooreenstem. Wat hier in gedagte gehou moet word, is dat die pH van die medium effens alkalies was, wat dus met die pH-afhanklike afbraaktyd van karbofuraan in verband gebring kan word.

4.7.3 Verandering in kalium-, kalsium-, magnesium-, natrium- en fosforkonsentrasies in die medium

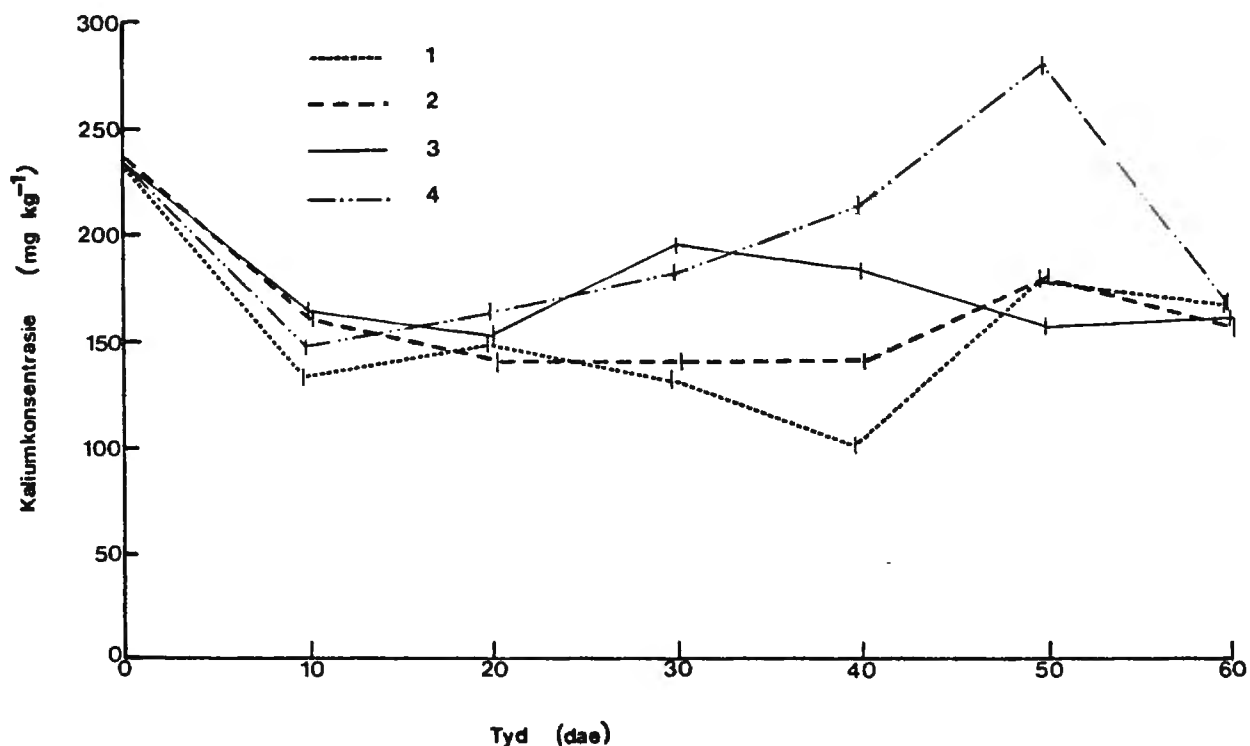
Die oorspronklike data van die bepaling word in tabel 9.16 van die bylaag gegee. Die resultate word grafies in figure 24 tot 28 voorgestel. Een fles van elke konsentrasie is elke tiende dag ontleed. Vir die bepaling is die medium van drie flesses, wat aanvanklik nie ontleed is nie, goed gemeng, in drie verdeel, en laat ontleed. Die standaardafwyking is hieruit bereken. Alhoewel die standaardafwyking in alle gevalle nie noemenswaardig groot is nie, kan vreemde fluktuasies in die konsentrasies van bv. kalium en magnesium waargeneem word. In 'n paar gevalle is hertoetse op die oorspronklike medium wat vir ontleding verskaf is gedoen. Die hertoets waardes het soms tot 30 % van die oorspronklike waardes verskil. Hierdie klaarblyklike onakuraatheid moet in gedagte gehou word met die interpretering van die grafieke.



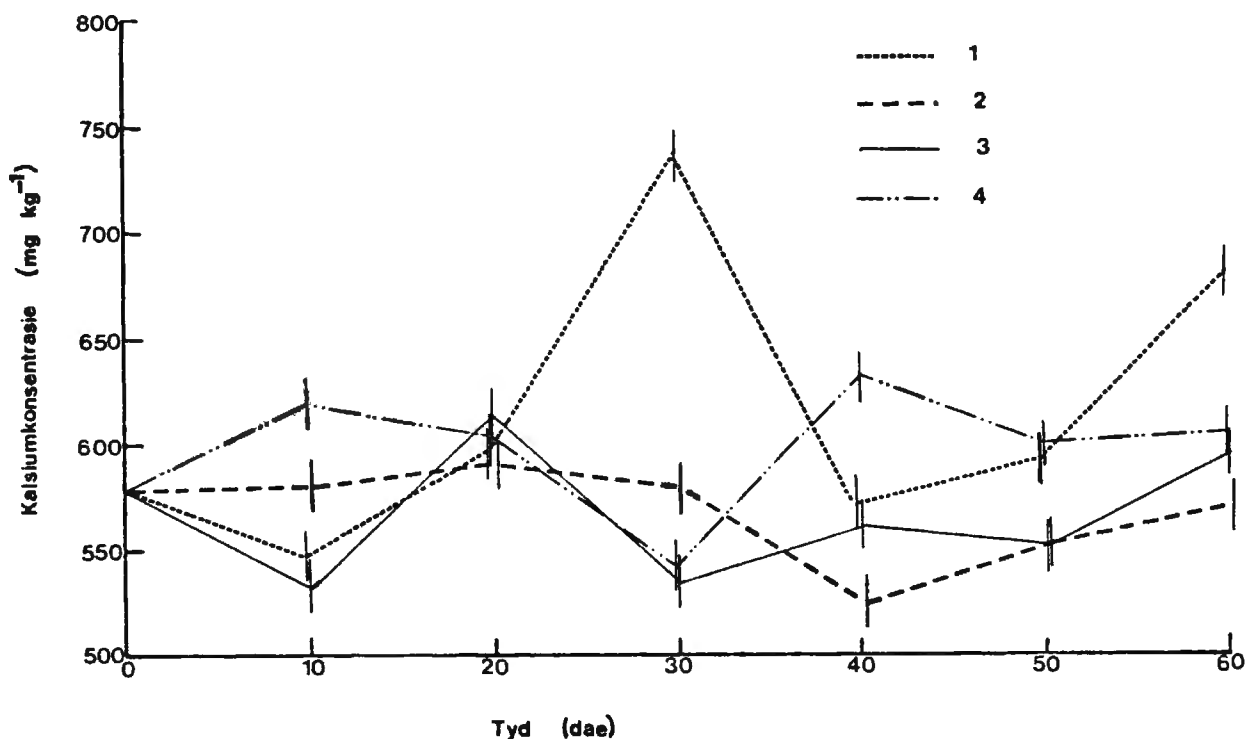
Figuur 22. Verandering in die waterinhoud van die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



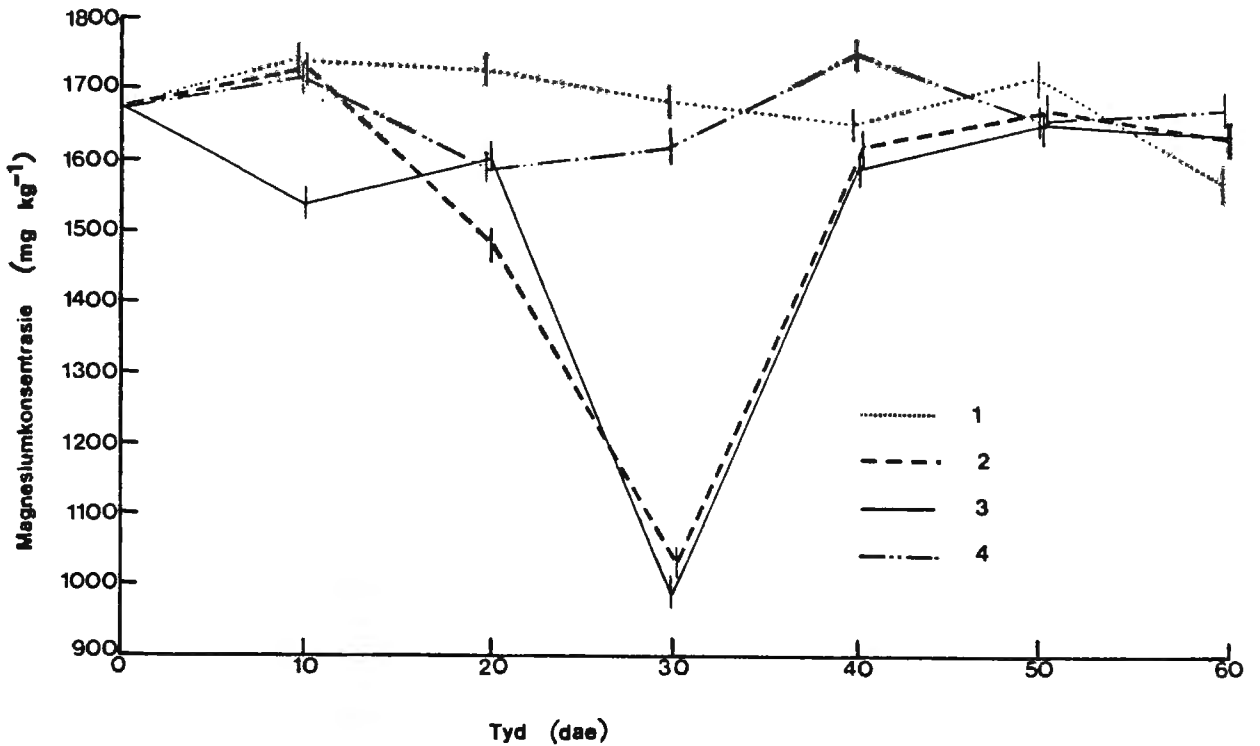
Figuur 23. Verandering in die pH in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



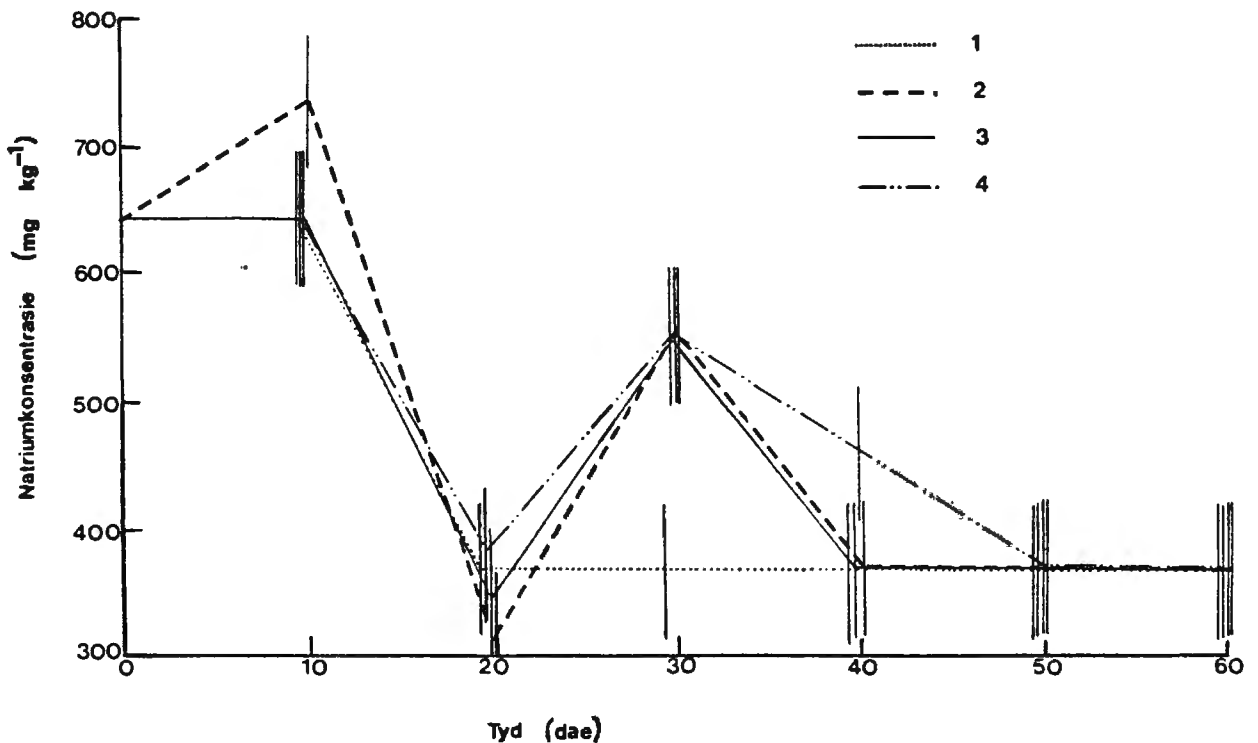
Figuur 24. Verandering in die kaliumkonsentrasie in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrolle, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



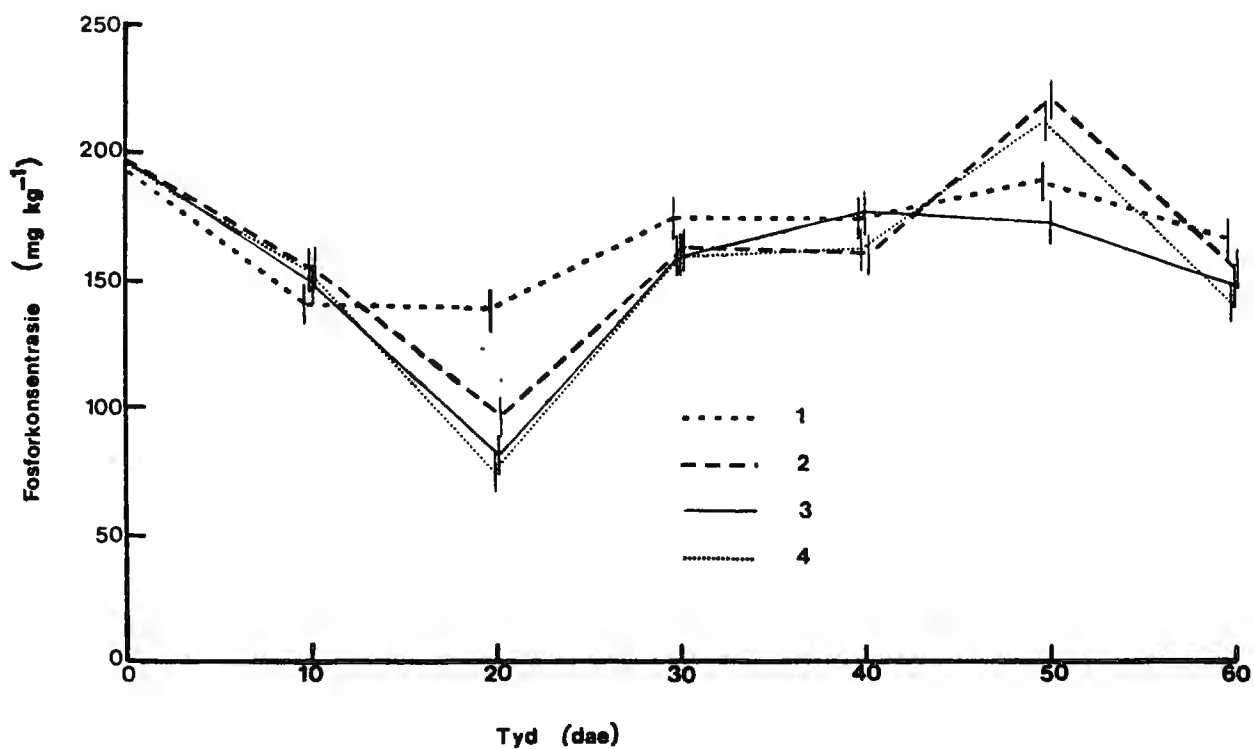
Figuur 25. Verandering in die kalsiumkonsentrasie in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrolle, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



Figuur 26. Verandering in die magnesiumkonsentrasie in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrolle, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



Figuur 27. Verandering in die natriumkonsentrasie in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrolle, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.



Figuur 28. Verandering in die fosforkonsentrasie in die mediums by die verskillende behandelings. 1- Kontrole, 2- 0,2 mg kg⁻¹, 3- 2,0 mg kg⁻¹, 4- 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan.

4.7.3.1 Die verandering in die kaliumkonsentrasie

Figuur 24 toon die verandering van die kaliumkonsentrasie tydens die verloop van die eksperiment. In al die mediums was daar 'n aanvanklike afname in die konsentrasie, ook by die 10 mg kg^{-1} waar al die wurms binne die eerste 3 dae gevrek het. Hierdie wurms het uit die aard van die saak nie kalium vanuit die medium kon assimileer nie en hierdie afname kan dus nie aan die biologiese aktiwiteit van die wurms toegeskryf word nie. Dit word verder weerspieël in die onverklaarbare toename en skielike afname van die kaliumkonsentrasie in die 10 mg kg^{-1} behandeling. Wat waarskynlik wel die geval is, is dat geen tekort binne 'n tydsbestek van 60 dae voorgekom het nie.

4.7.3.2 Die verandering in die kalsiumkonsentrasie

Figuur 25 het betrekking. Behalwe vir een uitsondering, is geen noemenswaardige veranderinge of fluktuasies bepaal nie. Die kontrole toon 'n maksimum konsentrasie op dag 30 waarna die konsentrasie weer skerp daal en dan weer 'n stygende tendens toon. 'n Toename in kalsiumkon nie verklaar word nie, maar net soos vir kalium lyk dit nie of tekorte ontstaan het nie.

4.7.3.3 Die verandering in die magnesiumkonsentrasie

Figuur 26 gee 'n grafiese voorstelling van die verandering. Die 0,2 en 2,0 mg kg^{-1} behandelings toon 'n skerp daling in die konsentrasie wat 'n minimum na 30 dae bereik. Hierna neem die konsentrasie weer toe tot ongeveer die oorspronklike vlak op dag 40. Aangesien hierdie tendens nie by die kontrole waargeneem is nie, kan dit toegeskryf aan analitiese foutgrense. In die lig hiervan is verdere spekulاسie oorbodig.

4.7.3.4 Die verandering in die natriumkonsentrasie.

Figuur 27 het betrekking op die bespreking. Dieselfde tendens word by al die behandelings waargeneem. Na 10 dae neem die konsentrasie af en stabiliseer na ongeveer 40 dae op 368 mg kg^{-1} . Aangesien die verandering nie direk met die erdwurms in verband gebring kan word nie (daar was geen wurms in die 10,0 mg kg^{-1} behandeling nie), is dit waarskynlik aan mikrobiële aktiwiteit in die medium toe te skryf. Die konsentrasie het waarskynlik nie tot onder 'n kritiese vlak gedaal nie, aangesien die wurms goeie massatoename in die kontrole en 0,2 mg kg^{-1} behandeling getoon het.

4.7.3.5 Die verandering in die fosforkonsentrasie

In figuur 28 word die resultate grafies voorgestel. Net soos vir natrium toon die grafiek 'n tendens wat by al die behandelings voorgekom het en dieselfde verklaring kan dus van toepassing wees. Die konsentrasie neem in alle gevalle met ongeveer 50 % in die eerste 20 dae af. Daarna vind 'n geleidelike toename plaas tot ongeveer die oorspronklike vlak waarna dit lyk asof daar weer 'n afname plaasvind. Hierdie fluktuasies dui daarop dat geen tekorte in die medium ontstaan het nie.

4.8 Ander waarnemings

4.8.1 Mesofauna wat in die medium waargeneem is

Die voorkoms van mesofauna in die medium kan verklaar word deur die inokulasie met die beesmiskstrak. By die aanvang van die eksperiment is die getalle van die verskillende organismes laag. Na verloop van tyd neem die getalle, beïnvloed deur die aard van die medium en teenwoordigheid van die erdwurms, toe. Kompetisie kan tussen die verskillende bevolkings ontstaan en ook daardeur die bevolkingsdinamika beïnvloed. Bevolkingsgetalle kan in so 'n mate toeneem dat, biomassagewys, so 'n bevolking 'n primêre biologiese komponent van die medium kan uitmaak. So 'n bevolking sal dan in 'n mate met die erdwurms in kompetisie t.o.v. ruimte en voedsel kan tree. Die omgekeerde is natuurlik ook moontlik nl. dat die erdwurms die bevolking as voedselbron sal kan benut. As voorbeeld van laasgenoemde geval kan die voordelige invloed van protosoë op die groei van E. fetida genoem word (Miles, 1963, p.409 en Neuhauser et al., 1980, p.46). Verder kan die teenwoordigheid van sekere organismes, d.m.v. ensiematiese werking, sekere voedingstowwe tot 'n assimileerbare vorm vir ander organismes verwerk. Die vermoede wat Hartenstein (1982, p.298) geopper het, dat 'n balans tussen die erdwurms en mikroorganismes t.o.v. humussuur bestaan, word waarskynlik deur 3.2.1 bevestig.

4.8.1.1 Nematode en Enchytraeidae

Die teenwoordigheid van nematode en Enchytraeidae word in 4.6 bespreek. Enchytraeidae is klein, wit wurms ongeveer 2 - 3 mm lank. Hulle kom hoofsaaklik in vogtige organiese gronde voor, tipies in digthede van tot 100000 m⁻². Voedsel word in die vorm van plantmateriaal en fungi ingeneem, maar bakterië word waarskynlik ook geassimileer. Die Enchytraeidae word as een van die belangrike verwerkers van plantmateriaal in gronde gereken. Data oor die generasietyd en kokonproduksie is skaars (Wallwork, 1970, p.66-70). Moontlike wisselwerking tussen erdwurms en nematode is nie in die literatuur ongespoor nie. Verdere inligting i.v.m. die generasietyd van die Enchytraeidae sou antwoorde kon verskaf oor die moontlike wisselwerking tussen nematode en Enchytraeidae.

4.8.1.2 Myte

Myte, behorende tot die orde Astigmata, is in die medium waargeneem. Astigmata is vrylewende myte wat op detritus, fungi, alge, bakterië en afbraakprodukte voed (Wallwork, 1970, p.159). Die groep word ook met gestoorde graanprodukte geasosieer (Hughes, 1961, p.23).

Naude (1982, ongepubliseerde waarnemings) het Rhizoglyphus (Astigmata), Kleemannia (Prostigmata, detritus voeders) en Cryptostigmata in klein hoeveelhede in beesmis waargeneem. Ook is heelwat Collembola in die beesmis gekry. Sy studie het aangetoon dat 'n effense toename in die getalle van die myte in beesmis met verloop van tyd plaasgevind het. Aanvanklik is geen myte waargeneem nie, maar na 30 dae het 'n totaal van 7 myte in 0,040 dm³ medium voorgekom. Alhoewel die getalle nie groot was nie, illustreer dit tog dat die generasietyd van die diere in so 'n

medium in vergelyking met nematode en Enchytraeidae relatief lank is. Dit verklaar dan ook die lae getalle van die myte wat in die huidige studie waargeneem is, alhoewel die myte in die nematodekstrak waargeneem is en geen ekstraksie, spesifiek vir myte, gedoen is nie. Dit wil dus voorkom dat myte as biologiese faktor nie 'n groot invloed op die totaal van die medium binne 'n tydsbestek van 60 dae sal uitoefen nie. Ook hierdie uitspraak is natuurlik onderworpe aan verdere ondersoek.

4.8.1.3 Protosoë

Enkele bewegende parameciums is in die nematodekstrak waargeneem. SEM-ondersoek het nie hierdie bevinding gestaaf nie, maar dit sluit nie die teenwoordigheid van die diere uit nie. Ander lewensvorme, moontlik protosoë, is wel met die SEM waargeneem maar verdere identifikasie is nie gedoen nie.

4.8.2 Mikroflora in die medium waargeneem

4.8.2.1 Fungi

Tentatiewe identifikasie van enkele fungi spesies is gedoen. Uitstrykings op ADA-agar is gevolg deur isolasie op skuinsbodems. Preparate met broom-fenol-blou is gedoen. Net enkele van die kolonies is geïdentifiseer. Humicola, Fusarium, Arthrobotris, Verticellium en Glioclodium is tentatief deur Prof. Jooste van die Dept. Plantkunde geïdentifiseer. 'n Ryke verskeidenheid kom dus in die medium voor. Geeneen van die genera wat geïdentifiseer is, is deur Neuhauser et al. (1980,p.46) gebruik vir die bepaling van die invloed op groei by E. fetida nie.

4.8.2.2 Alge en diatome

SEM-ondersoeke op filtrate van die medium het, alhoewel sekerheid hieroor nog verkry moet word, die teenwoordigheid van alge (moontlik Chlamydomonas) in die medium aangetoon. Enkele diatome is ook aangetref.

5 DIE BRUIKBAARHEID VAN DIE MEDIUM VIR TOKSIKOLOGIESE EN BIOLOGIESE STUDIES

5.1 Die bruikbaarheid van die medium vir toksikologiese studies

5.1.1 Bepaling van subletale effekte

Die doel van die studie was die ontwikkeling van 'n geskikte gedefinieerde medium vir eko-toksikologiese studies op grondorganismes, o.a. E. fetida.

In teenstelling met die literatuur oor die toksisiteit van karbofuraan (soos Stenersen, 1970, p.23), is in hierdie ondersoek bevind dat die LD₅₀ waarde vir E. fetida tussen 0,2 en 2 mg kg⁻¹ lê. Die vlakke van blootstelling is sodanig gekies dat dit onder die vlakke van toksisiteit vir E. fetida, soos bepaal deur ander navorsers, lê. Nogtans het 97 % mortaliteit by die 10 mg kg⁻¹ en 69,7 % by die 2,0 mg kg⁻¹ behandelings voorgekom. Geen mortaliteit is by die 0,2 mg kg⁻¹ behandeling gekry nie. Die oorlewende wurms van die 2 mg kg⁻¹ behandeling het 'n sterk massa-afname getoon en het eers na 60 dae weer massas hoër as die aanvanklike bereik. Die aanvangskonsentrasie het waarskynlik veroorsaak dat die wurms, vanweë die skokeffek, eers na 30 dae positiewe massaverandering getoon het. Waarskynlik sou die wurms later volwassenheid kon bereik, maar dit word betwyfel of die wurms onder natuurlike omstandighede sou oorleef. Geen verskil in massaverandering is tussen die kontrole en 0,2 mg kg⁻¹ behandeling gekry nie. Karbofuraan word deur E. fetida uitgeskei en dit verklaar die afwesigheid van residue in die wurm. Die vinnige afbraak van karbofuraan is onvallend en word tentatief toegeskryf aan die aard van die medium wat die gifstof waarskynlik meer toeganklik vir metabolisme (hetsy deur die mikrobiële of mesofauniese komponente van die medium) maak. Binding van die gifstof d.m.v. adsorpsie as nie-ekstraheerbare fraksie word nie ugesluit nie.

Afgesien van die feit dat geen kokonne deur die 2 en 10 mg kg⁻¹ behandelde wurms geproduseer is nie, is daar ook geen statisties betekenisvolle verskil tussen die kokonproduksie en kokonmassa by die 0,2 en kontrolebehandelings gevind nie. Die ontwikkelingskoers van klitellums word beslis deur die hoër vlakke van karbofuraan vertraag. Die verskille in die ontwikkelingskoers van klitellums tussen die kontrole en 0,2 mg kg⁻¹ behandelings, word nie in die massaverandering, kokonproduksie of kokonmassa weerspieël nie. Hierdie studie het aangetoon dat lae vlakke van karbofuraan waarskynlik 'n nadelige invloed op erdwurms in die veld sal hê. Die stelling word deur die bevindinge van verskeie outeurs gestaaf (Tomlin & Gore, 1974, p.491, Thomson & Sans, 1974, p.306).

Die medium en protokol soos gebruik vir die bepaling van die invloed van karbofuraan op 'n grondmikrohabitat het heelwat gebreke. Die bruikbaarheid van die medium is, ten spyte van die gebreke, duidelik bewys. Seker die belangrikste bewys hiervoor is, in teenstelling met die waardes in die literatuur vermeld, die onverwagte letale effek van lae vlakke van karbofuraan op E. fetida. Verder is die subletale invloed (groei en voortplanting) van lae konsentrasies van karbofuraan ook bewys en gekwantifiseer. Dit was tot op hede nie bepaal nie alhoewel die negatiewe invloed

van karbofuraan wel in veldstudies waargeneem is (Tomlin & Gore, 1974, p.491, Thomson & Sans, 1974, p.306). Veldstudies het die nadeel dat die voortplantingskoers nie direk bepaal kan word nie, maar die afleiding word hoofsaaklik vanuit die verandering in biomassa en getalle gemaak (Lofs-Holmin, 1981, p.144).

Die nadeel van modelekosisteme is dat ekstrapolasie na veldtoestande moeilik is. Lofs-Holmin (1981, p.145) het bevind dat korrelasie tussen organiese inhoud van 'n grond en die biologiese beskikbaarheid (in teenstelling met konsentrasie) soos deur Felsot & Wilson (1980, p.780), Helling, Kearney & Alexander (1971, p.150), Lord, Briggs, Neale & Manlove (1980, p.407) en Edwards (1975, p.49) voorspel is, nie in alle gevalle waar is nie en dat groot afwykings voorkom. Sy stel voor dat die biologiese beskikbaarheid (en dus ook persisterendheid) van die gifstof ook met die mikrobiële aktiwiteit gekorreleer moet word. Dit is beslis die geval in die huidige studie, aangesien die vinnige verdwyning van die gifstof waarskynlik deur die mikrobiële aktiwiteit veroorsaak word. Goring, Laskowski, Hamaker & Meikle (1972, p.163) stel tereg dat die grondbiota 'n groot maar onvoorspelbare invloed op die afbraak van gifstowwe het. Waterinhoud, addisionele energiebronne en pH, soos reeds verduidelik, kan ook 'n groot rol speel.

Die medium bied die moontlikheid om die invloed van die verskillende faktore op biologiese beskikbaarheid van xenobiote te ondersoek. Waterinhoud, organiese inhoud, pH, mikrobiële samestelling en mesofaunasamestelling kan baie noukeurig gereguleer of gemonitor word. Dit is in teenstelling met die metodes wat tot dusver gevolg is deur met bestaande gronde te werk. Natuurlike gronde bevat 'n magdom faktore wat nie gekontroleer kan word nie. Alhoewel die samestelling van die medium relatief eenvoudig is, kan aanpassings maklik gemaak word.

'n Tekortkoming van die huidige studie is die gebrek aan deurlopende kennis van die verloop van die afbraak en lokalisering (adsorpsie, oplossing of opname in 'n organisme) van die karbofuraan in die medium. Alhoewel die vermoede bestaan dat die afname in konsentrasie van karbofuraan met verloop van tyd aan die biologiese aktiwiteite te wyte is, kan adsorpsie van die gifstof 'n bydrae tot die vermindering die ekstraheerbare fraksie veroorsaak. Die eienskappe van hummussuur is sodanig dat akkumulering (of adsorpsie) van verbindings moontlik is (Saxena & Bartha, 1983, p.59 en Haque, 1972, p.99). Alhoewel die wateroplosbaarheid van karbofuraan (0,7 %) aanleiding tot adsorpsie mag gee (Haque, 1972, p.105), sal die mate van adsorpsie laer as in die geval van meer wateroplosbare verbindings soos paraquat, en hoër as in die geval van die gechlloreerde pestisiede wees. Moreale & Van Bladel (1981, p.951) het die adsorpsie van 13 pestisiede op 51 grondtipes in België ondersoek. Die gemiddelde persentasie adsorpsie vir aldikarb was 22 %, vir karbofuraan 34 % en paration 93 %. Luchini, Lord & Ruegg (1981, p.97-101) berig lae adsorpsiewaardes vir karbariel in vergelyking met organofosfate en gehalogeneerde pestisiede in 10 Brasiliaanse gronde. Groot afwykings in adsorpsie in verskillende gronde kom dus voor en voorspellings is dus moeilik.

Dit wil dus voorkom asof adsorpsie van xenobiote in enige medium

verwag kan word. Die beste manier om dit vas te stel is deur van koolstof-14 gemerkte verbindings gebruik te maak. Die aard van die gebonde residue asook die moontlike hervrystelling van die verbinding deur biologiese aktiwiteit is 'n groot leemte in die huidige kennis van omgewingstoksikologie. Mikro-ekosisteme kan, vanweë die hoë mate van kontroleerbaarheid, 'n wesentlike hidrae tot die oplossing van hierdie probleem lewer.

Fuhremann & Lichtenstein (1978,p.605-610) het na aanleiding van bogenoemde probleem 'n ondersoek na die biologiese vrystelling van gebonde paration gedoen. Nadat paration met grond geïnkubeer is, is hawerplante en L. terrestris as biologiese komponente aan die grond toegevoeg. Van die toegevoegde paration kon 32.5 % nie met ekstraksies uit die medium verkry word nie. Na 'n paar weke is heelwat van die gebonde radioaktiwiteit as ekstraheerbare residue in die erdwurms en plante terugverkry. Dit dui daarop dat gebonde residue nie van omgewingsfaktore uitgesluit word nie. Die outeurs bepleit dan ook verdere navorsing in die verband. Die waarskynlike wisselwerking tussen E. fetida en humussuur wat tydens die huidige studie aangetoon is, is 'n verdere aanduiding dat makrofauna, soos erdwurms, 'n rol in die binding en beskikbaarstelling van xenobiote speel. Die medium kan moontlik goeie data i.v.m. biologiese vrystelling van xenobiote verskaf aangesien die adsorpsie op sekere komponente van die medium (bv. humussuur of sellulose) voor vermenging noukeurig bepaal kan word. Die vrystelling vanuit sekere komponente kan dan noukeurig bepaal word. Heelwat meer aandag word die laaste tyd aan die probleem van adsorpsie - desorpsie geskenk.

Die medium het 'n ryke gemeenskap van organismes gehuisves en kan as sodanig as 'n mikro-ekosisteam beskou word. Metcalf (1977,p.242) noem verskeie gebruike vir modelkosisteme. Die toksikologie van radioaktiewe afval, spoormetale, petroleumprodukte, industriële chemikalieë en landbouchemikalieë is reeds m.b.v. sulke ekosisteme bestudeer. In die geval van gifstowwe noem Metcalf (1977,p.243) dat afbraakmeganismes en die biochemie daarvan, die toksikologie van die afbraakprodukte, translokasie en bio-akkumulasie, korrelasie van fisies-chemiese eienskappe van die gifstof met bio-akkumulering en afbraak, gedragpatrone van diere, sinergistiese werking met ander chemikalieë en bio-evaluering van nuwe verbindings in sulke mediums gedoen kan word.

Die toksikologie van metale en chemikalieë op 'n grondekosisteam behoort gerieflik, met behulp van die medium wat tydens die huidige studie ontwikkel is, onderneem te kan word. Van Rhee (1977,p.206), Malecki, Neuhauser & Loehr (1982,p.129-137) Ireland (1983,p.247-265) en Carter, Kenney, Guthrie & Timmenga (1983,p.267-274) het op metale gewerk en heelwat data is beskikbaar. Op grond hiervan kan die medium geëvalueer word. Ireland (1983,p.261) stel dat seisoensfaktore en voedselbronne in ag geneem moet word indien die metaalbelading van die erdwurm met die van die omgewing gekorreleer word. Dit spreek vanself dat van hierdie faktore in die medium gesimuleer kan word.

Die medium het ook ander moontlike toepassingsvelde. Die biochemiese afbraak van xenobiote asook die afbraakprodukte kan

vanweë die gekontroleerde aard van die medium bepaal word. Stenersen (1973, 1979a, 1979b, 1979c, 1980) en Stenersen & Oien (1980) het heelwat studies gedoen i.v.m. die biochemiese prosesse wat betrokke is by die toksikologie en afbraak van gifstowwe in erdwurms. Al hierdie studies is op wurms uitgevoer wat in ondefinieerbare substrate aangehou is. Vir die biochemiese ondersoek sou 'n meer kontroleerbare medium meer betroubare resultate ontlewer het.

Die toksikologie van die afbraakprodukte, akkumulering van xenobiote en afbraakprodukte asook die korrelasie hiervan met die fisies-chemiese eienskappe van die verbindings (adsorpsie ens.), sinergisme van verskillende verbindings en bio-evaluering van nuwe verbindings is moontlikhede wat met die medium wat ontwikkel is, uitgevoer kan word. Subletale effekte van karbofuraan op massaverandering en voortplanting is reeds suksesvol in die huidige studie bepaal.

Nog 'n moontlike gebruik van die medium, is die bio-evaluering van gekontamineerde substrate soos water of grond. Die evaluering kan met die substraat as komponent van die medium of met 'n selektiewe ekstrak van die substraat in die medium gedoen word. Moontlike substrate wat hiermee geëvalueer kan word, is gekontamineerde landbougronde en rioolslik. Selektiewe ekstraksie kan die vastelling van die oorsaak of oorsprong van besmetting vergemaklik. Gekontamineerde water wat moontlik vir besproeiing aangewend kan word, kan in die oorspronklike of gekonsentreerde vorme aan die medium toegevoeg word, met die voorbehoud dat die voorgeskrewe souttoevoeging tot die medium nie verander word nie.

Die medium leen hom daartoe om 'n groot hoeveelheid parameters vir subletale effekte te kan monitor. Met die wysigings in die protokol soos voorgestel, kan die volgende parameters t.o.v. E. fetida gemeet word. Groeikoers, ontwikkelingskoers van klitellums, kokonproduksie, kokonmassa, getal nakomelinge per kokon, biomassa van die nakomelinge, inkubasieperiode van die kokonne, uitbroeisukses van die kokonne en bio-akkumulering van die xenobiot in die wurms, kokonne of nakomelinge. Wat die gifstof aanbetref kan persisterendheid, afbraak, adsorpsie en fisiese faktore wat dit beïnvloed, bepaal word. Die mesofauna teenwoordig in die medium kan ook gerieflik vir veranderinge gemonitor word. Dieselfde geld vir die mikrobiële samestelling wat tot op hede die grootste onbekende faktor in die medium is.

Die moontlikhede wat hierdie relatief eenvoudige medium t.o.v. ekotoksikologiese werk bied, is dus baie groot. Die eintlike voordeel van die medium is geleë in die eenvoudige en goedkoop, maar doeltreffende hehaalbaarheid van die medium aangesien alle abiotiese komponente bekend is en selfs, na gelang van die probleem wat ondersoek word, verander kan word.

5.1.2 Bepaling van letale konsentrasies

Alhoewel die ondersoek nie daarop gemik was om 'n medium vir die bepaling van letale konsentrasies te ontwikkel nie, het letaliteit onder die erdwurms tydens die bepaling van die subletale effekte van karbofuraan voorgekom. Die vlakke wat gebruik vir

blootstelling was baie laag in vergelyking met die waardes wat in die literatuur gekry is. Hierdie variasie kan aan die inherente eienskappe van die medium of aan die variasie tussen die verskillende toetsbevolkings van die erdwurm toegeskryf word. Hoe dit ook al sy, letale dosisse vir die wurm kan met die medium vasgestel word en vanweë die hehaalbare aard van die medium kan dit selfs as 'n standaardmedium vir sulke bepalinge voorgestel word. Die medium soos voorgeskryf deur Edwards (1978) is 'n bruikbare medium, maar met die nadeel dat selfs al word die samestelling van die medium goed gekontroleer, die herhaalbaarheid tussen verskillende laboratoriums (indien verskillende bronne van komponente gebruik word) sal varieer. 'n Voorbeeld waar variasie mag intree is dat die spagnummos wat voorgeskryf word, heelwat variasie t.o.v. lokaliteit en seisoen kan vertoon. Dieselfde probleem is met beesmis ondervind.

Die moontlikheid om kortermyn toksikologiese studies (in teenstelling met eko-toksikologiese studies) met slegs die MCU-vermikuliet as matriks en soutoplossing te gebruik, kan ook ondersoek word. Sulke bepalinge kan as proeflopies gebruik word om 'n aanduiding van die omvang van die letale grense te verkry (LD_{50} , LD_{10} en LD_{99}). Hierdie voorlopige data kan ook handig gebruik word by die beplanning van 'n subletale studie sodat die uiteindelijke vlakke van toediening nie ongewenste mortaliteit (soos met eksperiment 4.1 gekry is) tot gevolg sal hê nie.

Aan die hand van bostaande bespreking, kan moontlike prosedures vir die bepaling van letaliteitsvlakke bespreek word. Die inherente nadele van die medium moet egter eers uitgelig word. Eerstens kan die medium in terme van volume net 'n beperkte getal wurms onderhou. Tweedens sal wurms wat vrek 'n nadelige invloed op die ander wurms in die medium hê. Dit geld ook vir enige ander medium. Derdens is die medium nie geskik om studies met volwasse wurms te doen nie (kyk 3.2.8). Dit kan egter ook vermy word deur die wurms eers vir ongeveer 40 dae ('n effektiewe ouderdom van 60 dae word dan verkry) in 'n onbesmette medium volwassenheid te laat bereik en dan na die blootstellingsmedium oor te dra. Of hierdie strategie sal werk, moet eers ondersoek word aangesien die wurms moontlik aanpassingsprobleme in die blootstellingsmedium kan ondervind. Indien dit werk, kan dieselfde metode gebruik word om volwasse wurms vir subletale studies te gebruik.

Die voordeel wat die gebruik van die medium vir beide die bepaling van die letale konsentrasies en subletale effekte bied, is dat al twee in een eksperiment met dieselfde wurms onder identiese kondisies bepaal kan word. Daar sal dan van meer en kleiner konsentrasieintervalle as wat in die huidige studie die geval was, gebruik gemaak moet word. Voorts word die invloed van organiese materiaal, en dus ook die biologiese beskikbaarheid van die gifstof, in 'n medium, wat andersins voordelig vir die wurm is, gesimuleer. Dieselfde nadele en oorwegings wat ter sprake is by die bepaling van subletale effekte geld ook in 'n mindere of meerdere mate vir die bepaling van letale vlakke.

5.2 Die bruikbaarheid van die medium vir ander biologiese studies

5.2.1 Moontlikhede vir verdere studie met E. fetida op die medium

In die studie van Hartenstein (1982, pp.595-599) word 'n groot verskeidenheid verbindings m.b.t. die groei (en dus voedingswaarde van die komponente) van E. fetida geëvalueer. Vanweë die ondefinieerbaarheid van die medium wat deur bogenoemde outeur gebruik is, sou die ondersoek op die gedefinieerde medium beter resultate gelewer het. Dieselfde inherente nadeel kan in die studies van Neuhauser et al. (1980, pp.43-60) en Kaplan et al. (1980, pp.347-352) gesien word.

Die medium soos hier ontwikkel, se volle potensiaal is nog nie bereik nie. Die paar komponente wat geëvalueer is, is slegs enkele van die wat in die natuurlike habitat van die wurm aangetref word. Vrye en geëstrifiseerde vetsure is komponente wat algemeen in gronde aangetref word. Hierdie verbindings in die vorm van vetsure, wasse, olies, vry alkohole en ketone is afkomstig van plante en kan tot 27 % van die totale organiese inhoud van sekere gronde uitmaak (Moucawi, Fustec, Jambu & Maquesy, 1981, p.462). Wat die hidrae van hierdie verbinding tot die voedingswaarde van die medium vir die erdwurms is, moet nog ondersoek word.

Heelwat ander komponente en verbindings kan as potensiële voedingsbronne geëvalueer word. Hartenstein (1981, p.157) meld die nodigheid van die bepaling van die presiese aard van die komponente in die medium wat deur E. fetida geassimileer word. Alhoewel heelwat navorsing oor die invloed van sekere stowwe op die groei van erdwurms al gedoen is, is dit nie seker dat assimilasië van die verbindings deur die wurms plaasvind nie. Dit kan, soos in die bespreking van eksperiment 3.2.9 verduidelik is, die geval wees dat die teenwoordigheid van sekere verbindings 'n voordelige mikrobiëse bevolking stimuleer en onderhou sodat die verbinding nie 'n primêre nie, maar 'n sekondêre rol in die voeding van die wurms speel. Dit is ook die geval met die bevindinge soos die van Miles (1963, p.407-409) en Neuhauser et al. (1980, p.46) waar die toevoeging van sekere protosoë, fungi en bakterië voordelig vir die erdwurms was. Die toegevoegde biologiese aktiwiteit kan ook voordelig wees deur voedsel na 'n assimileerbare of meer assimileerbare vorm te verwerk.

Hierdie ontbrekende inligting kan heelwaarskynlik m.b.v. die medium aangevul word. Die groot voordeel wat die medium bied, is dat die komponente afsonderlik toegevoeg kan word. Die invloed van die individuele komponente kan dus gemaklik bepaal word. Trouens, dit is reeds tydens die ontwikkeling van die medium gedoen. Die moontlikheid bestaan ook dat suiwer mikrobiëse kulture aan die medium toegevoeg kan word. Die sal waarskynlik die autoklavering van die medium (voor toevoeging van water), gevolg deur die toediening van die kultuur aan die medium, gesuspendeer in die steriele soutoplossing behels. Die enigste probleem wat voorsien word, is die onvermydelike innokulasie met die toevoeging van die erdwurms aan die medium. Miles (1963, p.407) beskryf 'n metode vir die sterilisering van erdwurms. Wurms kan egter vir 24 uur op filtreerpapier gehou word tot die spysverteringskanaal leeg is.

Alhoewel nie steriel nie sal die inokkulum kleiner wees. Die MCU word nie deur autoklaving beïnvloed nie.

5.2.2 Moontlike studies i.v.m. wisselwerking tussen die verskillende biologiese komponente

In 4.8.2 word die groot hoeveelheid Enchytraeidae in die medium genoem. Aangesien dieselfde voedingskomponent deur beide die erdwurm en die Enchytraeidae benut word, is kompetisie tussen hierdie twee groepe nie onwaarskynlik nie. Enchytraea albidus is 'n verteenwoordiger van die Enchytraeidae wat reeds in assosiasie met E. fetida deur Stenersen & Oien (1981,p.243) in kompos aangetref is. Die groot getalle Enchytraeidae wat in die medium waargeneem is, regverdig toekomstige identifikasie. Die invloed van getallegtheid (1, 2 of 3 wurms per fles) van erdwurms in die medium kan moontlik die Enchytraeidae getalle beïnvloed. Die mate van kompetisie sal dan waarskynlik uit die data afgelei kan word.

Fungi word deur Hartenstein (1981,p.157) as moontlik die hoof voedingskomponent van E. fetida beskou. Hy lig die vermoede met 'n aantal waarnemings toe, maar interpretasie hiervan moet in ag neem dat hy nie assimilering van fungi van assimilering van onverwerkte materiaal onderskei het nie. Fungi word definitief deur die teenwoordigheid van erdwurms beïnvloed. Sigbare groei van fungi (missiliums wat op die oppervlak van die medium waargeneem kan word) sal nie in die teenwoordigheid van erdwurms waargeneem word nie. In enkele gevalle waar die aard van die medium aanvanklik nie voordelig vir die erdwurms was nie, is, veral aan die begin (2-5 dae) welige groei op die oppervlak (en dus ook in die medium) waargeneem. In die gevalle waar die wurms na 'n lang aanpassingsfase begin groei het, het die sigbare groei van fungi verdwyn. Die waarnemings is gemaak tydens die eksperimente met die vergalsterde cholesterol. Die herstel van die wurms (die wat nie gevrek het nie) het na ongeveer twee weke begin.

Hierdie wisselwerking tussen fungus en erdwurm word waarskynlik veroorsaak deur die reeds vermelde bakteriostatiese eienskappe van die seloovloeistof van E. fetida. Hierdie eienskap word toegeskryf aan 'n dimeer van verskillende proteïene teenwoordig in die seloovloeistof van E. fetida (Roch, Valembois, Davant & Lassegues, 1981,p.829). Die metode wat deur hulle gebruik is, om die seloovloeistof te versamel (elektriese stimulering), suggereer dat dit dieselfde vloeistof is as die wat deur Venter (1983,p.99) gebruik is vir die bepaling van dieldrien in die liggaamsvloeistof van E. fetida. Hierdie twee waarnemings dui daarop dat die seloovloeistof van die wurms 'n groot rol, beide in die interne omgewing van die wurm (detoksifisering) sowel as in die omringende medium speel. Met die medium kan hierdie eienskappe goed bestudeer word. Aangesien die identiteit van die bakteriostatiese faktor bekend is, kan die teenwoordigheid daarvan in die medium bepaal word. Omgekeerd kan 'n ekstrak van die seloovloeistof aan die medium toegedien word en kan die invloed daarvan op die verskillende bevolkings (miskien selfs suiwer kulture) bepaal word.

Die moontlike wisselwerking tussen nematode en Arthrobotrys-fungus teenwoordig in die medium, regverdig verdere ondersoek. Die

waargenome fluktuasies van die nematode (kyk figuur 21) in die medium kan moontlik hieraan toegeskryf word. Die nematoodgetalle bereik 'n konstante waarde in die medium wat waarskynlik op 'n balans tussen die nematode en fungi dui.

5.3 Samevatting

'n Gedefinieerde medium is ontwerp om eko-toksikologiese studies op grondorganismes te doen. Alhoewel evaluering slegs met een xenobiot gedoen is, is verdere evaluasie met ander gifstowwe van groot belang. Studies op een van elk van die volgende behoort gedoen te word. Gehalogeneerde pestisiede (bv. dieldrien), organofosfate (bv. paration) en herbisiede soos paraquat en atrasion (Eng. atrazine).

Alhoewel die medium groei tot vovassenheid van die erdwurms moontlik maak, is dit nie 'n optimale medium vir die onderhouding van wurms nie. Vanweë die aard van die medium verkeer die wurms onder drukspanning. Drukspanning kom in elk geval in die natuur voor en laboratoriumstudies geskied meestal onder optimale kondisies. Die lae organiese inhoud van die medium is egter meer verteenwoordigend van landbougronde as beesmis of enige ander groeimedium wat tot dusver voorgestel is.

Dit blyk uit die bespreking dat die aanwendingsmoontlikhede van die medium, vanweë die plooibare aard van die samestelling daarvan, ruim geleentheid vir verdere studie bied. Nie net t.o.v. eko-toksikologiese studies nie, maar suiwer biologiese ondersoeke kan gedoen word. Die eienskap wat die medium so bruikbaar maak, is geleë in die feit dat alle abiotiese faktore, en in sekere gevalle ook die biotiese, noukeurig vooraf bepaal kan word om 'n samestelling te verkry wat antwoorde op die gestelde vrae kan verskaf. Al die komponente van die medium is kommersieel verkrygbaar. Die groot leemte in die werk word beskou as die gebrek aan kennis aangaande die ander biologiese, en veral mikrobiologiese, komponente van die medium.

6 OPSOMMING

1 Die doel van die ondersoek was die ontwikkeling en evaluering van 'n gedefinieerde toetsmedium vir eko-toksikologiese studies. Die erdwurm Eisenia fetida is as primere proefdier geselekteer.

2 Karbofuraan is as evalueringsgifstof vir die ondersoek geselekteer. 'n Prosedure vir die ekstraksie vanuit die erdwurm en medium is ontwikkel.

3 MCU-vermikuliet, verskaf deur Micrinized Products is as matriks vir die medium geselekteer.

4 Sellulose, kaseïen, DNA en humussuur is van die verbindings wat as voedselkomponente vir die erdwurm geëvalueer is. Humusuur is as 'n moontlike noodsaaklike voedingkomponent geïdentifiseer.

5 Cholesterol en nektien het geen positiewe invloed op die massaverandering van die wurms gehad nie. Aminosure is in lae konsentrasies toksies vir die wurm.

6 Slegs 20 dae oue wurms is geskik vir evaluering aangesien volwasse wurms nie in die medium kon aanpas nie. Die medium het die jong wurms vir 'n periode van 60 dae onderhou en wasdom is binne 30 dae bereik.

7 'n Konsentrasie 10,0 mg kg⁻¹ karbofuraan het 97 % mortaliteit tot gevolg gehad. 'n Konsentrasie van 2,0 mg kg⁻¹ het 69,7 % mortaliteit veroorsaak, terwyl geen mortaliteit by die 0,2 en kontrolegroep voorgekom het nie.

8 Die wurms in die 2,0 mg kg⁻¹ behandeling het 'n massa-afname van ongeveer 70 % getoon. Na 30 dae het die wurms weer massatoename getoon. Geen invloed is op die wurms in die 0,2 mg kg⁻¹ waargeneem nie.

9 Die halfleeftyd van die karbofuraan in die medium was ongeveer 7 dae, terwyl geen karbofuraan in die wurms waargeneem is nie.

10 Karbofuraan het kokonproduksie by die 2,0 mg kg⁻¹ behandeling geïnhibeer, maar geen invloed op die wurms in die 0,2 mg kg⁻¹ behandeling gehad nie. Net so is geen verskil in die geakkumuleerde kokonproduksie en -massa tussen die kontrole en 0,2 mg kg⁻¹ behandeling gekry nie.

11 Vrylewende nematode word skynbaar nie deur die karbofuraan geïmmuniseer nie. Enchytraeidae, myte en fungi is ook in die medium waargeneem.

12 Waterinhoud, pH, kalium- kalsium- magnesium-, fosfor- en natriumkonsentrasies het weinig geïmmuniseer.

13 Heelwat moontlikhede vir verbetering aan die samestelling van die medium, sowel as die eksperimentele uitleg van blootstellings is geïdentifiseer.

14 Verskeie studiemoontlikhede is geïdentifiseer.

15 Die mikrobiëse inhoud van die medium is as die grootste onbekende faktor geïdentifiseer.

7 BEDANKINGS

My opregte dank aan die volgende persone en instansies:

Prof. A.J. Reinecke vir sy bekwame leiding, raad en motivering.

Dr. J.O. Oliver vir die onskatbare ondervinding om saam met hom te kon werk.

Prof. J.A. van Eeden vir sy belangstelling.

Prof. H.S. Steyn en mev. H.S. Hibbert vir hulp met die statistiek.

Prof. G.C. Loots en Dr. P.D. Theron vir raad en belangstelling.

Dr. V.L. Hamilton-Attwell vir hulp met die elektronmikroskoop.

Prof. S.J. Pretorius vir hulp met die rekenaar.

Mej. M. du Plessis vir die besonder netjiese figure.

Mnre. P.J. Steyn en P.A.J. Ryke vir hulle aanmoediging en gewaardeerde vriendskap.

Ander lede van die Dept. Dierkunde.

Dr. U.W. Weisenberg vir die verskaffing van die vermikuliet.

Roela, Leenke, Elmarie en Annette vir die proeflees van die verhandeling.

Departement van Landbou en die WNNR vir finansiële bystand.

My ouers, broer en susters vir die volgehoue onderskraging en belangstelling.

8 LITERATUURVERWYSINGS

- ARGAUER, R.J. 1969. Determination of residues of banol and other carbamate pesticides after hydrolysis and chloroacetylation. Journal of agricultural and food chemistry 17(4): 888-892.
- ARIENS, E.J., SIMMONS, A.M. & OFFERMEIER, J. 1976. Introduction to general toxicology. New York : Academic Press. 230p.
- ATLAVINYTE, Ona., LAGAUSKAS, A. & KILIKEVICIUS, G. 1980. Accumulation of organophosphorous insecticides in earthworms and reactions of earthworms and microorganisms to these substances (In Dindal, D.L. ed. Soil biology as related to land use practices. Proceedings of the VII international colloquium of soil zoology. Washington: EPA. 13-24.)
- BAYA, Ana.M., BOETHLING, R.S, & RAMOS-CORMENZA, A. 1981. Vitamin production in relation to phosphate sollubilization by soil bacteria. Soil biology and biochemistry 13: 527-531.
- BEYER, W.N. & GISH, C. 1980. Persistence in earthworms and potential hazards to birds of soil applied DDT, dieldrin and heptachlor. Journal of applied ecology 17: 259-307.
- BOT, J. & HOLLINGS, Nora. 1981. pesticides and fungicides. Staatsdrukker, Pretoria. 309p.
- BOWMAN, M.C. & BEROZA, M. 1967. Determination of residues of Mobil MC-A-600 and its hydrolysis product in coastal Bermuda grass and milk. Journal of agricultural and food chemistry 15(5): 894-897.
- BUTLER, Lilian.I. & McDONOUGH, L. 1970. Spesific GLC method for determining residues of carbaryl by electron capture detection after derivative formation. Journal of the AOAC 35(3): 495-498.
- CARMODY, F. 1981. List of research needs. (In Appelhoff, Mary. ed. Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues. Volume I. Proceedings. Kalamzoo: Beech Leaf Press. 299-305.
- CARO, J.H., FREEMAN, H.P., GLOTFELTY, D.E., TURNER, B.C. & EDWARDS, W.M. 1973. Dissipation of soil-incorporated carbofuran in the field. Journal of agricultural and food chemistry. 21(6): 1010-1015.
- CARO, J.H., FREEMAN, H.P. & TURNER, B.C. 1974. Persistence in soil and losses in runoff of soil-incorporated carbaryl in a small watershed. Journal of agricultural and food chemistry 22(5): 860-863.

CARTER, A., KENNEY, E.A., GUTHRIE, T.F. & TIMMENGA, H. 1983. Heavy metals in earthworms in non-contaminated and contaminated agricultural soil from near Vancouver, Canada. (In Satchell, J.E. ed. Earthworm ecology. London: Chapman and Hall. 267-274.)

COHEN, I.J., NORCUP, J., RUZICKA, J.H.A. & WHEALS, B.B. 1969. Trace determination of phenols by gas chromatography as their 2,4-dinitrophenyl ethers. Journal of chromatography 44:251-255.

COLE, L.K., METCALF, R.L. & SANBORN, J.R. 1976. Environmental fate of insecticides in terrestrial model ecosystems. International journal of environmental studies 10: 7-14.

COLE, L.K., SANBORN, J.R. & METCALF, R.L. 1967. Inhibition of corn growth by aldrin and the insecticide's fate in the soil, crop and wildlife of a terrestrial model ecosystem. Environmental entomology. 5: 583-589.

CORTEZ, L. & SCHNITZER, M. 1981. Reactions of nucleic acid bases with inorganic soil constituents. Soil biology and biochemistry 13: 173-178.

DARWIN, C.R. 1881. The formation of vegetable mould through the action of worms. London : Faber and Faber. 153p.

DE WET, W.J. & OPPERMAN, D.P.J. 1980. Inleiding tot die intermidiêre metabolisme vir biochemie I. Potchefstroom. (Diktaat)-PU vir CHO. 211p.

DIXON, W.J. 1981. BMDP-81; Biomedical computer programmes, P-series. Berkeley : University of California Press. 880p.

EASTON, E.G. 1983. A guide to the valid names of Lumbricidae (Oligochaeta). (In Satchell, J.E. eds. Earthworm ecology. London: Chapman and Hall: 475-488.)

EDWARDS, C.A. 1975. Factors that affect the persistence of pesticides in plants and soils. Pure and applied chemistry 42(1): 39-56.

EDWARDS, C.A. 1978. Testing chemicals for toxicity to earthworms. Rothamsted Experimental Station, Harpenden Herts, England. 7p.

EDWARDS, C.A. & LOFTY, R.R. 1972. Biology of earthworms. London : Chapman and Hall. 283p.

FELSOT, A. & WILSON, J. 1980. Adsorption of carbofuran and movement in soil thin layers. Bulletin of environmental contamination and toxicology 24: 778-782.

FUHREMANN, T.W. & LICHTENSTEIN, E.P. 1978. Release of soil-bound methyl parathion residues and their uptake by earthworms and oat plants. Journal of agricultural and food chemistry 26(3): 605:610.

GILMAN, A.P. & VARDANIS, A. 1974. Carbofuran. Comparative toxicity and metabolism in the worm Lumbricus terrestris L and Eisenia foetida S. Journal of agricultural and food chemistry 22(4): 625-628.

GORDER, G.W. & DAHM, P.A. 1981. Analysis of carbofuran and atrazine in soil samples. Journal of agricultural and food chemistry 29: 629-634.

GORDER, G.W., DAHM, P.A. & TOLLEFSON, J.J. 1982. Carbofuran persistence in cornfield soils. Journal of economic entomology 75(4): 637-642.

GORING, C.A.I., LASKOWSKI, D.A., HAMAKER, J.W. & MEIKLE, R.W. 1972. Principles of pesticide degradation in soil. (In Haque, R. & Freed, V.H. eds. Environmental dynamics of pesticides. New York: Plenum Press. 135-172.)

GRIMM, R.E. 1968. Clay mineralogy. New York: McGraw-Hill. 596p.

HALL, E.T. 1971. Variations of florisil activity: Method to increase retentive properties and improve recovery and elution patterns of insecticides. Journal of the AOAC 45(6): 1349-1351.

HARTENSTEIN, R. 1981. Use of Eisenia foetida in organic recycling based on laboratory experiments. (In Appelhof, Mary ed. Workshop on the role of earthworms in the stabilization of organic residues. Volume I. Proceedings. Kalamazoo: Beech Leaf Press. 155-165.)

HARTENSTEIN, R. 1982. Effect of aromatic compounds, humic acids and lignins on growth of the earthworm Eisenia foetida. Soil biology and biochemistry 14: 595-599.

HARTENSTEIN, Frances., HARTENSTEIN, Elizabeth. & HARTENSTEIN, R. 1981. Gut load and transit time in the earthworm Eisenia foetida. Pedobiologia 22: 5-20.

- † HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E.F. & KAPLAN, D.L. 1979. Reproductive potential of the earthworm Eisenia foetida. Oecologia 43: 329-340.
- HAYES, M.H.B. 1983. Darwin's vegetable mould and some modern concepts of humus structure and soil aggregation. (In Satchell, J.E. ed. Earthworm ecology. London: Chapman and Hall. 19-34.)
- HAQUE, R. 1972. Role of adsorption in studying the dynamics of pesticides in a soil environment. (In Haque, R. & Freed, V.H. eds. Environmental dynamics of pesticides. New York: Plenum Press. 97-114.)
- HELLING, C.S., KEARNY, P.C. & ALEXANDER, M. 1971. Behaviour of pesticides in soils. (In Brady, N.C. ed. Advances in agronomy. Volume 23. New York: Academic Press. 147-240.)
- HEYNS, J. 1971. A guide to the plant and soil nematodes of South Africa. Cape Town: A.A. Balkema. 233p.
- HOLDEN, E.R., JONES, W.M. & BEROZA, M. 1969. Determination of residues of methyl- and dimethylcarbamate insecticides by gas chromatography of their 2,4-dinitroaniline derivatives. Journal of agricultural and food chemistry 17(1): 56-59.
- HUGHES. 1961. The mites of stored food. London: HMSO. 287p.
- HUMMEL, H.E. 1983. Insecticides and their design. Journal of nematology 15(4): 615-639.
- IRELAND, M.P. 1983. Heavy metal uptake and tissue distribution in earthworms. (In Satchell, J.E. ed. Earthworm ecology. London: Chapman and Hall. 247-266.)
- JENKINS. 1964. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soils. Plant disease reporter 48(9): 629.
- KARNAK, R.E. & HAMELINK, J.L. 1982. A standardized method of determining the acute toxicity of chemicals to earthworms. Ecotoxicology and environmental safety 6: 216-222.

- KAPLAN, D.L., HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E.F. & MALECKI, M.R. 1980. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm eisenia foetida. Soil biology and biochemistry 12: 347-352.
- KAUFMAN, D.D. 1983. Pesticide efficacy declining in some soils; Microorganisms, the culprits. News. Beltsville : USDA Agricultural research service :4p. May 19.
- KRIEL, J.R. 1980. Die invloed van temperatuur op die voortplanting van Eisenia foetida (Oligochaeta). Potchefstroom. 102 p. (Verhandeling (M.Sc.)-PU vir CHO.)
- KUIHR, R.J. & DOROUGH, H.W. 1976. Carbamate insecticides: Chemistry, biochemistry and toxicology. Cleveland: CRC Press. 292p.
- LAVEGLIA, J. & DAHM, P.A. 1977. Degradation of organophosphorus and carbamate insecticides in the soil and by soil microorganisms. Annual review of entomology 22: 483-513.
- LICHTENSTEIN, E.P., KATAN, J. & ANDEREGG, B.N. 1977. Binding of persistent C-14-labelled insecticides in an agricultural soil. Journal of agricultural and food chemistry 25(1): 43-47.
- LOFS-HOLMIN, Astrid. 1980. Measuring growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. Swedish journal of agricultural research 10: 25-33.
- LOFS-HOLMIN, Astrid. 1981. Influence in field experiments of benomyl and carbendazim on earthworms (Lumbricide) in relation to soil texture. Swedish journal of agricultural research 11: 141-147.
- LORD, K.A., BRIGGS, G.G., NEALE, M.C. & MANLOVE, Rosemary. 1980. Uptake of pesticides from water and soil by earthworms. Pesticide science 11: 401-408.
- LUCHINI, L.C., LORD, K.A. & RUEGG, Elza.F. 1981. Sorption and desorption of pesticides on Brazilian soils. Ciencia cultura 33(1): 97-102.
- MALECKI, M.R., NEUHAUSER, E.F. & LOEHR, R.C. 1982. The effect of metals on the growth and reproduction of Eisenia foetida (Oligochaeta, Lumbricidae). Pedobiologia 24: 129-137.

- MARSHMAN, N.A. & MARSHALL, K.C. 1981. Bacterial growth on proteins in the presence of clay minerals. Soil biology and biochemistry 13: 127-134.
- METCALF, L.R. 1977. Model ecosystem approach to insecticide degradation: A critique. Annual review of entomology 22: 241-261.
- MILES, H.B. 1963. Soil protozoa and earthworm nutrition. Soil Science 95(6): 407-409.
- MINGELGRIN, U. & GERSTL, Z. 1983. Reevaluation of partitioning as a mechanism of nonionic chemicals adsorption in soils. Journal of environmental quality 12(1): 1-11.
- MOREALE, A. & VAN BLADEL, R. 1981. Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité - réactivité. Revue de l'agriculture 34(4): 940-952.
- MOUCAWI, J., FUSTEC, Eliane., JAMBU, P. & JAQUESY, Rose. 1981. Decomposition of lipids in soils: Free and esterified fatty acids, alcohols and ketones. Soil biology and biochemistry. 13: 461-468.
- NAUDE, D.J. 1982. 'n Studie om die artropod-fauna in drie substrate nl. skaapmis, rioolslik en beesmis met mekaar te vergelyk. Potchefstroom. 38p. (Ongepubliseerde projek (B.Sc.Honns.)-PU vir CHO.
- NEUHAUSER, E.F., HARTENSTEIN, R. & CONNORS, W.J. 1978. Soil invertebrates and the degradation of vanillin, cinnamic acid, and lignins. Soil biology and biochemistry 10: 431-435.
- NEUHAUSER, E.F., KAPLAN, D.L., MALECKI, M.R. & HARTENSTEIN, R. 1980. Materials supporting weight gain by the earthworm Eisenia foetida in waste conversion systems. Agricultural Wastes 2: 43-60.
- PELZAR, M.J., REID, R.D. & CHAN, E.C.S. 1977. Microbiology. New York: McGraw-Hill. 952p.
- REINECKE, A.J. & KRIEL, J.R. 1980. The influence of temperature on the reproduction of the earthworm Eisenia foetida (Oligochaeta). South African Journal of Zoology 16 (2): 96-100.

RICE, W.A. & PAUL, E.A. 1971. The acetylene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. Canadian journal of microbiology 17: 1049-1056.

ROCH, P., VALEMBOIS, P., DAVANT, Nicole. & LASSEGUES, Maguy. 1981. Protein analysis of earthworm coelomic fluid-II. Isolation and biochemical characterization of the Eisenia Fetida Andrei factor (EFAF). Comparative biochemistry and physiology 69B: 829-836.

SAXENA, A. & BARTHA, R. 1983. Microbial mineralization of humic acid-3,4-dichloroaniline complexes. Soil biology and biochemistry 15(1): 59-62.

SIVAPALAN, K. 1981. Phenolics and the exchange capacity of humic materials. Soil biology and biochemistry 13: 331-333.

STANTON, N.L., ALLEN, M. & CAMPION, Marilyn. 1981. The effect of the pesticide carbofuran on soil organisms and root and shoot production in shortgrass prairie. Journal of applied ecology 18: 417-431.

STENERSEN, J. 1979a. Action of pesticides on earthworms. Part I: The toxicity of cholinesterase-inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. Pesticide Science 0: 66-74.

STENERSEN, J. 1979b. Action of pesticides on earthworms. Part II: Elimination of parathion by the earthworm Eisenia foetida. Pesticide Science 0: 104-112.

STENERSEN, J. 1979c. Action of pesticides on earthworms. Part III. Inhibition and reactivation of cholinesterases in Eisenia foetida (Savigny) after treatment with cholinesterase-inhibiting insecticides. Pesticide Science 0: 113-122.

STENERSEN, J. 1980. Esterases of earthworms. Part I: Characterisation of the cholinesterases in Eisenia foetida (Savigny) by substrates and inhibitors. Comparative biochemistry and physiology. 66C: 37-44.

STENERSEN, J., GILMAN, A. & VARDANIS, A. 1973. Carbofuran: Its toxicity to and metabolism by earthworm (Lumbricus terrestris). Journal of agricultural and food chemistry. 21(2): 166-171.

STENERSEN, J. & OIEN, N. 1980. Action of pesticides on earthworms. Part IV. Uptake and elimination of oxamyl compared with carbofuran. Pesticide Science 11: 396-400.

- SONCHIK, Susan.M. 1982. Chromatographic needs of the environmentalist. Journal of chromatographic science 20: 402-408.
- TALEKAR, N.S., SUN, L.T., LEE, E.M. & CHEN, J.S. 1977. Persistence of some insecticides in subtropical soil. Journal of agricultural and food chemistry 25(2): 348-352.
- THOMSON, A.R. & SANS, W.W. 1974. Effects of soil insecticides in southwestern Ontario on non-target invertebrates: Earthworms in pasture. Environmental Entomology 3(2): 305-308.
- TOMLIN, A.D. & GORE, F.L. 1974. Effects of six insecticides and a fungicide on the numbers and biomass of earthworms in pasture. Bulletin of environmental contamination & toxicology 12(4): 487-492.
- TOMLIN, A.D. & MILLER, J.J. 1980. Development and fecundity of the manure worm Eisenia foetida (Annelida: Lumbricidae) under laboratory conditions. (In Dindal, D.L. ed. Soil biology as related to land use practices. Proceedings of the VII international soil zoology colloquium of the international society of soil science. Washington : EPA. 673-678.)
- TURNER, B.C. & CARO, J.H. 1973. Uptake and distribution of carbofuran and its metabolites in field-grown corn plants. Journal of environmental quality 2(2): 245-247.
- VAN RHEE, J.A. 1977. Effects of soil pollution on earthworms. Pedobiologia 17: 201-208.
- VENTER, J.M. 1983. Die invloed van 'n gechlloreerde pestisied, dieldrien, op die voortplanting en lewensloop van Eisenia foetida. Potchefstroom. 163 p. (Verhandeling (M.Sc.)-PU vir CHO.)
- WALLWORK, J.A. 1970. Ecology of soil animals. Johannesburg: McGraww-Hill. 281p.
- WENIG, K. & KUBISTA, V. 1949. The presence of riboflavin in the luminous material of the earthworm Eisenia submontana. Experimentia 5: 73.
- WHITE, A., HANDLER, P. & SMITH, E.L. 1973. Principles of biochemistry. Fifth Edition. Tokyo: McGraw-Hill. 1296p.
- WILIAMS, I.H. & BROWN, M.J. 1976. Degradation of carbofuran by soil microorganisms. Bulletin of environmental contamination & toxicology 15(2): 244-249.

YEATES. 1980. Populations of nematode genera in soil under pasture. III Vertical distribution at eleven sites. Journal of agricultural research 23: 117-128.

YU, C.C., BOOTH, G.M., HANSEN, D.J. & LARSEN, J.R. 1974. Fate of carbofuran in a model ecosystem. Journal of agricultural and food chemistry 22(3): 431-434.

PERSOONLIKE MEDEDELINGS

Prof. JOOSTE, W.J. Dept. Plantkunde, PU vir CHO, Potchefstroom.

Prof. LOOTS, G.C. Dept. Dierkunde, PU vir CHO, Potchefstroom.

Prof. REINECKE, A.J. Dept. Dierkunde, PU vir CHO, Potchefstroom.

Dr. WEISSENBERG. U.W. Micronized Products, Johannesburg.

9 BYLAAG

TABEL 9.1 Data van ondersoek 3.1.2. Massa van die monster word in gram en volume water geabsorbeer word in dm^3 gegee.

Monster	Massa	Water geabsorbeer
PLV500	2	0,0087
PLV200	1	-
MCF	5	0,0040
RSU	5	0,0027
MCU	5	0,0024
Beesmis	5	0,0115

TABEL 9.2 Data van ondersoek 3.1.4. Die begin- en eindmassas van twee wurms na 20 dae in verskillende mediums word in gram gegee.

Nr	Dag1	Dag20
1	0,1166	0,2352
2	0,1425	0,1855
3	0,1640	0,2854
4	0,1327	0,1564
5	0,2981	0,3763
6	0,1824	0,2542
7	0,1194	0,1423
8	0,1389	0,1338
9	0,1112	0,1457
10	0,0915	0,3313

TABEL 9.3 Data van ondersoek 3.2.2. Die begin- en eindmassa word vir twee volwasse wurms van dieselfde ouderdom word in gram gegee.

Nr	Dag1	Dag21
1	0,4106	0,1354
2	0,3822	0,1612
3	0,4316	0,2869
4	0,2785	0,2631
5	0,3360	0,3987
6	0,3952	0,4523

TABEL 9.4 Data van ondersoek 3.2.4. Die massaverandering van twee volwasse wurms word in gram gegee.

Nr	Dag1	Dag3	Dag7
1	0,4337	0,3948	0,3687
2	0,4910	0,4696	0,4342
3	0,4945	0,4815	0,4318
4	0,4686	0,4640	0,4784

TABEL 9.5 Data van ondersoek 3.2.5. Die massaverandering van twee wurms van dieselfde ouderdom oor 'n periode van 31 dae word in gram gegee.

Nr	Dag1	Dag3	Dag8	Dag14	Dag19	Dag31
1	0,3135	0,3107	0,3395	0,3256	0,3240	0,3350
2	0,2648	0,2624	0,2367	0,2211	0,2064	0,1824
3	0,3131	0,2930	0,2982	0,2885	0,2194	0,1497
4	0,2712	0,2570	0,2542	0,2518	0,3076	0,3179

TABEL 9.6 Data van ondersoek 3.2.6. Die massaverandering van twee wurms van dieselfde ouderdom word in gram gegee.

Nr	Dag1	Dag3	Dag8	Dag14	Dag19	Dag31
1	0,2648	0,2624	0,2367	0,2211	0,2064	0,1824
2	0,4006	0,4020	0,3995	0,4266	0,5652	0,5886
3	0,2093	0,3224	0,3596	0,4083	0,4141	0,3210
4	0,1254	0,2273	0,2202	0,2173	0,2298	0,2186
5	0,2618	0,2870	0,3076	0,3215	0,3395	0,3240

TABEL 9.7 Data van eksperiment 3.2.7. Evaluering van die medium op groter skaal. Individuele massas van vyf wurms word gegee. Waardes met 'n (*) is as uitskieters beskou en is nie gebruik nie.

Grp	Fles	Dag	Massa (g)				
			1	2	3	4	5
1	1	1	0,1559	0,0359	0,0505	0,0255	0,0464
		5	0,1942	0,0568	0,0468	0,0744	0,1834
		10	0,0786	0,1257	0,2760	0,1073	0,1392
		12	0,3058	0,1773	0,0957	0,1204	0,1503
		17	0,4528	0,2581	0,2251	0,1960	0,1570
		22	0,2614	0,5244	0,3064	0,2172	0,2938
		27	0,6067	0,3617	0,2897	0,3624	0,3461
		1	2	1	0,0669	0,1289	0,0594
5	0,1701			0,0460	0,0732	0,0940	0,0350
10	0,1617			0,0940	0,2749	0,0950	0,1147
12	0,1792			0,3011	0,1043	0,1414	0,1008
17	0,2920			0,4389	0,1939	0,2151	0,1550
22	0,4981			0,3574	0,2696	0,2324	0,2234
27	0,6116			0,4258	0,3187	0,2509	0,3502
2	1			1	0,0647	0,0238	0,0856
		5	0,0533	0,0224	0,0657	0,0629	0,0259*
		10	0,0458	0,0739	0,0928	0,1048	0,0351*
		17	0,1133	0,1151	0,0611	0,0490	0,0402*
		22	0,1235	0,1443	0,0475	0,0658	0,0514*
		27	0,1751	0,1932	0,0907	0,0674	0,0451*
2	2	1	0,0981	0,0550	0,0586	0,0381	0,0203*
		5	0,0736	0,0490	0,0574	0,0341	0,0185*
		10	0,0842	0,0809	0,0530	0,0786	0,0202*
		12	0,0635	0,0874	0,0961	0,0933	0,0234*
		17	0,1071	0,1003	0,0834	0,0790	0,0195*
		22	0,1462	0,1342	0,0580	0,1015	0,0236*
		27	0,1903	0,1333	0,1720	0,0582	0,0437*
3	1	1	0,0537	0,0448	0,0508	0,0356	0,0174*
		5	0,0322	0,0556	0,0547	0,0350	dood*
		10	0,0842	0,0609	0,0810	0,0535	"
		12	0,0751	0,0911	0,0910	0,0543	"
		17	0,1132	0,1259	0,0813	0,0753	"
		22	0,1465	0,0977	0,1573	0,0892	"
		27	0,2117	0,1995	0,1248	0,1211	"
3	2	1	0,0883	0,0428	0,0548	0,0369	0,0274*
		5	0,0919	0,0545	0,0448	0,0266	0,0225*
		10	0,0753	0,1360	0,0517	0,0590	0,0397*
		12	0,0776	0,1419	0,0553	0,0635	0,0450*
		17	0,1785	0,0818	0,0873	0,0740	0,0501*
		22	0,2039	0,1088	0,0926	0,1004	0,0613*
		27	0,2552	0,1328	0,1395	0,1186	0,0871*
4	1	1	0,0687	0,0795	0,0601	0,0529	0,0335*
		5	0,0634	0,0931	0,0571	0,0756	0,0438*
		10	0,1260	0,0820	0,1419	0,1334	0,0708*
		12	0,1599	0,1476	0,1032	0,1336	0,0696*
		17	0,2081	0,1134	0,2054	0,1626	0,0707*
		22	0,2545	0,2666	0,1543	0,1614	0,0623*
		27	0,3095	0,2982	0,1614	0,1822	0,0690*

TABEL 9.7 Vervolg

Grp	Fles	Dag	Massa (g)				
			1	2	3	4	5
4	2	1	0,0668	0,0331	0,0525	0,0549	0,0311*
		5	0,0854	0,0781	0,0677	0,0578	0,0231*
		10	0,1474	0,1060	0,1434	0,1265	0,0219*
		12	0,1650	0,1310	0,1369	0,1590	0,0213*
		17	0,2300	0,2460	0,2105	0,1565	0,0190*
		22	0,3271	0,2985	0,2306	0,2560	0,0213*
		27	0,3270	0,4065	0,3677	0,2585	0,0177*
5	1	1	0,0943	0,1039	0,0570	0,0677	0,0434*
		5	0,1073	0,1194	0,0881	0,0689	0,0748*
		10	0,2020	0,1133	0,1602	0,1431	0,1052*
		12	0,2128	0,1817	0,1767	0,1367	0,0924*
		17	0,2984	0,2840	0,1740	0,2202	0,0947*
		22	0,3697	0,3796	0,2063	0,2489	0,1222*
		27	0,3189	0,3737	0,1302	0,1778	dood *
5	2	1	0,0739	0,0339	0,0814	0,0418	0,0295*
		5	0,0775	0,1116	0,0392	0,0573	0,0314*
		10	0,1701	0,1424	0,1031	0,0836	0,0629*
		12	0,2012	0,1718	0,1258	0,1047	0,0658*
		17	0,2497	0,2790	0,1983	0,1628	0,0838*
		22	0,3345	0,3671	0,2959	0,2140	0,0943*
		27	0,2955	0,2699	0,2722	0,1637	0,0664*
6	1	1	0,0384	0,0396	0,0623	0,0649	0,0241*
		5	0,0844	0,0563	0,0585	0,0888	0,0335*
		10	0,1635	0,1103	0,0928	0,1551	0,0418*
		12	0,1636	0,1006	0,1295	0,1823	0,0426*
		17	0,1972	0,2288	0,1507	0,1129	0,0460*
		22	0,2738	0,2533	0,1446	0,1736	0,0566*
		27	0,3449	0,2814	0,2306	0,1632	0,0632*
6	2	1	0,0598	0,0531	0,0220	0,0428	0,0155*
		5	0,0176	0,0889	0,0341	0,0705	0,0225*
		10	0,1265	0,1491	0,0429	0,0381	0,0331*
		12	0,1820	0,1328	0,0535	0,0434	0,0345*
		17	0,2606	0,1747	0,0741	0,0647	0,0581*
		22	0,3323	0,2558	0,1110	0,0889	0,0596*
		27	0,3601	0,4072	0,1595	0,1580	0,0875*
7	1	1	0,0411	0,0631	0,0459	0,0557	0,0111*
		5	0,0914	0,0602	0,0888	0,0808	0,0299*
		10	0,1795	0,1117	0,1293	0,1239	0,0589*
		12	0,1509	0,1197	0,1944	0,1428	0,0783*
		17	0,2896	0,2071	0,1995	0,1839	0,1001*
		22	0,3364	0,2297	0,2204	0,2015	0,1464*
		27	0,2827	0,2984	0,4647	0,2480	0,1772*

TABEL 9.7 Vervolg

Grn	Fles	Dag	Massa (α)				
			1	2	3	4	5
7	2	1	0,1050	0,0625	0,0371	0,0433	0,0230*
		5	0,1619	0,1005	0,0619	0,0425	0,0280*
		10	0,1676	0,2433	0,0912	0,0727	0,0391*
		12	0,1461	0,2665	0,1105	0,0858	0,0424*
		17	0,2851	0,2466	0,1512	0,1107	0,0610*
		22	0,3223	0,2936	0,1364	0,1731	0,0700*
		27	0,4193	0,4559	0,2349	0,1789	0,0542*
8	1	1	0,0550	0,0293	0,0952	0,0480	0,0291*
		5	0,0558	0,0906	0,0416	0,0770	0,0214*
		10	0,1479	0,0734	0,1262	0,1089	0,0158*
		12	0,0793	0,1625	0,1241	0,1395	0,0214*
		17	0,1783	0,2418	0,1759	0,1171	dood*
		22	0,2377	0,2828	0,2058	0,1570	"
		27	0,4073	0,3054	0,2376	0,2851	"
8	2	1	0,0317	0,0340	0,0342	0,0324	0,0721
		5	0,0548	0,1032	0,0528	0,0588	0,0561
		10	0,1220	0,1309	0,1090	0,1587	0,1068
		12	0,1473	0,1863	0,1527	0,1283	0,1324
		17	0,2902	0,2582	0,2270	0,2229	0,2215
		22	0,3921	0,3302	0,3387	0,3021	0,2913
		27	0,5122	0,3901	0,4316	0,4048	0,4488
9	1	1	0,0274	0,0566	0,0718	0,0453	0,0235*
		5	0,0588	0,0864	0,0522	0,0714	0,0331*
		10	0,1401	0,1076	0,1049	0,0846	0,0531*
		12	0,1358	0,1226	0,0857	0,1090	0,0489*
		17	0,1405	0,1419	0,1061	0,1320	0,0633*
		22	0,1851	0,1701	0,1432	0,1397	0,0645*
		27	0,1830	0,2195	0,2328	0,2373	0,0886*
9	2	1	0,0526	0,0416	0,0201	0,0355	0,0489
		5	0,0522	0,0863	0,0650	0,0567	0,0346
		10	0,0925	0,1298	0,0784	0,0691	0,1059
		12	0,1415	0,0890	0,0737	0,0970	0,1140
		17	0,1907	0,1133	0,1112	0,1780	0,1273
		22	0,2286	0,2250	0,1298	0,1368	0,1515
		27	0,3206	0,3467	0,1793	0,1651	0,1677

TABEL 9.8 Verwerkte data van eksperiment 3.2.7. Data verwerk m.b.v. BMDP7D en BMDDP2V statistiese programme. Die data verskaf is die verwerkte data van tabel 9.7 na log transformasie.

Groep	Dag	Gemiddeld	Standaardafwyking
1	1	0,0440	0,00566
	5	0,0760	0,01980
	10	0,1205	0,00636
	12	0,1335	0,00354
	17	0,2130	0,00141
	22	0,2705	0,00071
	27	0,3395	0,00071
2	1	0,0605	0,00212
	5	0,0525	0,00212
	10	0,0750	0,00212
	12	0,0815	0,00495
	17	0,0885	0,00495
	22	0,1025	0,01061
	27	0,1350	0,00424
3	1	0,0510	0,00707
	5	0,0490	0,00707
	10	0,0750	0,00707
	12	0,0815	0,00495
	17	0,1020	0,00424
	22	0,1245	0,00212
	27	0,1635	0,00212
4	1	0,0585	0,00919
	5	0,0720	0,00000
	10	0,1260	0,00707
	12	0,1420	0,00849
	17	0,1950	0,03253
	22	0,2435	0,04879
	27	0,2890	0,07212
5	1	0,0695	0,01626
	5	0,0835	0,01768
	10	0,1400	0,02121
	12	0,1640	0,01838
	17	0,2330	0,01556
	22	0,3020	0,00141
	27	0,2500	0,00000

TABEL 9.8 Vervolg

Groep	Dag	Gemiddeld	Standaardafwyking
6	1	0,0475	0,00495
	5	0,0625	0,01344
	10	0,1095	0,02899
	12	0,1235	0,02899
	17	0,1580	0,01980
	22	0,2040	0,00990
	27	0,2630	0,01131
7	1	0,0565	0,00778
	5	0,0860	0,00849
	10	0,1400	0,00566
	12	0,1520	0,00000
	17	0,2085	0,01485
	22	0,2390	0,01131
	27	0,3225	0,00071
8	1	0,0490	0,01131
	5	0,0655	0,00071
	10	0,1195	0,00078
	12	0,1555	0,00919
	17	0,2110	0,04667
	22	0,2760	0,07778
	27	0,3730	0,09051
9	1	0,0450	0,00707
	5	0,0630	0,00566
	10	0,1020	0,00990
	12	0,1085	0,00636
	17	0,1370	0,00990
	22	0,1670	0,00990
	27	0,2275	0,01344

TABEL 9.9 Data van eksperiment 3.2.8. Die invloed van humussuur en pektien op drie volwasse wurms.

Gro	Fles	Dag	Massa (g)			Kokonne		
			1	2	3			
1	1	1	0,6419	0,3630	0,3682	0		
		4	0,5772	0,5115	0,4347	0		
		10	0,4674	0,6063	0,4142	0		
		14	0,3382	0,4395	0,3845	0		
		20	0,4263	0,4219	0,3922	0		
		25	0,4465	0,5251	0,4715	0		
		31	0,4189	0,4275	0,4499	0		
		37	0,3766	0,4118	0,3779	0		
		42	0,3398	0,3466	0,3233	0		
		1	2	1	0,6111	0,3867	0,4374	0
				4	0,4499	0,6519	0,4645	0
				10	0,4622	0,6477	0,4561	0
				14	0,5589	0,4067	0,4546	0
20	0,4028			0,5234	0,3783	0		
25	0,3823			0,6423	0,4902	0		
31	0,4962			0,3602	0,6539	0		
37	0,3076			0,5356	0,4089	0		
42	0,4556			0,2702	0,3340	0		
1	3			1	0,6827	0,6026	0,6261	0
				4	0,7151	0,5963	0,6949	0
				10	0,7106	0,6007	0,5516	0
				14	0,6947	0,6536	0,5620	0
		20	0,7708	0,8424	0,6823	1		
		25	0,8031	0,8787	0,7658	0		
		31	0,6371	0,6757	0,6494	0		
		37	0,5944	0,5860	0,5650	0		
		42	0,4933	0,4821	dood	0		
		2	1	1	0,6184	0,5870	0,4866	0
				4	0,6893	0,7325	0,5508	1
				10	0,4594	0,7024	0,7362	2
				14	0,4907	0,7205	0,7118	1
20	0,5396			0,5287	0,4030	1		
25	0,3045			0,4433	0,3850	0		
31	0,3948			0,2533	dood	0		
37	0,3453			dood	dood	0		
termineer								
2	2			1	0,5543	0,4792	0,7242	0
				4	0,7361	0,6047	0,8429	1
				10	0,6610	0,7822	0,7306	2
				14	0,6498	0,7333	0,6070	4
		20	0,5468	0,5431	0,4871	1		
		25	0,5490	0,3664	0,6196	0		
		31	0,3667	0,4797	0,5116	0		
		37	dood	dood	dood	0		
		termineer						

TABEL 9.9 Vervolg

Grp	Fles	Dag	Massa (g)			Kokonne
			1	2	3	
3	1	1	0,8511	0,5711	0,5134	0
		4	0,6365	0,5330	0,8259	0
		10	0,5133	0,7789	0,5781	0
		14	0,7772	0,5098	0,4676	1
		20	0,4431	beskadig		0
		25	0,4438	-	-	0
		31	0,4010	-	-	0
		termineer				
3	2	1	0,4925	0,5970	0,5323	0
		4	0,3625	0,5073	0,5330	0
		10	0,6876	0,5118	0,4100	0
		14	0,4313	0,3214	0,3219	0
		20	0,3024	0,3275	0,2889	0
		25	0,2455	0,2708	0,2428	0
		31	dood	dood	dood	0
		termineer				
4	1	1	0,4480	0,6368	0,5577	0
		4	0,6717	0,4246	0,5066	0
		10	0,5678	0,5549	0,3682	0
		14	0,5807	0,5503	0,3267	0
		20	0,4625	0,4771	beskadig	0
		25	0,4662	0,5816	-	0
		31	0,4534	0,5969	-	0
		37	0,5306	0,4456	-	0
		42	0,4384	0,4602	-	0
		47	0,6144	0,4383	-	0
		4	2	1	0,6507	0,4698
4	0,6821			0,4885	0,4441	0
10	0,6817			0,4429	0,4696	0
14	0,3741			0,6067	0,4337	4
20	0,4122			0,4593	0,5050	2
25	0,4424			0,4482	0,5026	0
31	0,4317			0,5187	0,3827	0
37	0,4533			0,3556	0,6993	0
42	0,3173			0,4106	0,3166	0
47	0,3657			0,2968	dood	0
5	1			1	0,5762	0,6178
		4	0,6494	0,5632	0,5712	2
		10	0,6702	0,7590	0,6398	5
		15	0,4996	0,5999	0,6023	0
		20	0,5383	0,4054	0,3522	0
		25	0,4755	0,3257	0,3408	0
		31	dood	dood	dood	0
		termineer				
5	2	1	0,6319	0,7150	0,4297	0
		4	0,5805	0,5504	0,7914	2
		10	0,7898	0,5547	0,5893	5
		15	0,5791	0,7159	0,5603	0
		20	0,6080	0,4946	0,4413	0
		25	0,4749	0,4669	0,3694	0
		31	dood	dood	dood	0
		termineer				

TABEL 9.10 Verwerkte data van ekseriment 3.2.8. Die data is eers met 'n BMDPAM verwerk en toe deur die BMPD2V program. Gemiddelde massas van die wurms in gram en die standaardafwyking tot op dag 25 word gegee.

Nr	Daq	Gemiddeld	Stnd afw
1	1	0,52441	0,09817
1	4	0,56622	0,08909
1	10	0,54631	0,06595
1	14	0,49919	0,12667
1	20	0,53782	0,19718
1	25	0,60061	0,18680
2	1	0,57495	0,01594
2	4	0,69272	0,04976
2	10	0,67863	0,06501
2	14	0,65218	0,01582
2	20	0,50805	0,02491
2	25	0,44418	0,09416
3	1	0,59290	0,07396
3	4	0,56637	0,13968
3	10	0,57995	0,06149
3	14	0,47153	0,16028
3	20	0,38349	0,10921
3	25	0,36047	0,15193
4	1	0,53452	0,01836
4	4	0,54052	0,00879
4	10	0,50820	0,01589
4	14	0,49058	0,00662
4	20	0,45880	0,00005
4	25	0,48433	0,02819
5	1	0,60165	0,01336
5	4	0,61768	0,03264
5	10	0,66713	0,03187
5	14	0,59285	0,03618
5	20	0,47330	0,05845
5	25	0,40887	0,03988

Geen betekenisvolle verskil is tussen hierdie groepe gekry nie.

TABEL 9.11 Data van eksperiment 3.2.9. Die invloed van humussur en pektien op jong wurms. Die massas van drie wurms in elke fles word in gram aangedui.

Nr	Fles	Dag	Massa			Getal kokonne
			1	2	3	
1	1	1	0,0365	0,0551	0,0714	0
		9	0,1244	0,1154	0,1268	0
		14	0,1882	0,2178	0,2063	0
		19	0,3054	0,2020	0,2880	0
		25	0,2532	0,3628	0,3181	0
		30	0,2777	0,3294	0,3627	0
		36	0,2498	0,3653	0,2857	0
		40	0,2611	0,3450	0,3044	0
		48	0,2926	0,2599	0,2050	0
		56	0,1801	0,2405	0,2137	0
1	2	1	0,0564	0,0523	0,0504	0
		9	0,1255	0,1419	0,1172	0
		14	0,1920	0,2490	0,1605	0
		19	0,3236	0,2751	0,1830	0
		25	0,3243	0,2199	0,4687	0
		30	0,5199	0,3416	0,2598	0
		36	0,4467	0,2922	0,2449	0
		40	0,2682	0,4179	0,2269	0
		48	0,2421	0,1809	0,3703	0
		56	0,1817	0,2362	dood	0
1	3	1	0,0499	0,0539	0,0606	0
		9	0,1471	0,1095	0,1246	0
		14	0,1840	0,2392	0,2097	0
		19	0,2320	0,3103	0,3438	0
		25	0,4436	0,3121	0,4015	0
		30	0,4654	0,5027	0,3984	0
		36	0,4193	0,3010	0,3748	0
		40	0,4179	0,2969	0,3423	0
		48	0,4288	0,4606	0,2932	0
		56	0,3768	0,4129	0,2618	0
2	1	1	0,0503	0,0486	0,0317	0
		9	0,1196	0,1039	0,1323	0
		14	0,1839	0,1744	0,1976	0
		19	0,2216	0,1924	0,2460	0
		25	0,3267	0,2498	0,2894	0
		30	0,3030	0,3206	0,2528	0
		36	0,2557	0,2350	0,2787	0
		40	0,2333	0,2975	0,2544	0
		48	0,2821	0,2468	0,2085	0
		56	0,2664	0,1882	0,1887	0

TABEL 9.11 Vervolg

Nr Fles		Daq	Massa			Kokonne
2	2	1	0,0492	0,0563	0,0488	0
		9	0,1063	0,1380	0,1064	0
		14	0,2215	0,1728	0,1818	0
		19	0,2296	0,2505	0,3469	0
		25	0,4217	0,3041	0,2740	0
		30	0,3852	0,3005	0,4432	0
		36	0,3517	0,3215	dood	0
		40	0,2878	0,3346	"	0
		48	dood	dood	"	0
		56	"	"	"	0
2	3	1	0,0338	0,0528	0,0544	0
		9	0,1542	0,1229	0,1291	0
		14	0,2067	0,2558	0,2116	0
		19	0,3705	0,3115	0,2922	0
		25	0,3355	0,4188	0,3818	0
		30	0,3658	0,3075	0,4342	0
		36	0,3695	0,3468	0,3050	0
		40	0,2304	0,2649	0,3113	0
		48	0,2821	0,2464	0,2085	0
		56	dood	dood	dood	0
3	1	1	0,0602	0,0568	0,0945	0
		9	0,0967	0,0827	0,1436	0
		14	0,1410	0,1826	0,1069	0
		19	0,1262	0,2264	0,2005	0
		25	0,2390	0,2420	0,1920	0
		30	0,2339	0,2747	0,2753	0
		36	0,2251	0,2629	0,2760	0
		40	0,2458	0,3263	0,2690	0
		48	0,2111	0,2627	0,2472	0
		56	0,1878	0,2099	0,1961	0
3	2	1	0,0805	0,0843	0,0534	0
		9	0,1126	0,1043	0,1317	0
		14	0,1329	0,1282	0,1586	0
		19	0,1759	0,1808	0,1606	0
		25	0,2154	0,2337	0,2120	0
		30	0,2533	0,2789	0,2473	0
		36	0,2564	0,2971	0,2503	0
		40	0,2681	0,3172	0,3137	0
		48	0,2336	0,2061	0,2414	0
		56	0,2025	0,2207	0,2392	0
3	3	1	0,0727	0,0875	0,0538	0
		9	0,1176	0,1328	0,1287	0
		14	0,1599	0,1106	0,1340	0
		19	0,0924	0,1669	0,0802	0
		25	0,1143	0,0968	0,2204	0
		30	0,2927	0,1449	0,1594	0
		36	0,1576	0,3658	0,1758	0
		40	0,3608	0,2024	0,2278	0
		48	0,2664	0,1484	0,1537	0
		56	0,1394	0,2540	0,1304	0

TABEL 9.11 Vervolg

Nr	Fles	Daar		Massa		Kokonne
4	1	1	0,0398	0,0311	0,0404	0
		9	0,0714	0,0437	0,0467	0
		14	0,0437	0,0576	0,0992	0
		19	0,0643	0,1123	0,0415	0
		25	0,0682	0,0390	0,1551	0
		30	0,1973	0,0667	0,0477	0
		36	0,0649	0,1796	0,0498	0
		40	0,1451	0,0545	0,0460	0
		48	0,0530	0,1224	0,0606	0
		56	0,1858	0,0482	0,0370	0
4	2	1	0,0319	0,0966	0,0515	0
		9	0,0828	0,1064	0,0498	0
		14	0,0974	0,1448	0,0779	0
		19	0,1042	0,1695	0,0947	0
		25	0,2095	0,0897	0,0738	0
		30	0,1003	0,0926	0,2807	0
		36	0,2881	0,0991	0,0765	0
		40	0,0773	0,1125	0,2695	0
		48	0,0875	0,0645	0,3171	0
		56	0,2225	0,0561	0,0729	0
4	3	1	0,0426	0,0525	0,0821	0
		9	0,0790	0,1017	0,0839	0
		14	0,0902	0,1162	0,1145	0
		19	0,1180	0,1157	0,1099	0
		25	0,1610	0,1401	0,1105	0
		30	0,1819	0,0870	0,1559	0
		36	0,1610	0,1150	0,0862	0
		40	0,0795	0,1291	0,1787	0
		48	0,0631	0,1075	0,1513	0
		56	0,1342	0,0537	0,0919	0
5	1	1	0,0394	0,0502	0,0401	0
		9	0,1162	0,0949	0,0779	0
		14	0,1819	0,1748	0,1167	0
		19	0,2770	0,1263	0,2472	0
		25	0,3986	0,1320	0,3485	0
		30	0,5166	0,5578	0,2014	0
		36	0,6398	0,5443	0,2033	4
		40	0,6081	0,7338	0,3040	8
		48	0,7104	0,5945	0,1673	9
		56	0,6765	0,6336	0,1650	6
5	2	1	0,0559	0,0774	0,0730	0
		9	0,1548	0,1298	0,1457	0
		14	0,2259	0,1932	**	0
		19	0,3456	0,2931	**	0
		25	0,3089	0,3730	**	0
		30	0,3966	0,5894	**	0
		36	0,5143	0,7058	**	3
		40	0,5218	0,7934	**	7
		48	0,6025	0,8312	**	9
		56	0,6787	0,8404	**	10

TABEL 9.11 Vervolg

Nr	Fles	Dag	Massa			Kokonne
			1	2	3	
5	3	1	0,0635	0,0469	0,0435	0
		9	0,1367	0,1012	0,1017	0
		14	0,1499	0,1688	0,2243	0
		19	0,2362	0,2130	0,2954	0
		25	0,3129	0,3092	0,2641	0
		30	0,4122	0,4384	0,3304	0
		36	0,5189	0,4447	0,3687	0
		40	0,5836	0,6279	0,5102	0
		48	0,6325	0,6103	0,6155	4
		56	0,7187	0,6580	0,6919	11
6	1	1	0,0341	0,0698	0,0794	0
		9	0,1964	0,2187	0,1295	0
		14	0,3813	0,2548	0,3579	0
		19	0,4646	0,5275	0,4077	0
		25	0,6287	0,5221	0,5881	1
		30	0,6559	0,5563	0,6161	7
		36	0,6322	0,6028	0,5154	13
		40	0,6162	0,6459	0,5638	17
		48	0,5529	0,5908	0,5109	6
		56	0,5684	0,5727	0,5367	8
6	2	1	0,0399	0,0699	0,0826	0
		9	0,2144	0,2354	0,1470	0
		14	0,3622	0,3171	0,2776	0
		19	0,4663	0,5097	0,4372	0
		25	0,5521	0,6128	0,5488	3
		30	0,7038	0,5637	0,6110	12
		36	0,6036	0,5373	0,6909	17
		40	0,5832	0,7396	0,6048	11
		48	0,5902	0,5168	0,6823	15
		56	0,5393	0,5011	0,6476	13
6	3	1	0,0961	0,0353	0,0716	0
		9	0,2345	0,2908	0,1597	0
		14	0,3964	0,3062	0,4621	0
		19	0,6022	0,4829	0,6061	2
		25	0,6264	0,6068	0,7104	6
		30	0,7522	0,6974	0,6430	12
		36	0,6218	0,7317	0,6363	19
		40	0,6021	0,5783	0,7622	8
		48	0,5567	0,6538	0,5299	9
		56	0,6573	0,5280	0,5455	3

TABEL 9.12 Data van eksperiment 3.2.9 verwerk m.b.v. BMDPAM en BMDP2V programme. Die eerste program doen 'n statistiese skatting van die lesings wat nie geneem is nie en gebruik die waardes vir verdere statistiese ontledings.

Nr	Daq	Gemiddelde	Stnd afw
1	1	0,05406	0,00092
1	9	0,12582	0,00319
1	14	0,20519	0,00532
1	19	0,27369	0,01891
1	25	0,34491	0,03771
1	30	0,38418	0,06673
1	36	0,33108	0,03250
1	40	0,32007	0,02798
1	48	0,30371	0,07859
1	56	0,26622	0,07408
2	1	0,05108	0,00391
2	9	0,12646	0,00927
2	14	0,20924	0,01642
2	19	0,29859	0,02469
2	25	0,36590	0,02848
2	30	0,40032	0,04792
2	36	0,34408	0,01938
2	40	0,31496	0,04242
2	48	0,33038	0,07644
2	56	0,34713	0,00292
3	1	0,07152	0,00113
3	9	0,11664	0,00921
3	14	0,13941	0,00435
3	19	0,15666	0,03183
3	25	0,19618	0,04537
3	30	0,24004	0,03555
3	36	0,25189	0,01760
3	40	0,28123	0,01802
3	48	0,21896	0,02636
3	56	0,19778	0,02130
4	1	0,05206	0,01296
4	9	0,07393	0,01784
4	14	0,09350	0,02309
4	19	0,10334	0,02686
4	25	0,11632	0,02583
4	30	0,13446	0,02768
4	36	0,12113	0,02324
4	40	0,12136	0,03624
4	48	0,11411	0,03930
4	56	0,10026	0,01472

TABEL 9.12 Vervolg

Nr	Daq	Gemiddelde	Stnd afw
5	1	0,05443	0,01305
5	9	0,11766	0,02386
5	14	0,18113	0,02339
5	19	0,25525	0,04238
5	25	0,30897	0,02557
5	30	0,42087	0,02529
5	36	0,47188	0,03350
5	40	0,55904	0,01321
5	48	0,56441	0,06635
5	56	0,59501	0,09921
6	1	0,06430	0,00329
6	9	0,20293	0,02366
6	14	0,34618	0,03694
6	19	0,50047	0,05484
6	25	0,59958	0,04203
6	30	0,64438	0,04679
6	36	0,61911	0,04057
6	40	0,63290	0,02116
6	48	0,57603	0,02273
6	56	0,56629	0,00937

TABEL 9.13 Data van eksperiment 4.1. Invloed van karbofuraan op E. fetida. Massas word in gram gegee.

Nr	Daq	Fles	Massa voor			Massa na		
1	10	1	0,1560	0,0789	0,1932	0,3359	0,3232	0,1553
1	10	2	0,1400	0,1926	0,1924	0,4012	0,3307	0,3746
2	10	1	0,2217	0,1218	0,1170	0,2751	0,2519	0,1785
2	10	2	0,3151	0,2616	0,1989	0,3745	0,3219	0,1526
3	10	1	0,1550	0,1255	0,0396	0,0893	0,0742	0,0413
3	10	2	alle wurms dood					
4	10	1	"	"	"			
4	10	2	"	"	"			
1	20	1	0,1612	0,1207	0,2523	0,4702	0,2781	0,3731
1	20	2	0,0651	0,2675	0,1920	0,5977	0,3549	0,2592
2	20	1	0,2260	0,0785	0,2210	0,2295	0,4690	0,4842
2	20	2	0,1444	0,1531	0,0688	0,4677	0,2889	0,5362
3	20	1	0,2815	0,0827	0,0969	0,0550	0,0352	0,1014
3	20	2	alle wurms dood					
4	20	1	"	"	"			
4	20	2	"	"	"			
1	30	1	0,2336	0,1300	0,0633	0,4533	0,6561	0,1229
1	30	2	0,1640	0,3654	0,1877	0,6992	0,7461	0,6061
2	30	1	0,1280	0,2355	0,1436	0,5451	0,6997	0,4904
2	30	2	0,0532	0,2042	0,1186	0,5668	0,2176	0,2579
3	30	1	0,2317	0,1382	0,0775	0,0274	0,0093	dood
3	30	2	alle wurms dood					
4	30	1	"	"	"			
4	30	2	"	"	"			
1	40	1	0,2057	0,1569	0,0385	0,5196	0,8021	0,3496
1	40	2	0,2109	0,1232	0,0666	0,5247	0,3025	0,3762
2	40	1	0,0705	0,1636	0,2094	0,5264	0,3182	0,0445*
2	40	2	0,2113	0,1744	0,1825	0,3882	0,6075	0,6727
3	40	1	0,0630	0,2291	0,0738	0,0418	dood	dood
3	40	2	alle wurms dood					
4	40	1	0,0717	0,1369	0,2381	0,0266	dood	dood
4	40	2	alle wurms dood					
1	50	1	0,1742	0,1086	0,1197	0,5265	0,4229	0,5069
1	50	2	0,1639	0,1476	0,2122	0,4655	0,5236	0,5694
2	50	1	0,0924	0,0943	0,0899	0,3573	0,3526	0,3526
2	50	2	0,1304	0,0731	0,1657	0,3062	0,4638	0,3768
3	50	1	0,1209	0,1035	0,0904	0,0434	dood	dood
3	50	2	alle wurms dood					
4	50	1	"	"	"			
4	50	2	"	"	"			
1	60	1	0,0779	0,1183	0,1056	0,4836	0,4436	0,3142
1	60	2	0,1968	0,2060	0,1506	0,3315	0,4548	0,5632
2	60	1	0,1193	0,2578	0,2109	0,5664	0,5388	0,5587
2	60	2	0,2912	0,2222	0,1176	0,5731	0,5271	0,4180
3	60	1	0,1192	0,1287	0,0750	0,2475	0,1397	0,1714
3	60	2	alle wurms dood					
4	60	1	"	"	"			
4	60	2	"	"	"			

TABEL 9.14 Data van ekperiment 4.1. Hierdie tabel gee die massa van elke kokon asook die aantal wurmpies wat uitgebroei het. Die massas van die kokonne word in gram gegee. ** Dui kokonne aan wat tydens hantering beskadig is. *** Dui kokonne aan wat leeg was met versameling.

Nr	Fles	Dag	Getal kokonne	Massas van kokonne					
2	1	20	2	0,0086	0,0060				
Getal nakomelinge				respektiewelik	0, 0				
1	1	30	2	0,0170	0,0114				
Getal nakomelinge				respektiewelik	0, 0				
2	1	30	2	0,0098	0,0094				
Getal nakomelinge				respektiewelik	0, 1				
1	1	40	1	0,0142					
Getal nakomelinge				respektiewelik	0				
1	2	40	3	0,0043	0,0103	0,0111			
Getal nakomelinge				respektiewelik	0, 3, 0				
2	1	40	12	0,0019	0,0127	0,0116	0,0067	0,0063	
				0,0056	0,0107	0,0105	0,0051	0,0115	
				0,0058	0,0076				
Getal nakomelinge				respektiewelik	1, 0, 1, 1, 2,	1, 2, 0,	0, 2, 0,	0, 1	
2	2	40	13	0,0098	0,0065	0,0140	0,0100	0,0130	
				0,0093	0,0098	0,0100	0,0098	0,0121	
				0,0072	0,0096	**			
Getal nakomelinge				respektiewelik	3, 1, 1, 0, 0,	2, 1, 0,	0, 0, 1, 1		
1	1	50	20	0,0090	0,0074	0,0101	0,0026	0,0089	
				0,0112	0,0102	0,0077	0,0082	0,0076	
				0,0082	0,0079	0,0074	0,0081	0,0081	
				0,0098	0,0066	0,0075	0,0079	0,0095	
Getal nakomelinge				respektiewelik	1, 0, 0, 0, 0,	1, 0, 0,	0, 0, 0, 0, 0,		
				0, 0, 1, 0, 1,	0, 0, 1				
1	2	50	29	0,0095	0,0104	0,0087	0,0107	0,0086	
				0,0096	0,0106	0,0083	0,0092	0,0080	
				0,0092	0,0088	0,0100	0,0101	0,0090	
				0,0100	0,0101	0,0098	0,0113	0,0101	
				0,0086	0,0104	0,0101	0,0093	0,0105	
				0,0090	0,0050	0,0097	**		
Getal nakomelinge				respektiewelik	0, 0, 1, 0, 0,	0, 1, 0,	0, 0, 0, 0, 0,		
				1, 0, 0, 0, 1,	0, 3, 0,	3, 2, 0, 0, 0,			
				0, 0					

TABEL 9.14 Vervolg

Nr	Fles	Dag	Getal	Massa van						
			kokonne	kokonne						
2	1	50	7	0,0087	0,0094	0,0084	0,0105	0,0094		
				0,0069	0,0089					
Getal nakomelinge respektiewelik										
				2, 3, 3, 2, 3,	0, 0					
2	2	50	16	0,0107	0,0068	0,0063	0,0066	0,0117		
				0,0100	0,0107	0,0077	0,0092	0,0082		
				0,0105	0,0119	0,0097	0,0089	0,0116		
				0,0099						
Getal nakomelinge respektiewelik										
				2, 0, 2, 2, 2,	3, 0, 2,	0, 0, 2,	0, 0,			
				3, 1, 2						
1	1	60	23	0,0102	0,0079	0,0064	0,0074	0,0058		
				0,0067	0,0105	0,0103	0,0058	0,0134		
				0,0073	0,0103	0,0131	0,0101	0,0061		
				0,0063	0,0065	0,0058	0,0068	0,0068		
				0,0103	0,0077	0,0096				
Getal nakomelinge respektiewelik										
				0, 0, 0, 2, 0,	0, 0, 1,	0, 0, 0,	0, 0,			
				0, 1, 1, 0, 0,	0, 3, 0,	0, 0				
1	2	60	21	0,0094	0,0086	0,0099	0,0071	0,0117		
				0,0081	0,0092	0,0094	0,0073	0,0106		
				0,0113	0,0105	0,0110	0,0059	0,0072		
				0,0087	0,0082	0,0089	0,0109	0,0093		
				0,0107						
Getal nakomelinge respektiewelik										
				0, 0, 2, 0, 0,	0, 0, 0,	0, 0, 0,	1, 0,			
				0, 0, 0, 0, 1,	0, 0, 0					
2	1	60	44	0,0079	0,0138	0,0113	0,0109	0,0099		
				0,0072	0,0067	0,0077	0,0128	0,0118		
				0,0109	0,0084	0,0094	0,0110	0,0069		
				0,0062	0,0072	0,0145	0,0138	0,0118		
				0,0109	0,0116	0,0077	0,0076	0,0102		
				0,0111	0,0078	0,0103	0,0098	0,0108		
				0,0091	0,0070	0,0091	0,0087	0,0126		
				0,0120	0,0107	0,0113	0,0100	0,0102		
				0,0093	0,0110	0,0080	0,0109			
Getal nakomelinge respektiewelik										
				3, 0, 0, 0, 2,	0, 0, 0,	0, 0, 0,	0, 0,			
				1, 0, 0, 0, 0,	0, 0, 1,	0, 2, 2,	0, 1,			
				0,1,2, 2, 1, 0,	2, 0, 0,	0, 0, 0,	0,			
				1, 0, 0, 2, 0						
2	2	60	28	0,0128	0,0129	0,0119	0,0094	leeg		
				0,0103	0,0118	0,0091	0,0100	0,0123		
				0,0094	0,0108	0,0128	0,0110	0,0099		
				0,0087	0,0114	0,0099	0,0092	0,0119		
				0,0145	0,0119	0,0121	0,0098	0,0098		
				0,0078	0,0078	0,0120				
Getal nakomelinge respektiewelik										
				0, 0, 3, 2, 0,	0, 2, 2,	1, 3, 1,	1, 0,			
				1, 2, 2, 2, 2,	2, 2, 2,	3, 1, 2,	1, 1,			
				1, 3						

TABEL 9.15 Gemiddelde pH en waterinhoud van die behandelings oor 'n periode van 60 dae.

Nr	Daag	Gemiddelde pH	S.A.	Gemiddelde waterinhoud	S.A.
1	0	7,50	0,00	0,4180	0,0000
	10	7,15	0,07	0,4104	0,0033
	20	7,40	0,00	0,4529	0,0092
	30	8,30	0,28	0,4471	0,0134
	40	8,35	0,07	0,4310	0,0134
	50	7,65	0,49	0,4454	0,0091
	60	7,85	0,07	0,4126	0,0343
2	0	7,20	0,00	0,3980	0,0000
	10	7,20	0,00	0,4092	0,0049
	20	7,45	0,07	0,4518	0,0110
	30	8,15	0,07	0,4448	0,0013
	40	8,35	0,07	0,4489	0,0049
	50	7,60	0,00	0,4389	0,0100
	60	7,75	0,35	0,4317	0,0252
3	0	7,30	0,00	0,4150	0,0000
	10	7,45	0,07	0,4041	0,0040
	20	7,40	0,14	0,4589	0,4525
	30	8,05	0,21	0,4525	0,0045
	40	8,45	0,21	0,4369	0,0058
	50	8,10	0,00	0,4373	0,0194
	60	7,85	0,07	0,4340	0,0040
4	0	7,70	0,00	0,3590	0,0000
	10	7,40	0,14	0,3987	0,0000
	20	7,30	0,00	0,4432	0,0032
	30	7,90	0,00	0,4534	0,0000
	40	8,00	0,00	0,4569	0,0000
	50	7,35	0,07	0,4545	0,0131
	60	7,85	0,35	0,4475	0,0099

TABEL 9.16 Data van eksperiment 4.1. Resultate van die bepaling van verskillende ioone en fosfor soos bepaal deur die Landbounavorsingsinstituut te Potchefstroom. Alle waardes word in mg kg gegee.

Nr	Dag	K	Ca	Mg	Na	P
1	1	234	578	1675	644	195
	10	133	546	1739	644	140
	20	148	596	1725	368	138
	30	132	736	1682	368	174
	40	101	572	1650	368	174
	50	179	594	1717	368	188
	60	167	682	1570	368	165
2	10	160	580	1728	736	154
	20	140	590	1481	311	96
	30	140	578	1033	552	162
	40	140	524	1619	369	159
	50	179	552	1672	368	220
	60	156	570	1634	368	153
3	10	164	532	1539	644	148
	20	152	614	1604	345	81
	30	195	534	995	552	159
	40	183	560	1590	460	176
	50	156	550	1655	368	172
	60	160	594	1641	368	147
4	10	148	618	1716	644	154
	20	164	602	1590	380	75
	30	183	540	1619	552	159
	40	214	630	1750	368	165
	50	280	598	1658	368	212
	60	168	604	1675	368	141
Kontrole						
	1	164	650	1696	368	147
	2	168	650	1694	460	156
	3	168	644	1694	368	162
	4	172	670	1740	460	165
S.A.		3,3	11,4	22,7	53,0	8,0