

# **DIE OPNAME, VERSPREIDING EN INVLOED VAN KOPER BY *XENOPUS LAEVIS* (DAUDIN).**

**Sonja Vorster (B.Sc Hons)**

Verhandeling voorgelê as gedeeltelike nakoming van die vereiste vir die graad *Magister Scientiae* in Dierkunde aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys.

Studieleier: Dr. C.T. Wolmarans  
Hulpleier: Prof. K.N. de Kock

**Potchefstroom**

**1997**

*Opgedra aan Oupa en Ouma Goërke*

# INHOUDSOPGAWE

---

ABSTRACT .....	iv
----------------	----

## HOOFSTUK 1

ALGEMENE INLEIDING .....	1
--------------------------	---

## HOOFSTUK 2

ALGEMENE MATERIAAL & METODEDES .....	3
2.1 Herkoms, aanhouding en versorging van proefdiere .....	3
2.1.1 Voorbereiding van proefdiere vir eksperimente .....	3
2.1.2 Opmaak van koperblootstellingsmediums en ander blootstellingsparameters .....	4
2.2 Nablootstellingbehandeling van proefdiere .....	4
2.2.1 Doodmaak en disseksie van proefdiere .....	4
2.3 Versameling van bloed- en weefselmonsters .....	6
2.3.1 Bloedmonsters .....	6
2.3.2 Weefselmonsters .....	7
2.4 Vertering van bloed- en weefselmonsters .....	8
2.5 Versameling en analisering van watermonsters .....	8
2.6 Atoomabsorpsiespektrofotometrie .....	9
2.6.1 Voorbereiding van koperstandaarde en kalibrering van die atoomabsorpsiespektrofotometer (AAS) .....	9
2.7 Wasprosedure van apparaat .....	10
2.8 Voorbereiding van weefsel vir ligmikroskopie .....	10
2.9 Voorbereiding van weefsel vir histochemiese tegnieke .....	11
2.10 Voorbereiding van huidweefsel vir skandeerelektronmikroskopie (SEM) .....	12

## HOOFSTUK 3

EKSPERIMENTE .....	13
3.1 Die bepaling van kopersensitiwiteit by <i>Xenopus laevis</i> tydens 'n blootstellingsperiode van 96 uur. ....	13
3.1.1 Inleiding .....	13
3.1.2 Materiaal & Metodes .....	13
3.1.3 Resultate & Bespreking .....	14

3.2	Die bepaling van die letale koperkonsentrasie (LD <sub>50</sub> -waarde) tydens 'n 96 uur blootstellingsperiode	17
3.2.1	Inleiding	17
3.2.2	Materiaal & Metodes	17
3.2.3	Resultate & Bespreking	18
3.3	'n Ondersoek na die verband tussen die opgemaakte en gemete koperkonsentrasie gedurende 'n 96 uur periode	21
3.3.1	Inleiding	21
3.3.2	Materiaal & Metodes	21
3.3.3	Resultate & Bespreking	22
3.4	'n Ondersoek na die opname, verspreiding en ekskresie van koper in geselekteerde weefsels van <i>Xenopus laevis</i> oor 'n periode van 96 uur	24
3.4.1	Inleiding	24
3.4.2	Materiaal & Metodes	25
3.4.2.1	Akkumulatie-eksperiment	25
3.4.2.2	Ekskresie-eksperiment	26
3.4.3	Resultate & Bespreking	27
3.4.3.1	Heelbloed	27
3.4.3.2	Huidweefsel	31
3.4.3.3	Spysverteringskanaal	35
3.4.3.4	Longweefsel	39
3.4.3.5	Nierweefsel	42
3.4.3.6	Lewerweefsel	46
3.5	'n Ligmikroskopiese ondersoek na histologiese skade van geselekteerde weefsels van <i>Xenopus laevis</i> wat vir 24 uur aan 'n koperkonsentrasie van 62.5 µg ml <sup>-1</sup> blootgestel is	51
3.5.1	Inleiding	51
3.5.2	Materiaal & Metodes	51
3.5.3	Resultate & Bespreking	52
3.5.3.1	Huid	52
3.5.3.2	Spysverteringskanaal	54
3.5.3.2.1	Esofagus	54
3.5.3.2.2	Maag	54
3.5.3.2.3	Intestinum	55
3.5.3.3	Lewer	56
3.5.3.4	Nier	56
3.5.3.5	Long	57

3.6	'n Histologiese ondersoek na die <i>in situ</i> lokalisering van koper in die huid van <i>Xenopus laevis</i> wat vir 96 uur aan 'n koperkonsentrasie van $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is .....	66
3.6.1	Inleiding .....	66
3.6.2	Materiaal & Metodes .....	66
3.6.3	Resultate & Bespreking .....	67
3.7	'n Skandeerelektronmikroskopiese ondersoek na die histologiese skade van die huidoppervlak van <i>Xenopus laevis</i> wat vir 96 uur aan 'n koperkonsentrasie van $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is .....	69
3.7.1	Inleiding .....	69
3.7.2	Materiaal & Metodes .....	69
3.7.3	Resultate & Bespreking .....	70
HOOFSTUK 4		
	SAMEVATTING .....	74
	BEDANKINGS .....	77
	LYS VAN TABELLE EN FIGURE .....	78
	LITERATUURVERWYSINGS .....	82

# ABSTRACT

---

- (1) Adult female *Xenopus laevis* were subjected to copper concentrations ranging from 25 to 1 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for a period of 96 hours to ascertain their sensitivity towards the heavy metal. A more confined range was selected after this (25, 62.5, 125, 187.5 and 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) and the dose of 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  was established as the 96 hours  $\text{LD}_{50}$  value.
- (2) Due to the influence of adsorption of copper on the aquarium walls and its precipitation due to pH-levels of the exposure media, the copper concentration decreased from 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  to  $14.2 \pm 2.55 \mu\text{g ml}^{-1}$  in aquaria without specimens after 96 hours. When animals were placed in exposure media, the copper concentration decreased from 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  to a lower value of  $11.8 \pm 0.45 \mu\text{g ml}^{-1}$  after 96 hours, illustrating the degree to which exposed animals accumulated the heavy metal.
- (3) To determine the accumulation of copper in *Xenopus*, groups of 80 animals were exposed to either clean water or 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  copper for 96 hours. Every 24 hours, 10 animals from both a control and an exposure medium were removed and the following tissues were sampled: blood, skin, alimentary canal (from oesophagus up to rectum), lungs, kidneys and liver. The copper concentration in each tissue was measured by atomic absorption spectrophotometry after nitric acid digestion.
- (4) Results indicate that the mean copper concentration was significantly highest in the alimentary canal and that the following tissues contained copper in order of decreasing concentrations: liver > skin > kidneys > lungs > blood.
- (5) To determine whether the accumulated copper can be successfully excreted, animals were exposed to an initial copper concentration of 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  for 96 hours. Thereafter 80 animals were removed and transferred to copper-free water for 96 hours. Every 24 hours 10 animals from both a control and an exposure medium were removed and the same tissues as above were sampled for copper.
- (6) Results indicate that liberation of copper occurred solely from the skin during the 96 hour excretion period. Copper concentrations varied considerably in the other tissues, but exhibited high levels of primarily adsorbed copper which were not released during the 96 hour excretion experiment.
- (7) Copper-induced histological damage to the various tissues and histochemical localisation of copper were studied in both exposed and control specimens. Results indicate that the skin of exposed animals was damaged to a great extent. Scanning electron microscopy revealed the extent to which copper afflicted the epidermis of exposed animals.

# HOOFSTUK 1

## ALGEMENE INLEIDING

---

Paracelsus het bykans 400 jaar gelede die volgende stelling gemaak: "*All substances are poisons; there is none which is not a poison. The right dose differentiates a poison and a remedy.*" (Piscator 1979). Volgens Hattingh, Kempster, Sartory & Toerien (1984) beteken besoedeling kortliks "... enige entiteit wat, wanneer dit in 'n terrestriële of akwatiese ekosisteem op antropogeniese wyse ingevoer word, die potensiaal besit om die sisteem só te verander dat die biota daarvan ernstige skade opdoen en dat die sisteem nie meer gunstig is vir die bevordering en handhawing van lewe nie...". Indien hierdie entiteite in oormaat aan die omgewing afgegee word, tree dit as besoedelingstowwe op en kan dit die fisiese, biologiese en chemiese eienskappe van 'n sisteem versteur (Doull & Bruce 1986).

Hoewel metale natuurlik in varswaterhabitats teenwoordig is, neem metaalbesoedeling van water toe weens onder andere 'n toename in mynbou, industriële en landbou-aktiwiteite. Die belangrikste metale betrokke by die besoedeling van water is sink, koper, lood, kadmium en kwik (Hellowell 1989). Alhoewel swaarmetale, soos koper (Cu), noodsaaklike spoorelemente vir die instandhouding van lewe uitmaak, is dit toksies in hoë konsentrasies (Sunda & Guillard 1976; Friberg, Nordberg & Vouk 1979). Hoë blootstellingskonsentrasies aan sulke verbindings kan histologiese skade of 'n verlaging in die oorlewing, groei en voortplanting van 'n spesie teweegbring (Van Vuren, Du Preez & Deacon 1994).

Metaaltoksisiteit word deur verskeie faktore, soos temperatuur (Hoffman & Zachary 1951), pH en waterhardheid (Meyling, Meyling & Pitchford 1966), bepaal. Dit bepaal die chemiese spesiëring van die metaal en dus ook die bio-beskikbaarheid van die metaal aan akwatiese organismes. Koper kan onder andere as 'n vry neutrale atoom, as  $\text{Cu}^+$  (onstabiel in vloeistowwe) en as  $\text{Cu}^{2+}$  (stabiel in vloeistowwe) voorkom. Die bio-beskikbaarheid en toksisiteit van koper kan waarskynlik aan die vry  $\text{Cu}^{2+}$ -ioon toegeskryf word (Frieden 1968; Friberg *et al.* 1979). Hierdie effekte is by organismes soos bakterieë, alge, slakke, krappe en visse waargeneem (Rai, Guar & Kumar 1981; Babich & Stotzky 1983).

Volgens die Suid-Afrikaanse Rooidatyls vir Reptiele en Amfibieërs (Branch 1988) geniet die klaarblyklige afname in amfibieërgetalle, weens habitatsversteurings deur besoedeling, tans wêreldwye aandag. Amfibieërs is belangrik en bruikbaar weens hul vermoë om klaarblyklik onsigbare, nadelige effekte van besoedeling waarneembaar te maak voordat die res van die omgewing enige reaksie begin toon (Channing & Van Dijk 1995). Weens hul akwatiese lewenswyses is visse (Campbell & Stokes 1985) en veral amfibieërs, wat 'n sagte, deurlatende huid het (Khangarot & Ray 1987), sensitief vir steurstowwe soos swaarmetale, byvoorbeeld koper.

Amfibieërs, en veral die akwatiese platannas, verteenwoordig 'n ekologiese belangrike groep en beset 'n posisie in die voedselketting wat na òf die mens òf ander belangrike spesies (soos voëls) lei. Daarbenewens is platannas relatief maklik bekombaar en word hierdie organismes moeitvry onder laboratoriumtoestande aangehou (Buikema, Niederlehner & Cairns 1982).

Hoewel daar genoegsame data ten opsigte van die taksonomie, fisiologie en genetica van hierdie spesie beskikbaar is, is inligting met betrekking tot die effekte wat swaarmetale op amfibieërs het, skaars. Weens hierdie gebrek aan inligting was dit in hierdie studie belangrik om die akkumulاسie en invloed wat koper op *Xenopus laevis* (Daudin) het, te ondersoek (Buikema, Niederlehner & Cairns 1982; Cairns 1982).

Die eksperimente wat in hierdie studie aandag geniet het, was die volgende: (1) die vasstelling van 'n letale blootstellingskonsentrasie by 'n pH van ongeveer 8 oor 'n 96 uur periode ( $LD_{50}$ -waarde) asook die evaluاسie van die werklike blootstellingskonsentrasie by hierdie vasgestelde waarde, (2) die amfibieër se vermoë om koper op te neem en in bepaalde weefsels en bloed te akkumuleer en vervolgens daaruit vry te stel, (3) die moontlike histopatologiese effek van koper op weefsels en (4) die *in situ* lokalisering van koper in die weefsels deur middel van histochemiese tegnieke.

# HOOFSTUK 2

## ALGEMENE MATERIAAL & METODEDES

---

### 2.1 Herkoms, aanhouding en versorging van proefdiere

Volwasse *Xenopus laevis* wyfies, met 'n ouderdom van ongeveer 3 jaar en 'n gemiddelde massa van 60g, is vanaf die *African Xenopus Facility* te Noordhoek aangekoop.

Vierhonderd organismes is in onderdak geplaasde 3000ℓ PVC-damme, gevul met 750ℓ skoon kraanwater, oorgeplaas. Die temperatuur van die water in hierdie aanhoudingsdamme het met dié van die omgewing ooreengestem terwyl normale dag-nag beligtingsiklusse gehandhaaf is. 'n Konstante deurvloei van kraanwater, teen 'n koers van 50 ℓh<sup>-1</sup> het verseker dat alle onverteerde reste voortdurend uit die aanhoudingsdamme weggevoer is. Die totale waterinhoud van die damme is dus elke 60 uur vervang.

Epol-katkosblokkies en vars, gekerfde erdwurms (wanneer beskikbaar) is elke tweede dag aan die proefdiere verskaf.

Die paddas is vir ongeveer vier weke geakklimmeer voordat hulle in eksperimente aangewend is (Alikhan & Zia 1989; Van Vuren *et al.* 1994). Tydens hierdie periode is beseerde paddas geïdentifiseer en verwyder.

#### 2.1.1 Voorbereiding van proefdiere vir eksperimente

Ses-en-negentig uur voor aanvang van die eksperimente is ewekansig gekose platannas uit die aanhoudingsdamme verwyder en na skoon glasakwariums, gevul met 20ℓ skoon gedechlorineerde, verouderde kraanwater, oorgedra waarin akklimering plaasgevind het. 'n Glasdeksel is bo oor elke glasakwarium geplaas om te verhoed dat die platannas "ontsnap" en uitdroog.

Tydens hierdie periode is geen voedsel aan die proefdiere verskaf nie en is onverteerde reste op 'n gereelde basis met 'n waterstraalsuigpomp verwyder wat daartoe bygedra het dat septiese toestande in die akklimeringsmediums tot 'n minimum beperk is en dat die onverteerde voedselreste verwyder kon word. Dieselfde water is ook as oplossingsmedium vir die blootstellings- en kontrole eksperimente aangewend.

Hierdie periode waartydens die proefdiere by 'n konstante temperatuur van  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH van ongeveer 8, 'n

konduktiwiteit van ongeveer  $700 \mu\text{S cm}^{-1}$  en 'n normale dag-nag beligtingsiklus aangehou is, het as akklimeringsperiode voor die aanvang van eksperimente gedien. Lug is voortdurend deur hierdie akklimeringsmediums geborrel.

Bogenoemde toestande is deurgaans vir alle akklimeringsperiodes gehandhaaf.

### **2.1.2 Opmaak van die koperblootstellingsmedium en ander blootstellingsparameters**

Kommersieël beskikbare kopersulfaat,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (96% suiwer), is gebruik om die koperoplossings mee op te maak ( $1 \mu\text{g ml}^{-1} \text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  bevat  $0.0039 \text{ g l}^{-1} \text{Cu}$ ).

Elkeen van die afsonderlike koperkonsentrasies is soos volg opgemaak: die gepaste hoeveelheid kopersulfaatkristalle is met behulp van 'n gekalibreerde balans afgeweeg en in 250 ml glasbekers, gevul met verouderde, gedechlorineerde kopervrye water wat vanuit die akklimeringsmediums geneem is (pH van ongeveer 8 en temperatuur van  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ), opgelos deur van 'n magnetiese roerder gebruik te maak. Die inhoud van elk van hierdie bekers is hierna na die afsonderlike akwariums, waarin die organismes geaklimeer is, oorgedra.

Die presipitering van koperverbindings en die voorkoming van anoksiese toestande in die blootstellings- en kontrole mediums is verhoed deur voortdurend druklug deur die mediums te borrel. Beide die koperakkumulاسie en vrystellingsperiodes het 96 uur geduur. Eksperimente is deurlopend met 10 diere per akwarium uitgevoer. Geen kontrole diere het tydens enige van die eksperimente doodgegaan nie.

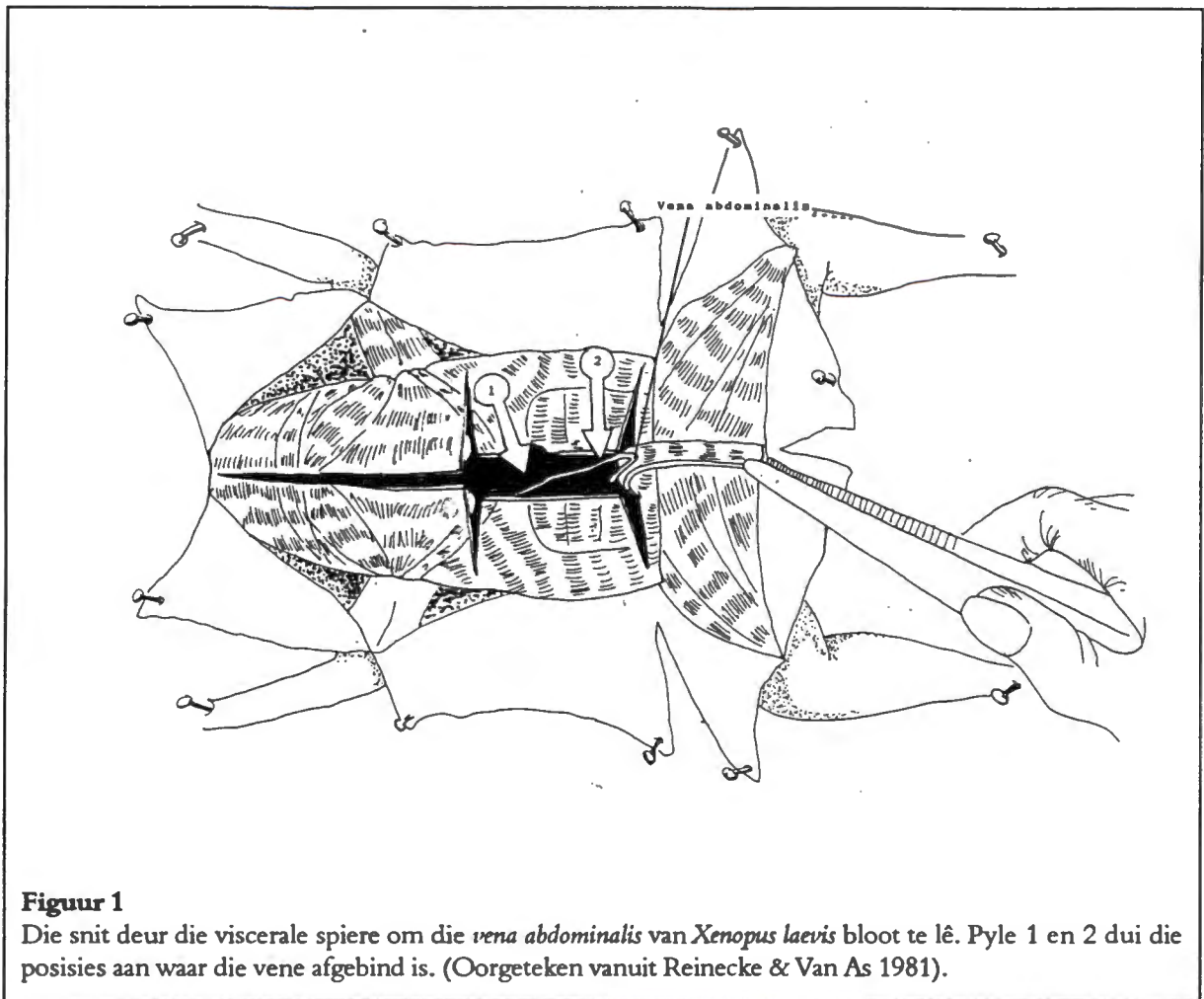
'n Temperatuur van  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en 'n pH van ongeveer 8 is deurgaans in die blootstellings- en kontrole mediums gehandhaaf gedurende die eksperimente en druklug is konstant deur die mediums geborrel om die presipitering van koper tot 'n minimum te beperk.

## **2.2 Nablootstellingsbehandeling van proefdiere**

### **2.2.1 Doodmaak en disseksie van proefdiere**

Alle proefdiere is deur middel van dekapitasie gedood. 'n Skerp vlekvrystaalskêr, wat na elke dekapitasie met 10%  $\text{HNO}_3$  en daarna met gedistilleerde water, afgespoel is, is hiervoor aangewend. Dit het kruiskontaminاسie van kopersulfaat tussen organismes verhoed. Disseksies is volgens Reinecke & Van As (1981) uitgevoer: die padder is, met die ventrale kant na bo, in 'n disseksiebak geplaas en die ledemate met spelde vasgesteek. Hierdie disseksie

is nie onder water uitgevoer soos deur die outeurs aanbeveel word nie. Dit het verseker dat die verliese van koper vanuit die weefsel en vanaf die huidoppervlak tot 'n minimum beperk is. 'n Oorlangse snit is deur die vel gemaak en by die ledemate tot en met die eerste lit verleng. Hierna is die los huidweefsel aan die wasoppervlak van die disseksiebak vasgespeld. Twee sneë deur die buikspiere is aan weerskante van die *vena abdominalis* gemaak en verleng tot by die kraakbenige gedeelte van die pektoraalgordel. Die strook spierweefsel waarin die *vena abdominalis* voorkom, is op twee plekke, ongeveer 1 cm uitmekaar, met behulp van garingdraad afgebind en daarna deurgesny (Figuur 1).



**Figuur 1**

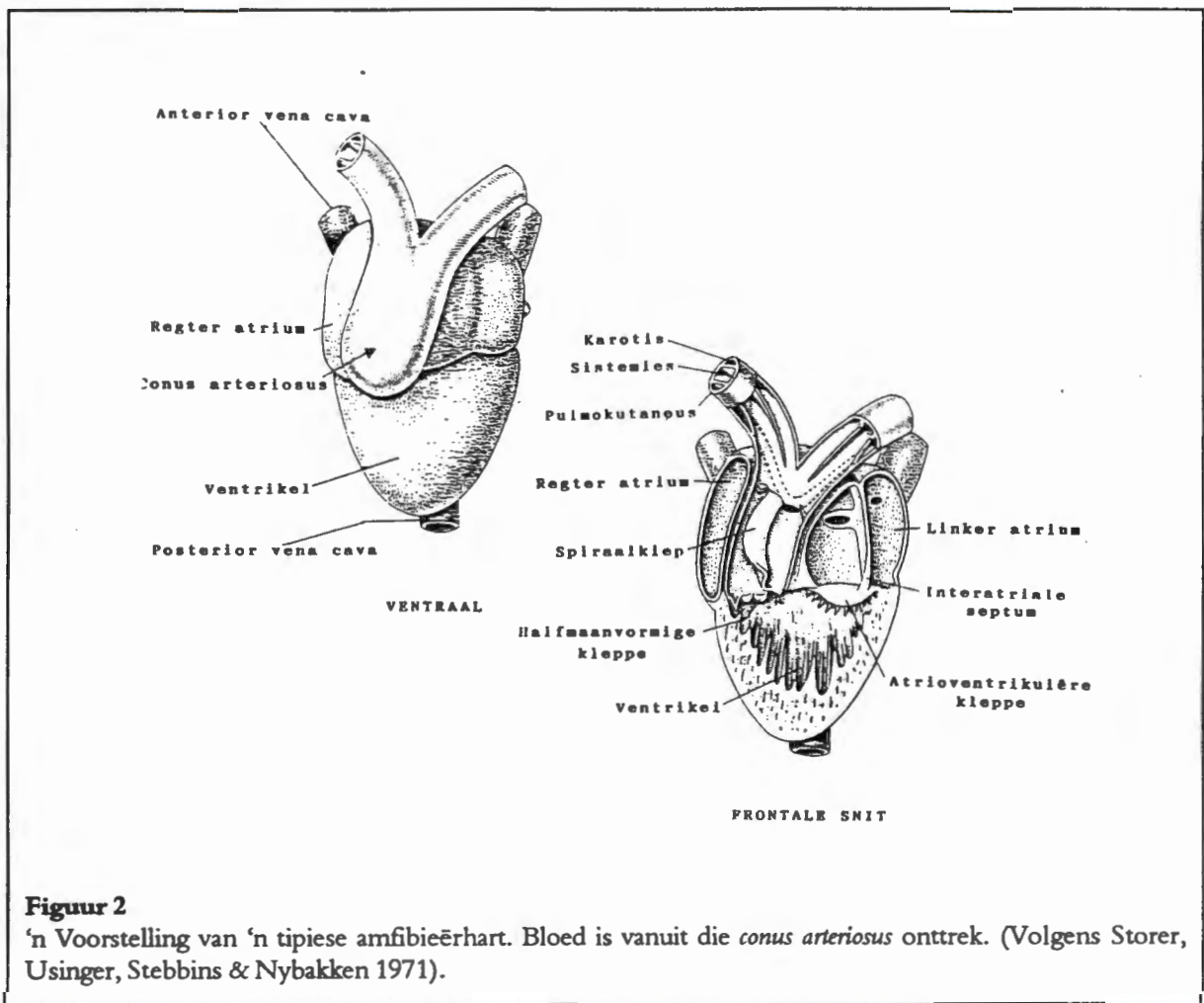
Die snit deur die viscerale spiere om die *vena abdominalis* van *Xenopus laevis* bloot te lê. Pyle 1 en 2 dui die posisies aan waar die vene afgebind is. (Oorgeteken vanuit Reinecke & Van As 1981).

Dit het bloedverlies, en ook kruiskontaminasie tussen organe, tot die minimum beperk. Vervolgens is die abdominaalholte blootgelê deur die visceraalspiere oop te dissekteer (Reinecke & Van As 1981). Na hierdie prosedure was die interne organe duidelik sigbaar en kon weefsels vervolgens verwyder word.

## 2.3 Versameling van bloed- en weefselmonsters

### 2.3.1 Bloedmonsters

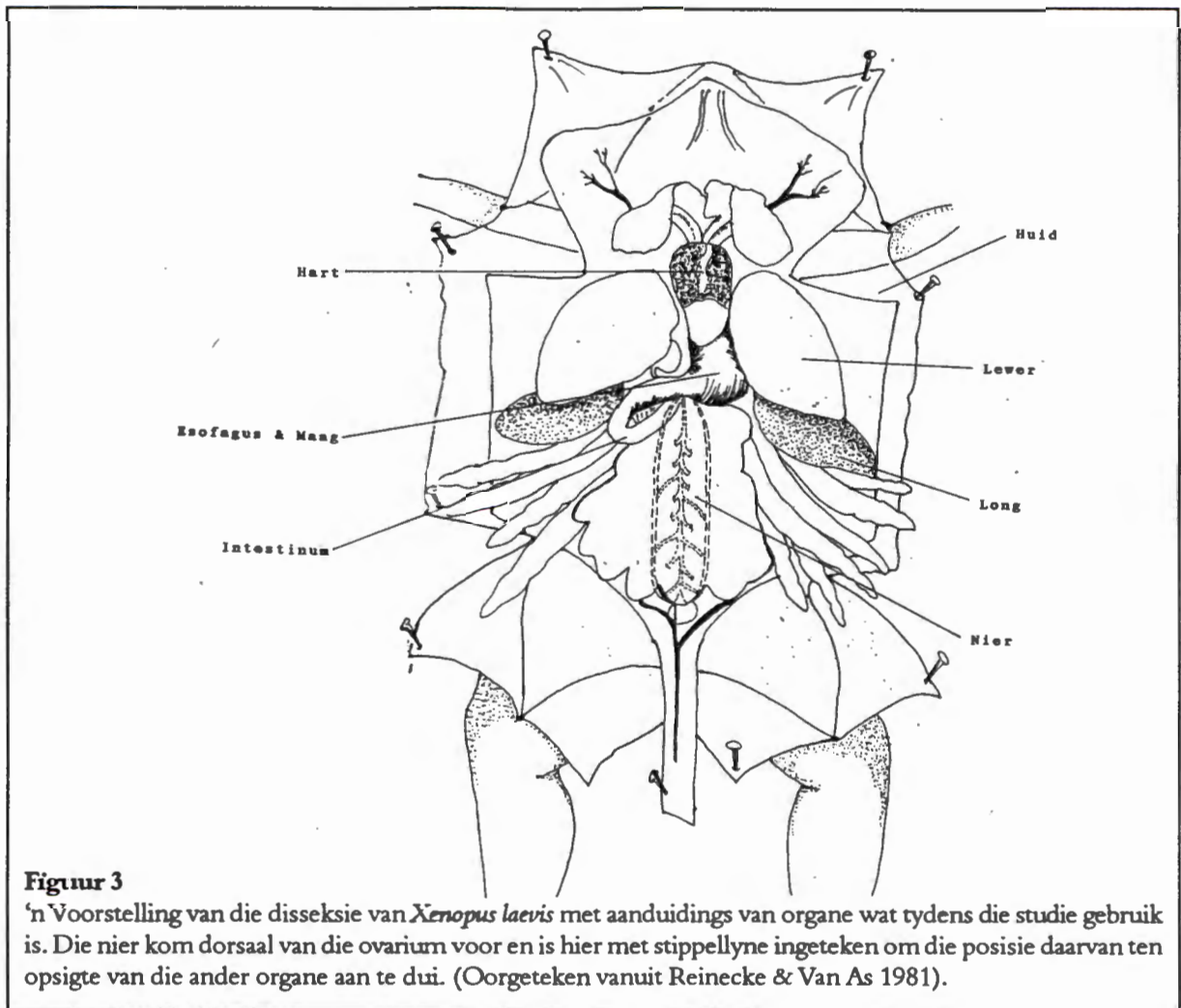
Nadat die hart blootgelê is, is 'n steriele 1ml, wegdoenbare plastiekspuit met 'n spuitnaald met 'n dikte van 0.5 x 16mm aangewend om bloed te onttrek (Smith, Lewis & Kaplan 1952). Die hartventrikel is met 'n pinset vasgehou en die naald is versigtig in die *truncus arteriosus* (Figuur 2), wat oorgaan in die linker karotis-, sistemiese- en pulmokutaneuse boë, gedruk. 'n Volume van 0.5ml bloed is hieruit onttrek en na skoon 20ml kwartsglasbotteltjies oorgedra en vir latere analises by -20°C ingevries. Om kruiskontaminasie van bloed tussen



verskillende organismes te verhoed, is elke spuitnaald slegs eenmalig aangewend.

### 2.3.2 Weefselmonsters

Deur gebruik te maak van 'n skoon, skerp dissekteerskêrtjie en -pinset, wat telkens in 10% HNO<sub>3</sub> gewas en daarna met gedistilleerde water afgespoel is, is ongeveer 30mm x 30mm huid aan beide die dorsale en ventrale kant van die padda verwyder. Hierdie huidsnitte is vir elke padda vir die verdere verwerkings gepeel (Knezovich, Lawton & Inouye 1989). Hierna is die spysverteringskanaal, dit wil sê die gedeelte wat die esofagus, maag en intestinum tot voor die rektum insluit, as 'n geheel verwyder. Beide die longe en niere is verwyder. Om die dorsaal geleë niere te kon verwyder, is die ovariums wat deur vliesagtige mesovariums aan die nier verbind is, asook die peritoneummembraan wat die nier aan die seloondak vasheg, losgesny.



Om kruiskontaminasie van bloed tussen organe te verhoed, is die relatief bloedlose organe, soos die huid, spysverteringskanaal en longe eerste, en die nier en bloedryke lever (sonder die galblaas) laaste uitgedissekteer. Figuur 3 toon die ligging en posisie van die organe wat na afloop van eksperimente verwyder is.

Die uitgedissekteerde weefselfragmente is elk op 'n stukkie handdoekpapier geplaas sodat oortollige weefselvloeistof kon dreineer. Elke fragment se natmassa is met behulp van 'n gekalibreerde balans bepaal en daarna is dit in duidelik gemerkte 20 ml kwartsglasbotteltjies gevries en gelaat vir verdere verwerking.

## **2.4 Vertering van bloed- en weefselmonsters**

Alle bloedmonsters is na ontvriessing met 0.5 ml 55% chemies-suiwer  $\text{HNO}_3$  in kwartsglasbotteltjies verteer. Die suur is met behulp van 'n 1 ml gekalibreerde Eppendorf-pipet by die weefselfragmente in die kwartsglasbotteltjies gevoeg. Hierna is die verteringsbotteltjies met digsluitende poliëtileenproppe bedek en vir 24 uur in 'n waterbad by 'n temperatuur van  $50^\circ\text{C}$  gelaat.

Weefselmonsters is op 'n soortgelyke wyse verteer, behalwe dat daar 2ml  $\text{HNO}_3$  by die afsonderlike weefsels in die kwartsglasbotteltjies gevoeg is.

Na afloop van vertering is die, nou helder verteringsproduk, vanuit die verteringsbotteltjie onttrek en na 5 ml poliëtileenhousers ("Snap-caps") oorgedra. Hierna is dit met gedistilleerde water verdun sodat die viskositeit van die verteerde weefsels met dié van die standaard, wat tydens atoomabsorpsiespektrofotometrie aangewend is, ooreengestem het en die resultate wat hier verkry is, binne die kalibrasiereeks van die apparaat weergegee kon word. Verder het hierdie verdunnings ook daartoe bygedra dat die korroderende effekte wat 'n sterk suur, soos  $\text{HNO}_3$ , op die stuifspoeier van die atoomabsorpsiespektrofotometer het, tot 'n minimum beperk kon word.

## **2.5 Versameling en analisering van watermonsters**

Watermonsters is gedurende al die eksperimente versamel om die spesifieke koperkonsentrasie wat in die onderskeie mediums teenwoordig is, te bepaal.

Vyf 5 ml watermonsters is met behulp van 5 ml poliëtileenhousers ("Snap caps") uit elk van die betrokke blootstellings- en kontrole akwariums geneem. Hierdie prosedure het voor en direk na die byvoeging van koper aan die blootstellingsmediums en daarna daaglik vir die duur van elk van die eksperimente, plaasgevind. Soortgelyke monsternemings is ook vir die kontrole mediums uitgevoer. Hierna is dit gemerk en by  $-20^\circ\text{C}$  ingevries vir latere verwerking.

Na ontvriessing is alle watermonsters goed geskud en spektrofotometriese analises is hierna uitgevoer om sodoende die koperkonsentrasie in elk van die mediums vir die betrokke tydsinterval, sowel as die bepaalde eksperiment, te bepaal. Die vasgestelde koperkonsentrasies van al vyf die monsters wat per tydseenheid per

akwarium versamel was, is gepoel om die gemiddeld, uitgedruk as  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , vas te stel.

## 2.6 Atoomabsorpsiespektrofotometrie

### 2.6.1 Voorbereiding van koperstandaarde en kalibrering van die atoomabsorpsiespektrofotometer (AAS)

Koperanalises is met behulp van 'n *Varian Spectra AA 250 Plus*, volgens voorgeskrewe riglyne en gestandaardiseerde tegnieke, uitgevoer.

'n Kalibrasiereeks van verskillende koperkonsentrasies is opgemaak deur deelvolumes van  $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper as kopersulfaat, van 'n Tritisol-oplossing, te neem en dit in gepaste volumes kopervrye gedistilleerde water in kwartsglasvolumetriese flesse te verdun. Hierdie konsentrasiereeks wat vir die kalibrering van die vlamgedeelte van die apparaat voorberei is, het onderskeidelik uit twee oplossingsreekse van  $25, 50$  en  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  en  $2, 4, 6$  en  $8 \mu\text{g ml}^{-1}$  bestaan. Eersgenoemde kalibrasiereeks is tydens die bepaling van die werklike koperblootstellingskonsentrasie, na die vaststelling van die  $LD_{50}$ -waarde, sowel as vir die bepaling van die koperkonsentrasie in die blootstellings en kontrole mediums, aangewend. Laasgenoemde reeks is tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente aangewend. Elke reeks is met  $\text{HNO}_3$  aangesuur om 'n 10% suurkonsentrasie te verkry wat daartoe bygedra het dat die standaard se rakleef tyd aansienlik verleng is. Dit het verseker dat konstante kalibrasiekrommes oor 'n relatief lang periode verkry kon word. Hierdie standaardreeks is aangewend om die AAS te optimaliseer terwyl die kalibrasiekrommes wat verkry is, gebruik is om die verteerde weefsel se absorpsiewaardes na konsentrasie-eenhede ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) te herlei.

Vir die bepaling van koper is die volgende parameters tydens kalibrering van die apparaat ingestel: golflengte  $324.7 \text{ nm}$  en 'n vlamspleetwydte van  $0.5 \text{ nm}$ . 'n Mengsel van asetyleengas en lug is tydens die bepaling van koper gebruik (Kinson & Belcher 1961). Die apparaat is op 'n  $3.5 \text{ mA}$  stroomsterkte ingestel.

Om te verseker dat die apparaat korrekte lesings weergegee het, is dit telkens na elke twintig analises met behulp van die opgemaakte kalibrasiereeks geoptimaliseer.

Die gedistilleerde water wat tydens die AAS-bepalings gebruik is, was vanuit 'n Barnstedt-distilleertoestel afkomstig. Alle dele van die apparaat wat met gedistilleerde water in aanraking kom, is met tin bedek om die moontlikheid van metaalkontaminasie van die water te voorkom. Hierdie apparaat is ook van 'n hoë suiwerheidskamer voorsien wat ontwerp is om die vlugtige onsuiverhede van die distillaat te verwyder. AAS-bepalings van die gedistilleerde water het aangedui dat die water volkome kopervry is.

## 2.7 Wasprosedures van apparaat

Om te bevestig dat die eksperimentele akwariums voor gebruik kopervry is, is dit eerstens met 'n 10%  $\text{HNO}_3$ -seepmengsel gewas en daarna deeglik met gedistilleerde water uitgespoel. Die gebruik van die  $\text{HNO}_3$  het verseker dat alle koper vanuit die akwariums verwyder is.

Die kwartsglasbotteltjies is met 'n soortgelyke mengsel en 'n nylonproefbuisborsel gewas om alle kontaminasie wat tydens vorige verterings voorgekom het, te verwyder. Hierna is dit saam met die poliëteleenhouers, waarin die verteerde weefsels verdun is, en alle ander apparaat, soos pipetpunte en poliëteleenproppe, in 'n 10%  $\text{HNO}_3$ -oplossing gewas. Alle apparaat is hierna deeglik met kraanwater en daarna met gedistilleerde water uitgespoel en oornag in 'n droogoond by ongeveer  $30^\circ\text{C}$  gelaat.

Om die effektiwiteit van hierdie wasprosedure te bepaal, is onderskeidelik 10 kwartsglasbotteltjies en 10 poliëteleenverdunningshouers met kopervrye gedistilleerde water gevul, geskud en is die water vir die teenwoordigheid van koper spektrofotometries ge-analiseer. Resultate het aangedui dat die water steeds kopervry is.

## 2.8 Voorbereiding van weefsel vir lignmikroskopie

Die doel van hierdie lignmikroskopiese ondersoek is om moontlike histopatologiese skade, wat tydens die eerste 24 uur van blootstelling aan koper kon intree, na te gaan.

Na blootstelling aan koper is die proef- en kontrole diere gedood en is weefsels, soos reeds bespreek, uitgedissekteer en met 'n skoon, skerp lemmetjie in kleiner fragmente van ongeveer  $2\text{mm} \times 2\text{mm}$  gesny. Hierdie fragmente is vir 'n minimum van ses ure in Todd se fikseermiddel (Todd 1986) gefikseer en vir lignmikroskopie voorberei. Fiksering is in 'n roteer-apparaat by kamertemperatuur uitgevoer. Hierna is dit drie keer vir 10 minute elk in 0.05M natriumkrokodilaatbuffer afgespoel (Todd 1986). Na-fiksering van een uur in 1% osmiumtetroksied (opgemaak in gedistilleerde water) is hierna uitgevoer (Bullock 1984) en dit is opgevolg deur die weefselfragmente drie maal vir 10 minute elk in gedistilleerde water af te spoel. Hierna is die weefselfragmente vir 15 minute elk in 'n asetonreeks (droogmiddel) van 50%, 70%, 90%, en twee maal in 100% gedehidreer. Die aseton is hierna met 'n 2:1 aseton : Spurr se harsmengsel (Spurr 1969) vervang en die weefselfragmente is hierin gelaat totdat dit ten volle met hierdie oplossing geïmpregneer is. Die weefselfragmente is vervolgens na 'n 1:1 aseton : harsmengsel oorgedra en oornag gelaat sodat dit ten volle met hierdie mengsel geïmpregneer kon word. Hierna is die weefselsfragmente na vars opgemaakte 100% hars oorgedra en vir 30 minute gelaat sodat dit ten volle met hars geïmpregneer kon word. Bogenoemde stap is twee maal herhaal en na afloop hiervan is die materiaal in vars 100% hars in gietvorms ingebed, gemerk en oornag by  $70^\circ\text{C}$  gelaat om te polimeriseer.

Weefselsnitte met 'n dikte van silwer tot goud (90 - 150 nm) is vervolgens met 'n ultramikrotoom gesny. Die snitte is op 'n voorwerpglasie in 'n druppel gedistilleerde water geplaas en op 'n warmplaat, by 40°C, gedroog. Hierna is dit vir 'n paar sekondes met 0.5% toluëdienblou gekleur en met gedistilleerde water afgespoel. Die spoelwater op die weefselsnitte is met behulp van 'n warmplaat weggedroog en was dit nou gereed vir ligmikroskopiese ondersoek.

Foto's van beide blootgestelde en kontrole weefsels is deur 'n *Wild Photoautomat MPS45*, gekoppel aan 'n *Leitz Dialux 20*-ligmikroskoop, op *Agfa Copex Pan*-film gefotografeer. Hierdeur kon enige moontlike histologiese skade, wat na 'n blootstellingsperiode van 24 uur kon voorkom, aangedui word.

## 2.9 Voorbereiding van weefsel vir histochemiese tegnieke.

Tydens hierdie eksperiment is daar gepoog om die *in situ* lokalisering van koper in die weefsels van platannas wat vir 96 uur aan 'n teoretiese koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, histologies vas te stel.

Na blootstelling is die gedissekteerde weefselfragmente elk in 'n 50 ml glasbeker, gevul met 30 ml 100% alkohol, gefikseer. Hierdie fiksering het die maak van paraffienwassnitte voorafgegaan. Die weefselfragmente is hierna in gemerkte metaalhouertjies geplaas en elk vir 'n uur lank met behulp van 'n alkoholreeks van 70%, 90% en drie maal 100%, gedehidreer. Hierna is die afsonderlike metaalhouertjies vir 30 minute in 'n 1:1 etanol : chloroformmengsel gelaat en daarna, vir dieselfde periode, in 'n suiwer chloroformoplossing. Die weefsels is nou in onderskeidelik drie opeenvolgende paraffienwasbaddens, vir 30 minute elk, geplaas. Die laaste wasbad is gekoppel aan 'n vakuumpomp wat verseker het dat die weefselfragmente deeglik met paraffienwas geïmpregneer is. Hierna is die afsonderlike fragmente in paraffienwasbootjies ingebed. Nadat die was met die weefselfragment gestol het, is 'n "820" *Spencer*-mikrotoom gebruik om mikrotroomsnitte van ongeveer  $0.6 \mu\text{m}$  te maak. Die wassnitte is vanaf die oppervlak van die water in 'n waterbad, met 'n temperatuur van ongeveer 50°C, versamel en met 'n voorwerpglasie, bedek met 'n poli-L-lisienoplossing, opgetel. Poli-L-lisienbehandeling van die voorwerpglasie dra daartoe by dat die weefselsnitte aan die glasoppervlak adsorbeer. Die voorwerpglasie met weefselsnitte is op 'n warmplaat by ongeveer 30°C gelaat om te droog.

Die snitte is volgens Mallory se hematoksilienkleuring (Lillie & Fullmer 1976) vir yster en koper gekleur. Volgens hierdie outeurs kleur kerne blou-grys, hemosiderien ('n bloed-afvalproduk) swart en vertoon koper lig tot donkerblou.

Die kleurstof is soos volg voorberei: een gram hematoksilienpoeier is in 'n 100 ml 100% alkohol opgelos. Een liter gedistilleerde water, wat vooraf gekook is om koolstofdiksied af te dryf, is by hierdie oplossing gevoeg en deeglik geroer. Kleuring is in kleuringsrakkies in glashouers, wat met die hematoksilienmengsel gevul is, vir

ongeveer 90 minute lank uitgevoer. Die voorwerpglasies is vir vier tydsintervalle van 25 minute elk met kraanwater afgespoel en weer deur die alkoholreeks, soos hierbo beskryf, gedehidreer. Die weefsel is daarna met xilol verhelder. 'n Druppel *Entellan*-monteergom is op elk van die nat voorwerpglasies, bo op die weefselsnit, gedrup en 'n dekglasie is direk hierna hieroor gemonteer. Die gemonteerde voorwerpglasies is gelaat om droog te word.

Blootgestelde, sowel as kontrole weefsel, is deur middel van 'n *Wild Photoautomat MPS45*, gekoppel aan 'n *Leitz Dialux 20*-ligmikroskoop, op *Agfa Copex Pan*-film gefotografeer.

## **2.10 Voorbereiding van huidweefsel vir skanderelektronmikroskopie (SEM)**

Die doel van hierdie elektronmikroskopiese ondersoek is om moontlike histopatologiese skade van die huid, wat na afloop van 'n blootstellingsperiode van 96 uur, kon intree, na te gaan.

Die blootgestelde en kontrole proefdiere is na blootstelling gedood en ongeveer 10mm x 10mm huidweefsel-fragmente is vanaf die ventrale en dorsale oppervlak van die organismes verwyder en in Todd se fikseermiddel vir 'n minimum van agt ure gefikseer. Alle prosedures, tot en met die dehidrerings in die asetonreeks, het met dié wat vir ligmikroskopie aangewend is, ooreengestem.

Na dehidrerings is die materiaal met behulp van koolstofdiksied krities gedroog en hierna is die huidfragmente met 'n goud-paladiummengsel bedamp.

Elektronmikrograwe vir elk van die blootgestelde en kontrole weefsels, asook die dorsale en ventrale huidweefsels is geneem om enige histopatologiese skade wat op die huid tydens blootstelling aan koper kon plaasvind, na te gaan.

# HOOFSTUK 3

## EKSPERIMENTE

---

### 3.1 DIE BEPALING VAN KOPERSENSITIWTEIT BY *XENOPUS LAEVIS* TYDENS 'N BLOOTSTELLINGSPERIODE VAN 96 UUR.

---

#### 3.1.1 INLEIDING

Met die uitsondering van enkele metaalkontaminasiestudies wat met *Bufo juxtasper* (Heng Lee & Stuebing 1990), *Bufo marinus* (Goldfisher, Schiller & Sternlieb 1970), *Rana heckscheri* (Punzo 1993), *Bufo arenarum* (Muiño, Ferrari & Salibán 1990) en *Bufo melanostictus* (Khangarot & Ray 1987) uitgevoer is, is inligting met betrekking tot spesifieke koperkonsentrasies wat verantwoordelik is vir mortaliteite onder amfibieërspecies, waaronder *Xenopus laevis*, skaars. 'n Verskeidenheid faktore, soos temperatuur, lig, pH, liggaamsgrootte, ouderdom en dieet kan 'n organisme se sensitiwiteit ten opsigte van koper beïnvloed en daardeur ook die LD<sub>50</sub>-waarde (die konsentrasie wat 50% van die populasie binne 'n bepaalde periode doodmaak) (Buikema & Voshell 1993).

Die duur van hierdie eksperimente is hoofsaaklik deur die feit dat die diere vooraf uitgehonger is, beperk. Indien hierdie periode sou voortduur, sou die fisiologie van die dier nadelig beïnvloed word (Buikema & Voshell 1993).

Die doel van hierdie voorlopereksperiment was om die kopersensitieweitsgrense van *Xenopus laevis* oor 'n tydperk van 96 uur te bepaal om sodoende 'n koperkonsentrasiereeks, waarby LD<sub>50</sub>-eksperimente uitgevoer kon word, saam te stel.

#### 3.1.2 MATERIAAL & METODEDES

Dertig platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos bespreek in die Algemene Materiaal & Metodes, geakklimeer. Die geakklimeerde organismes is tydens hierdie eksperiment in ses groepe van vyf elk verdeel waarna een groep elk na 'n nuut voorbereide akwariums, gevul met 20l verouderde, gedechlorineerde kopervrye water, oorgeplaas is.

'n Koperkonsentrasiereeks van onderskeidelik 25, 125, 250, 500 en 1250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  is tot 'n finale volume van 20l opgemaak, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek. 'n Sesde akwarium is met 20l kopervrye water gevul en het as kontrole gedien. Blootstelling het vir 'n 96 uur periode geduur en is by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en by 'n pH van

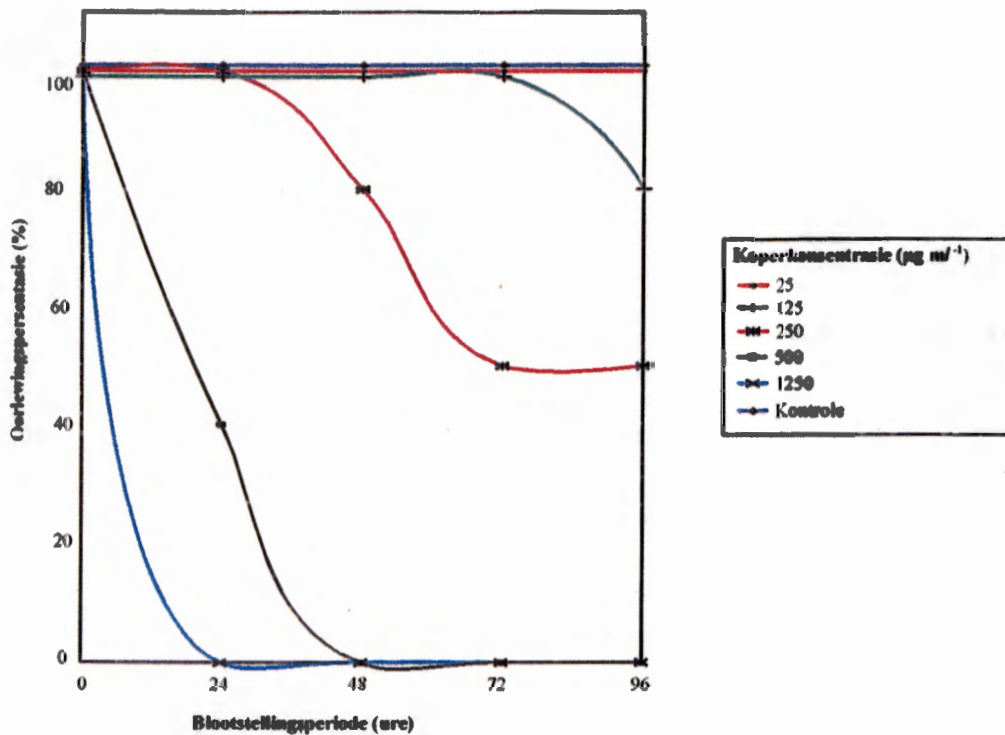
8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is daaglik, vir die duur van die eksperiment, gemonitor en druklug is konstant deur die mediums geborrel.

Mortaliteite is elke 24 uur genoteer waarna die dooie diere uit die blootstellingsmediums verwyder is om sodoende enige nadelige effekte wat dit op die ander proefdiere kon hê, te voorkom (Muiño *et al.* 1990; Khangarot & Ray 1987).

### 3.1.3 RESULTATE & BESPREKING

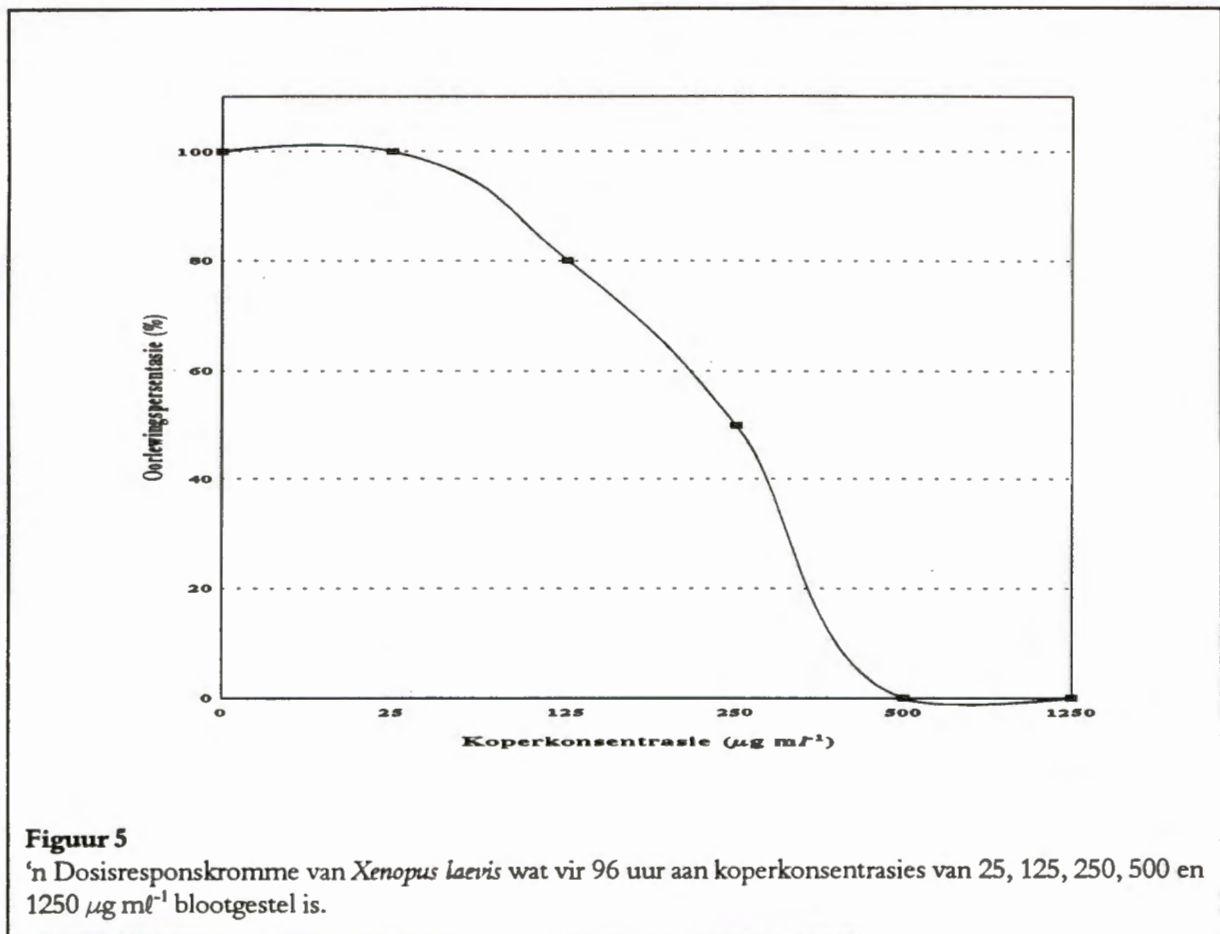
Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 4 en 5 weergegee. Uit Figuur 4 is dit duidelik dat honderdprosent mortaliteite na 24 en 48 uur by organismes wat onderskeidelik aan 1250 en 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper blootgestel is, voorgekom het.



**Figuur 4**

'n Vergelyking tussen die oorlewingspersentasies van *Xenopus laevis* wat aan koperkonsentrasies van 25, 125, 250, 500 en 1250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oor 'n periode van 96 uur blootgestel is.

Na 'n 96 uur blootstellingsperiode is mortaliteite van onderskeidelik 20% en 50% by organismes wat aan 125 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, waargeneem. Organismes wat aan 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper blootgestel is, het na 96 uur 'n oorlewingspersentasie van 100% getoon. Geen mortaliteite is tydens hierdie periode by die kontrole organismes gevind nie. In Figuur 5 kan gesien word dat koper 'n normale dosisresponseffek op *Xenopus laevis* het. Die mortaliteitstempo van proefdierewat aan hoë koperkonsentrasies blootgestel is, is merkbaar hoër as dié wat met laer, subletale konsentrasies in aanraking gekom het.



Verder het die organismes feitlik onmiddelik nadat hulle na die blootstellingsmediums oorgedra is, op die akwariumbodem gaan lê. Hierdie verskynsel is ook tydens studies wat op die vis *Clarias gariepinus* uitgevoer is, opgemerk (Van Vuren, Du Preez & Deacon 1994). Volgens Scherer & Nowark (1973), wat die reaksies van vis met betrekking tot swaarmetaalbesoedeling ondersoek het, sal 'n organisme uit die besoedeling waarin hy verkeer wil ontsnap om sodoende die nadelige effekte daarvan te vermy. Hierdie "vermydingsgedrag" is nie by die platannas opgemerk nie en is dit moontlik dat hul gedrag op óf 'n beskermingsreaksie óf op die begin van mortaliteit dui.

Soos genoem in die Algemene Inleiding veroorsaak hoë koperkonsentrasies 'n afname in die oorlewing van 'n spesie (Van Vuren *et al.* 1994). Uit die resultate van hierdie eksperiment is dit duidelik dat die oorlewing van platannas wel by relatief hoë koperkonsentrasies nadelig beïnvloed word.

Afskilfering van die epidermale lae, sowel as die vorming van blase op die eksterne oppervlak van die huid is na slegs 24 uur by organismes wat aan 1250 en 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper blootgestel is, waargeneem. Hierdie skilfers was duidelik sigbaar in die blootstellingsmedium. Afskilfering van die epidermis het tot 'n mindere mate by organismes wat aan 250, 125 en 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, voorgekom terwyl geen sigbare afskilfering of blaasvorming by kontrole organismes waargeneem is nie.

Na 'n periode van 96 uur het die huid van organismes wat aan koperkonsentrasies van 25, 125 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, minder slymryk as dié van kontrole organismes voorgekom. Feitlik geen slym is na 'n blootstellingsperiode van 24 uur op die huid van organismes wat aan 1250 en 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper blootgestel is, waargeneem nie.

Verder het kontrole organismes relatief normale swembewegings uitgevoer en gedurig na die wateroppervlak geswem om lug in te neem. Platannas wat onderskeidelik aan 25, 125, 250, 500 en 1250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper blootgestel is, het ongeveer twee tot drie keer so lank as kontrole diere op die akwariumbodem gelê voordat hulle na die wateroppervlak beweeg het.

Tydens hierdie eksperiment is vasgestel dat *Xenopus laevis* oor 'n blootstellingsperiode van 96 uur minder sensitief is vir koperkonsentrasies van tussen 25 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Hieruit is besluit om 'n koperkonsentrasiereeks van tussen genoemde konsentrasies saam te stel waarby die volgende eksperiment, die  $\text{LD}_{50}$ -waarde bepaling, uitgevoer kon word.

---

## 3.2 DIE BEPALING VAN DIE LETALE KOPERKONSENTRASIE (LD<sub>50</sub>-WAARDE) TYDENS 'N 96 UUR BLOOTSTELLINGSPERIODE.

---

### 3.2.1 INLEIDING

Uit die resultate van die vorige eksperiment is dit duidelik dat blootstelling van die organismes aan 'n koperkonsentrasie van 500 en 1 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  binne 96 uur tot 100% mortaliteit gelei het. Verder is gevind dat organismes vir laer koperkonsentrasies (25, 125 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) minder sensitief is.

In hierdie eksperiment is die LD<sub>50</sub>-waarde vir *Xenopus laevis* vasgestel. Met inagneming van die vorige eksperiment se resultate is 'n koperkonsentrasiereeks van tussen 25 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  opgemaak om die LD<sub>50</sub>-waarde vir koper tydens 'n 96 uur blootstellingsperiode so akkuraat moontlik te probeer vasstel.

### 3.2.2 MATERIAAL EN METODES

'n Honderd-en-twintig platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos bespreek in die Algemene Materiaal & Metodes, geakklimmeer. Die geakklimmeerde organismes is in ses groepe van twintig elk verdeel waarna een groep na elk van die akwariums oorgeplaas is.

'n Koperkonsentrasiereeks van respektiewelik 25, 62.5, 125, 187.5 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  is tot 'n finale volume van 20l opgemaak soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek. 'n Sesde akwarium is met 20l koper-vrye water gevul en het as kontrole gedien. Blootstelling het vir 'n 96 uur periode geduur en is by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en by 'n pH van ongeveer 8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is daaglik, vir die duur van die eksperiment, gemonitor en druklug is konstant deur die mediums geborrel.

Mortaliteit is elke 24 uur genoteer waarna die dooie diere uit die blootstellingsmediums verwyder is om sodoende enige nadelige effekte wat dit op die ander organismes kon hê, te voorkom (Muiño *et al.* 1990; Khangarot & Ray 1987).

### 3.2.3 RESULTATE & BESPREKING

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 1 en Figure 6 en 7 weergegee. Uit die resultate is bevind dat die statiese 96 uur LD<sub>50</sub>-waarde van koper vir *Xenopus laevis* ongeveer 62.5 µg ml<sup>-1</sup> is.

Die oorlewingspersentasies van platannas wat aan koperkonsentrasies van onderskeidelik 25, 62.5, 125, 187.5 en 250 µg ml<sup>-1</sup> blootgestel is, word in Tabel 1 weergegee. Hieruit is dit duidelik dat koper, wanneer dit in konsentrasies van 125, 187.5 en 250 µg ml<sup>-1</sup> oor 'n blootstellingsperiode van 96 uur aangewend word, meer toksies as 25 en 62.5 µg ml<sup>-1</sup> is. Na 96 uur is die oorlewingspersentasies van organismes wat aan bogenoemde drie koperkonsentrasies blootgestel is, onderskeidelik 25%, 5% en nul (Figuur 6).

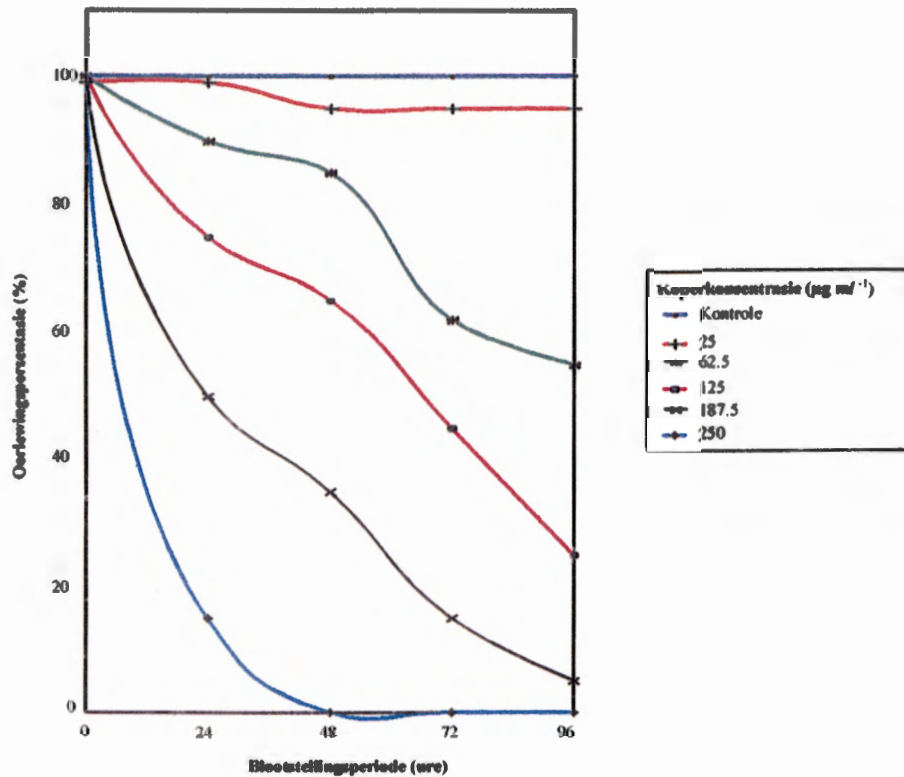
**Tabel 1**

**Die oorlewingspersentasie (%) van *Xenopus laevis* wat tydens 'n 96 uur periode aan verskillende koperkonsentrasies blootgestel is.**

Blootstellingsperiode (uur)					
Koper-konsentrasie (µg ml <sup>-1</sup> )	0	24	48	72	96
Kontrole	100	100	100	100	100
25	100	100	95	95	95
62.5	100	90	85	60	55
125	100	75	65	45	25
187.5	100	50	35	15	5
250	100	15	0	0	0

Uit Figuur 6 kan afgelei word dat alhoewel daar mortaliteite by blootstellingskonsentrasies van 25 en 62.5 µg ml<sup>-1</sup> voorgekom het, dit tydens hierdie akute korttermynblootstelling minder toksies was: na 'n periode van 96 uur is oorlewingspersentasies van onderskeidelik 95% en 55% by hierdie koperkonsentrasies gevind.

Soos tydens die vorige eksperiment het die blootgestelde organismes feitlik dadelik na blootstelling aan koper na die akwariumbodem afgesak en het ongeveer twee tot drie keer so lank as die kontrole organismes op die bodem verkeer voordat hulle na die wateroppervlak gegaan het om suurstof in te neem.



**Figuur 6**

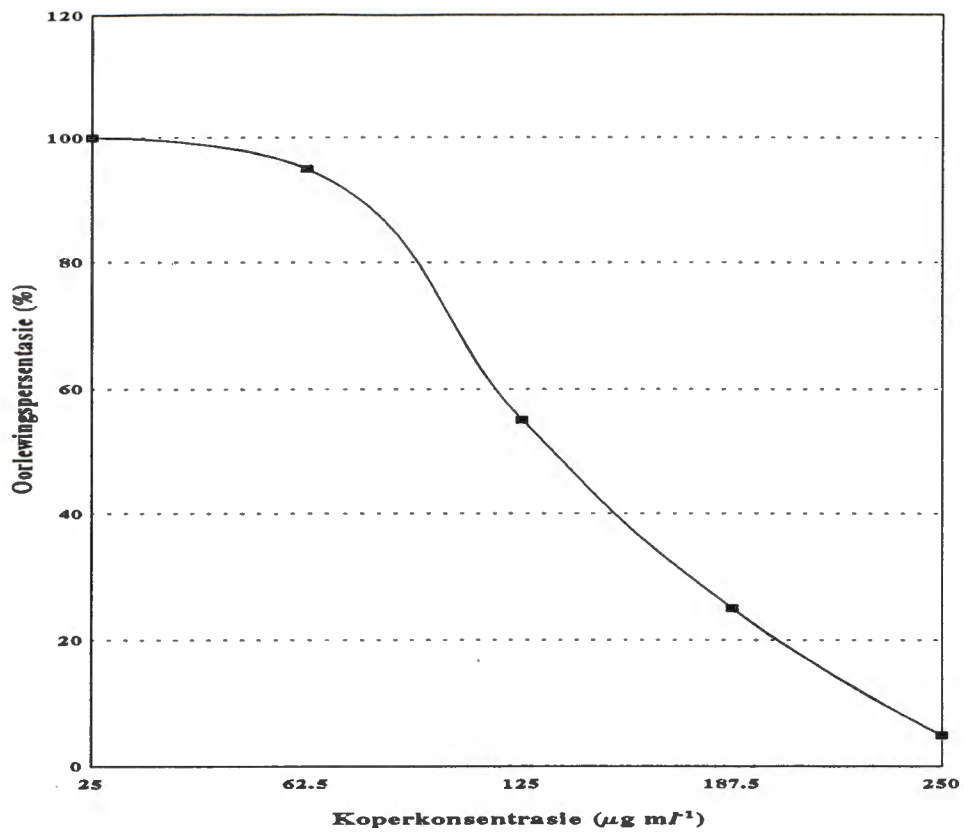
Die oorlewingspersentasies van *Xenopus laevis* wat oor 'n periode van 96 uur aan koperkonsentrasies van 25, 62.5, 125, 187.5 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is.

Afskilfering van die epidermale lae het ook hier, soos in eksperiment 3.1, by blootgestelde organismes plaasgevind. Geen waarneembare afskilfering van die huid het by kontrole diere voorgekom nie.

Geen waarneembare blaasvorming, soos gevind by blootstelling aan koperkonsentrasies van 500 en 1 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , is op die huid van blootgestelde of kontrole organismes in hierdie eksperiment waargeneem nie. Die huid van blootgestelde organismes het wel minder slymryk as dié van kontrole organismes voorgekom.

In Figuur 7 kan gesien word dat koper 'n normale dosisresponseffek tydens hierdie eksperiment vertoon het. 'n Dosisresponskromme is saamgestel vanuit die  $LD_{50}$ -waardes wat na 96 uur vir elk van die blootstellingskonsentrasies gevind is. Hieruit kom dit dus voor dat die oorlewingspersentasie van organismes wat aan koperkonsentrasies van 125, 187.5 en 250  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel was, na 'n periode van 96 uur laer is as vir organismes wat aan konsentrasies van 25 en 62.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is.

Geen mortaliteite het vir die duur van die eksperiment by kontrole organismes voorgekom nie.



**Figuur 7**

'n Dosisresponskromme van *Xenopus laevis* wat vir 96 uur aan verskillende koperkonsentrasies blootgestel is.

Na aanleiding van die resultate van hierdie eksperiment is 'n blootstellingskonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  as teoretiese, letale koperkonsentrasie, wat tydens die volgende eksperimente aangewend sou word, gekies.

---

### 3.3 'N ONDERSOEK NA DIE VERBAND TUSSEN DIE OPGEMAakte EN VASGESTELDE KOPERKONSENTRASIE GEDURENDE 'N 96 UUR PERIODE.

---

#### 3.3.1 INLEIDING

Tydens toksisiteitstudies is dit belangrik om die konsentrasie van die swaarmetaal, wat werklik tydens blootstelling in die medium beskikbaar is, te bepaal. Volgens Van Vuren *et al.* (1994) is gevind dat die toegediende, teoretiese swaarmetaalkonsentrasie na 'n verloop van tyd gewoonlik afneem. Sprague (1969) beweer dat hierdie afname die gevolg is van die klaarblyklike adsorpsie van die swaarmetaal aan die blootstellingshouer se wande terwyl Yager & Harry (1964) gevind het dat koper wel adsorberingseienskappe op 'n verskeidenheid biologiese en nie-biologiese materiale vertoon.

Verder kan die afname in die aanvanklike koperkonsentrasie ook aan die pH van die medium toegeskryf word. Volgens Meyling (1966) word die hidrolise van 'n verbinding deur die pH van die medium beïnvloed. Wolmarans (1984; ongepubliseerde tesis) stel dat die gemete koperkonsentrasie by 'n pH van 7.2 82% van die teoretiese opgemaakte konsentrasie is, terwyl dit by 'n pH van 8.4 slegs 78% is. By 'n pH van 2.8 stem die waarde van die teoretiese konsentrasie met dié van die gemete konsentrasie ooreen.

Die afname in die aanvanklik toegediende koperkonsentrasie kan ook die gevolg wees van koper wat vanuit die medium deur blootgestelde organismes opgeneem en geakkumuleer word (Hellowell 1985; Van Vuren *et al.* 1994).

Uit die vorige eksperiment was gevind dat die subletale, teoretiese koperkonsentrasie  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  is. Die doel van hierdie eksperiment was dus om die werklike koperkonsentrasie waaraan die organismes blootgestel is, te bepaal.

#### 3.3.2 MATERIAAL & METODEDES

Vyf koperoplossings van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  elk is tot 'n finale volume van 20l opgemaak, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek. 'n Sesde akwarium is met 20l kopervrye water gevul en het as kontrole gedien.

Temperatuur en pH is daaglik, vir die duur van die eksperiment, gemonitor en druklug is konstant deur die

mediums geborrel.

Voordat die koperoplossings by die akwariums gevoeg is, is vyf 5 ml watermonsters in 5ml poliëtileenhouders uit elk van die ses akwariums versamel en is dit vir latere atoomabsorpsiespektrofotometriese verwerking by  $-20^{\circ}\text{C}$  ingevries. Nadat die koperoplossings by elk van die akwariums gevoeg is, is daar tydens die eerste 6 ure elke 30 minute, en hierna weer na 6, 12, 24, 48, 72 en 96 uur soortgelyke monsternemings uitgevoer. Ook hierdie watermonsters is in 5ml poliëtileenhouders versamel en ingevries.

'n AAS-kalibrasiereeks van 25, 50 en  $100\ \mu\text{g ml}^{-1}$  koper is, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, opgemaak. Atoomabsorpsiespektrofotometriese analises is hierna uitgevoer om die teenwoordigheid van koper in die blootstellingsmediums te ondersoek.

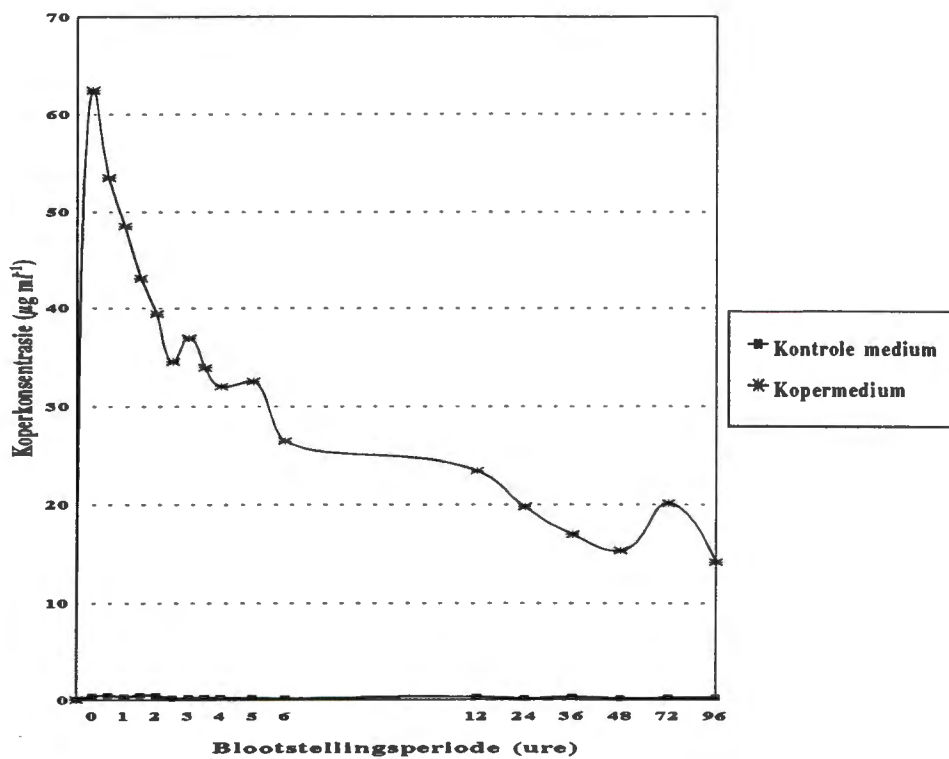
### 3.3.3 RESULTATE & BESPREKING

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 8 aangedui. Hierin word 'n duidelike afname in die meetbare koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium oor 'n periode van 96 uur waargeneem: die opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$  het binne 6 ure tot 'n konsentrasie van  $26.5\ \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem.

Hierdie verskynsel kan enersyds aan die feit dat koper by 'n pH van ongeveer 8 relatief swak oplos, en andersyds aan die moontlike adsorpsie van die swaarmetaal aan die akwariumwande, toegeskryf word.

Tydens die daaropvolgende 6 ure het die koperkonsentrasie in die medium relatief stadiger afgeneem en het dit voorgekom asof die koperkonsentrasie 'n ewewig bereik het. Twaalf ure later, en tot en met die einde van die eksperiment, het die koperkonsentrasie in oplossing by 'n gemiddeld van  $18.6 \pm 5.02\ \mu\text{g ml}^{-1}$ , wat ongeveer 'n derde van die aanvanklike konsentrasie is, gewissel.

Bepalings van die pH wat daagliks gedurende hierdie studie gemeet is, het getoon dat die aanvanklike pH van die water, voordat koper daarin opgelos is, 8.4 was. Vier-en-twintig uur na die byvoeging van koper, het hierdie waarde na 7.4 afgeneem. 'n Konstante pH van ongeveer 8 is in die kontrole medium, wat deurgaans kopervry was, gehandhaaf.



**Figuur 8**

Die vasgestelde koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium by 'n pH van ongeveer 8 en 'n temperatuur van  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  oor 'n periode van 96 uur waartydens lug voortdurend deurgeborrel is.

Tydens hierdie ondersoek is gevind dat die opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  na 'n periode van 96 ure na 'n gemete subletale konsentrasie van  $14.2 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem het. Die werklike koperkonsentrasie waaraan organismes dus blootgestel is, is dus veel laer as die aanvanklike toegediende dosis van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ . In die volgende paar eksperimente sal duidelikheid aangaande die rol van die organisme, wat die opname van koper vanuit die medium aanbetref, gevind word.

### 3.4 'N ONDERSOEK NA DIE OPNAME, VERSPREIDING EN EKSKRESIE VAN KOPER IN GESELEKTEERDE WEEFSELS VAN *XENOPUS LAEVIS* OOR 'N PERIODE VAN 96 UUR.

---

#### 3.4.1 INLEIDING

Förstner & Whittmann (1979) en Ellis (1989) het gevind dat akwatiese biota wel swaarmetale kan akkumuleer en Heath (1987) en Roux (1994) beweer dat hierdie opname van die metale in die liggaam op vier moontlike wyses kan plaasvind: opname deur die kieuë (Van Vuren *et al.* 1994), inname van gekontameneerde voedsel (Waldichuck 1974) en drinkwater (Eddy 1981) en deur middel van diffusie van die swaarmetaal deur die huid (Heath 1987). Die belangrikheid van elk van hierdie opnameroetes varieer, maar die belangrikste faktor wat in ag geneem behoort te word, is die swaarmetaalverbindings in die omgewing se toeganklikheid vir opname deur organismes.

Subletale effekte van swaarmetaalbesoedeling is hoofsaaklik biochemies van aard omdat dit die basiese vlak van sellulêre organisasie affekteer. Swaarmetale beïnvloed die funksies van ensieme en hul metaboliete en dit bind ook aan en affekteer membraansisteme en ander sellulêre komponente (Klaassen 1976). Hierdie interaksies lei tot veranderinge in die vlak van organisasie wat essensiële funksies, soos osmo- en hormoonregulering, sensuïele en spierfunksionering, respirasie, immuunreaksies en sirkulasie beïnvloed. Volgens Van Vuren *et al.* (1994) word 'n organisme in geheel, die energiemetabolisme, verskeie bloedveranderlikes en ensiematiese aktiwiteite, deur koper beïnvloed.

Die mate waarin akwatiese organismes swaarmetale akkumuleer kan as 'n funksie van opname- en ekskresiekoerse beskou word. Opname van metale is 'n aktiewe en/of passiewe proses en dit sluit diffusie oor konsentrasiegradiënte, wat weens adsorpsie of binding van die metaal aan weefsels of seloppervlakke ontstaan, in (Heath 1987).

*In vivo* is die graad van metaalakkumulering in verskeie weefsels van metaalligandbindings afhanklik. Volgens Marafante (1976) sal organe soos die lewer en niere, wat spesifieke metaalbindende proteïene sekreteer, sowel as ander sensitiewe organe, swaarmetale akkumuleer. Veral die lewer, wat swaarmetale opneem, berg en soms detoksifiseer, speel hier 'n belangrike rol (Klaassen 1976).

Nadat 'n toksiese verbinding in 'n organisme se sirkulasiestelsel opgeneem is, word dit òf deur ensieme van die lewer of nier gemetaboliseer, òf dit word in die lewer, niere, spiere of vetweefsel geberg. Verder kan dit ook deur

die lewer, huid, spysverteringskanaal, niere of kieu, in die vorm van onderskeidelik gal, mukus, feses en/of uriene, geëkskretreer word (Van Vuren *et al.* 1994).

Volgens Doudorff & Katz (1953) is die toksiese meganisme van swaarmetale moontlik van die effek daarvan op die respiratoriese apparaat van akwatiese organismes, wanneer dit daar akkumuleer, afhanklik. Om te bepaal of akkumulاسie van swaarmetale ook by akwatiese amfibieërs, wat daarvoor bekend is om van beide huid- en longrespirasie gebruik te maak (Lillywhite & Maderson 1988; Storer *et al.* 1971) voorkom, is die mate waarin koper in geselekteerde weefsels van blootgestelde *Xenopus laevis*-eksemplare akkumuleer, tydens die studie ondersoek.

Tydens hierdie studie was platannas aan 'n opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel. Ondersoeke na die akkumulاسie, verspreiding en invloed van koper in die huid, spysverteringstelsel, longe, niere, lewer en heelbloed is uitgevoer. Verder is die moontlikheid of vrystelling van koper uit hierdie geselekteerde weefsels na blootstelling voorkom, ook ondersoek. So ver moontlik is die tendense van die gemiddelde koperkonsentrasies wat in elk van die onderlinge weefsels bepaal was, met mekaar, sowel as met die koperkonsentrasie in die blootstellings- en kontrole mediums vergelyk.

### 3.4.2 MATERIAAL & METODEDES

#### 3.4.2.1 Akkumulاسie-eksperiment

Tagtig platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, geakklimeer. Die geakklimeerde organismes is in agt groepe van tien elk verdeel waarna dit afsonderlik na elk van die agt nuut voorbereide akwariums, waarin verouderde, gedechlorineerde kopervrye water voorgekom het, oorgedra is.

Vier koperoplossing van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  elk is vooraf, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, tot 'n finale volume van 20l opgemaak. Die oplossings is na vier van die bogenoemde akwariums, waarin die geakklimeerde organismes oorgeplaas is, opgelos. Die oorblywende vier akwariums is elk met 20l kopervrye water gevul en het as kontroles gedien. Die platannas is hierna in die akwariums oorgeplaas en blootstelling het vir 'n 96 uur periode geduur en is by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en by 'n pH van ongeveer 8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is daaglik, vir die duur van die eksperiment, gemonitor en druklug is konstant deur die mediums geborrel.

Vyf 5ml watermonsters is na onderskeidelik 24, 48, 72 en 96 uur vanuit elk van die agt akwariums versamel en in 5ml poliëtileenhouders vir latere atoomabsorpsiespektrofotometriese verwerking by  $-20^\circ\text{C}$  ingevries.

Na onderskeidelik 24, 48, 72 en 96 uur is een groep organismes wat aan koper blootgestel was en een kontrole groep uit die akwariums verwyder en gedissekteer. Die versameling en verwerking van blootstellings- en kontrole medium watermonsters het soos hierbo bespreek, ook op hierdie tye plaasgevind. Nadat die organismes vanuit 'n akwarium verwyder is, is die neem van watermonsters uit die betrokke akwarium gestaak. Die disseksie en die versameling van heelbloed- en weefselmonsters het, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, plaasgevind en die gedissekteerde weefsel is by  $-20^{\circ}\text{C}$  vir latere atoomabsorpsiespektrofotometrie ingevries.

#### **3.4.2.2 Ekskresie-eksperiment**

Proefdiergetalle, akklimering en die opmaak van blootstellingsoplossings en -parameters en voorbereiding van die akwariums, het met dié van die akkumulatie-eksperiment ooreengestem.

Tydens hierdie eksperiment is vier groepe van tien proefdiere elk afsonderlik aan 'n opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  vir 'n periode van 96 uur blootgestel. Vier ander groepe is vir dieselfde tydskuur in kopervryewater aangehou en het as kontroles gedien. Na afloop van die 96 uur blootstellingsperiode was elk van die agt groepe na agt afsonderlike akwariums, gevul met 20l kopervrye, verouderde kraanwater, oorgedra.

Vyf 5ml watermonsters is na onderskeidelik 24, 48, 72 en 96 uur na oorplasing vanuit elk van die agt akwariums versamel en in 5ml poliëtileenhouders vir latere atoomabsorpsiespektrofotometriese verwerking by  $-20^{\circ}\text{C}$  ingevries.

Vier-en-twintig, 48, 72 en 96 uur nadat die proefdiere na die kopervrye water oorgedra was, is onderskeidelik een groep koperblootgestelde en een groep kontrole organismes vanuit die akwariums verwyder en gedissekteer. Die disseksie en versameling van bloed- en weefselmonsters is, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, uitgevoer.

Watermonsters is soos by die akkumulatie-eksperiment op ooreenstemmende tye uit beide die blootstellings- en kontrole akwariums versamel en vir latere atoomabsorpsiespektrofotometrie ingevries.

Na afloop van beide die akkumulatie- en die ekskresie-eksperimente is die versamelde weefsels verteer en vir atoomabsorpsiespektrofotometrie voorberei (sien Algemene Materiaal & Metodes). Die koperkonsentrasies in elk van die geselekteerde weefsels en in die heelbloed is onderskeidelik as  $\mu\text{g g}^{-1}$  en  $\mu\text{g ml}^{-1}$  koper uitgedruk. Alle statistiese data-analises is met behulp van Stat-Graphics 4.0 uitgevoer. Betekenisvolheid van die data is deur middel van veelvuldige variansie analise (Tukey se toets) met 'n waarskynlikheidsgrens van 95%, uitgevoer.  $P \leq 0.05$  het na hoogs betekenisvolle verskille tussen datagroepe verwys, terwyl  $p \geq 0.05$  geen beduidende verskille aangedui het nie.

Alle watermonsters is ontvries en atoomabsorpsiespektrofotometries, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, geanaliseer om sodoende die koperkonsentrasie per tydseenheid in beide die blootstellings- en die kontrole mediums vas te stel. Hierdie resultate is as  $\mu\text{g ml}^{-1}$  uitgedruk.

Beide die akkumulasië- en ekskresie-eksperimente is in duplikaat uitgevoer.

### 3.4.3 RESULTATE & BESPREKING

#### 3.4.3.1 Heelbloed

##### *Akkumulasië-eksperiment*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 2 en Figuur 9 weergegee. Statistiese vergelykings van hierdie resultate het telkens op 'n gebrek aan betekenisvolle verskille tussen die onderskeie blootgestelde en kontrole organismes gedui ( $p \geq 0.05$ ).

'n Analise van die kontrole data het sonder enige tendens tussen  $1.28 \pm 0.53 \mu\text{g ml}^{-1}$  en  $0.9 \pm 0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$  gevarieer. Hierteenoor het daar 'n toename in die koperkonsentrasies van die bloed van die blootgestelde platannas tot na 'n blootstellingsperiode van 72 uur voorgekom. In vergelyking met die gemiddelde kontrole waarde van  $1.07 \pm 0.41 \mu\text{g ml}^{-1}$ , was hierdie toename na blootstellingsperiodes van 24, 48 en 72 uur onderskeidelik 76%, 86% en 137%.

Na 96 uur was die koperkonsentrasie in die heelbloed van die blootgestelde organismes slegs 82% meer as die gemiddelde kontrole waarde. 'n Moontlike verklaring vir hierdie afname is dat die koper in die heelbloed òf deur die organisme na buite geëkskreteer word, òf vanuit die bloed na die weefsels begin beweeg. Hierdie verklaring sal moontlik deur die volgende eksperimente gesubstansieer word.

Die gebrek aan betekenisvolle verskille ( $p \geq 0.05$ ) tussen die koperkonsentrasies wat in die heelbloed van die onderskeie kontrole en blootgestelde groepe het, kon moontlik vanweë die relatief groot standaardafwykings wat in die resultate van die blootgestelde weefsel gevind is, versluier word.

In studies waarin koperblootgestelde voëls en soogdiere aan koper onderwerp is, is gevind dat koper aan seruloplasmien, 'n serumproteïen wat deur die lewer vervaardig word, bind. Hoewel koper in hoë konsentrasies aan hierdie proteïen bind, kan dit ook met albumien en bepaalde aminosure assosieer (Van Vuren *et al.* 1994).

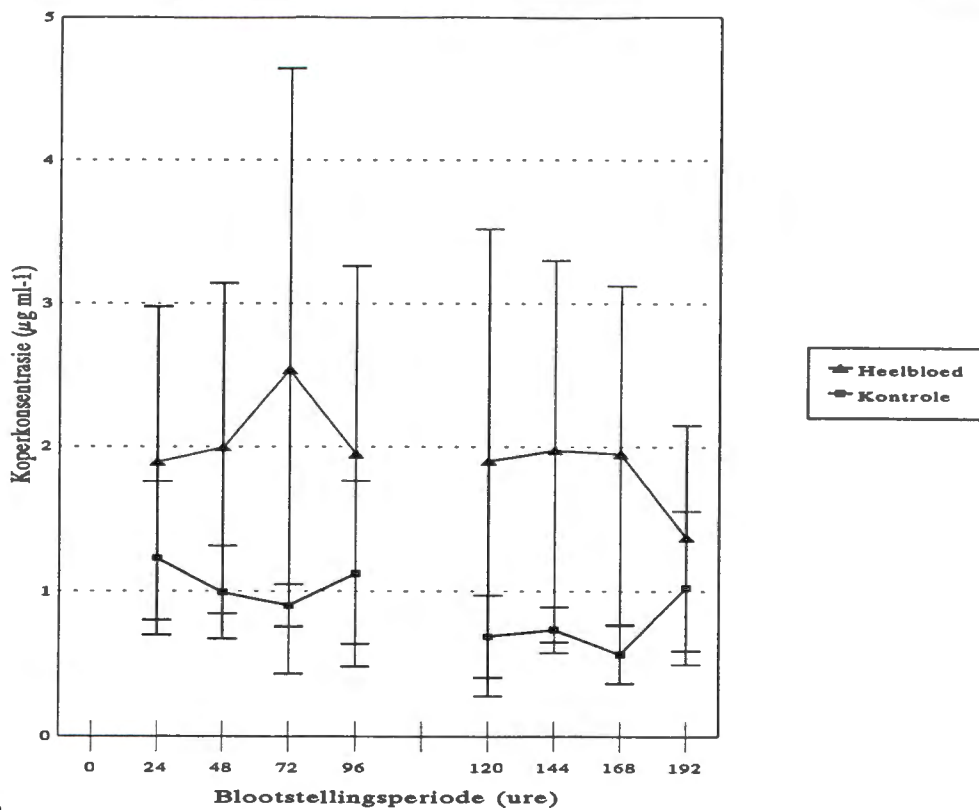
Tabel 2

'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die heelbloed van *Xenopus laevis* tydens die akkumulasi- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die heelbloedweefsel van blootgestelde en kontrole organismes en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums teenwoordig is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )			
	Kontrole organismes (n=20)	Blootgestelde organismes (n=20)	Kontrole medium	Blootstellings- medium
<b>Akkumulasi- 24</b>	1.28 ± 0.53	1.89 ± 1.09	0.04 ± 0.01	11.81 ± 0.45
<b>48</b>	0.99 ± 0.32	1.99 ± 1.15	0.04 ± 0.01	10.76 ± 0.69
<b>72</b>	0.90 ± 0.15	2.54 ± 2.11	0.05 ± 0.01	10.09 ± 0.38
<b>96</b>	1.12 ± 0.64	1.95 ± 1.31	0.05 ± 0.01	9.65 ± 0.42
$\bar{x}$	1.07 ± 0.41	-	0.045 ± 0.01	-
<b>Ekskresie 120</b>	0.69 ± 0.28	1.90 ± 1.62	0.04 ± 0.002	0.80 ± 0.11
<b>144</b>	0.73 ± 0.16	1.97 ± 1.32	0.05 ± 0.01	0.94 ± 0.1
<b>168</b>	0.57 ± 0.07	1.95 ± 1.18	0.05 ± 0.001	0.94 ± 0.06
<b>192</b>	1.02 ± 0.53	1.37 ± 0.78	0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.07
$\bar{x}$	0.75 ± 0.26	-	0.048 ± 0.01	-

Verder kan hierdie proteïen- swaarmetaalverbindings relatief geredelik afgegee word (Mertz 1987). Of koper aan soortgelyke serumproteïene in die bloed van *Xenopus laevis* bind, is nie bekend nie. Die toename in die koperkonsentrasie in die heelbloed van blootgestelde organismes kan onder andere aan 'n fisiese verhoging van koperione in die bloed en/of aan die akkumulasi van die metaal in die bloed weens binding daarvan aan metaalbindingsproteïene, soos gevind by voëls en soogdiere, toegeskryf word (Van Vuren *et al.* 1994).

Uit Tabel 2 is dit duidelik dat die gemiddelde koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium na 'n periode van 24 uur vanaf 'n opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  na  $11.81 \pm 0.45 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem het. Die feit dat hierdie afname nie deur 'n toename van koper in die heelbloed verteenwoordig word nie, dui daarop dat dit eerder aan onder andere faktore soos adsorpsie aan die blootstellingshouerwande en/of die organisme se liggaamsoppervlak, die presipitering van die swaarmetaal weens die medium se pH, of die akkumulasi daarvan in ander weefsel, toegeskryf kan word.



**Figuur 9**

'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulasië- en ekskresie-eksperimente in die heelbloed van *Xenopus laevis*, wat vir 96 uur aan 'n konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

In eksperiment 3.3 is gesien dat die vasgestelde koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium sonder proefdiere, na 24 uur vanaf 'n opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  met ongeveer  $68\%$  na  $19.77 \pm 2.81 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem het. Gedurende hierdie eksperiment (3.4) is daar na 'n 24 uur blootstellingsperiode slegs  $11.81 \pm 0.45 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper in die medium waarin proefdiere voorgekom het, gevind. Dit is 'n afname van bykans  $81\%$  en dit kom dus hieruit voor of die blootgestelde organismes vir die verlies van  $13\%$  van die koper gedurende die eerste 24 uur verantwoordelik is. Die aansienlike toename van koper in die organismes tussen die 48 en 72 uur blootstellingsperiodes word nie deur so 'n drastiese afname in die koperkonsentrasie van die water waarin blootstelling plaasgevind het, gereflekteer nie. Dit is te verwagte omdat daar 'n konsentringseffek van koper in die organisme voorkom, terwyl die verhouding van die aantal organismes tot die volume van die blootstellingsmedium so groot is dat 'n drastiese afname van koper vanuit die blootstellingsmedium hoogs onwaarskynlik is.

Na die drastiese afname in die koperkonsentrasie wat na 24 uur in die blootstellingsmedium waargeneem is, het die gemiddelde konsentrasie vir die volgende 72 uur, tot en met die einde van die eksperiment, verder met onderskeidelik  $8.9\%$ ,  $6.2\%$  en  $4.4\%$  afgeneem. Dit kom dus voor asof die konsentrasie van die swaarmetaal in die

medium 'n plato bereik gedurende hierdie periode, wat moontlik op die direkte inname van koper deur die organismes dui.

### ***Ekskresie-eksperiment***

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 2 en Figuur 9 weergegee. Hieruit is dit duidelik dat daar geen statisties betekenisvolle verskille ( $p \geq 0.05$ ) tussen die koperkonsentrasies wat in die heelbloed van die onderskeie blootgestelde groepe en die gemiddelde kontrole waarde van  $0.75 \pm 0.26 \mu\text{g ml}^{-1}$  voorgekom het nie. Dit is moontlik dat beduidende verskille deur die relatief groot standaardafwykings versluier kon word. Die laer gemiddelde koperkonsentrasie wat tydens die ekskresie-eksperiment in die heelbloed van kontrole organismes gevind is, is moeilik verklaarbaar.

Die noue ooreenkoms tussen die koperkonsentrasie wat 96 uur na blootstelling en 24, 48 en 72 uur na oorplasing na kopervryewater voorgekom het, is opvallend. 'n Drastiese afname in die koperkonsentrasie het egter na 96 uur, nadat organismes na die kopervryewater oorgeplaas is, voorgekom en was dit ongeveer 29% laer as die waarde wat na 'n 96 uur blootstellingsperiode verkry is. Dit was egter nog 45% hoër as die kontrole waardes soos gevind by die kontrole groepe wat tydens die ekskresie-eksperiment ondersoek is. Dit kom dus hieruit voor of die verlies van koper tydens die eerste 72 uur van die ekskresie-eksperiment, grootliks beperk word en eers na 96 uur beduidend toeneem. Dit is moontlik dat die organismes eers na hierdie periode sodanig herstel het sodat eliminerings van koper uit die blootgestelde organismes 'n aanvang kan neem. Hierdie eliminerings kan òf deur die ekskresie daarvan na die omringende omgewing òf die afgee daarvan aan ander weefsels behels.

Indien die koperkonsentrasie in die water van die ekskresiemedium geanaliseer en met die water van die kontrolemedium vergelyk word, is dit duidelik dat daar, 24 uur nadat blootgestelde organismes na die kopervryewater oorgeplaas is, 'n aansienlike toename van ongeveer 1 900% in die koperkonsentrasie van die ekskresiemedium voorgekom het. Dit is waarskynlik aan koper wat ekstern op die platanna teenwoordig was en direk na oorplasing in die kopervryewater van die ekskresiemedium afgewas is en in oplossing gekom het, toe te skryf.

Die relatief stadige toename van koper in die medium na 48, 72 en 96 uur (18%, 0% en 5%) is waarskynlik, gesien in die lig van die feit dat dit relatief stadig plaasvind, aan die vrystelling van koper vanuit die organismes toeskryfbaar. Of dit via 'n proses van passiewe diffusie of aktiewe ionregulering plaasvind, is nie bekend nie.

Na 'n 96 uur ekskresieperiode is 'n koperkonsentrasie van ongeveer 20 keer meer as die gemiddelde koperkonsentrasie in die kontrole medium, in die ekskresiemedium gevind, wat bevestig dat koper wel vanaf die blootgestelde organismes vryekom het.

Die feit dat daar geen betekenisvolle verskille tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die water van die blootstellingsmediums na 48, 72 en 96 uur voorgekom het nie, wys daarop dat die koperinhoud van dié mediums 'n ewewig bereik het.

### 3.4.3.2 Huidweefsel

#### *Akkumulatie-eksperiment*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 10 en Tabel 3 weergegee. Statisties betekenisvolle verskille ( $p \leq 0.05$ ) het na 24, 48, 72 en 96 uur tussen die gemiddelde koperkonsentrasies wat in die huidweefsel van die onderskeie blootgestelde organismes en dit wat in die gemiddelde kontrole weefsel ( $2.44 \pm 0.87 \mu\text{g g}^{-1}$ ) gevind is, voorgekom. 'n Toename van ongeveer 88% het gedurende die eerste 24 uur in die huid van blootgestelde platannas voorgekom. Hierna, en tot en met die einde van die akkumulatie-eksperiment, het die gemiddelde koperkonsentrasie in die huidweefsel van die blootgestelde organismes 'n plato bereik. Die aanvanklik drastiese toename in die konsentrasie na 24 uur dui moontlik daarop dat die opname van koper waarskynlik weens adsorpsie op die huidoppervlak toe te skryf is. Die plato wat na hierdie periode bereik is, dui op akkumulatie van die swaarmetaal op, of in die huidlae.

Indien die gemiddelde koperkonsentrasies in die huidweefsel en heelbloed (3.4.3.1) van blootgestelde organismes vergelyk sou word, is dit waarneembaar dat die gemiddelde waarde in die heelbloed tot na 72 uur blootstelling geleidelik toeneem, terwyl die konsentrasie in die huid van blootgestelde platannas na 24 uur blootstelling reeds met 756% toegeneem het. Dit is dus moontlik dat koper via die huid tot in die bloedstroom opgeneem is.

Indien die gemiddelde koperkonsentrasie wat in die water van die blootstellingsmedium gevind is, met die konsentrasie wat in die onderskeie blootgestelde groepe vergelyk word, is dit duidelik dat daar 'n verlies aan koper vanuit die medium voorkom, terwyl daar 'n toename van die metaal in die huidweefsel gevind is. Hiertydens is dit nodig om die aannames wat tydens 3.4.3.1 genoem is, ook in ag te neem: dit kom dus voor dat die verlies aan koper vanuit die blootstellingsmedium aan die adsorpsie en/of absorpsie op, of in die huid van die blootgestelde platannas toegeskryf kan word, wat die hoë waardes in die huidweefsel moontlik verklaar. Soos reeds genoem, het die gemiddelde koperkonsentrasie in die water van die blootstellingsmedium binne die bestek van 24 uur vanaf  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  na  $11.81 \pm 0.45 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem en hierna het die waarde rondom 'n gemiddeld van  $10.17 \pm 0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  gestabiliseer. Verder is genoem dat daar gedurende eksperiment 3.3 gevind is dat die blootstellingsmedium sonder proefdiere ongeveer 13% meer koper na 24 uur besit het as die mediums met proefdiere. Die afleiding kan dus gemaak word dat koper wel in, of op hierdie weefsel geakkumuleer het.

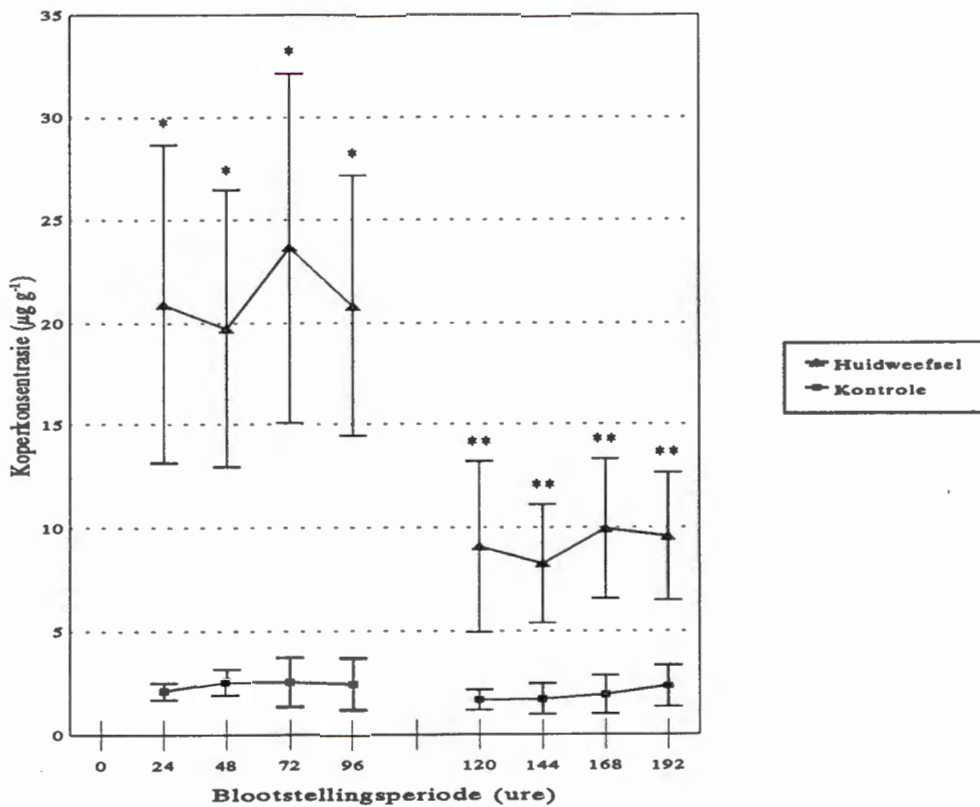
Tabel 3

'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die huid van *Xenopus laevis* tydens die akkumulasi- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die huidweefsel van blootgestelde en kontrole organismes en die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is. 'n Asterisk (★ en ★★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ ).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie			
	Kontrole organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Blootgestelde organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Kontrole medium $\mu\text{g ml}^{-1}$	Blootstellings- medium $\mu\text{g ml}^{-1}$
<b>Akkumulاسie</b> 24	2.14 ± 0.41	20.9 ± 7.75 ★	0.04 ± 0.01	11.81 ± 0.45
48	2.60 ± 0.60	19.71 ± 6.74 ★	0.04 ± 0.01	10.76 ± 0.69
72	2.57 ± 1.19	23.66 ± 8.57 ★	0.05 ± 0.01	10.09 ± 0.38
96	2.45 ± 1.26	20.80 ± 6.35 ★	0.05 ± 0.01	9.65 ± 0.42
$\bar{x}$	2.44 ± 0.87	-	0.045 ± 0.01	-
<b>Ekskresie</b> 120	1.70 ± 0.49	9.09 ± 4.12 ★★	0.04 ± 0.002	0.80 ± 0.11
144	1.74 ± 0.75	8.25 ± 2.86 ★★	0.05 ± 0.01	0.94 ± 0.1
168	1.95 ± 0.94	9.94 ± 3.38 ★★	0.05 ± 0.001	0.94 ± 0.06
192	2.37 ± 1.00	9.58 ± 3.09 ★★	0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.07
$\bar{x}$	1.94 ± 0.8	-	0.048 ± 0.01	-

### **Ekskresie-eksperiment**

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 3 en Figuur 10 weergegee. Hieruit is dit duidelik dat daar statisties betekenisvolle verskille ( $p \leq 0.05$ ) 24, 48, 72 en 96 uur, na die oorplasing van die blootgestelde organismes na kopervrye water, tussen die onderskeie blootgestelde groepe voorgekom het indien dit met die gemiddelde kontrole waarde van  $1.94 \pm 0.8 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk is.



**Figuur 10**

'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulasie- en ekskresie-eksperimente in die huidweefsel van *Xenopus laevis*, wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, gevind is. ('n Asterisk (★ en ★★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

Die gemiddelde koperkonsentrasie in die huid van blootgestelde platannas was 24 uur na oorplasing ongeveer 368% hoër as die gemiddelde kontrolle waarde ( $1.94 \pm 0.8 \mu\text{g g}^{-1}$ ), maar terselfdertyd bykans 129% laer as die gemiddelde koperkonsentrasie wat 96 uur na blootstelling gevind is, wat op statisties betekenisvolle verskille ( $p < 0.05$ ) tussen die blootgestelde groepe wat onderskeidelik die akkumulasie- en die ekskresie-eksperimente onderwerp was, dui. Die feit dat daar na 24 uur na oorplasing in kopervrye water steeds 'n hoë koperkonsentrasie in die huid van vooraf blootgestelde organismes is, dui op retensie van die swaarmetaal in hierdie weefsel, terwyl die verskil in waardes wat 96 uur na blootstelling ( $20.08 \pm 6.35 \mu\text{g g}^{-1}$ ) en 24 uur na oorplasing ( $9.09 \pm 4.12 \mu\text{g g}^{-1}$ ) gevind is, op 'n mate van vrystelling van die geakkumuleerde koper vanaf die huid dui ( $p \leq 0.05$ ).

Die afname in die koperkonsentrasie van  $20.8 \pm 6.35 \mu\text{g g}^{-1}$  (96 uur na blootstelling) tot  $9.09 \pm 4.12 \mu\text{g g}^{-1}$  (24 uur na oorplasing na kopervrye water) kan aan die volgende moontlike verskynsels toegeskryf word: die afskilfering van koperbevattende huidweefsel, die vrykorn van koperbevattende slym en/of die vrykorn van ongebinde koper. Die aansienlik hoër koperkonsentrasie in die huid na 24 uur in die kopervrye water in

vergelyking met die kontrole waarde van  $1.94 \pm 0.8 \mu\text{g g}^{-1}$ , is hoogs waarskynlik aan die retensie van koper in die huid toeskryfbaar. Hierdie retensie kan òf deur 'n proses van absorpsie òf adsorpsie verteenwoordig word.

Indien 'n vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies wat in die huidweefsel van blootgestelde organismes na 24, 48, 72 en 96 uur na oorplasing, met die gemiddelde koperkonsentrasie wat in die water van die ekskresiemedium voorgekom het, getref word, is dit opmerklik dat 'n afname in die huid se konsentrasie deur 'n toename in die medium gereflekteer word. Dit was tydens die ekskresie-eksperiment opmerklik dat die huid weer groot volumes slym geproduseer het. Tog het die epidermale laag steeds gereedlik afgeskilfer. Weens die verlies aan fragmente van die epidermis is dit moontlik dat die blootgestelde organismes op hierdie wyse groot hoeveelhede koper vry kon stel. Die afwerping van die epidermis kan eendersyds as 'n nuwe-effek wat die swaarmetaal op die huid het, en andersyds as 'n wyse waardeur daar van die geakkumuleerde koper ontslae geraak kan word, gesien word.

Volgens Lillywhite & Maderson (1988) bestaan die huid uit 'n komplekse membraanstelsel met talle obstruksies en diffusieweë waar spesifieke molekules met die omgewing uitgeruil kan word. Die deurlatendheid van 'n organisme se eksterne oppervlak is van intersellulêre aansluitings, wat op hul beurt die diffusie van hierdie molekules reguleer, afhanklik. Epidermale lipiedlae, sowel as veselryke proteïene wat in hierdie lae voorkom, is essensieel vir die effektiewe regulering van diffusie van water en ander opgeloste stowwe.

$\text{Cu}^+$  en  $\text{Cu}^{2+}$ -verbindings kompeteer met, en vervang, watermolekules om met negatiefgelaaië fosfolipiedgroepe wat in die huidlae voorkom, te reageer. Die deurlatendheid van die selmembrane vir wateroplossings varieer weens onder andere die samestelling van die membraan, sowel as die fisiese toestand waarin hierdie verbindings verkeer (Lillywhite & Maderson 1988). Indien die huidweefsel, weens die binding van koper aan hierdie fosfolipiedlae, beskadig sou word, sal die invloekoers van die gekontameneerde water toeneem, wat weer verdere skade veroorsaak. Tensy hierdie skade nie herstel kan word nie, of die verhoogde invloei van water en ione nie effektief gereguleer kan word nie, is dit waarskynlik dat die algemene fisiologie van die blootgestelde organismes nadelig beïnvloed sal word.

Verder stel bogenoemde outeurs dat die deurlatendheid van die huid 'n funksie van die osmotiese toestand van hierdie weefsel se samestellende selle is. Dié selle is weer van die deurlatendheid van die huid se eksterne oppervlak, sowel as die slymbedekking wat hier voorkom, afhanklik. In eksperimente 3.1, 3.2 en 3.3 is gesien dat organismes wat aan koper blootgestel was se huid minder slymryk as dié van die kontrole organismes voorgekom het en dat die epidermis gereedlik afgeskilfer het. Volgens Machin (1977) kom hierdie slymlaag gewoonlik by diere voor wat van die huid as absorpsie- en respirasie-organen gebruik maak. Slym word deur dermale kliere gesekreteer en word ook aangewend om die organisme teen meganiese beserings te beskerm, pH en ionuuitruiling te reguleer, bakteriële infeksies en wrywing te bekamp en uitdroging te voorkom. Indien hierdie noodsaaklike eksterne buffer verwyder sou word, sal die koers van wateropname, en noodwendig die hoeveelheid

opgeloste molekules, toeneem. Homeostatische meganismes sal hierna na alle waarskynlikheid nie meer doeltreffend kan funksioneer nie en die organisme se algemene metabolisme sal daardeur beïnvloed word (Lillywhite & Maderson 1988).

Die diffusiekoers van opgeloste molekules hang uitsluitlik van hul oplosbaarheid in die medium af (Lillywhite & Maderson 1988). In eksperiment 3.3 is bespreek dat pH 'n rol in die oplosbaarheid van koper speel: minder koperione sal in 'n medium met 'n hoër pH oplos. Ferreira & Hill (1982) het gevind dat die intersellulêre aansluitings in die huidlae deur die effek van pH-verskille, verswak word. Hierdie effek lei tot 'n toename in die deurlatendheid van die huidweefsel en hoewel hierdie weefsel aangepas is om water en ione in bepaalde konsentrasies deur te laat, kan dit, weens die konstante invloei- en uitvloeistrominge, nie die oormaat koperione wat in die medium voorkom, buite die liggaamsoppervlak hou nie. As gevolg hiervan is dit moontlik dat die platanna, wat vir lang periodes aan subletale koperkonsentrasies (of vir kort periodes aan hoër koperkonsentrasies blootgestel is), respiratoriese en/of osmoregatoriese probleme kan ontwikkel.

Die platanna se huid is ryklik van kapillêre bloedvate, wat 'n integrale rol by respiratoriese en osmoregatoriese prosesse speel, voorsien. Hierdie intensiewe sirkulasienetwerk voorsien in die metaboliese behoeftes van die aktiewe huidweefsel en verder dien dit ook as 'n transportmedium wat molekules, wat by die huidoppervlak uitgeruil is, na spesifieke organe en weefsels vervoer. Dit weer bepaal die funksionele area en die afstand waardeur diffusie en uitruiling van molekules plaasvind (Lillywhite & Maderson 1988). Voorheen (3.4.3.1) is gesien dat die gemiddelde koperkonsentrasie in die heelbloed van blootgestelde organismes wel gedurende 'n 96 uur blootstellingsperiode toegeneem het. Die moontlikheid bestaan dus dat koperione wat hierin vanuit die huidlae opgeneem is, na ander organe vervoer kon word en so tot die koperkonsentrasie in hierdie weefsels kon bydra. Die volgende eksperimente sal hierdie aanname moontlik kan substansieer.

### 3.4.3.3 Spysverteringskanaal

#### *Akkumulاسie-eksperiment*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 11 en Tabel 4 weergegee. Indien 'n gemiddeld van die kontrole waardes, wat tussen  $13.45 \pm 7.19 \mu\text{g g}^{-1}$  en  $26.77 \pm 21.48 \mu\text{g g}^{-1}$  gewissel het, bereken sou word, is dit  $17.97 \pm 11.93 \mu\text{g g}^{-1}$ . Hierdie waarde verteenwoordig die hoeveelheid koper wat onder normale toestande in die spysverteringskanale van die ondersoekte platannas voorgekom het.

Tabel 4

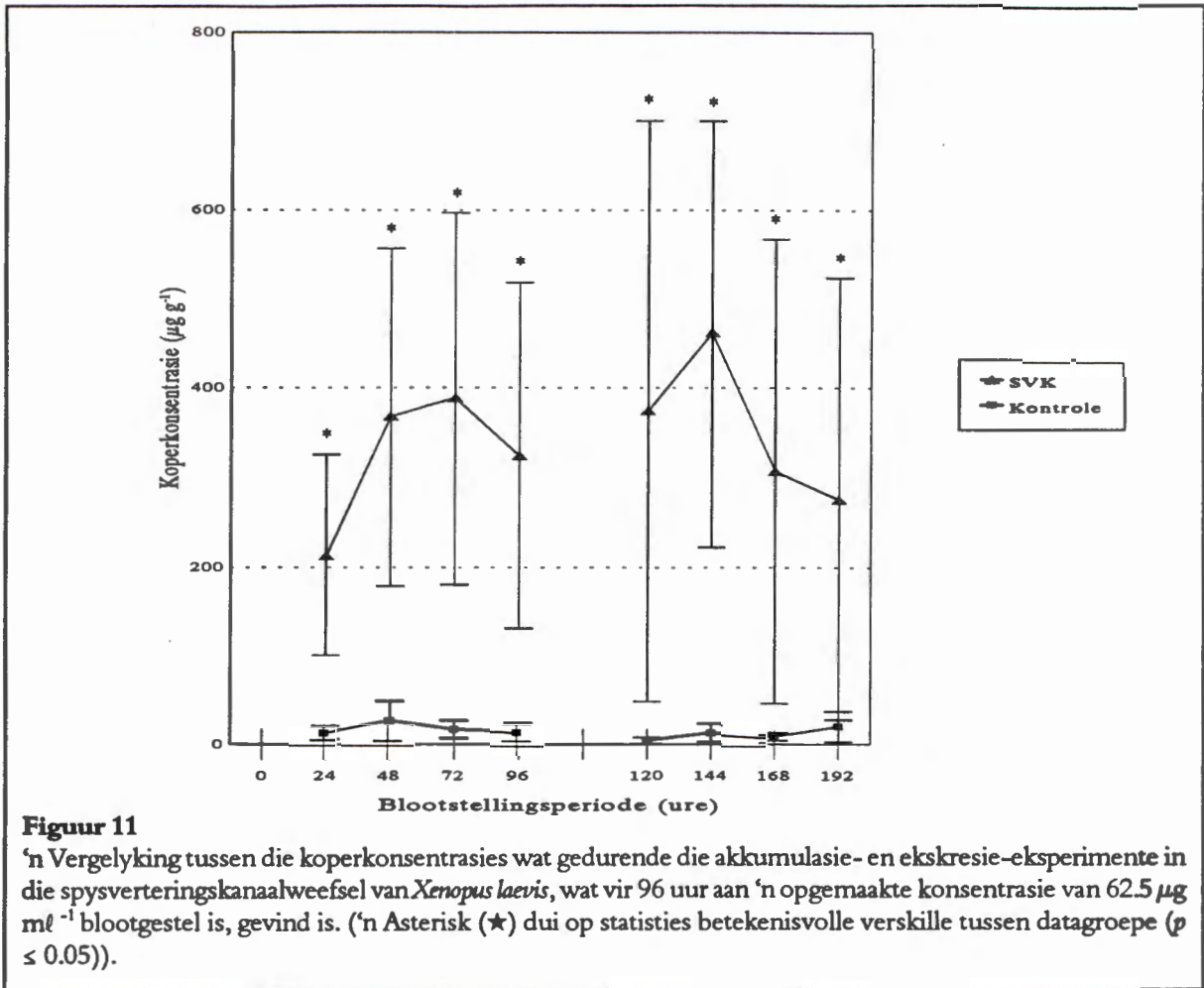
'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die spysverteringskanaal van *Xenopus laevis* tydens die akkumulasië- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die spysverteringskanaalweefsel van blootgestelde en kontrole organismes en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p < 0.05$ )).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie			
	Kontrole organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Blootgestelde organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Kontrole medium $\mu\text{g ml}^{-1}$	Blootstellings- medium $\mu\text{g ml}^{-1}$
<b>Akkumulasië</b> 24	13.45 ± 7.19	212.27 ± 112.71★	0.04 ± 0.01	11.81 ± 0.45
48	26.77 ± 21.48	367.43 ± 188.89★	0.04 ± 0.01	10.76 ± 0.69
72	16.82 ± 9.88	388.24 ± 208.34★	0.05 ± 0.01	10.09 ± 0.38
96	14.82 ± 9.17	323.73 ± 193.88★	0.05 ± 0.01	9.65 ± 0.42
$\bar{x}$	17.97 ± 11.93	-	0.045 ± 0.01	-
<b>Ekskresie</b> 120	4.61 ± 3.63	374.17 ± 326.48★	0.04 ± 0.002	0.80 ± 0.11
144	13.10 ± 9.96	461.45 ± 238.86★	0.05 ± 0.01	0.94 ± 0.1
168	8.83 ± 4.48	306.35 ± 260.65★	0.05 ± 0.001	0.94 ± 0.06
192	19.82 ± 16.95	275.18 ± 247.81★	0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.07
$\bar{x}$	11.59 ± 8.76	-	0.048 ± 0.01	-

'n Hoogs betekenisvolle ( $p < 0.05$ ) toename van koper het reeds na 24 uur in die spysverteringskanale van blootgestelde organismes voorgekom. Hiertydens is die koperkonsentrasie bykans 1 081% hoër as wat in die kontrole organismes ( $17.97 \pm 11.93 \mu\text{g g}^{-1}$ ) gevind is. Na 48 uur was hierdie waarde  $367.43 \pm 188.88 \mu\text{g g}^{-1}$ , wat 73% meer is as die koperkonsentrasie wat na 24 uur in die blootgestelde organismes se spysverteringskanale gevind is. Na 72 uur was die koperkonsentrasie slegs 5% hoër as na 48 uur en hierna het dit met 16% na  $323.73 \pm 193.88 \mu\text{g g}^{-1}$  afgeneem, wat steeds 1 701% hoër is as dit met die gemiddelde kontrole waarde van  $17.97 \pm 11.93 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk sou word.

Dit kom uit hierdie resultate voor of koper gedurende die eerste 24 uur van die akkumulasië-eksperiment die grootste blootgestelde area van die spysverteringskanaal beset het. Die toenames wat na 48 en 72 uur gevind is, dui waarskynlik op 'n verdere besetting van beskikbare blootstellingsareas wat nie tydens die eerste 24 uur met koper beset is nie. Gedurende blootstelling is 'n helderblou presipitaat op die akwariumbodem opgemerk en tydens die disseksie van die blootgestelde organismes is 'n soortgelyke substans in die spysverteringskanale gevind. Weens die verskynsel dat die blootgestelde organismes lank op die akwariumbodem voorgekom het, is

dit voorsienbaar dat groot hoeveelhede van die koperpresipitaat ingesluk is en het hierdie geïngesteerde koper tot die hoë koperkonsentrasie in hierdie weefsel bygedra.



Dit kom voor of koper na 72 uur 'n ewewig begin bereik, wat daarop dui dat koper feitlik op al die moontlike blootstellingsareas geabsorbeer het.

Indien hierdie tendens met die heelbloed (3.4.3.1) vergelyk sou word, is dit voorsienbaar dat die koperkonsentrasie in die heelbloed van die blootgestelde organismes ook sou toeneem. Tog word dit nie uit die resultate gereflekteer nie. Geen noemenswaardige toenames ( $p > 0.05$ ) in die koperkonsentrasie van die bloed is gedurende die akkumulasie- of ekskresie-eksperimente opgemerk nie. Dit kom dus voor of koper hoofsaaklik aan die spysverteringskanaalwande adsorbeer en daar akkumuleer en dat slegs 'n minimale hoeveelheid van die swaarmetaal aan die sirkulatoriese stelsel afgegee word.

In eksperiment 3.3 is gesien dat die gemiddelde koperkonsentrasie in die water van die blootstellingsmedium na slegs 24 uur vanaf die opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  na  $19.77 \pm 2.81 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem het. Die

afname van bykans 68% dui enersyds op die presipitering van koper en andersyds op die adsorpsie van die swaarmetaal aan die akwariwmwande. Geen proefdiere is gedurende hierdie eksperiment aangewend nie. Tydens die huidige eksperiment het die gemiddelde koperkonsentrasie in die water van die blootstellingsmedium binne die bestek van 24 uur vanaf die opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  na  $11.81 \pm 0.45 \mu\text{g ml}^{-1}$  afgeneem. Dit verteenwoordig 'n afname van ongeveer 81%. Indien die gemiddelde koperkonsentrasies wat gedurende die twee eksperimente, soos wat na 24 uur gevind is, vergelyk sou word, is dit duidelik dat laasgenoemde eksperiment ongeveer 40% minder koper in oplossing in die blootstellingsmedium gehad het, moontlik weens die teenwoordigheid van proefdiere, waar die koper enersyds op die huid kon akkumuleer (3.4.3.2) of andersyds geïngesteer kon word.

Verder moet daar in ag geneem word dat watermonsters by die oppervlak van die mediums geneem is en hoewel lug voortdurend deur die mediums geborrel is, die waardes nie noodwendig verteenwoordigend is van die koperkonsentrasies wat werklik rondom die organismes, wat op die akwariumbodem voorgekom het, is nie.

#### ***Ekskresie-eksperiment***

'n Betekenisvolle ( $p \leq 0.05$ ) hoë koperkonsentrasie is steeds gedurende die ekskresie-eksperiment in die spysverteringskanaalweefsel van die blootgestelde organismes, wat onderskeidelik na 24, 48, 72 en 96 uur na oorplasing na kopervrye water ondersoek is, gevind indien die gemiddelde koperkonsentrasies van die onderlinge blootgestelde groepe met die gemiddelde kontrole waarde van  $11.59 \pm 8.76 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk is.

'n Duidelike afname in die koperkonsentrasie in die spysverteringskanale van die blootgestelde organismes het na 72 uur in kopervrye water voorgekom. Hoewel die koperkonsentrasie wat 96 uur na oorplasing gevind is ( $275.18 \pm 247.81 \mu\text{g g}^{-1}$ ) bykans 40% laer is as die konsentrasie van  $461.45 \pm 238.86 \mu\text{g g}^{-1}$  wat na 48 uur na aanvang van die ekskresie-eksperiment gevind is, is eersgenoemde konsentrasie steeds 2 400% hoër as die gemiddelde kontrole koperkonsentrasie van  $11.59 \pm 8.76 \mu\text{g g}^{-1}$ . Dit kom dus voor of die koper wat gedurende die akkumulatie-eksperiment ingesluk is en in die spysverteringskanale van die blootgestelde organismes geakkumuleer het, eers na 72 uur in kopervrye water vanuit hierdie weefsel vrygestel word.

Alhoewel die verlies van koper uit die spysverteringskanaal nie verder na die 96 uur ekskresieperiode gemonitor is nie, dui die resultaat na 96 uur verkry of die koper hierna vinnig uit hierdie weefsel geëlimineer sou word. Die moontlikheid bestaan dus dat koper volkome vanuit hierdie weefsel geëkskreteer sou kon word indien die blootgestelde platannas vir 'n langer periode in kopervrye water, wat daaglik vervang was, kon voorkom. Hierdie moontlikheid kan in opvolgstudies ondersoek word.

Eksperimente met die vis *Barbus marequensis* het getoon dat die intestinumwand die hooflokaliteit vir die neerlegging van koper is (Van Vuren *et al.* 1994). Volgens Mertz (1987) bestaan die moontlikheid dat koper in

al die dele van 'n organisme se spysverteringskanaal geabsorbeer kan word en, hoewel die intestinum veral hier van groot belang is, kan die maag en kolon ook tot 'n mindere mate van die swaarmetaal absorbeer. Die hoë koperkonsentrasies wat dus deurgaans in die spysverteringskanaalweefsel van blootgestelde platannas gevind is, kan dus ook aan die hand van hierdie resultate gesubstansieer word. Dit wil tog uit die resultate van die koperkonsentrasies wat in die heelbloed van blootgestelde organismes (3.4.3.1) voorgekom het, blyk dat absorpsie nie so 'n groot rol gedurende die 96 uur blootstellings- en ekskresieperiodes speel nie weens die lae koperkonsentrasies wat gedurende hierdie eksperimente in die bloed gevind is.

Intestinale absorpsie word grootliks deur die organismes se voedingstatus, sowel as die chemiese spesie waarin die metaal voorkom, beïnvloed. Cunnane, Horrobin & Manku (1985) het gevind dat metallotioniene, wat swaarmetale deur middel van detoksifisering reguleer, in die epiteelselle van die intestinum voorkom en 'n rol tydens die regulering van geïngesteerde koper speel. Wanneer die swaarmetaal aan hierdie proteïene bind, vorm 'n inerte kompleks wat die metaaltoksisiteit laat afneem. Hoewel dit nie bekend is of hierdie prosesse in *Xenopus laevis* plaasvind nie, kan 'n verklaring hieruit gewaag word: dit is moontlik dat koper, wat in hoë konsentrasies in die spysverteringskanaalweefsel van blootgestelde platannas voorgekom het, min, of selfs geen, sigbare toksiese of skadelike effekte gedurende subletale blootstelling oor die 96 uur blootstellingsperiode veroorsaak het nie.

Goldstine, Manickavel & Cohen (1975) het verder gevind dat die epiteelselle wat die spysverteringskanaal, en veral die intestinum, uitvoer, onder normale toestande gereeld afgewerp en geëkskretreer word. Of die ekskresie van hierdie koperbevattende epiteelselle vanuit die spysverteringskanale van vooraf blootgestelde organismes vir die toename in die koperkonsentrasie van die aanvanklik koper-vrye ekskresiemedium verantwoordelik is, is nie bekend nie.

Die toename in die koperkonsentrasie van die ekskresiemedium waarin die vooraf blootgestelde organismes in oorgeplaas is, het na 24 uur vanaf 'n gemiddelde kontrole waarde van  $0.05 \pm 0.01 \mu\text{g ml}^{-1}$  na  $0.8 \pm 0.11 \mu\text{g ml}^{-1}$  toegeneem. Dit is 'n toename van bykans 1 900% en kan eensyds aan die verlies van koper vanaf die blootgestelde huid tydens oorplasing en andersyds weens ekskresie vanuit die spysverteringskanaal toegeskryf word.

#### 3.4.3.4 Longweefsel

##### *Akkumulatie-eksperiment*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 12 en Tabel 5 weergegee. Hieruit is dit duidelik dat die koperkonsentrasie in die longweefsel van kontrole organismes tussen  $3.54 \pm 1.78 \mu\text{g g}^{-1}$  en  $9.06 \pm 6.54 \mu\text{g g}^{-1}$  gewissel het. Indien 'n gemiddeld van die waardes soos na 24, 48, 72 en 96 uur gevind, bereken sou word, is 'n

waarde van  $6.7 \pm 3.84 \mu\text{g g}^{-1}$  gevind. Hierdie waarde verteenwoordig die hoeveelheid koper wat normaalweg as spoorelement in die longe van die kontrole organismes wat gedurende hierdie eksperiment ondersoek is, voorgekom het.

Wat die blootgestelde organismes betref, is dit duidelik dat daar reeds na 24 uur 'n betekenisvolle ( $p < 0.05$ ) toename van 112% in die koperkonsentrasie is indien dit met die gemiddelde koperkonsentrasie van  $6.7 \pm 3.84 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk sou word. Na 'n blootstellingsperiode van 48 uur is 'n gemiddelde koperkonsentrasie van  $17.07 \pm 4.52 \mu\text{g g}^{-1}$  gevind wat ongeveer 20% hoër was as die waarde van  $14.22 \pm 5.28 \mu\text{g g}^{-1}$  wat na 24 uur voorgekom het. Na 72 uur was die waarde 11% meer as na 48 uur, terwyl dit na 96 uur weer na  $17.82 \pm 5.31 \mu\text{g g}^{-1}$  afgeneem het, wat op 'n afname van 6% dui.

Dit wil uit die gegewens voorkom of koper in die longweefsel van blootgestelde organismes adsorbeer en dat feitlik al die blootgestelde areas binne die eerste 24 uur met koper beset is. Verder is dit moontlik dat die koperkonsentrasie na 'n 24 uur blootstellingsperiode 'n ewewig in die longe bereik. In so 'n geval is dit voorsienbaar dat die koperkonsentrasie in die heël bloed van die blootgestelde organismes gedurende die blootstellingsperiode aansienlik sal toeneem. Die koperkonsentrasie wat egter in die bloed gevind is (3.4.3.1), ondersteun hierdie afleiding net deels weens die feit dat hierdie konsentrasie geen noemenswaardige toenames ( $p \geq 0.05$ ) getoon het nie.

### ***Ekskresie-eksperiment***

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 12 en Tabel 5 aangetoon. Dit is duidelik dat geen noemenswaardige afname ( $p \geq 0.05$ ) in die koperkonsentrasie in die longweefsel van die vooraf blootgestelde organismes voorgekom het nie. Alhoewel die laagste konsentrasie van  $13.86 \pm 5.28 \mu\text{g g}^{-1}$  sowat 27% minder is as die hoogste konsentrasie wat na 72 uur ( $18.97 \pm 3.51 \mu\text{g g}^{-1}$ ) gedurende die akkumulatie-eksperiment gevind is, is dit steeds 431% meer as die gemiddelde kontrole waarde van  $2.61 \pm 2.07 \mu\text{g g}^{-1}$ , wat bereken is deur die kontrole koperkonsentrasies, soos wat na 24, 48, 72 en 96 uur gevind is, te vergelyk. Hierdie bevinding wil die aanname dat koper tydens 'n proses van adsorpsie op, of in die longe akkumuleer, sterk ondersteun.

Indien die bloed 'n rol sou speel om die genoemde ewewigsreaksie tot stand te bring, sou dit logies wees om te verwag dat die koperkonsentrasie in die longe relatief vinnig sou afneem nadat die vooraf blootgestelde organismes in 'n koper-vrye omgewing oorgeplaas is. In teenstelling hiermee sou daar steeds 'n toename in die heël bloed koper konsentrasie voorkom. Dit blyk egter nie die geval te wees nie (3.4.3.1) en kan daar dus met 'n rede like mate van sekerheid aangeneem word dat die koper via 'n adsorpsieproses op, of in die longe akkumuleer.

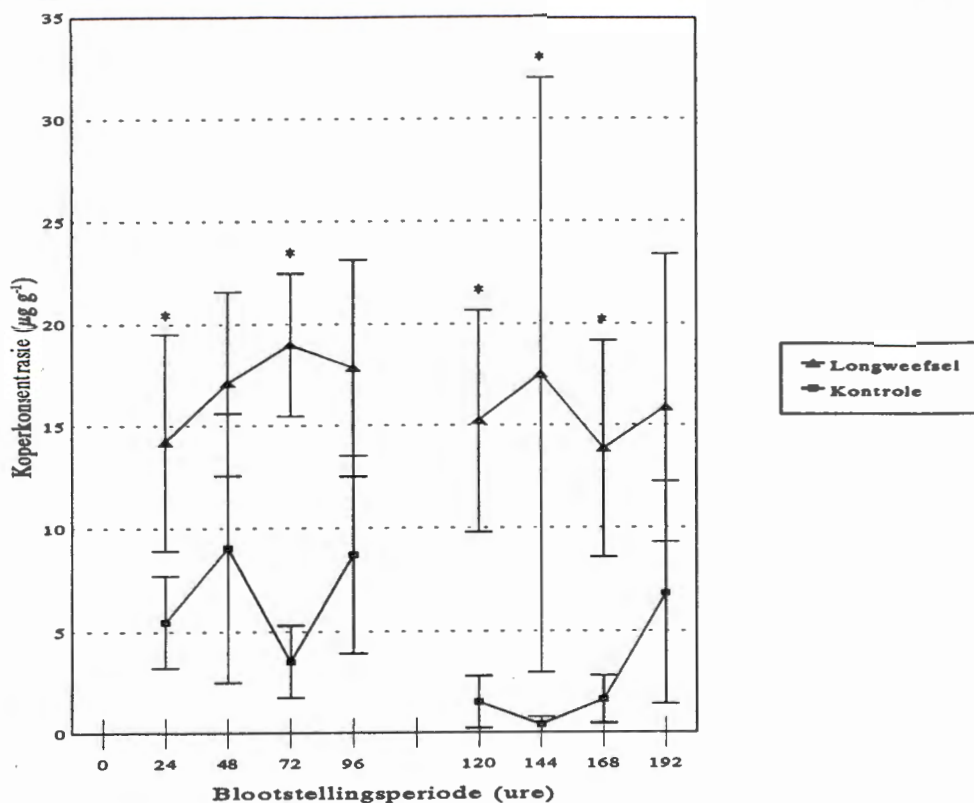
Tabel 5

'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die longweefsel van *Xenopus laevis* tydens die akkumulasië- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die longweefsel van blootgestelde en kontrole organismes en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is. (n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie			
	Kontrole organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Blootgestelde organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Kontrole medium $\mu\text{g ml}^{-1}$	Blootstellings- medium $\mu\text{g ml}^{-1}$
<b>Akkumulasië</b> 24	5.48 ± 2.24	14.22 ± 5.28 ★	0.04 ± 0.01	11.81 ± 0.45
48	9.06 ± 6.54	17.07 ± 4.52	0.04 ± 0.01	10.76 ± 0.69
72	3.54 ± 1.78	18.97 ± 3.51 ★	0.05 ± 0.01	10.09 ± 0.38
96	8.73 ± 4.79	17.82 ± 5.31	0.05 ± 0.01	9.65 ± 0.42
$\bar{x}$	6.70 ± 3.84	-	0.045 ± 0.01	-
<b>Ekskresie</b> 120	1.53 ± 1.29	15.23 ± 5.43 ★	0.04 ± 0.002	0.80 ± 0.11
144	0.4 ± 0.39	17.50 ± 14.5 ★	0.05 ± 0.01	0.94 ± 0.1
168	1.65 ± 1.19	13.86 ± 5.28 ★	0.05 ± 0.001	0.94 ± 0.06
192	6.84 ± 5.41	15.85 ± 6.54	0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.07
$\bar{x}$	2.61 ± 2.07	-	0.048 ± 0.01	-

Indien die bloed 'n rol sou speel om die genoemde ewewigsreaksie tot stand te bring, sou dit logies wees om te verwag dat die koperkonsentrasie in die longe relatief vinnig sou afneem nadat die vooraf blootgestelde organismes in 'n koper-vrye omgewing oorgeplaas is. In teenstelling hiermee sou daar steeds 'n toename in die heëlbloedkoperkonsentrasie voorkom. Dit blyk egter nie die geval te wees nie (3.4.3.1) en kan daar dus met 'n redelike mate van sekerheid aangeneem word dat die koper via 'n adsorpsieproses op of in die longe akkumuleer.

Volgens Pattle, Schock, Creasy & Hughes (1977) is die amfibieërlong 'n eenvoudige sakstruktuur wat intern deur septums (trabekulas), wat die long 'n alveolêre voorkoms gee, verdeel word. Die laterale wande van hierdie septums, sowel as die streke tussen die septumbasisse, is bloedvatryk en dit word met diggepakte silinderepiteel, wat mikrovilli (wat die gaswisselingsoppervlak aansienlik vergroot) bevat, sowel as gelamineerde osmiofiele selle uitgevoer. Laasgenoemde selle tree as intrasellulêre surfaktante op wat die oppervlakspanning in die long ophef. Hierdie fosfolipiedbevattende selle kom veral in die epiteelarea van die lug-bloedgrens, waar gaswisseling plaasvind, voor.



**Figuur 12**

'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulasië- en ekskresie-eksperimente in die longweefsel van *Xenopus laevis*, wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

Soos reeds in 3.4.3.2 bespreek, bind koperione aan negatiefgelaaide fosfolipiedgroepe (Lillywhite & Maderson 1988) en weens hierdie verskynsel is dit dus moontlik dat koper gedurende blootstelling aan hierdie surfaktantlaag kon adsorbeer en hiertydens in hoë konsentrasies in die longweefsel van blootgestelde platannas akkumuleer.

### 3.4.3.5 Nierweefsel

#### *Akkumulasië-eksperiment*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 6 en Figuur 13 weergegee. Nadat die onderskeie kontrolle koperkonsentrasies, soos na 24, 48, 72 en 96 uur verkry is, vergelyk is, is 'n gemiddelde konsentrasie van  $8.82 \pm 3.52 \mu\text{g g}^{-1}$  gevind. Hierdie waarde het nie betekenisvol ( $p \geq 0.05$ ) van die koperkonsentrasie wat na 24 uur in die nierweefsel van blootgestelde organismes ( $18.79 \pm 7.93 \mu\text{g g}^{-1}$ ) verskil nie, maar was wel ongeveer 113% laer as hierdie waarde, wat op opname van die swaarmetaal gedurende hierdie periode dui.

Tabel 6

'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die nierweefsel van *Xenopus laevis* tydens die akkumulasi- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies in die nierweefsel van blootgestelde en kontrole organismes en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie			
	Kontrole organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Blootgestelde organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Kontrole medium $\mu\text{g ml}^{-1}$	Blootstellings- medium $\mu\text{g ml}^{-1}$
<b>Akkumulasi- 24</b>	8.57 ± 3.02	18.79 ± 7.93	0.04 ± 0.01	11.81 ± 0.45
<b>48</b>	9.08 ± 1.39	28.80 ± 14.18 ★	0.04 ± 0.01	10.76 ± 0.69
<b>72</b>	6.85 ± 3.16	34.83 ± 9.97 ★	0.05 ± 0.01	10.09 ± 0.38
<b>96</b>	10.77 ± 6.51	29.99 ± 19.52	0.05 ± 0.01	9.65 ± 0.42
$\bar{x}$	8.82 ± 3.52	-	0.045 ± 0.01	-
<b>Ekskresie 120</b>	2.68 ± 0.84	23.75 ± 10.37 ★	0.04 ± 0.002	0.80 ± 0.11
<b>144</b>	2.08 ± 0.77	26.09 ± 11.17 ★	0.05 ± 0.01	0.94 ± 0.1
<b>168</b>	5.85 ± 3.09	22.62 ± 7.57 ★	0.05 ± 0.001	0.94 ± 0.06
<b>192</b>	10.22 ± 7.42	20.78 ± 4.99 ★	0.05 ± 0.01	0.99 ± 0.07
$\bar{x}$	5.14 ± 3.03	-	0.048 ± 0.01	-

'n Betekenisvolle toename ( $p \leq 0.05$ ) in die koperkonsentrasie in die niere van blootgestelde organismes van ongeveer 53% is na 48 uur gevind ( $28.8 \pm 14.18 \mu\text{g g}^{-1}$ ) indien dit met die koperkonsentrasie wat na 24 uur voorgekom het, vergelyk sou word. Hierdie waarde verteenwoordig ongeveer 226% meer koper in die niere van blootgestelde platannas indien dit met die gemiddelde konsentrasie wat in die kontrole organismes se niere voorgekom het, vergelyk word. Hierna neem die konsentrasie in die blootgestelde niere met 'n verdere 21% toe ( $34.83 \pm 9.97 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Alhoewel die koperkonsentrasie in die blootgestelde niere na 96 uur ( $29.99 \pm 19.52 \mu\text{g g}^{-1}$ ) met ongeveer 14% van die konsentrasie wat na 72 uur gevind is, afgeneem het, bevat dit steeds 246% meer koper as die kontrole nierweefsel ( $8.82 \pm 3.52 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

Dit kom dus uit die resultate voor asof koper reeds gedurende die eerste 24 uur in hoë konsentrasies in die niere van blootgestelde organismes akkumuleer en dat dit vir die eerste 72 uur gehandhaaf word. Die afname wat na 96 uur gevind is, mag die resultaat van aktiewe uitskeiding van koper saam met die uriene en/of die herabsorpsie van koperione terug na die bloed, verteenwoordig.

### ***Ekskresie-eksperiment***

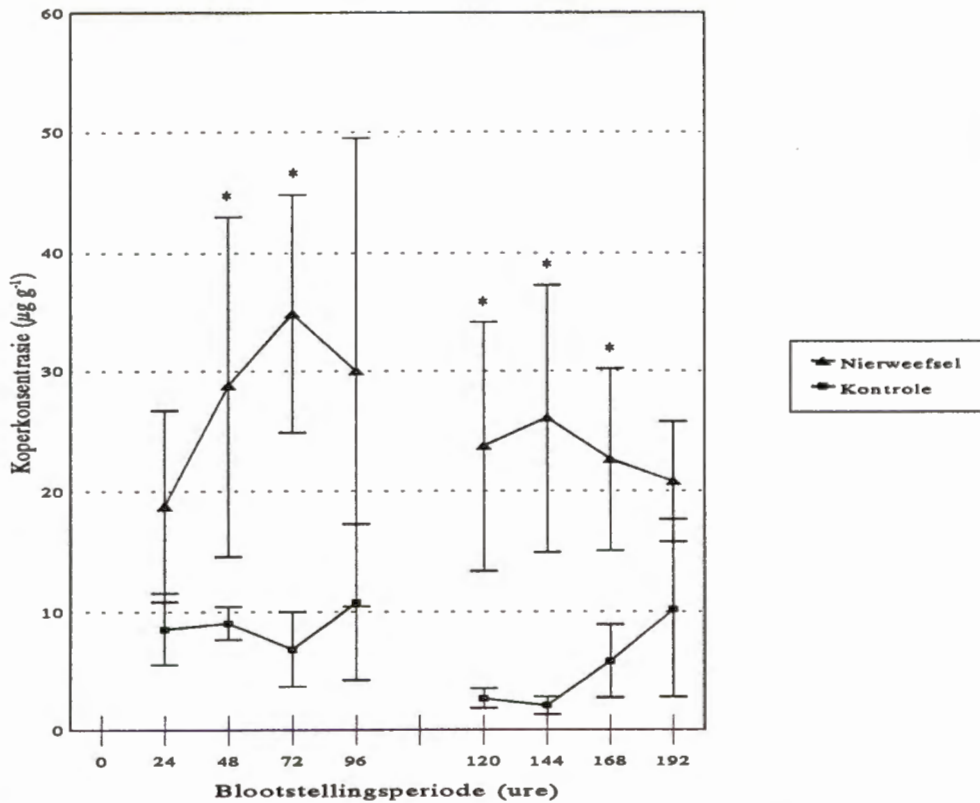
Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 6 en Figuur 13 aangedui. 'n Gemiddelde kontrole koperkonsentrasie van  $5.14 \pm 3.03 \mu\text{g g}^{-1}$  is gevind deur die onderskeie kontrole waardes, soos wat na 24, 48, 72 en 96 uur te sommeer en die gemiddeld te bereken. Hierdie waarde verteenwoordig die koperkonsentrasie wat onder normale omstandighede in die niere van kontrole platannas voorkom.

Wat die blootgestelde weefsels betref, is dit opmerklik dat die koperkonsentrasie wat 24 uur na oorplasing na kopervrye water gevind is ( $23.75 \pm 10.37 \mu\text{g g}^{-1}$ ) betekenisvol van die konsentrasie wat na 'n 96 uur blootstellingsperiode gevind is ( $29.99 \pm 19.52 \mu\text{g g}^{-1}$ ), verskil ( $p \leq 0.05$ ). Dit is duidelik dat koper gedurende die eerste 24 uur van die ekskresieperiode vanuit die blootgestelde niere vrygestel word. Betekenisvolle verskille ( $p \leq 0.05$ ) is tussen die koperkonsentrasie wat na 24 uur na oorplasing in die niere van blootgestelde platannas ( $23.75 \pm 10.37 \mu\text{g g}^{-1}$ ) en die gemiddelde kontrole waarde van  $5.14 \pm 3.03 \mu\text{g g}^{-1}$  gevind.

Na 48 uur neem die koperkonsentrasie in die blootgestelde niere ( $26.09 \pm 11.17 \mu\text{g g}^{-1}$ ) met 10% toe as dit met die konsentrasie wat na 24 uur in die niere van die blootgestelde platannas voorgekom het, vergelyk sou word. Hierdie waarde verteenwoordig ongeveer 408% meer koper in die niere van blootgestelde organismes as dié van die kontrole platannas ( $p \leq 0.05$ ). Alhoewel die koperkonsentrasie wat na 72 uur in die nierweefsel van blootgestelde organismes ( $22.62 \pm 7.57 \mu\text{g g}^{-1}$ ) steeds betekenisvol meer (340%) as dié van die gemiddelde kontrole waarde was, het dit met ongeveer 13% afgeneem indien dit met die konsentrasie wat na 48 uur in die niere van blootgestelde organismes voorgekom het, vergelyk sou word.

Na 96 uur het die koperkonsentrasie ( $20.78 \pm 4.99 \mu\text{g g}^{-1}$ ) met 'n verdere 8% afgeneem indien dit met die waarde na 72 uur ( $22.62 \pm 7.57 \mu\text{g g}^{-1}$ ) vergelyk word. Laasgenoemde afname is egter nie betekenisvol nie ( $p \geq 0.05$ ) en is dit riskant om af te lei dat koper wel aktief na 96 uur in die ekskresiemedium vrygestel word. Verlies van koper uit die nierweefsel na buite dra waarskynlik baie min tot die toename in die koperkonsentrasie van die ekskresiemedium by.

Harvey (1974) en Noble (1954) stel dat die nier 'n ekskretoriese- en regulatoriese orgaan is wat 'n hoofrol tydens die handhawing van die kenmerkende bestendigheid van die samestelling van liggaamsvloeistowwe speel. Die outeurs noem verder dat die uriene van varswateramfibieërs hoofsaaklik hipotonies ten opsigte van hul bloed is



**Figuur 13**

'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulasie- en ekskresie-eksperimente in die nierweefsel van *Xenopus laevis*, wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p \leq 0.05$ )).

weens die gebrek aan 'n tipiese Henlé-buig in die niernefron. Verder is die organisme normaalweg hipertonies ten opsigte van sy omgewing, wat beteken dat die liggaam soute terughou en 'n groot volume verdunde uriene produseer (Schmidt-Nielsen 1990). Die gebrek aan betekenisvolle afnames tydens die ekskresieperiode word moontlik deur hierdie fisiologiese verskynsel verklaar.

Uit die literatuur is dit duidelik dat die nier skadelike stowwe en die oormaat soute en water in die liggaam reguleer (Noble 1954; Storer *et al.* 1971) en kan die teenwoordigheid van swaarmetale die effektiwiteit van die uitskeidingstelsel affekteer. Mertz (1987) het in eksperimente met visse wat aan kadmium blootgestel is, vasgestel dat die metaal in die proksimaal gekronkelde buise van die niernefron akkumuleer en dat dit herabsorpsie van noodsaaklike verbindings, soos soute en water, nadelig beïnvloed. Volgens die outeur lei hierdie verskynsel gewoonlik tot totale nierversaking by hierdie akwatiese organismes. Dit is dus die sekondêre effekte, en nie die metaal as sodanig, wat vir die dooë van blootgestelde organismes verantwoordelik is. Of koper gedurende die blootstellingseksperiment in die nierbuise van *Xenopus* adsorbeer, is onbekend.

Schmidt-Nielsen (1990) stel dat die kapillêrewand van die glomerulus van die Malpighi-liggaam, wat deel van die niernefron uitmaak, slegs molekules wat kleiner as 70 000 dalton is, na die proksimaal gekronkelde nierbuisies deurlaat. Koper het, volgens Piscator (1979), 'n molekulêre massa van 63.5 dalton en kan dus geredelik tydens die proses van ultrafiltrasie deur die dunwandige kapillêre-bloedvat en Bowmankapsel-epiteel beweeg en sodoende in die proksimale buis opgeneem word. Volgens Camner, Clarkson & Nordberg (1979) bevat die glomerulêre ultrafiltraat spesifieke ione en plasmaverbindings waarvan die groottes varieer. Metallotionienkomplekse (of proteïen-metaalkomplekse) het ook 'n relatief lae molekulêre massa en kan dus geredelik deur die glomerulêre membraan beweeg. Metale wat op hierdie wyse gebind is, kan so toegang tot die niernefron verkry en daar akkumuleer. Soos in die vorige paragraaf genoem, kan hierdie geakkumuleerde metale die herabsorpsie van ander essensiële verbindinge teëwerk en sodoende nierversaking tot gevolg hê.

Volgens Magos & Clarkson (1977) kan die nefronepiteelselle weens die teenwoordigheid van 'n swaarmetaal afgewerp word en saam met ander metaboliese afvalstowwe in die groot volume verdunde uriene geëkskretêr word. Dit sou beteken dat die koper wat in die epiteel van die gekronkelde buise van die niernefron gedurende die akkumulatie-eksperiment opgeneem is, op hierdie wyse gedurende die ekskresie-eksperiment vrygestel kon word. Of dit wel tydens hierdie studie die geval is, is nie bekend nie.

Swaarmetale word hoofsaaklik deur die gal, en tot 'n mindere mate deur uriene, uitgeskei en sal die verwydering van die kontaminant 'n proses van herstel inisieer, tensy die organisme reeds onherstelbare weefselkade opgedoen het (Piscator 1979). Uit die resultate van hierdie eksperiment kom dit dus voor of die blootgestelde organismes wel na 'n 96 uur ekskresieperiode van die geakkumuleerde koper begin vrystel, wat op die aanvang van 'n herstelproses dui. Dit is moontlik dat 'n langer ekskresieperiode (veel langer as wat tydens hierdie eksperiment aangewend is) tot 'n groter afname in die koperkonsentrasie in die nierweefsel van blootgestelde organismes sal lei.

### **3.4.3.6 Lewerweefsel**

#### ***Akkumulatie-eksperiment***

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 7 en Figuur 14 aangetoon. Dit is hieruit duidelik dat die gemiddelde koperkonsentrasie in die lewerweefsel van kontrole organismes tussen  $5.25 \pm 2.50 \mu\text{g g}^{-1}$  en  $19.34 \pm 18.22 \mu\text{g g}^{-1}$  gewissel het. Indien 'n gemiddelde van hierdie waardes, soos na 24, 48, 72 en 96 uur gevind, bereken sou word, is dit  $11.73 \pm 7.14 \mu\text{g g}^{-1}$ . Hierdie waarde verteenwoordig die koperkonsentrasie wat onder normale omstandighede in die lewers van die kontrole platannas voorkom.

Die koperkonsentrasie in die lewers van blootgestelde organismes het reeds na 'n 24 uur blootstellingsperiode 'n betekenisvolle toename ( $p < 0.05$ ) van bykans 215% getoon ( $36.93 \pm 19.43 \mu\text{g g}^{-1}$ ) indien dit met die gemiddelde kontrole waarde van  $11.73 \pm 7.14 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk sou word. Agt-en-veertig uur na aanvangs van die akkumulatie-eksperiment het die koperkonsentrasie in die lewers van die blootgestelde platannas na  $50.31 \pm 28.66 \mu\text{g g}^{-1}$  toegeneem, wat 'n toename van 36% vanaf 24 uur verteenwoordig.

Na 72 uur was die gemiddelde koperkonsentrasie  $15.55 \pm 6.82 \mu\text{g g}^{-1}$ , 224% laer as die konsentrasie wat na 48 uur in die lewers van blootgestelde organismes gevind is ( $p > 0.05$ ). 'n Onbeduidende toename van 13% in die koperkonsentrasie in die lewerweefsel van die blootgestelde organismes ( $17.79 \pm 7.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) het na 'n 96 uur blootstellingsperiode voorgekom.

Dit kom uit hierdie gegewens voor of koper gedurende die eerste 48 uur van blootstelling in hoër konsentrasies in die lewerweefsel van blootgestelde organismes akkumuleer en daarna uit die lewer vrykom.

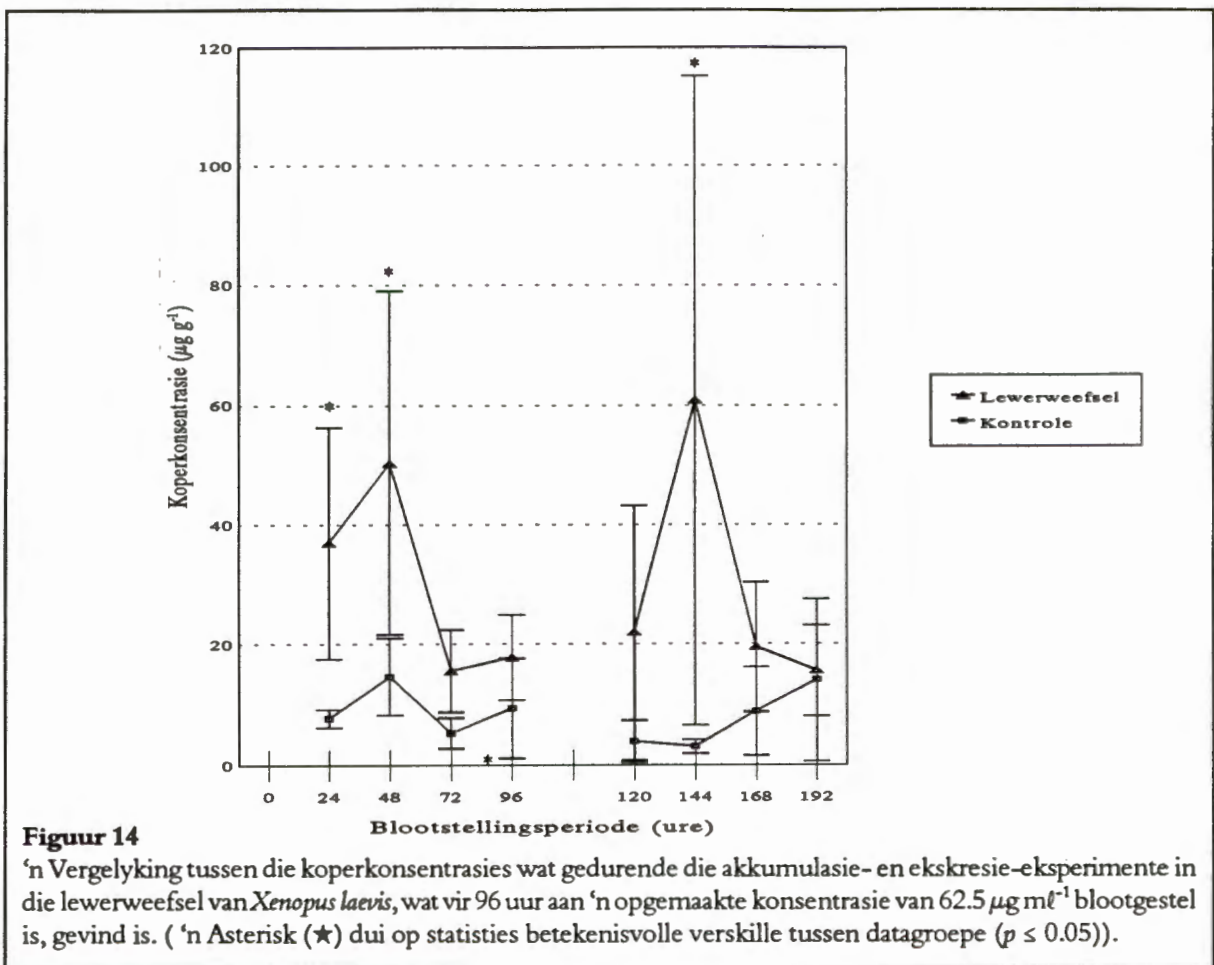
**Tabel 7**

'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die lewerweefsel van *Xenopus laevis* tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die lewerweefsels van blootgestelde en kontrole organismes en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p < 0.05$ )).

Blootstellings- periode (ure)	Koperkonsentrasie			
	Kontrole organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Blootgestelde organismes (n=20) $\mu\text{g g}^{-1}$	Kontrole medium $\mu\text{g ml}^{-1}$	Blootstellings- medium $\mu\text{g ml}^{-1}$
<b>Akkumulatie</b>				
24	$7.70 \pm 1.49$	$36.93 \pm 19.43 \star$	$0.04 \pm 0.01$	$11.81 \pm 0.45$
48	$14.61 \pm 6.36$	$50.31 \pm 28.66 \star$	$0.04 \pm 0.01$	$10.76 \pm 0.69$
72	$5.25 \pm 2.50$	$15.55 \pm 6.82 \star$	$0.05 \pm 0.01$	$10.09 \pm 0.38$
96	$19.34 \pm 18.22$	$17.79 \pm 7.08$	$0.05 \pm 0.01$	$9.65 \pm 0.42$
$\bar{x}$	$11.73 \pm 7.14$	-	$0.045 \pm 0.01$	-
<b>Ekskresie</b>				
120	$3.90 \pm 3.45$	$22.01 \pm 21.18$	$0.04 \pm 0.002$	$0.80 \pm 0.11$
144	$3.05 \pm 1.15$	$60.88 \pm 54.36 \star$	$0.05 \pm 0.01$	$0.94 \pm 0.1$
168	$8.85 \pm 7.29$	$19.51 \pm 10.78$	$0.05 \pm 0.001$	$0.94 \pm 0.06$
192	$14.06 \pm 13.4$	$15.56 \pm 7.52$	$0.05 \pm 0.01$	$0.99 \pm 0.07$
$\bar{x}$	$7.47 \pm 6.32$	-	$0.048 \pm 0.01$	-

### Ekskresie-eksperiment

Die resultate van hierdie eksperiment word in Tabel 7 en Figuur 14 weergegee. Dit is hieruit duidelik dat die koperkonsentrasie in die lewerweefsel van die blootgestelde organismes na 'n 24 uur ekskresieperiode ( $22.01 \pm 21.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) geen noemenswaardige verskille ( $p \geq 0.05$ ) getoon het indien dit met die koperkonsentrasies wat na onderskeidelik 72 en 96 uur ( $15.55 \pm 6.82 \mu\text{g g}^{-1}$ ,  $17.79 \pm 7.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) tydens die akkumulatie-eksperiment gevind is, vergelyk is nie. Die koperkonsentrasie wat na 24 uur na oorplasing na kopervrye water in die lewers van die vooraf blootgestelde platannas gevind is, het ook geen betekenisvolle toename ( $p \geq 0.05$ ) getoon indien dit met die gemiddelde kontrole waarde van  $7.47 \pm 6.32 \mu\text{g g}^{-1}$  vergelyk sou word nie. Alhoewel daar geen statisties betekenisvolle verskille gevind is nie, is hierdie waarde bykans 194% hoër as die gemiddelde kontrole waarde.



**Figuur 14**

'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die lewerweefsel van *Xenopus laevis*, wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, gevind is. ('n Asterisk (★) dui op statisties betekenisvolle verskille tussen datagroepe ( $p < 0.05$ )).

'n Betekenisvolle toename ( $p < 0.05$ ) in die koperkonsentrasie van bykans 177% is na 48 uur in die vooraf blootgestelde organismes se lewers gevind, indien dit met die gemiddelde koperkonsentrasie van  $22.01 \pm 21.18 \mu\text{g g}^{-1}$ , wat 24 uur na oorplasing na kopervrye water in die blootgestelde weefsel verkry is, vergelyk sou word. Hierdie waarde is 715% hoër as die gemiddelde kontrole waarde van  $7.47 \pm 6.32 \mu\text{g g}^{-1}$ . Na 72 uur het die konsentrasie met ongeveer 212% afgeneem na  $19.51 \pm 10.78 \mu\text{g g}^{-1}$  en hierna weer met 'n verdere 20% na  $15.56$

$\pm 7.52 \mu\text{g g}^{-1}$ . Laasgenoemde twee waardes het geen betekenisvolle verskille ( $p \geq 0.05$ ) getoon indien dit met die gemiddelde kontrole waarde vergelyk word nie. Alhoewel die laagste konsentrasie van  $15.56 \pm 7.52 \mu\text{g g}^{-1}$ , wat na 96 uur voorgekom het, ongeveer 291% laer is as die koperkonsentrasie wat na 48 uur na oorplasing gevind is ( $60.88 \pm 54.36 \mu\text{g g}^{-1}$ ), is dit steeds 108% hoër as die gemiddelde kontrole waarde van  $7.47 \pm 6.32 \mu\text{g g}^{-1}$ , wat op akkumulاسie van die swaarmetaal in die lewer dui.

Dit is voorheen genoem dat daar 'n moontlikheid bestaan dat die lewer deur die een of ander reinigings- of detoksifiseringmeganisme van die hoër konsentrasie koper vanuit hierdie weefsel ontslae raak. Vanweë die gebrek aan betekenisvolle verskille wat na 24 uur tydens die ekskresieperiode voorgekom het, kom dit voor of daar reeds tydens die akkumulاسie-eksperiment van die geakkumuleerde koper vrygestel is. Die drastiese toename in die koperkonsentrasie wat na 48 uur gedurende die ekskresieperiode gevind is en wat tot betekenisvolle verskille tussen die onderskeie datagroepegelei het, is onverwags en die rede(s) daarvoor onbekend. 'n Moontlike afleiding wat gewaag kan word is dat koper, wat vanuit ander weefsels vrygestel word, in die lewer geakkumuleer word deur òf aan metallotioniene te bind òf aan die lewerweefsel te adsorbeer. Die koperkonsentrasies in die heelbloed, spysverteringskanaal-, long- en nierweefsel (3.4.3.1, 3.4.3.3, 3.4.3.4 en 3.4.3.5) toon elk onderskeidelik toenames vir hierdie bepaalde periode, wat op 'n algehele toename van koper in die blootgestelde organismes se liggame dui. Dit is dus moontlik dat die lewer tydens hierdie periode 'n oormaat koper via die bloed vanaf hierdie organe kon ontvang en die swaarmetaal kon akkumuleer.

Die afnames in die koperkonsentrasie wat na onderskeidelik 72 en 96 uur in die vooraf blootgestelde lewerweefsel gevind is, en die gebrek aan betekenisvolle verskille tussen koperkonsentrasies van die blootgestelde en kontrole weefsels, dui op die begin van vrystelling van koper vanuit die lewer. Hierdie afname is 'n herhaling van wat tydens die akkumulاسieperiode plaasvind en dui moontlik daarop dat aktiewe metabolisering van koper in die lewer plaasvind nadat die koperkonsentrasie tot bokant 'n bepaalde drempelwaarde toeneem.

Heng Lee & Stuebing (1990) het in studies met *Bufo juxtasper* en *Bufo marinus* gevind dat die lewers van blootgestelde organismes onderskeidelik  $1\ 020$  en  $2\ 000 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper bevat het. Soos in die inleiding gencem (3.4.1), is die lewer by die metabolisme van swaarmetale, waaronder koper, betrokke (Klaassen 1976). Die teenwoordigheid van hierdie metaal in die lewer reflekteer die mate waarin dit vanuit die omgewing opgeneem word, sowel as die normale koperstatus van die organisme, dit wil sê die konsentrasie koper wat die organisme vir normale fisiologiese prosesse benodig (Heng Lee & Stuebing 1990). Hierdie koperkonsentrasie kan in die gemiddelde waardes wat tydens beide die akkumulاسie- ( $11.73 \pm 7.14 \mu\text{g g}^{-1}$ ) en ekskresie-eksperimente ( $7.47 \pm 6.32 \mu\text{g g}^{-1}$ ) in die lewerweefsel van die kontrole platanna (Tabel 7) gevind is, gesien word.

Volgens Piscator (1979) word koper hoofsaaklik na opname in die lewer en skeletspiere geberg. Studies deur Saltman, Aley & McCornack (1959) het getoon dat die opname van koper in die lewer relatief vinnig plaasvind,

wat as 'n verduideliking vir die hoë gemiddelde koperkonsentrasie wat na 'n blootstellingsperiode van slegs 24 uur in die lewerweefsel van blootgestelde organismes waargeneem kan word (Tabel 7; Figuur 14), kan dien.

Dit is verder moontlik dat metallotioniene ook hier 'n belangrike detoksifiserende rol speel. Volgens Bremner (1987) is metallotioniene waarskynlik dié hoof koperbindende proteïene in die lewer. Die outeur stel dat dit 'n hoë metaalbindende kapasiteit van sowat 7 tot 10 atome per molekule besit. Wanneer koper aan metallotioniene bind, word die toksisiteit daarvan weens die koppeling aan die inerte proteïenkompleks opgehef (Stagg & Shuttleworth 1982). Metallotioniene kom gewoonlik in lae konsentrasies in die lewer voor (Web 1982). Indien hepatosiete met 'n hoë konsentrasie van die swaarmetaal in aanraking sou kom, word die produksie van metallotioniene gestimuleer (Noël-Lambot, Gerday & Disteche 1978). Dit is moontlik dat koper die produksie van hierdie metaalbindende proteïene, gedurende die akkumulatie-eksperiment, in die lewer geïnisieer het en dat die resultaat van hul detoksifiserende invloed eers na 48 uur, in beide die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente, in die lewerweefsel na vore gekom het. Of hierdie proteïene wel 'n rol gedurende die 96 uur akkumulatie- en ekskresieperiodes speel, is nie bekend nie.

---

### 3.5 'N LIGMIKROSKOPIESE ONDERSOEK NA HISTOLOGIESE SKADE VAN GESELEKTEERDE WEEFSELS VAN *XENOPUS LAEVIS* WAT VIR 24 UUR AAN 'N KOPERKONSENTRASIE VAN 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ BLOOTGESTEL IS.

---

#### 3.5.1 INLEIDING

Van Vuren *et al.* (1994) het in studies met die vis *Clarias gariepinus* gevind dat hierdie organisme se kieuë morfologiese veranderinge, weens blootstelling aan 'n subletale swaarmetaalkonsentrasie, ondergaan het. Verder stel die outeurs dat hierdie geïnduseerde veranderinge uiteraard tot verdere fisiologiese versteurings sal lei, wat op hul beurt verskeie orgaansisteme kan affekteer. Die voorkoms van fisiologiese veranderinge kan òf as die inisiële reaksie op die toksiese stof, òf as 'n aanpassingsreaksie, wat normale liggaamstoestande probeer handhaaf, beskou word.

Volgens Clarkson (1979) is swaarmetale, weens hul invloed op die molekulêre-, sellulêre-, weefsel- en orgaanvlak, vir 'n breë spektrum effekte op biologiese materiaal verantwoordelik. Die effek wat die metaal op die biologiese materiaal het, kan òf as lokaal (die huid, pulmonêre membrane, spysverteringskanaal), òf as sistemies (weefsel- of orgaanvlak) beskou word. Verder kan die metale as allergene, mutagene, teratogene of karsinogene optree. Alhoewel die toksiese effekte weens blootstelling aan essensiële metale, soos koper, weens die prosesse van homeostase klein mag wees, kom daar 'n verskeidenheid van maniere waarby hierdie beheerstelsels omseil kan word, voor. Weens die versteuring in die beheerstelsels van 'n organisme se liggaam en die persisterendheid van swaarmetale, kan die akkumulاسie daarvan tot kroniese effekte lei. Kazantzis (1979) stel dat toksiese metale, soos koper, kroniese effekte, waaronder hipersensitiwiteit van die huid, long, nier en senuweestelsel, veroorsaak.

Die doel van hierdie eksperiment is om ondersoek na die moontlikheid van histologiese skade, weens blootstelling aan 'n letale koperkonsentrasie, in te stel.

#### 3.5.2 MATERIAAL & METODEDES

Vier platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, geakklimeer. Die geakklimeerde organismes is in twee groepe van twee elk verdeel waarna elke groep na aparte akwariums oorgedra is.

'n Koperoplossing van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  is, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, tot 'n finale volume van 20l opgemaak en na een van die akwariums oorgedra. Die oorblywende akwarium is met 20l verouderde kraanwater gevul en het as kontrole gedien. Die platannas is vervolgens na die akwariums oorgeplaas en blootstelling is vir 24 uur by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en 'n pH van ongeveer 8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is vir die duur van die eksperiment gemonitor en druklug is voortdurend deur die mediums geborrel.

Na blootstelling aan koper is die blootgestelde en kontrole diere, soos in die Algemene Materiaal & Metodes (2.2.1) vermeld, gedood en is die geselekteerde weefsels deur middel van 'n disseksie verwyder en gefikseer. Hierna is die weefsels vir ligmikroskopie voorberei. Foto's van beide blootgestelde en kontrole weefsels is geneem (kyk Algemene Materiaal & Metodes (2.8)).

### 3.5.3 RESULTATE & BESPREKING

#### 3.5.3.1 Huid

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figure 15, 16 en 17 weergegee. Gedurende eksperimente 3.1, 3.2, 3.3 en 3.4 is waargeneem dat blootgestelde organismes se huidoppervlak minder slymryk as dié van kontrole diere was en dat die epidermis (E), wat uit 'n *stratum corneum*, of horinglaag (H), *stratum intermedium* (I) en *stratum germinativum*, of kiernlaag (K), bestaan (Whitear 1975; Toledo & Jared 1993a, 1993b), gereedelik afgeskilfer het. Figure 16 en 17 toon snitte van die huidweefsel van blootgestelde organismes en hieruit kom dit voor of die *stratum corneum* (H) van die onderliggende *stratum intermedium* (I), wat uit polihedriese selle bestaan, losgeraak of weggetrek het (Figuur 17), of selfs afwesig is (Figuur 16). Die *stratum corneum* (H) bestaan uit 'n enkellaag plat, gekeratiniseerde plaveiselepiteelselle wat losweg aanmekaar verbind is en wat gereeld afgewerp word. Hierteenoor kan 'n duidelik intakte *stratum corneum* in die huidweefsel van kontrole platannas waargeneem word (Figuur 15).

Alhoewel die *stratum corneum* 'n weerstandbiedende selmembraan is wat deur 'n filamentagtige keratiennetwerk en 'n interfilamentêre matriks versterk word, kan water gereedelik hierdeur beweeg (Whitear 1975). Die horinglaag se hoof funksie is om desikkasie van die organisme te voorkom terwyl dit die normale deurlatendheid ten opsigte van stowwe soos water en ione handhaaf (Toledo & Jared 1993a).

Die *stratum corneum*, word gedurig deur die proses van ekdise verwyder (Zug 1993). Budtz & Larsen (1973) en Spearman (1973) het in histologiese studies flesvormige selle (F) onder die *stratum corneum* gevind en daar word tans aangeneem dat hierdie selle, wat in Figure 15 en 16 aangedui word, òf die horinglaag aan die onderliggende

*stratum intermedium* bind, òf vir die verwydering van die horinglaag tydens ekdise, verantwoordelik is. Dit is dus moontlik dat hierdie selle gedurende blootstelling deur koper gestimuleer kon word om ekdise te inisieer om sodoende van die gekontameneerde epidermale laag ontslae te raak om die organismes teen moontlike skade te beskerm. Volgens Whitear (1975) word die flesvormige selle deur vingeragtige uitlopers, wat moontlik deur die koper beskadig kon word, aan die *stratum corneum* verbind. Tydens normale ekdise, beweeg die selle, wat rondom die flesvormige selle voorkom, in die rigting van die horinglaag en begin dit die uitlopers afsnoer, met die gevolg dat die verbinding tussen die *stratum corneum* en *stratum intermedium* verbreek word. Die horinglaag kom dus op hierdie wyse vry van die onderliggende lae.

Geen opmerklike strukturele verskille is in die slymkliere (S), gifkliere (G) en dermale lae van die onderskeie blootgestelde (Figure 16 en 17) en kontrole (Figuur 15) huidweefsels waargeneem nie. Slymkliere produseer voortdurend 'n kleurlose, waterige sekreet wat as 'n smeermiddel in die watermedium dien, desikkasie verhoed en 'n bydrae tot huidrespirasie lewer deurdat dit 'n klam omgewing bied waar gasse uitgeruil kan word (Noble 1954; Lillywhite & Maderson 1988). Die gifkliere stel slegs hul melkerige sekreet vry wanneer die huid onder andere deur toksiese stowwe geïrriteer word. Soos voorheen reeds genoem, was die huid van blootgestelde organismes minder slymryk as dié van kontrole organismes. Dit is dus hieruit duidelik dat koper wel die beskermende slymlaag gedurende blootstelling aan koper verwyder het, wat tot die toename in afskilfering van die horinglaag bygedra het. Tog het die huid na oorplasing na kopervrye water weer slymryk voorgekom, wat op die aanvang van herstel dui. Hieruit kan afgelei word dat, hoewel die epidermis (en veral die *stratum corneum*) gedurende blootstelling deur koper geïmpak is, die kliere as sodanig nie waarneembare histologiese skade gely het nie.

In Figure 16 en 17 kan 'n derde tipe klier, wat Noble (1954) 'n granulêre klier (GR) noem, in die dermis (D) gesien word. Volgens hierdie outeur gee slymkliere oorsprong aan hierdie groep vergrote en soms buisagtige kliere. Die sekreet van die klein granulêre klier het 'n growwe, korrelrige voorkoms en verskil van dié van die slymklier wat 'n borrelagtige, draderige voorkoms het en dié van die groter gifklier met 'n diffuse korrelrige inhoud. Uit die resultate van hierdie eksperiment kom dit nie voor of hierdie kliertipe, waarvan die funksie onbekend is, enige histologiese skade gedurende blootstelling opgedoen het nie.

Dit is dus hieruit duidelik dat dit veral die *stratum corneum* van die epidermale laag is wat gedurende 'n blootstellingsperiode van 24 uur histologiese skade opgedoen het.

### 3.5.3.2 Spysverteringskanaal

#### 3.5.3.2.1 *Esofagus*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 18 (kontrole) en Figuur 19 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) weergegee. Figuur 19 toon dat die esofagus van 'n blootgestelde organisme na afloop van die ligmikroskopiese ondersoek geen opmerkbare histologiese skade na 'n 24 uur blootstellingsperiode gely het nie. Tydens die disseksie van die blootgestelde platannas is 'n helderblou koperpresipitaat in die esofaguslumen (L) waargeneem. Aangesien die blootgestelde organismes, in vergelyking met die kontrole platannas, vir langer periodes op die bodem van die akwarium voorgekom het, is hierdie presipitaat waarskynlik gedurende blootstelling geïngesteer en weens die groot oppervlakarea in die esofageale lumen, wat deur die groot hoeveelheid voue wat in die esofageale wand gevorm word (Noble 1954; Krause & Cutts 1986), is dit moontlik dat die koper in hierdie holtes kon akkumuleer en tot die hoë konsentrasie wat na 24 uur hier gevind is, bygedra het.

Esofageale kardiaal kliere kom in en om die *lamina propria* (LP) voor en is buisvormige strukture wat slym produseer (Krause & Cutts 1986). In Figure 18 en 19 kan hierdie ronde, liggekleurde strukture rondom die *lamina propria* waargeneem word. Dit is waarskynlik dat die koper wat moontlik in hierdie slymsekreet geakkumuleer het, 'n bydraende faktor vir die hoë koperkonsentrasie in die spysverteringskanaalweefsel, wat in eksperiment 3.4 bepaal was, is.

Dit is dus hieruit duidelik dat koper, na 'n blootstellingsperiode van 24 uur, geen histologiese skade op die esofaguswand van blootgestelde organismes gehad het nie.

#### 3.5.3.2.2 *Maag*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 20 (kontrole) en Figuur 21 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) aangedui. Tydens die disseksie van blootgestelde organismes is groot hoeveelhede van die helderblou koperpresipitaat in die maag opgemerk. Tog is dit uit Figuur 21 duidelik dat koper na 'n 24 uur blootstellingsperiode geen opmerkbare histologiese skade op hierdie weefsel gehad het nie. Die feit dat geen ooglopende skade in die maagmukosa van blootgestelde organismes voorgekom het nie, kan moontlik aan die hand van die gedurige afwerping van die silinderepiteellaag ( $\overline{\text{SE}}$ ) verklaar word (Krause & Cutts 1986). Enige skade aan hierdie epiteelselle, wat in direkte kontak met die kontaminant was, sou dus verwyder word, wat op onderhoud van die lewende weefsel dui. Die tempo waarteen die selle tot niet gaan, is onbekend en dit is moontlik dat koper dit kan laat toeneem. Hierdie proses kan ook in 'n mate op herstel van beskadigde weefsel dui.

Die maagmukosa bestaan uit talle voue wat as *rugae* bekendstaan. Die voering bevat ongesiliëerde silinderepiteelselle (SE) waarop talryke klein kliere, die gastriese kliere (GK), voorkom. Die neutrale musien wat voortdurend deur hierdie oppervlakepiteel (met slymselle (S) as die sekreterende eenhede), geproduseer word, vorm 'n smerende slymlaag in die maaglumen (L) wat die orgaan teen verteringsappe beskerm (Noble 1954; Krause & Cutts 1986). Dit is moontlik dat koper, soos in die geval van die esofagus (3.5.3.2.1), in die slym wat hier afgeskei is, opgeneem kon word en, tesame met die geïngesteerde koperpresipitaat, tot die hoë koperkonsentrasie wat in die spysverteringskanaalweefsel van blootgestelde organismes gevind is (eksperiment 3.4), bygedra het. 'n Ander moontlikheid, wat in kombinasie met bogenoemde kan staan, is dat die koperpresipitaat in die holtes wat deur die talle *rugae* gevorm word, kon akkumuleer en so tot die hoë konsentrasie kon bydra.

Indien onaangename stowwe ingeneem word, is die organisme in staat om die maag "om te dop", soveel so dat die maag by die mondholte uitgestulp word (Noble 1954). Hierdie reaksie is nie tydens enige van die eksperimente waargeneem nie.

### 3.5.3.2.3 *Intestinum*

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 22 (kontrole) en Figuur 23 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) weergegee. Figure 22 en 23 is na afloop van ligmikroskopiese ondersoeke as twee afsonderlike dele van die intestinum geïdentifiseer. Figuur 22 is 'n foto van 'n snit deur die eerste gedeelte van die dunderm, wat soortgelyk aan die soogdiertduodenum is, terwyl Figuur 23 'n snit deur die ekwivalent van die jejunum is. Die verskil in hierdie twee gedeeltes lê in die voorkoms van mikrovilli (MV), wat in Figuur 23 op die epiteellaag van die villi (V) waarneembaar is.

Mikrovilli word volgens Krause & Cutts (1986) deur 'n glikoproteïenlaag, wat deur die silinderepiteelselle gesekreter word, bedek. Die laag is weerstandbiedend vir mukolitiese en proteolitiese middels en het, volgens oorlewering, 'n beskermende, sowel as 'n verteringsfunksie. Die moontlikheid bestaan dus dat die koper deur hierdie glikoproteïenlaag gebind kon word en in hierdie inerte vorm geen weefselkade kon aanrig nie.

Die intestinale mukosa bestaan uit absorberende silinderepiteelselle (SE) en bekereelselle (BE) wat slym sekreter wat absorpsie van verteerde stowwe fasiliteer. Die moontlikheid bestaan dus dat die koperione in die slymlaag opgeneem en geakkumuleer kon word.

Die mukosa het verder talryke voue wat villi (V) vorm wat die absorpsie-oppervlak van die intestinum vergroot (Noble 1954). Soos in die geval van die esofagus (3.5.3.2.1) en die maag (3.5.3.2.2) is dit moontlik dat die geïngesteerde koperpresipitaat in die talle voue wat hier voorkom, kon akkumuleer en so 'n bydra tot die hoë koperkonsentrasie wat in die spysverteringskanaalweefsel gemeet is, kon lewer.

Alhoewel 'n helderblou koperpresipitaat tydens die disseksie in die lumen (L) van die intestinums van blootgestelde organismes waargeneem is, kom dit nie uit die resultate van hierdie eksperiment voor of daar na 'n 24 uur blootstellingsperiode weefselskade plaasgevind het nie. Verder is dit ook moontlik dat enige skade wat wel aangerig is, weens die voortdurende afwerping van die silinderepiteelselle, soos in die geval van die maagweefsel (3.5.3.2.2), versluier is (Krause & Cutts 1986).

Dit kom dus uit hierdie resultate voor of daar na 'n 24 uur blootstellingsperiode geen histologiese skade aan die afsonderlike dele van die spysverteringskanaal, dit wil sê die esofagus, maag en intestinum, plaasgevind het nie.

### 3.5.3.3 Lewer

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 24 (kontrolle) en Figuur 25 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) aangedui. Tydens eksperiment 3.4 is 'n daar na 'n blootstellingsperiode van 24 uur 'n relatief hoë koperkonsentrasie in die lewers van blootgestelde organismes gevind. Tog kom dit uit die resultate van hierdie eksperiment (3.5) voor of hierdie orgaan en klier geen waarneembare histologiese skade opgedoen het nie. Dit is moontlik dat reaksies, waaronder detoksifisering en die binding van die metaal aan metaalbindende proteïene (metallotioniene), 'n rol hierin kon speel.

'n Moontlike verklaring vir die hoë koperkonsentrasie wat na 24 uur in die lewerweefsel van blootgestelde organismes gemeet is, is dat die koperione in die talryke sinusoïede (SI), wat met 'n dun plaveiselepiteellaag uitgevoer is en wat die hepatosiete (HP) van mekaar skei, kon akkumuleer.

'n Interessante verskil wat wel tussen die weefselsnitte van onderskeidelik die blootgestelde en kontrolle organismes gesien kan word, is die hoeveelheid hemosiderien (Hs) wat in elk voorkom. Hemosiderien is 'n proteïen-ysterhidroksiedkompleks wat as groot, donkergekleurde korrels in die sinusoïede (SI), wat tussen die hepatosietstringe (HPS) geleë is, waargeneem kan word. Dit kom voor of daar, in vergelyking met die kontrolle organismes, meer van hierdie hemosiderienkorrels in die lewerweefsel van blootgestelde organismes aanwesig was. Of hierdie verskynsel weens blootstelling aan koper voorgekom het, is onbekend.

### 3.5.3.4 Nier

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 26 (kontrolle) en Figuur 27 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) weergegee. In eksperiment 3.4 is gevind dat daar na 'n 24 uur blootstellingsperiode geen statisties betekenisvolle verskille tussen die koperkonsentrasies wat in die nierweefsels van blootgestelde en kontrolle organismes bepaal was, voorgekom het nie. Tog was die gemiddelde koperkonsentrasie in die blootgestelde

organismes se weefsel baie hoër (Tabel 6; Figuur 13). Dit kom uit Figuur 27, wat 'n snit van die nierweefsel van 'n blootgestelde organisme toon, voor of daar wel na 24 uur weefselskade voorgekom het. Die gekronkelde buise (KB) se individuele selle is nie soos dié van die kontrole organisme (Figuur 26) gedefinieer nie en dit veroorsaak die diffuse voorkoms. Die gekronkelde buise in die nierweefsel van kontrole organismes se samestellende selle is duidelik onderskeibaar en intakt (Figuur 27). Dit is dus duidelik dat die geakkumuleerde koper wel na 24 uur 'n effek op die niernefron, en dus die regulatoriese eenheid, wat die herabsorpsie van essensiële minerale en water betref, van die amfibieër se liggaam gehad het.

Volgens Noble (1954) word liggaamsvreemde stowwe hoofsaaklik deur 'n organisme se niere verwyder. Homeostase word dus op hierdie wyse gehandhaaf. In studies met vis, het Van Vuren *et al.* (1994) opgemerk dat kadmium veral in die proksimaal gekronkelde buise van die organismes se niere akkumuleer en daar die herabsorpsie van water en ander essensiële ione affekteer. Die moontlikheid bestaan dus dat koper op 'n soortgelyke wyse in hierdie buise van die blootgestelde platannas kon akkumuleer en, afhangende van die blootstellingsperiode, wat in hierdie geval 24 uur is, histologiese skade kon aanrig.

Daar word dus uit die resultate van hierdie eksperiment afgelei dat koper wel na 'n blootstellingsperiode van slegs 24 uur 'n effek op die nierweefsel van blootgestelde organismes het.

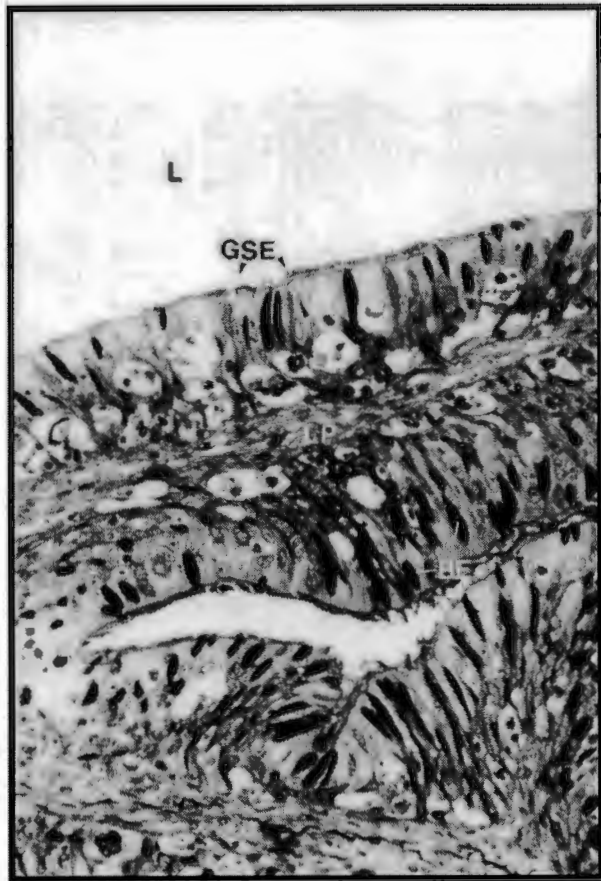
### 3.5.3.5 Long

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 28 (kontrole) en Figuur 29 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) aangedui en dit kom hieruit voor dat, indien die longweefsel van die kontrole organismes met dié van die blootgestelde platannas vergelyk sou word, daar wel histologiese veranderinge na 'n 24 uur blootstellingsperiode aanwesig was.

Die voeringsepitheel van die alveolêre oppervlak, dit wil sê die dunwandige plaveiselepitheel wat die alveolêre sakke (A) uitvoer, bevat talle gelamineerde osmiofiele selle (van hierdie selle word in Figure 28 en 29 met behulp van pyle aangedui). Dit tree as 'n surfaktant, wat die oppervlakspanning van die longe ophef, op en kom in die epitelarea tussen die lug-bloedgrens voor (Pattle, Schock, Creasey & Hughes 1977). Hierdie laag in die longweefsel van blootgestelde organismes is merkbaar minder opsigtelik as dié van die kontrole organisme. Voorheen is genoem dat positiefgelaaiete koperverbindings met watermolekules kompeteer om die negatiefgelaaiete fosfolipiedgroepe wat in die huidlae voorkom, te vervang (3.4.3.2) (Lillywhite & Maderson 1988). Dit is dus moontlik dat die koperione, wat deur middel van die bloedstroom na die longe vervoer is, hier by die lug-bloedgrens met die fosfolipiedlaag kon bind en moontlike skade, wat die afname in die osmiofiele selle sou veroorsaak, tot gevolg kon gehad het.

Verder het geen waarneembare histologiese skade in die longweefsel van blootgestelde organismes voorgekom nie. Dit is dus duidelik dat koper slegs 'n klein effek, indien enige, op die longweefsel van blootgestelde platannas het.

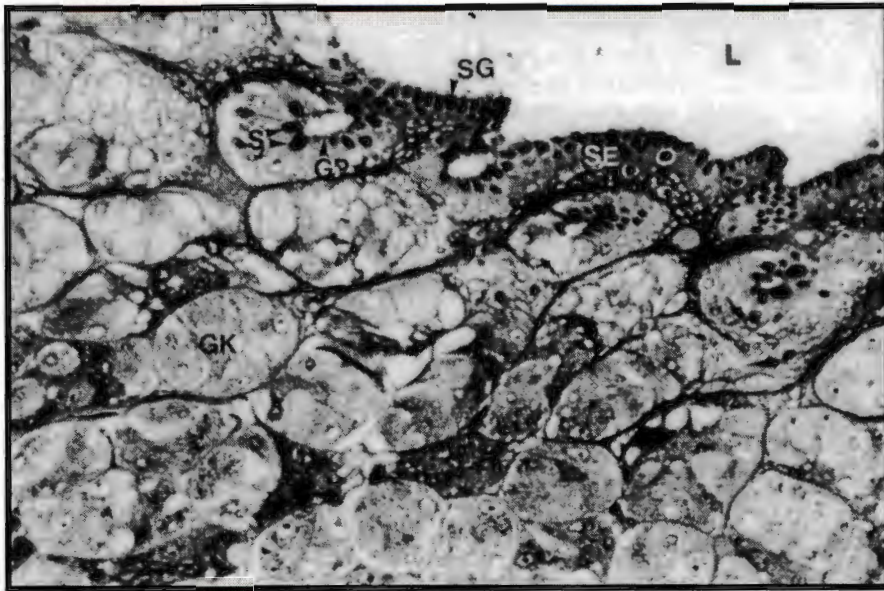
Gevolgtik kan die afleiding gemaak word dat koper na 'n 24 uur blootstellingsperiode wel 'n effek op veral die huid, nier en long van blootgestelde organismes het. Hoewel hierdie skade nie fisiologiese skade impliseer nie, kan volgehoue blootstelling verdere weefselskade teweegbring, soveel so dat die organisme se welstand daaronder sou ly. Alhoewel geen ooglopende weefselskade na 'n 24 uur blootstellingsperiode by die esofagus, maag, intestinum en lewer gevind is nie, is dit moontlik dat skade wel na 'n langer blootstelling kan intree. Dit is dus moontlik dat koper, wat wel in laasgenoemde weefsels voorgekom het (eksperiment 3.4), effektief na opname gereguleer is.



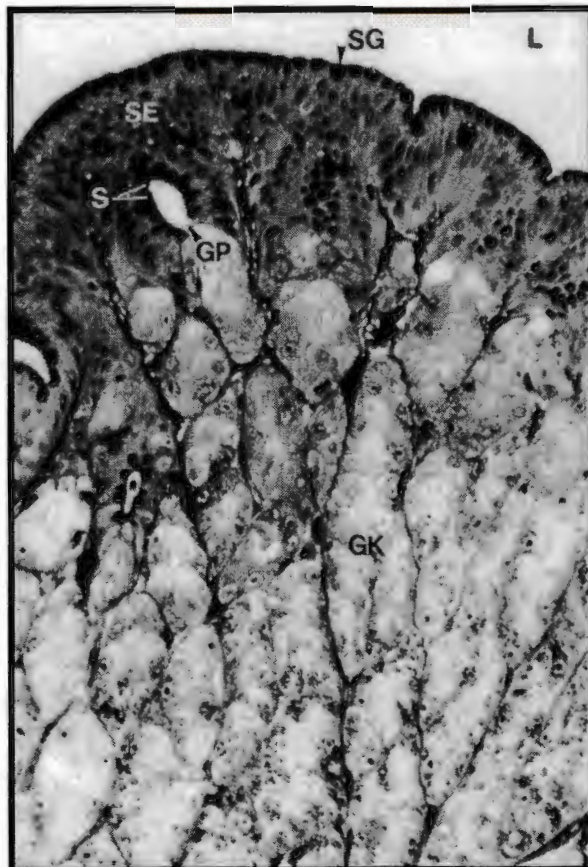
Figuur 18



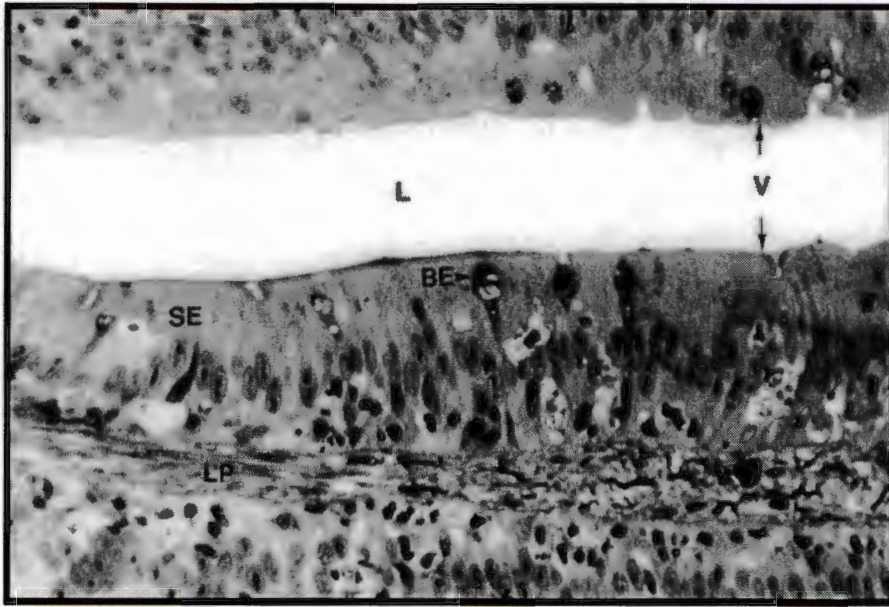
Figuur 19



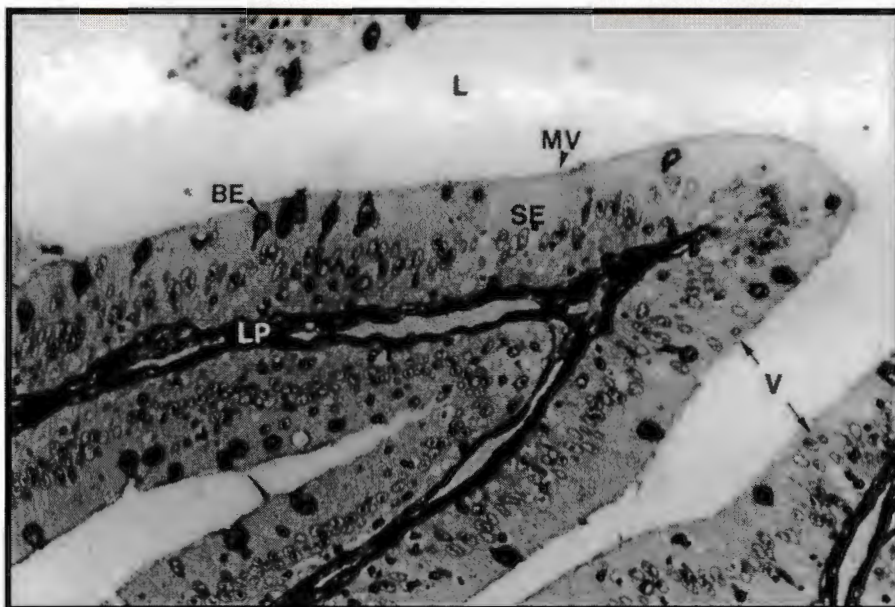
Figuur 20



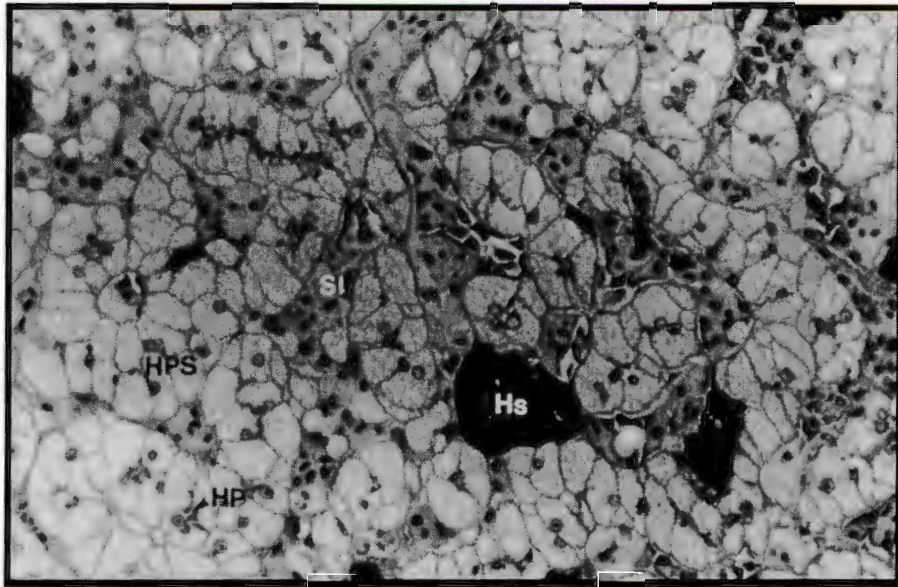
Figuur 21



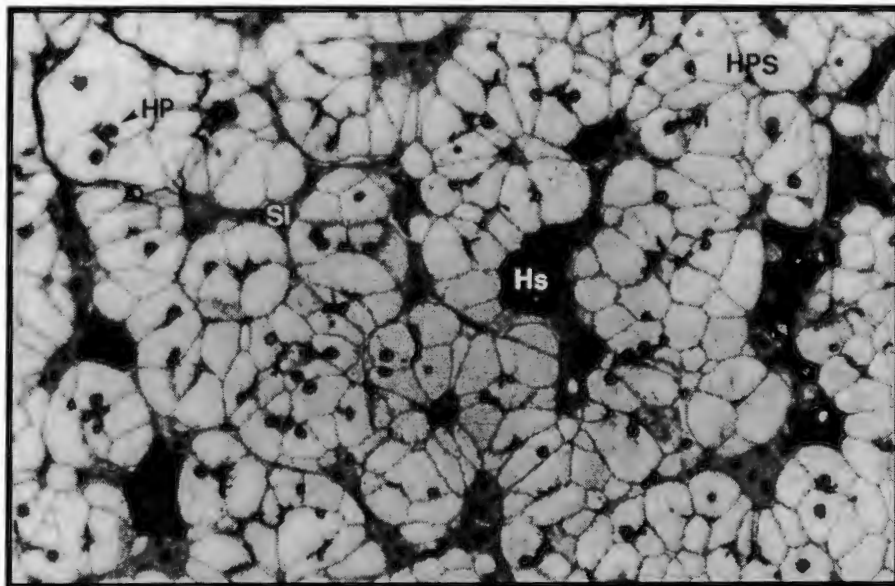
**Figuur 22**



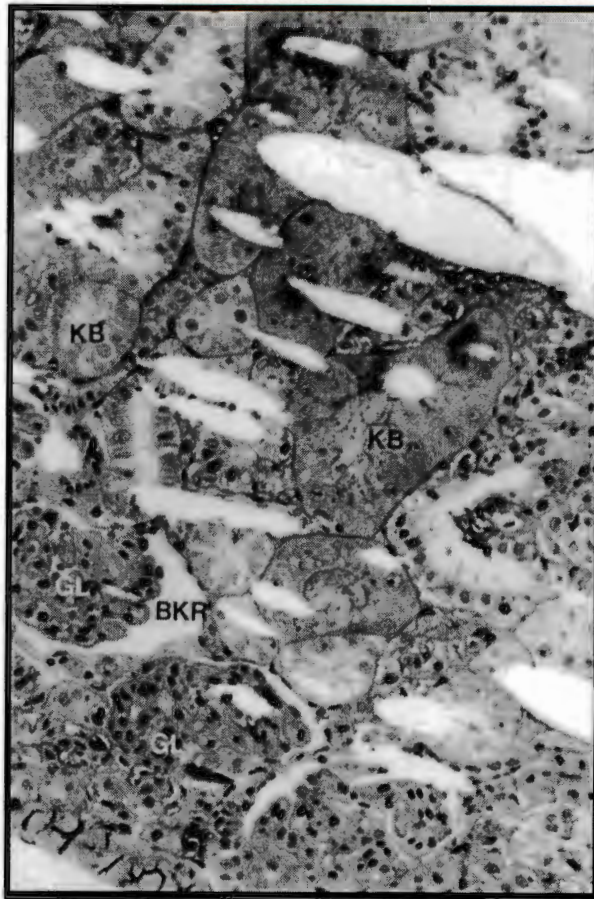
**Figuur 23**



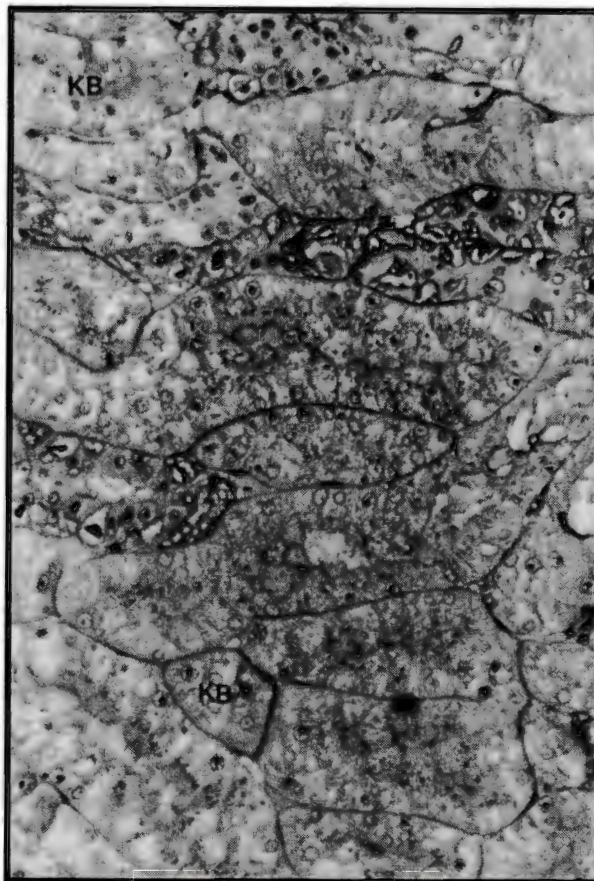
**Figuur 24**



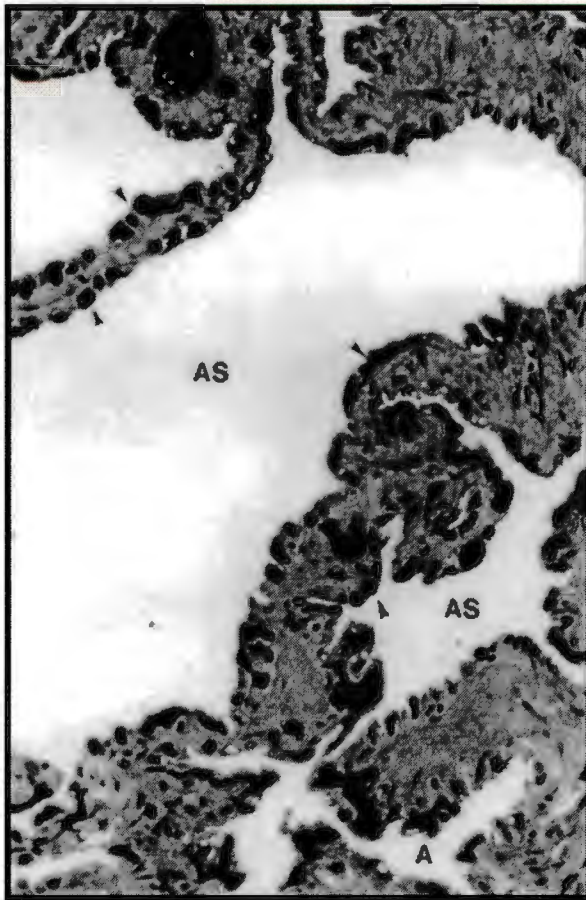
**Figuur 25**



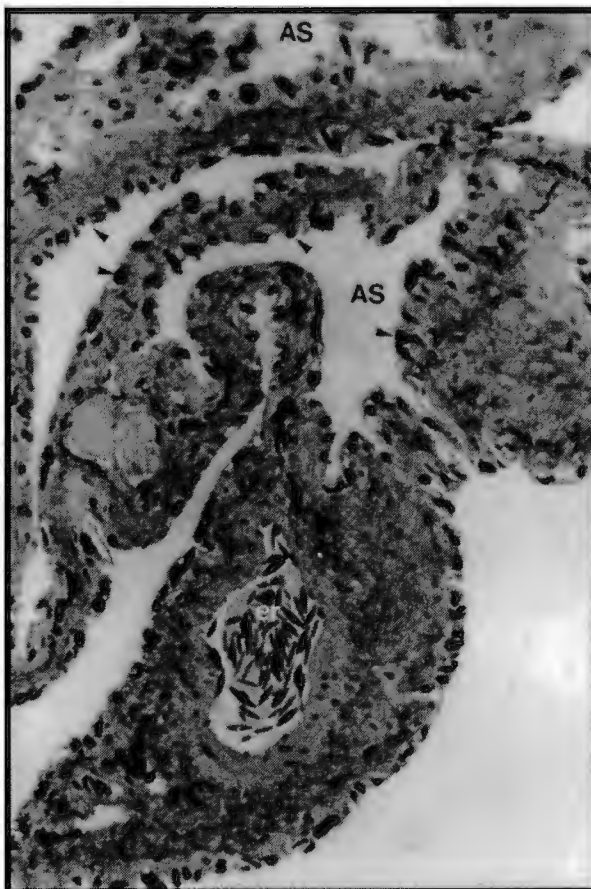
Figuur 26



Figuur 27



Figuur 28



Figuur 29

---

### 3.6 'N HISTOLOGIESE ONDERSOEK NA DIE *IN SITU* LOKALISERING VAN KOPER IN DIE HUID VAN *XENOPUS LAEVIS* WAT VIR 96 UUR AAN 'N KOPERKONSENTRASIE VAN $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ BLOOTGESTEL IS.

---

#### 3.6.1 INLEIDING

Uit die resultate en bespreking van die eksperiment 3.5 is gesien dat die huid van blootgestelde organismes reeds na 'n 24 uur blootstellingsperiode histologiese skade getoon het. In Figure 16 en 17 was dit duidelik dat dit veral die *stratum corneum* was wat skade gely het.

Weens die feit dat die huid in direkte kontak met die koperblootstellingsmedium is, is daar tydens hierdie eksperiment gepoog om, deur middel van histochemiese tegnieke, die *in situ* lokalisering van koper in hierdie weefsel op te spoor.

#### 3.6.2 MATERIAAL & METODEDES

Vier platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, geakklimeer. Die geakklimeerde organismes is in twee groepe van twee elk verdeel en elke groep is, na die opmaak van die koperoplossing, na afsonderlike akwariums oorgedra.

'n Koperoplossing van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  is, soos in die Algemene Materiaal & Metodes, tot 'n finale volume van 20l opgemaak en na een van bogenoemde akwariums oorgedra. Die oorblywende akwarium is met 20l verouderde, gedechlorineerde kraanwater gevul en het as kontrole gedien. Blootstelling het 24 uur geduur en is by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en by 'n pH van ongeveer 8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is vir die duur van die eksperiment gemonitor en druklug is deurgaans deur die mediums geborrel.

Na blootstelling aan koper is die eksperimentele organismes gedood en is die huidweefsels deur middel van 'n disseksie verwyder (2.2.1) en in alkohol gefikseer. Voorbereiding, kleuring en fotografering van die blootgestelde en kontrole weefsels het, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek (2.9), plaasgevind.

### 3.6.3 RESULTATE & BESPREKING

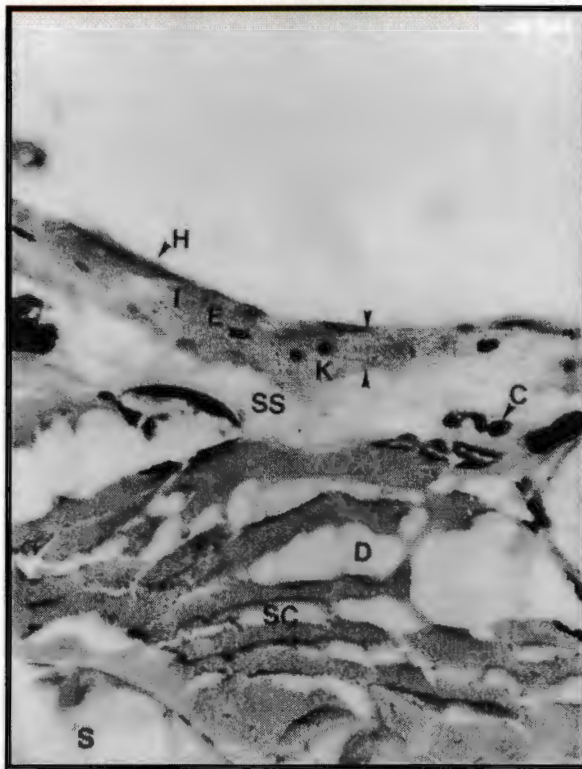
Die resultate van hierdie eksperiment word in Figuur 30 (kontrole) en Figure 31 en 32 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper) weergegee. Die samestellende dele van die huid, soos wat dit in eksperiment 3.5 uiteengesit is, kan in die foto van die kontrole weefsel (Figuur 30) waargeneem word. Volgens Lillie & Fullmer (1976) kleur kerne blou-grys en vertoon koper lig- tot donkerblou. Indien die snitte onder 'n ligmikroskoop beskou sou word, is koper as 'n helder blou laag in die epidermis van die blootgestelde organismes waargeneem. Tydens die neem van die wit-en-swart foto's is daar van 'n rooi filter gebruik gemaak om die koperbevattende laag swart te kleur. Weens die gebrek aan 'n duidelike swart laag na afloop van kleuring, is dit duidelik dat daar geen koper in òf die epidermis (E) òf die dermis (D) van kontrole organismes voorgekom het nie. 'n Donkerswart laag, wat 'n aanduiding van koper in die weefsel is, het wel duidelik in die epidermale lae van die blootgestelde organismes na vore gekom (Figure 31 en 32).

Dit kom dus uit die figure voor of koper slegs in die epidermale laag (wat die *stratum corneum* (H), *stratum intermedium* (I) en *stratum germinativum* (K) insluit), voorgekom het. Verder kan daar ook uit Figure 31 en 32 gesien word dat die *stratum corneum* weereens van die onderliggende *stratum intermedium* weggetrek het.

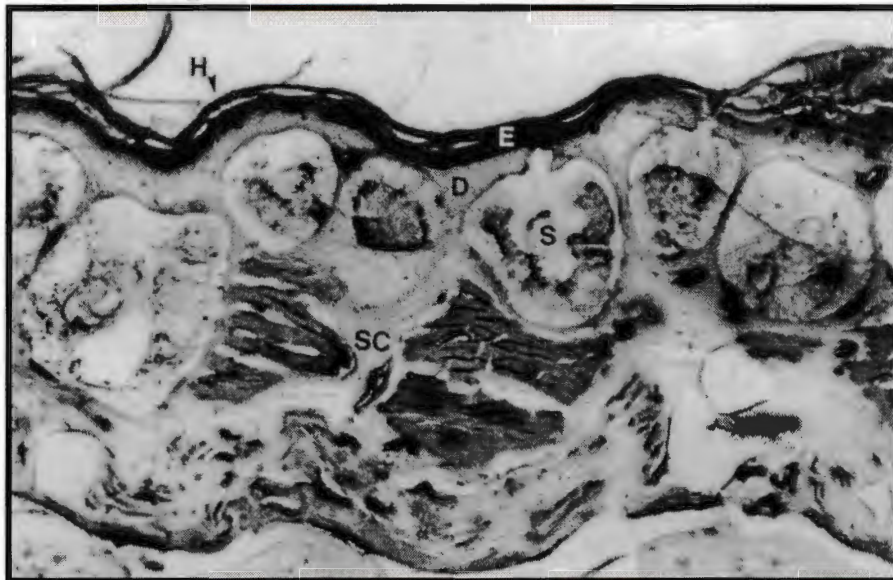
Verder kan daar uit Figure 31 en 32 afgelei word dat koper nie in die dermis (D) van blootgestelde platannas opgeneem is nie. Hierdie laag het by die blootgestelde organismes geen swart laag vertoon nie.

Dit is dus uit hierdie eksperiment duidelik dat koper slegs deur die epidermale laag opgeneem word. Uit die vorige eksperimente is opgemerk dat die huid van blootgestelde organismes minder slymryk as dié van kontrole organismes was, met die gevolg dat die hoeveelheid koper wat hierin geakkumuleer het, gedurig vrygestel is. Dit is dus moontlik dat die akkumulasie van koper in die epidermis van blootgestelde organismes deur die beskermende slymlaag waarin die oormaat koper vanuit die omgewing vasgevang en weer vrygestel is, gebuffer is.

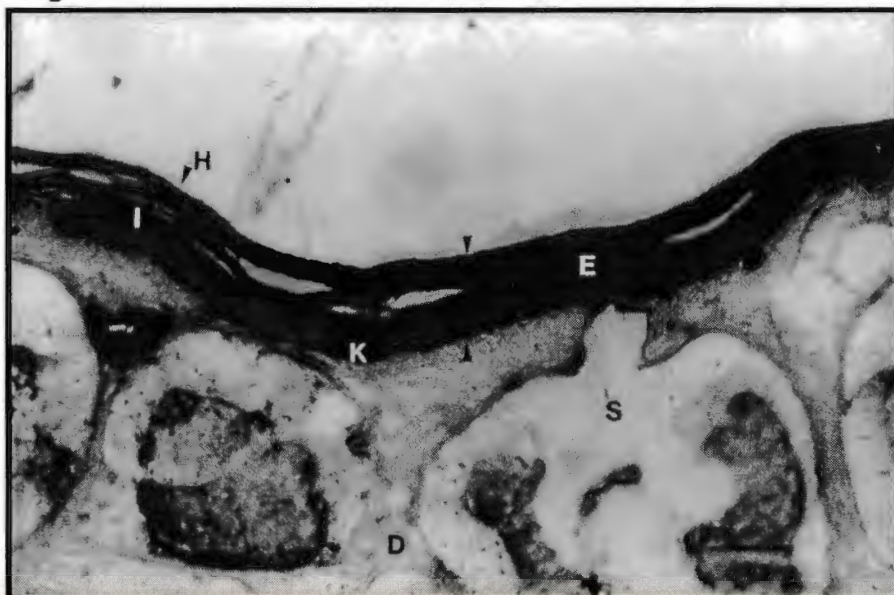
Volgens Kendall (1947) en Storer *et al.* (1971) besit die *stratum spongiosum* (SS), wat direk onder die *stratum germinativum* (K) geleë is, 'n uitgebreide kapillêre netwerk. Dit is moontlik dat koperione, wat wel in die epidermis opgeneem is, hierin kon indiffundeer, waarna dit na die ander organe en weefsels vervoer kon word.



Figuur 30



Figuur 31



Figuur 32

---

### **3.7 'N SKANDEERELEKTRONMIKROSKOPIESE ONDERSOEK NA DIE HISTOLOGIESE SKADE VAN DIE HUIDOPPERVLAK VAN *XENOPUS LAEVIS* WAT VIR 96 UUR AAN 'N KOPERKONSENTRASIE VAN $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ BLOOTGESTEL IS.**

---

#### **3.7.1 INLEIDING**

Na aanleiding van die resultate en besprekings van eksperimente 3.4, 3.5 en 3.6 kan die gevoltrekking gemaak word dat koper in die huid, en wel in die epidermis, van blootgestelde organismes akkumuleer. Die doel van die eksperiment is om hierdie histopatologiese skade van die huidoppervlak, weens die blootstelling aan koper, deur middel van 'n skandeerelektronmikroskoop te ondersoek.

#### **3.7.2 MATERIAAL & METODEDES**

Vier platannas is vir 96 uur by eksperimentele parameters, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, geakklimeer. Die geakklimeerde organismes is in twee groepe van twee elk verdeel en elke groep is, na die opmaak van die koperoplossing, na afsonderlike akwariums oorgedra.

'n Koperoplossing van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  is, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, tot 'n finale volume van 20l opgemaak en na een van bogenoemde akwariums oorgedra. Die oorblywende akwarium is met 20l verouderde kraanwater gevul en het as kontrole gedien. Die organismes is vervolgens na die akwariums oorgedra en blootstelling het 24 uur geduur en is by  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  en by 'n pH van ongeveer 8 uitgevoer.

Temperatuur en pH is vir die duur van die eksperiment gemonitor en druklug is voortdurend deur die mediums geborrel.

Na blootstelling aan koper is die eksperimentele organismes gedood en is fragmente huidweefsel deur middel van 'n disseksie verwyder (2.2.1) en in Todd se fikseermiddel gefikseer. Voorbereiding en die neem van die elektronmikrograwe van beide die blootgestelde en kontrole huidfragmente het, soos in die Algemene Materiaal & Metodes bespreek, plaasgevind.

### 3.7.3 RESULTATE & BESPREGING

Die resultate van hierdie eksperiment word in Figure 33 (kontrole; dorsaalhuid), 34 en 35 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper; dorsaalhuid) en in Figure 36 en 38 (kontrole; ventraalhuid) en 37 en 39 (blootgestel aan  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  koper; ventraalhuid) weergegee. Figuur 33 verteenwoordig die dorsaalhuidoppervlak van 'n kontrole organisme. Die gifklieropening (G), gladdespierskede (Dawson 1920) en die slymlaag, wat aanleiding tot die vae voorkoms van die foto gee, is duidelik waarneembaar.

Figure 34 en 35 verteenwoordig die dorsaalhuidoppervlak van 'n blootgestelde organisme. Indien hierdie foto's met dié van die kontrole platanna vergelyk sou word, is dit duidelik dat die blootgestelde weefsel 'n slymlase en gebarste voorkoms het, terwyl die kontrole weefsel ongeskonde blyk te wees.

Dit kom uit Figure 34 en 35 voor of die gifklieropening van blootgestelde organismes na blootstelling aan koper verstop is. Volgens Spearman (1973) stel die gifkliere hul inhoud vry nadat die organisme met 'n irriterende toksiese stof in aanraking kom. Dit kan moontlik as verklaring in hierdie geval dien. Die gebarste voorkoms van die huidoppervlak van blootgestelde organismes kon moontlik verder weens die adsorpsie van koper aan die buitenste laag en die gevolglike verwydering van die slymlaag, voorgekom het.

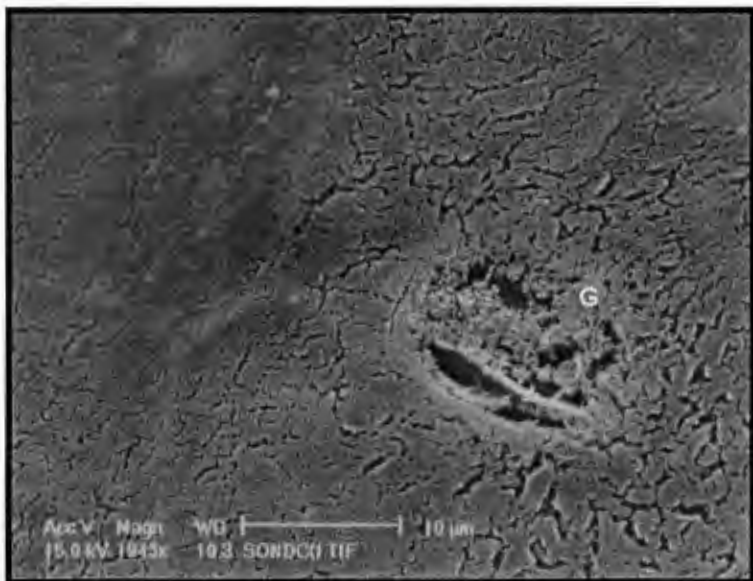
Die effek wat koper op die ventraalhuidepiteel van blootgestelde platannas het, kan duidelik in Figuur 37 gesien word. Dié weefsel toon afskilfering na blootstelling, terwyl die kontrole weefsel, wat in Figuur 36 aangedui word, ongeskonde voorkom. Die slymklieropening (S), wat kleiner is as dié van die gifkliere (G) en wat geen gladdespierskedes besit nie (Dawson 1920), is ook duidelik in beide die figure waarneembaar. Hoewel die weefsel rondom die klieropening weens die blootstelling aan koper afskilfering toon, kom dit nie uit Figuur 39 voor of die slymklieropening enigszins beskadig is nie.

Figuur 39 toon die effek wat koper op die klieropening, en wel dié van die gifklier, het. Dit is duidelik dat die area rondom die opening opgehewe en geswel voorkom, terwyl dié van die kontrole organisme (Figuur 38) normaal vertoon. Verder het die gladdespierskede, wat binne die klieropening gesien kan word, ook 'n geswolle voorkoms. 'n Moontlike verklaring vir hierdie opgeblase voorkoms is dat water deur middel van osmotiese invloed weens die afwesigheid van slym en die beskadiging van die oppervlakepiteel, in die areas rondom die gifkliere kon versamel. Hierdie inbeweeg van water sou dan ook dien om die konsentrasieverskille van koper aan weerskante van die huidoppervlak op te hef.

Daar is dus tydens hierdie eksperiment bevestig dat koper wel 'n invloed op die huid van die amfibieër het. In eksperiment 3.6 is gesien dat dit veral die *stratum corneum* of horinglaag was wat deur die swaarmetaal aangetas is en in hierdie eksperiment kan gesien word dat dit hierdie laag is wat afskilfer.



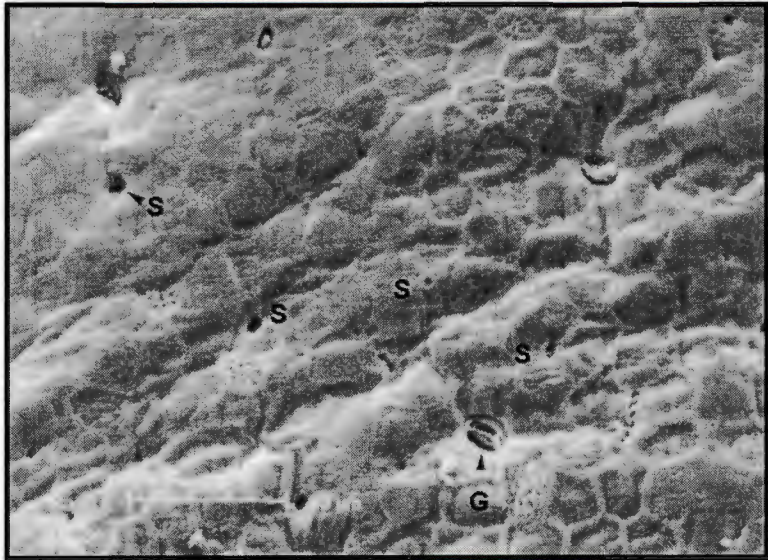
**Figuur 33**



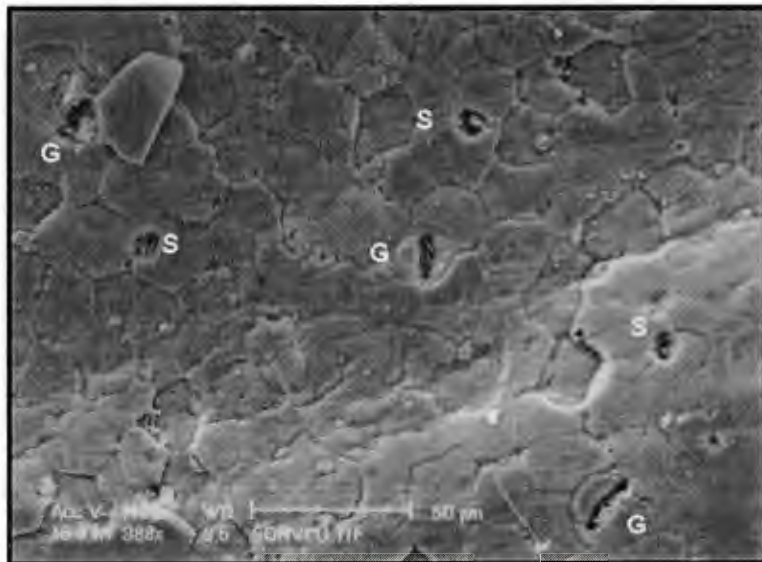
**Figuur 34**



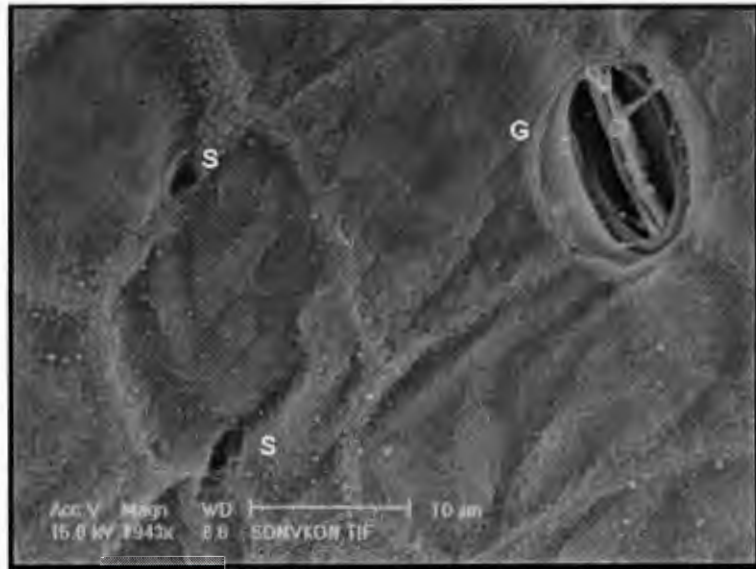
**Figuur 35**



**Figuur 36**



**Figuur 37**



**Figuur 38**



**Figuur 39**

## HOOFSTUK 4

### SAMEVATTING

---

'n Onderzoek na die opname, verspreiding en invloed van koper in volwasse *Xenopus laevis*-wyfies is uitgevoer.

Blootgestelde organismes is hoogs sensitief vir koperkonsentrasies van meer as  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ . 'n Letale koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  ( $\text{LD}_{50}$ -waarde) is vir die duur van die blootstellingseksperimente (96 uur) toegedien. Faktore soos adsorpsie aan die blootstellingshouerwande en presipitering van die swaarmetaal het veroorsaak dat organismes aan 'n laer koperkonsentrasie as die oorspronklik opgemaakte konsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is. Hierdie konsentrasie het verder afgeneem weens adsorpsie en ingestie van koper deur die blootgestelde organismes in die blootstellingsmediums.

Platannas wat vir onderskeidelik 24, 48, 72 en 96 uur aan die opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  blootgestel is, het wisselende konsentrasies van die metaal in die bloed, huid-, spysverteringskanaal-, long-, nier- en lewerweefsel getoon. Dit kom voor of die meeste beskikbare bindingsplekke of blootgestelde areas van hierdie geselekteerde weefsels gedurende die eerste 24 uur van blootstelling beset is.

Die spysverteringskanaalweefsel het gedurende die akkumulatie-eksperiment deurgaans die hoogste gemiddelde koperkonsentrasie getoon en is in 'n afnemende tendens deur die koperkonsentrasies wat in die lewer-, huid-, nier-, long- en heelbloedweefsel gevind is, gevolg. Gedurende die ekskresie-eksperiment het die spysverteringskanaalweefsel die hoogste gemiddelde koperkonsentrasie besit, waarna die koperkonsentrasies in die lewer-, nier-, long-, huid- en heelbloedweefsel weer 'n afnemende tendens gevolg het.

Geen noemenswaardige toename of afname in die koperkonsentrasies in die heelbloed van die blootgestelde organismes is gedurende beide die akkumulatie- en ekskresie-eksperiment gevind nie. Dit kom dus voor of die bloed die swaarmetaal vinnig en geredelik aan organe soos die lewer en niere afgee, of as sulks nie koper in hoë konsentrasies akkumuleer nie. Die rede hiervoor is moontlik die feit dat die organisme se liggaam 'n dinamiese sisteem is wat so vinnig moontlik van liggaamsvreemde stowwe ontslae moet raak. Koper wat in die bloed, wat 'n groot rol speel in die handhawing van homeostase, voorgekom het, is dus moontlik aan ander regulerende organe afgegee.

Die hoë koperkonsentrasie wat gedurende die akkumulatie-eksperiment in die huidweefsel van blootgestelde platannas gevind is, is waarskynlik aan die adsorpsie van die metaal in die slymlaag en epidermis toeskryfbaar. Hierdie afleiding word deur die ligmikroskopiese en histochemiese ondersoeke gesubstansieer. Die verlies van die koper tydens die ekskresie-eksperiment, die vrystelling van koperbevattende slym en die afskilfering van die epidermis, wat gedurende eksperimente waargeneem is, is waarskynlik vir die betekenisvolle afname in die

koperkonsentrasie in die huid van vooraf blootgestelde organismes en die toename in die koperkonsentrasie in die water van die ekskresiemedium verantwoordelik. Die huidweefsel is die enigste van die geselekteerde weefsels wat 'n betekenisvolle afname in die koperkonsentrasie tydens die ekskresie-eksperiment getoon het.

Die aansienlik hoë koperkonsentrasie in die spysverteringskanaalweefsel is hoofsaaklik aan die ingestie van die koperpresipitaat wat op die akwariumbodems voorgekom het, toeskryfbaar. Hierdie presipitaat is as 'n helderblou substans in die lumen van die spysverteringskanaal van blootgestelde organismes waargeneem. Dit kom vanuit die resultate voor of die metaal nie tydens die ekskresie-eksperiment geredelik vanuit die spysverteringskanaal vrygestel word nie, wat die aanname betreffende adsorpsie sterk ondersteun.

Betekenisvolle toenames in die koperkonsentrasie is tydens beide die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die longweefsel van blootgestelde organismes gevind wanneer dit met die koperkonsentrasie in die kontrole organismes se longe vergelyk is. Dit kom voor of koper via die bloed in relatief groot hoeveelhede in hierdie weefsel geadsorbeer het. Geen betekenisvolle afnames het tydens die ekskresieperiode voorgekom nie, wat weereens die aanname van adsorpsie in hierdie weefsel ondersteun.

Die hoë koperkonsentrasie in die nierweefsel van blootgestelde organismes, en die gebrek aan 'n betekenisvolle afname daarvan tydens die ekskresieperiode, dui enersyds op adsorpsie van die swaarmetaal in die weefsel en andersyds op aktiewe ioonregulering soos in eksperiment 3.4 (3.4.3.5) bespreek. Verder wil dit uit die resultate wat gedurende ligmikroskopie gevind is, voorkom of daar wel histologiese skade aan die nierweefsel van blootgestelde organismes voorgekom het. Dit kom uit die resultate voor of die toename in die koperkonsentrasie in die water van die ekskresiemedium slegs tot 'n mindere mate aan die vrystelling van koperbevattende uriene toeskryfbaar kan wees.

Die variërende hoë en lae koperkonsentrasies in die lewerweefsel van die blootgestelde platannas gedurende beide die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente dui moontlik op 'n meganisme wat die hoë koperkonsentrasie, wat via die bloed aan die lewer gelewer word, reguleer. Die presiese meganisme en wyse waarop dit mag plaasvind, is nie bekend nie.

Alhoewel variasies in die gemiddelde koperkonsentrasies gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente deurgaans voorgekom het, was die koperkonsentrasie in die geselekteerde weefsels van blootgestelde organismes deurgaans hoër as dié van die kontrole platannas. Die resultaat dui dus op opname en verspreiding van die swaarmetaal in organismes wat daaraan blootgestel is.

Verder is dit uit die resultate duidelik dat die koperkonsentrasie van die water van die blootstellingsmediums, wat 'n opgemaakte koperkonsentrasie van  $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$  met aanvangs van die akkumulatie-eksperiment ontvang het, binne die bestek van 24 uur aansienlik afneem weens adsorpsie, presipitering en opname en/of adsorpsie deur

die blootgestelde organismes. Hierna bereik die koperkonsentrasie in die blootstellingsmediums 'n plato. Tydens die ekskresie-eksperiment is dit duidelik dat die gemiddelde koperkonsentrasie in die aanvanklik kopervrye water gedurende die eerste 24 uur toeneem en daarna 'n plato bereik. Hierdie toename in die koperkonsentrasie is waarskynlik aan die vrykom van koper vanaf die huid toeskryfbaar. Die feit dat die spysverteringskanaal- en nierweefsel ten tye van die ekskresie-eksperiment steeds betekenisvolle hoë koperkonsentrasies besit, dui daarop dat die vrystelling van onderskeidelik koperbevattende feses en uriene tot 'n mindere mate tot die koperkonsentrasie in die ekskresiemedium bygedra het.

Uit die resultate van hierdie studie is dit dus duidelik dat koper wel deur blootgestelde organismes opgeneem is en dat dit in variërende konsentrasies in die geselekteerde weefsels versprei en geakkumuleer het.

# BEDANKINGS

---

*My opregte dank teenoor die volgende persone en instansies:*

- ☆ My Skepper, sonder wie ek nie die krag en geleentheid sou gehad het om hierdie studie, en daarmee saam my talente, te kon voltooi en ontwikkel nie.
- ☆ Dr. Corrie Wolmarans vir u hulp en leiding gedurende die studie.
- ☆ Prof. Kenné de Kock vir die hulp, taalversorging en literatuur wat u tot my beskikking gestel het.
- ☆ Prof. Willie van Aardt vir u advies.
- ☆ Dr. Gerhard van Aswegen vir u hulp tydens die histochemiese studie, sowel as die neem van die foto's.
- ☆ Mnr. Casper Geldenhuys vir u hulp tydens die ontwikkeling van die foto's.
- ☆ Dr. Louwrens Tiedt en Mev. Wilna Pretorius (Laboratorium vir Elektronmikroskopie, PU vir CHO) vir u hulp en geduld tydens die lignmikroskopiese en skandeerelektronmikroskopiese studies.
- ☆ Mnr. Collin Read vir u hulp gedurende die AAS-analises.
- ☆ Dr. Louis du Preez (UOVS) vir u hulp in die identifisering van die skandeerelektronmikroskopiese data.
- ☆ Prof. Eddie van Dijk vir die literatuurverwysings wat u met soveel entoesiasme met my gedeel het.
- ☆ Aan my vriende:  
Kobus le Roux vir jou hulp met die inskandering van die foto's vir publikasie en jou ondersteuning  
Lianda Lötter - op ons projekte wat eindelijk "suksesse" is!
- ☆ André Vosloo vir jou *groot* liefde en ondersteuning... en breë skouers. Jy's 'n ware steunpilaar en jy het my gedagtes vleuels gegee.
- ☆ Ma Corli, Pa Roelof, Riaan en Lorianne Vorster vir die geleentheid wat julle my gegun het en die bystand en aanmoediging wat nooit opgehou het nie.
- ☆ Ouma en Oupa Goërke, Oorn Andries en Tannie Ina, vir die duisende gebede wat gedurig vir my opgegaan het.
- ☆ SNO, Trustbank en PU vir CHO vir finansiële steun.
- ☆ Mev. Zita Prinsloo vir u geduld en geloof in die voltooiing van hierdie werkstuk.
- ☆ Departement Dierkunde vir die beskikbaarstelling van apparaat.
- ☆ African Xenopus Facility vir die verskaffing van proefdiere.

# LYS VAN TABELLE EN FIGURE

---

## Tabelle

---

Tabel 1	Die oorlewingspersentasie van <i>Xenopus laevis</i> wat tydens 'n 96 uur periode aan verskillende koperkonsentrasies blootgestel is .....	18
Tabel 2	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die heelbloed van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die heelbloedweefsel en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is .....	28
Tabel 3	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die huid van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die huidweefsel en in die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is .....	32
Tabel 4	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die spysverteringskanaal van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente en 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat in die spysverteringskanaalweefsel en die water van die blootstellings- sowel as die kontrole mediums gevind is .....	36
Tabel 5	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die longweefsel van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente .....	41
Tabel 6	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die nierweefsel van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente .....	43
Tabel 7	'n Vergelyking tussen die gemiddelde koperkonsentrasies in die lewerweefsel van <i>Xenopus laevis</i> tydens die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente .....	47

## Figure

---

Figuur 1	'n Snit deur die viscerale spiere om die <i>vena abdominalis</i> van <i>Xenopus laevis</i> bloot te lê (Oorgeteken vanuit Reinecke & Van As 1981) .....	5
Figuur 2	'n Voorstelling van 'n tipiese amfibieërhart (Volgens Storer, Usinger, Stebbins & Nybakken 1971) .....	6

Figuur 3	'n Voorstelling van die disseksie van <i>Xenopus laevis</i> met aanduidings van organe wat tydens die studie gebruik is. (Oorgeteken vanuit Reinecke & Van As 1981) .....	7
Figuur 4	'n Vergelyking tussen die oorlewingspersentasies van <i>Xenopus laevis</i> wat aan koperkonsentrasies van 25, 125, 250, 500 en 1 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oor 'n periode van 96 uur blootgestel is .....	14
Figuur 5	'n Dosisresponskromme van <i>Xenopus laevis</i> wat vir 96 uur aan koperkonsentrasies van 25, 125, 250, 500 en 1 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is .....	15
Figuur 6	Die oorlewingspersentasies van <i>Xenopus laevis</i> wat oor 'n periode van 96 uur aan koperkonsentrasies van 25, 62.5, 125, 187.5 en 250 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is .....	19
Figuur 7	'n Dosisresponskromme van <i>Xenopus laevis</i> wat vir 96 uur aan verskillende koperkonsentrasies blootgestel is. ( $\text{LD}_{50}$ -waarde bepaling) .....	20
Figuur 8	'n Aanduiding van die werklike koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium ( $\text{pH} \pm 8$ , temperatuur $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) waaraan <i>Xenopus laevis</i> oor 'n periode van 96 uur blootgestel is .....	23
Figuur 9	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die heelbloed van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n konsentrasie van 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	29
Figuur 10	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die huidweefsel van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	33
Figuur 11	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die spysverteringskanaalweefsel van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	37
Figuur 12	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die longweefsel van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	42
Figuur 13	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulatie- en ekskresie-eksperimente in die nierweefsel van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	45

Figuur 14	'n Vergelyking tussen die koperkonsentrasies wat gedurende die akkumulasie- en ekskresie-eksperimente in die lewerweefsel van <i>Xenopus laevis</i> , wat vir 96 uur aan 'n opgemaakte konsentrasie van $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ blootgestel is, gevind is .....	48
Figuur 15	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	59
Figuur 16	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	59
Figuur 17	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	59
Figuur 18	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die esofagus van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	60
Figuur 19	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die esofagus van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	60
Figuur 20	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die maagwand van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	61
Figuur 21	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die maagwand van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	61
Figuur 22	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die voorste gedeelte van die intestinumwand van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	62
Figuur 23	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die agterste gedeelte van die intestinumwand van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	62
Figuur 24	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die lewer van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	63
Figuur 25	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die lewer van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	63
Figuur 26	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die nier van <i>Xenopus laevis</i> (kontrolle) .....	64
Figuur 27	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die nier van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan $62.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	64

Figuur 28	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die long van <i>Xenopus laevis</i> (kontrole) .....	65
Figuur 29	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die long van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	65
Figuur 30	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (kontrole) wat met hematoksilien gekleur is om vir die teenwoordigheid van koper te toets .....	68
Figuur 31	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) wat met hematoksilien gekleur is om vir die teenwoordigheid van koper te toets .....	68
Figuur 32	'n Ligmikroskopiese foto van 'n snit deur die huid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) wat met hematoksilien gekleur is om vir die teenwoordigheid van koper te toets. ....	68
Figuur 33	'n Skandeerelektronmikrograaf van die dorsaalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (kontrole) .....	71
Figuur 34	'n Skandeerelektronmikrograaf van die dorsaalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	71
Figuur 35	'n Skandeerelektronmikrograaf van die dorsaalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper). ....	71
Figuur 36	'n Skandeerelektronmikrograaf van die ventraalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (kontrole) .....	72
Figuur 37	'n Skandeerelektronmikrograaf van die ventraalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	72
Figuur 38	'n Skandeerelektronmikrograaf van die ventraalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (kontrole) .....	73
Figuur 39	'n Skandeerelektronmikrograaf van die ventraalhuid van <i>Xenopus laevis</i> (blootgestel aan 62.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ koper) .....	73

# LITERATUURVERWYSINGS

---

- ALIKHAN, M.A. & ZIA, S. 1989. Nickel uptake and regulation in a copper-tolerant decapod, *Cambarus bartoni* (Fabricius) (Decapoda, Crustacea). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45**: 712 - 717.
- ★ BABICH, H. & STOTZKY, G. 1983. Influence of chemical speciation on the toxicity of heavy metals to the micro biota. In: NRIAGU, J.O. (Ed.). *Advances in Environmental Science and Technology*. Vol. 13. John Wiley, New York. pp. 1 - 46.
- ★ BARGMANN, W., KNOOP, A. & SCHLIEBLER, Th.H. 1955. Histologische, cytochemische, und electronen mikroskopische Untersuchungen am Nephron (mit Berücksichtigung der Mitochondrien). *Zeitschrift Zellforschung mikroskopische Anatomie* **42**: 386 - 422.
- ★ BRANCH, W.R. 1988. South African Red Data Book - Reptiles and amphibians. South African National Scientific Programmes Report No. 151. Pretoria. Foundation for Research and Development.
- ★ BREMNER, I. 1987. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *Journal of Nutrition* **117**: 19 - 29.
- ★ BUDTZ, P.E. & LARSEN, Lis-O. 1973. Structure of the toad epidermis during the moulting cycle. I. Light microscopic observations in *Bufo bufo* (L.). *Zeitschrift Zellforschung mikroskopische Anatomie* **144**: 143 - 158.
- ★ BUIKEMA, A.L., NIEDERLEHNER, B.R. & CAIRNS, J. 1982. Biological monitoring: Part IV - Toxicity testing. *Water Research* **16**: 239 - 262.
- BUIKEMA, A.L. & VOSHELL, J.R. 1993. Toxicity studies using freshwater benthic macro invertebrates. In: ROSENBERG, D.M. & RESH, V.H. (Eds.) 1993. *Freshwater biomonitoring and benthic macro invertebrates*. Chapman & Hall, New York. pp. 488.
- ★ BULLOCK, G.R. 1984. The current status of fixation for electron microscopy: a review. *Journal of microscopy* **133**: 1 - 15.
- CAIRNS, J. 1982. *Biological monitoring in water pollution*. Pergamon Press.

- CAMNER, P., CLARKSON, T.W. & NORDBERG, G.F. 1979. Routes of exposure, dose and metabolism of metals. pp. 65 - 97. In: FRIBERG, L., NORDBERG, G.F. & VOUK, V.B. (Eds.) 1979. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp. 687.
- ★ CAMPBELL, P.G.C. & STOKES, P.M. 1985. Acidification and toxicity of metals to aquatic biota. *Canadian Journal of Fish and Aquatic Science* **42**: 2034 - 2049.
- CHANNING, A. & VAN DIJK, D.E. 1995. Amphibia. pp. 193 - 205. In: COWAN, G.I. (Ed.) 1995. *Wetlands of South Africa*. Department Environmental Affairs.
- ★ CLARKSON, T.W. 1979. Effects - general principles underlying the toxic action of metals. In: FRIBERG, L., NORDBERG, G.F. & VOUK, V.B. (Eds.) 1979. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp. 99 - 117.
- ★ CUNNANE, S.C., HORROBIN, D.F. & MANKU, M.S. 1985. *Annual Nutrition and Metabolism* **29**: 103.
- ★ DAWSON, A.B. 1920. The integument of *Necturus maculosus*. *Journal of morphology* **34**: 487.
- ★ DOUDORFF, P. & KATZ, M. 1953. A critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. II. The metals as salts. *Sewage and Industrial Wastes* **25**: 802 - 839.
- DOULL, J. & BRUCE, M.C. 1986. Origin and scope of toxicology. In: KLAASSEN, C.D., AMDUR, M.O. & DOULL, J. (Eds.) 1986. *Toxicology. The basic science of poisons*. 3<sup>rd</sup> edition. Macmillan Publishing Company, New York. pp. 3 - 32.
- ★ EDDY, F.B. 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: PICKERING, A.D. (Ed.). *Stress and fish*. Academic Press, London. pp. 367.
- ★ ELLIS, K.V. 1989. *Surface water pollution and its control*. The Macmillan Press Ltd., London. pp. 373.
- ★ FERREIRA, K.T.G. & HILL, B.S. 1982. The effect of low external pH on properties of the paracellular pathway and junctional structure in isolated frog skin. *Journal of Physiology* **332**: 59 - 67.
- ★ FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. 1979. *Metal pollution in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York. pp. 486.

- FRIBERG, L., NORDBERG, G.F. & VOUK, V.B. 1979. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp. 687.
- FRIEDEN, E. 1968. The biochemistry of copper. *Scientific American* **218**: 102 - 114.
- ★ GOLDFISHER, S., SCHILLER, B. & STERNLIEB, I. 1970. Copper in hepatocyte lysosomes of the toad, *Bufo marinus* L. *Nature* **228**: 172 - 173.
- GOLDSTINE, S.N., MANICKAVEL, V. & COHEN, N. 1975. Phylogeny of gut-associated lymphoid tissue. *American Zoologist* **15**: 107 - 118.
- HARVEY, R.J. 1974. *The kidneys and the internal environment*. Chapman & Hall, London. pp. 167.
- HATTINGH, W.H.J., KEMPSTER, P.L., SARTORY, D.P., TOERIEN, D.F., VAN VLIET, H.R. & VILJOEN, F.C. 1984. Pollutants. In: ALLANSON, B.R. & HART, R.C. (Eds.) 1984. Limnological criteria for management of water quality in the southern hemisphere. *South African National Scientific Programmes Report No 93*. Foundation for Research Development, South Africa. pp. 1 - 85.
- ★ HEATH, A.G. 1987. *Water pollution and fish physiology*. CRC Press, Inc., Florida, USA. pp. 245.
- HELLAWELL, J.M. 1989. *Biological indicators of freshwater pollution and environmental management*. Elsevier Applied Science, London. pp. 507.
- HENG LEE, Y. & STUEBING, R.B. 1990. Heavy metal contamination in the river toad *Bufo juxtasper* (Inger), near a copper mine in East Malaysia. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45**: 272 - 279.
- ★ HOFFMAN, D.O. & ZACHARY, R. 1951. The effect of temperature on the molluscicidal activity of copper sulphate. *Science* **114**: 521 - 523.
- ★ JONAS, L. & ROHLICH, P. 1970. Electron microscopischer Nachweis saurer Mucopolysaccharide in den Flaschenzellen der *Xenopus*-Niere. *Zeitschrift Zellforschung mikroskopische Anatomie* **104**: 56 - 68.
- ★ KAZANTZIS, G. 1979. General aspects on individual diagnosis and treatment of metal poisoning. In: FRIBERG, L., NORDBERG, G.F. & VOUK, V.B. (Eds.) 1979. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp. 219 - 236.
- KENDALL, J.I. 1947. *Microscopic anatomy of vertebrates*. 3<sup>rd</sup> Edition. Lea & Febiger, Philadelphia. pp. 156 - 159.

- KHANGAROT, B.S. & RAY, P.K. 1987. Sensitivity of toad tadpoles, *Bufo melanostictus* (Schneider) to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **38**: 523 - 527.
- ★ KLAASSEN, C.D. 1976. Biliary excretion of metals. *Drug Metabolism Reviews* **5(2)**: 165 - 196.
- ★ KINSON, K. & BELCHER, C.B. 1961. Determination of minor amounts of copper in iron and steel by atomic absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* **31**: 180 - 183.
- KNEZOVICH, J.P., LAWTON, M.P. & INOUE, L.S. 1989. Bioaccumulation and tissue distribution of a quarternary ammonium surfactant in three aquatic species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **42**: 87 - 92.
- KRAUSE, W.J. & CUTTS, J.H. 1986. *Concise text of histology*. 2<sup>nd</sup> Edition. Williams & Wilkens London, pp. 527.
- LILLIE, R.D. & FULLMER, H.M. 1976. *Histopathological technique and practical histochemistry*. 4<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Book Company, New York.
- LILLYWHITE, H.B. & MADERSON, P.F.A. 1988. The structure and permeability of integument. *American Zoologist* **28**: 945 - 962.
- ★ MACHIN, J. 1977. Role of integument in molluscs. In: GUPTA, B.L., MORETEN, R.B., OSCHMAN, J.J. & WALL, B.J. (Eds.). *Transport of ions and water in animals*. Academic Press, New York. pp. 735 - 762.
- ★ MAGOS, L. & CLARKSON, T.W. 1977. *Nature of New Biology* **264**: 121 -124.
- MARAFANTE, E. 1976. Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus*). *Experimentia* **32**: 149 - 151.
- McBEAN, R.L. & GOLDSTEIN, L. 1970. Accelerated synthesis of urea in *Xenopus laevis* during osmotic stress. *American Journal of Physiology* **219(4)**: 1124 - 1130.
- MERTZ, W. 1987. *Trace elements in human and animal nutrition*. 5<sup>th</sup> Edition. Academic Press Inc., New York.
- ★ MEYLING, A.H. 1966. Notes on some limiting factors in the use of molluscicides. *South African Journal of Science* **62(7)**: 224 - 228.
- ★ MEYLING, A.H., MEYLING, J. & PITCHFORD, R.J. 1966. Physico-chemical properties of substances used as molluscicides. *Bulletin of the World Health Organization* **34**: 141 - 146.

- ★ MOORE, J.W. & RAMAMOORTHY, S. 1984. *Heavy metals in Natural Waters: Applied monitoring and impact assessment*. Springer-Verlag, New York. pp. 268.
- MUIÑO, C.V., FERRARI, L. & SALIBÁN, A. 1990. Protective action of ions against cadmium toxicity to young *Bufo arenarum* tadpoles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **45**: 313 - 319.
- NOBLE, G.K. 1954. *The biology of the amphibia*. Dover Publications Inc., New York. pp. 1 - 577.
- ★ NOËL-LAMBOT, F., GERDAY, C.H. & DISTECHE, A. 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comparative Biochemical Physiology* **61C**: 177 - 187.
- PATTLE, R.E., SCHOCK, C., CREASEY, J.M. & HUGHES, G.M. 1977. Surpelllic films, lung surfactants, and their cellular origin in newt, caecilian, and frog. *Journal of Zoology* **33**: 125 - 136.
- PISCATOR, M. 1979. Copper. In: FRIBERG, L., NORDBERG, G.F. & VOUK, V.B. (Eds.) 1979. *Handbook on the toxicology of metals*. Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. pp. 411 - 420.
- PUNZO, F. 1993. Effect of mercuric chloride on fertilization and larval development in the river frog, *Rana heckscheri* (Wright) (Anura: Ranidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **51**: 575 - 581.
- ★ RAI, L.C., GUAR, J.P. & KUMAR, H.D. 1981. Psychology and heavy metal pollution. *Biological Review* **56**: 99 - 151.
- REINECKE, A.J. & VAN AS, J.G. 1981. *Die disseksie van werweldiere en ander chordate*. Buchbaum Uitgewers, Roodepoort. pp. 57 - 74.
- ★ ROUX, D.J. 1994. *Role of biological monitoring in water quality assessment and a case study on the Crocodile River, Eastern Transvaal*. M.Sc Thesis. Rand Afrikaans University, Johannesburg, South Africa. pp. 130.
- ★ SALTMAN, P., ALEY, T. & MCCORNACK, B. 1959. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **83**: 538.
- ★ SCHERER, E. & NOWARK, S. 1973. Apparatus for recording avoidance movements of fish. *Journal of Fish Research Bd Canada* **30**: 1594 - 1596.

- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1990. *Animal physiology: adaptation and environment*. 4<sup>th</sup> Edition. Cambridge University Press. pp. 364 - 387.
- ★ SMITH, G.C., LEWIS, W.M. & KAPLAN, H.M. 1952. A comparative morphologic and physiological study of fish blood. *Progressive Fish Culture* **14**: 169 - 172.
- SPEARMAN, R.I.C. 1973. *The integument: a textbook of skin biology*. Cambridge University Press. pp. 73 - 82.
- ★ SPRAGUE, J.B. 1969. Review Paper: Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research* **3**: 793 - 821.
- ★ SPURR, A.R. 1969. *Journal of Ultrastructure Research* **26**: 31.
- ★ STAGG, R.M. & SHUTTLEWORTH, T.J. 1982. The accumulation of copper in *Platichthys flesus* L. and its effects on plasma electrolyte concentrations. *Journal of Fish Biology* **20**: 491 - 501.
- STETSON, D.L. 1978. Renal alterations induced by osmotic stress and metabolic acidosis in *Xenopus laevis*. *Journal of Experimental Zoology* **206**: 157 - 166.
- STORER, T.I., USINGER, R.L., STEBBINS, R.C. & NYBAKKEN, J.W. 1971. *General Zoology*. 6<sup>th</sup> Edition. McGraw-Hill Book Company, New York. pp. 902.
- ★ SUNDA, W.G. & GUILLARD, R.R.L. 1976. *Journal of Marine Research* **34**: 511 - 529.
- ★ TODD, W.J. 1986. Effects of specimen preparations on the apparent ultrastructure of microorganisms. In: ALDRICH, H.C. & TODD, W.J. 1986. *Ultrastructure techniques for microorganisms*. Plenum Press, New York. pp. 87.
- TOLEDO, R.C. & JARED, C. 1993a. The calcified dermal layer in Anurans. *Comparative Biochemistry and Physiology* **104A** (3): 443 - 448.
- TOLEDO, R.C. & JARED, C. 1993b. Cutaneous adaptations to water balance in amphibians. *Comparative Biochemistry and Physiology* **105A** (4): 593 - 608.
- VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. & DEACON, A.R. 1994. *Effect of pollution on the physiology of fish in the Olifants River (Eastern Transvaal)*. Rand Afrikaans University. pp. 214.
- ★ VIDAL, I.L. 1978. Copper in the livers of trout caught below a sewage discharge. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **12**(2): 217 - 219.

- ★ WALDICHUCK, M. 1974. Some biological concerns in heavy metal pollution. In: VERNBERG, F.J. & VERNBERG, V.B. 1974. *Pollution and physiology of marine organisms*. Academic Press, New York. pp. 1 - 57.
  
- ★ WEB, M. 1982. Binding of cadmium ions by rat livers. *Biochemical Pharmacology* **21**: 2751 - 2755.
  
- WHITEAR, M. 1975. Flask cells and epidermal dynamics in frog skin. *Journal of Zoology (London)* **175**: 107 - 149.
  
- WOLMARANS, C.T. 1984. Die opname en verspreiding van CuSO<sub>4</sub> by *Bulinus (Bulinus) tropicus*. Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys. Ph.D Tesis.
  
- ★ YAGER, C.M. & HARRY, H.W. 1964. The uptake of radio-active zinc, cadmium and copper by the freshwater snail, *Taphius glabratus*. *Malacologia* **1(3)**: 339 - 353.
  
- ZUBAY, G. 1988. *Biochemistry*. 2<sup>nd</sup> Edition. MacMillan Publishing Company, New York. pp. 1 - 1266.
  
- ZUG, G.R. 1993. *Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles*. Academic Press, New York.
  
- ★ *Literatuur nie in die oorspronklike gesien nie.*