

DIE EFFEK VAN LOOD EN
WATERKWALITEIT OP DIE BIOLOGIE VAN
DIE VLEIKURPER, *TILAPIA SPARRMANII*

DEUR

L.C.R. VENTER

Verhandeling voorgelê vir gedeeltelike nakoming van die vereistes vir die
graad Magister Scientiae in die Skool vir Omgewingswetenskappe en
Ontwikkeling aan die Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër
Onderwys



**Ontstaan 1869
50 jaar selfstandig 2001**

Studieleier: Prof. W.J. van Aardt
Potchefstroom
Maart 2001

Dankbetuigings

Graag bedank ek die volgende persone of instansies wat die daarstelling van hierdie studie moontlik gemaak het.

Amptelik

- ❖ Prof. W.J. van Aardt, my studieleier, vir sy aanmoediging, ondersteuning en insiggewende raad, waarsonder hierdie studie nie moontlik sou wees nie.
- ❖ Potchefstroomse Universiteit vir Christelike Hoër Onderwys, vir die geleentheid om navorsing te doen.
- ❖ Prof. H. van Hamburg en personeel van die Departement Dierkunde vir die gebruik van die fasiliteite.
- ❖ Me Riana van der Westhuizen vir taalversorging van die verhandeling.
- ❖ Mnr. J. Booysen vir hulp met veldwerk en analyses asook voltydse ondersteuning.
- ❖ Mnr. Colin Read vir bystand met chemiese analyses.

Persoonlik

- ❖ My Skepper. Sonder God se genade en liefde sou my lewe en hierdie verhandeling nie die lig gesien het nie.
- ❖ My ouers, vir opregte besorgdheid, liefde, ondersteuning en gebede deur die jare.
- ❖ My suster en swaer, Erica en Vos, vir al jul ondersteuning en bystand.
- ❖ My vriend, broer en kollega, Riaan Booysen (swaer, shorty) vir sy sy ware vriendskap, geduld en ondersteuning.
- ❖ My vriendin, Belinda Bester, vir al haar liefde, vriendskap, ondersteuning en bystand.

OPSOMMING

1. Hanteringstres het 'n verhoging in die suurstofverbruikskoers ($\dot{M}O_2$) by *Tilapia sparrmanii* met gemiddeld 27% en stabiliseer vier ure na hanteringstres.
2. Alle $\dot{M}O_2$ -meting is na 'n tien-uur rusperiode uitgevoer.
3. Daar is van onderskeidelik 410 visse vir $\dot{M}O_2$ -studies en 130 visse vir weefselanalises tydens hierdie studie gebruik gemaak.
4. Subakute loodblootstellings in Hardewater en Sagtewater het geen effek op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* nie.
5. Subakute loodblootstellings, tesame met die verlaging in pH, verhoog die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii*.
6. As 'n groep van tien *T. sparrmanii* visse gelyktydig in die 23.033 liter respirometer geplaas word, styg die $\dot{M}O_2$ met 280% as dit vergelyk word met die $\dot{M}O_2$ van 'n enkele vis per respirometer.
7. Die vorming van mukus op die kieulamellae is 'n aanduiding van 'n lae pH in die water en 'n toename in die opgeloste swaarmetaalkonsentrasies in die water.
8. Akute blootstelling van *T. sparrmanii* aan lood het 'n afname van ongeveer 12.5% in die $\dot{M}O_2$ tot gevolg.
9. By akute loodblootstellings is waargeneem dat mukus op die lamellae van *T. sparrmanii* vorm. Mukus vorming kan as 'n aanduiding van loodbesoedeling dien.
10. Toename van ammoniak (NH_4^+) in water by hoë pH kan 'n verklaring bied waarom die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* in Hardewater by subakute blootstelling styg.
11. Lae pH by Sagtewater het 'n sekondêre stresrespons tot gevolg, wat veroorsaak dat $\dot{M}O_2$ toeneem.
12. Onder hipoksiese toestande verlaag die dalings tempo van die PO_2 -waarde in die geseëde watervolume met die gevolg dat die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* afneem.
13. Die totale opgeloste stowwe in gal en bloedplasma by Harde- en Sagtewater by subakute loodblootstelling verskil nie statisties beduidend nie.

14. Die totale opgeloste stowwe in bloedplasma neem statisties beduidend af met 'n afname in die pH van die water.
15. Toenemende loodkonsentrasie met 'n afname in pH-waardes van die water is die primêre faktore wat 'n daling in die chloried-waardes van die bloedplasma van *T. sparrmanii* tot gevolg het.
16. 'n Toename in loodkonsentrasie gedurende subakute loodblootstellings veroorsaak 'n toename in die loodkonsentrasie van kieu- en lewerweefsel.
17. Kieuweefsel bioakkumuleer 40 keer meer lood in vergelyking met die lewerweefsel.
18. Lae pH in die water bevorder die akkumulering van lood in lewer- en kieuweefsel.
19. Die bioakkumulering van lood in kieu- en lewerweefsel van *T. sparrmanii* kan gebruik word as 'n bio-indikator vir loodbesoedeling in akwatiese stelsels.
20. 'n Afname in die hardheid van die water het 'n toename van gemiddeld 50% in die loodkonsentrasie in die water tot gevolg.
21. 'n Verlaging in pH by Sagtewater het 'n styging van gemiddeld van 20% in die loodkonsentrasie van die water tot gevolg.
22. Lugdeurborreling en meganiese roering van die water veroorsaak dat die onoplosbare presipitaat in suspensie gaan, wat 'n toename in die geanaliseerde konsentrasie lood tot gevolg het.
23. Long *et al.* (1977) het met sy teoretiese berekening van die hoeveelheid lood in oplossing, by hoë pH, en 'n mengsel van vars- en seewater, gevind dat ongeveer 10% van die lood in oplossing bly, terwyl by hierdie ondersoek minder as 1% lood in oplossing by hoë pH en Hardewater gevind is.

ABSTRACT

1. Handling stress increases the oxygen consumption rate ($\dot{M}O_2$) of *Tilapia sparrmanii* by an average of 27% and stabilises four hours after handling.
2. All $\dot{M}O_2$ measurements were done after a ten hour rest period.
3. For $\dot{M}O_2$ studies 410 fish were used while 130 fish were used for tissue analysis.
4. Subacute lead exposure in Hard and Soft water has no effect on the $\dot{M}O_2$ of *T. sparrmanii*.
5. Subacute lead exposure combined with the lowering of pH, increases the $\dot{M}O_2$ of *T. sparrmanii*.
6. When a group of ten *T. sparrmanii* are placed simultaneously in a 23.033 liter respirometer an increase of 280% in $\dot{M}O_2$ was measured if the $\dot{M}O_2$ is compared with the $\dot{M}O_2$ measurement of one fish per respirometer.
7. The forming of mucus on the gill lamellae is an indication of low pH and an increase in heavy metal concentration in the water.
8. Acute exposure of *T. sparrmanii* to lead resulted in a decrease of 12.5% in $\dot{M}O_2$.
9. The formation of mucus on the gill lamellae was observed when *T. sparrmanii* was exposed to acute lead exposure. The formation of mucus can be used as an indicator of lead exposure.
10. An increase of ammonia (NH_4^+) in water, high pH, can explain why the $\dot{M}O_2$ of *T. sparrmanii* increases with exposure to subacute lead concentrations.
11. Low pH in Soft water results in a secondary stress response that increases the $\dot{M}O_2$ of *T. sparrmanii*.
12. Under hypoxia the decrease rate of the PO_2 values in a sealed water volume is inhibited and results in the decrease of the $\dot{M}O_2$ of *T. sparrmanii*.
13. The total dissolved solids in bile and blood plasma in Hard and Soft water, by sub-acute lead exposure, does not statistically differ significantly.
14. The total dissolved solids in the blood plasma decreases with a decrease in the pH of the water.

15. An increase in lead concentration, combined with a decrease in the pH of the water, is the primary factor resulting in a decrease of the chloride values of blood plasma of *T. sparrmanii*.
16. An increase in the lead concentrations at subacute lead exposure results in the increase in lead concentrations of the gill and liver tissue.
17. Gill tissue accumulates 40 times more lead than liver tissue.
18. Low pH of water favours the accumulation of lead on gill and liver tissue.
19. The bioaccumulation of lead in the gill and liver tissue can be used as a bio-indicator for lead contamination in aquatic systems.
20. A decrease in hardness of water results in the increase of lead concentration by about 50%.
21. A decrease in pH of Soft water results in an increase of about 20% in the lead concentration in the water.
22. The bubbling of air through water and the mechanical stirring of the water cause the insoluble precipitate to go into suspension. This results in an increase of the concentration of lead that is analysed.
23. Long *et al.* (1977) theoretically calculated that the concentration of lead, at high pH, and a seawater mixture of fresh and seawater, was about 10% while in this study less than 1% lead was still in solution in Hard water and high pH.

Inhoudsopgawe

Dankbetuigings	I
Opsomming	II
Abstract	IV
Hoofstuk 1 Inleiding	1
Literatuurlys	5
Hoofstuk 2	8
2.1 Vang, behandeling en aanhouding van vis	8
2.2 Watertipes gebruik vir die blootstellingseksperimente	9
2.3 Literatuurlys	10
Hoofstuk 3 Blootstellingseksperimente aan lood: meting van suurstofverbruikskoers ($\dot{M}O_2$).....	11
3.1 Algemene materiaal en metodes	11
3.1.1 Beginsel waarop die Clark-polarografiese suurstofelektrode werk	11
3.1.2 $\dot{M}O_2$ -berekeninge	13
3.1.2.1 Berekening van $\dot{M}O_2$ - waardes van visse	13
3.1.2.2 $\dot{M}O_2$ -korreksies van wisselende vismassas na 'n standaard 30 gram vis.	16
3.3 $\dot{M}O_2$ tydens normoksiese toestand (PO_2 : 130mm Hg – 80mm Hg)	18
3.3.1 Die effek van hanteringstres op die $\dot{M}O_2$ van <i>T. sparrmanii</i>	18
3.3.1.1 Eksperimentele opstelling	18
3.3.1.2 Meetmetode	18
3.3.1.3 Resultate	20
3.3.1.4 Bespreking	21
3.3.1.5 Gevolgtrekking	22
3.3.2 Sub-akute blootstellings: suurstof verbruik tydens normoksie ($\dot{M}O_2$)	22

3.3.2.1	Eksperimentele opstelling	22
3.3.2.2	Meetmetode	23
3.3.2.3	Resultate	24
3.3.2.4	Bespreking	28
3.3.2.5	Gevolgtrekking	29
3.3.3	Akute loodblootstellings: suurstofverbruikskoeers tydens normoksie ($\dot{M}O_2$) ..	30
3.3.3.1	Eksperimentele opstelling	30
3.3.3.2	Meetmetode	31
3.3.3.3	Resultate	31
3.3.3.4	Bespreking	33
3.3.3.5	Gevolgtrekking	34
3.3.4	Subakute blootstellings: suurstofverbruik ($\dot{M}O_2$) tydens hipoksie	35
3.3.4.1	Eksperimentele opstelling	35
3.3.4.2	Meetmetode	35
3.3.4.3	Resultate	36
3.3.4.4	Bespreking	38
3.3.4.5	Gevolgtrekking	40
3.3.5	Akute loodblootstelling: Bepaling van PO_2 – afnamekoeers tydens hipoksie en suurstofverbruik ($\dot{M}O_2$) tydens hipoksiese toestande	41
3.3.5.1	Eksperimentele opstelling	41
3.3.5.2	Meetmetode	42
3.3.5.3	Resultate	42
3.3.5.4	Bespreking	45
3.3.5.5	Gevolgtrekking	46
3.4	Literatuurlys	47

Hoofstuk 4 Blootstellingeksperiment aan lood: analyses van bloedplasma, gal en weefsels by subakute loodkonsentrasies

4.1	Materiaal en metodes	51
4.1.1	Bloedmonsternemingtegniek	51
4.1.2	Dissekteertegnik en verwydering van weefsels	52
4.2	Bepaling van die totale opgeloste stowwe in bloedplasma en gal	53

4.2.1	Eksperimentele opstelling	53
4.2.2	Resultate	54
4.2.3	Bespreking	57
4.2.4	Gevolgtrekking	57
4.3	Bepaling van bloedplasmachloriede	58
4.3.1	Eksperimentele opstelling	58
4.3.2	Resultate	60
4.3.3	Bespreking	61
4.3.4	Gevolgtrekking	62
4.4	Atoom-absorpsie spektrometrie	63
4.4.1	Algemene materiaal en metodes: van die loodanalise van die lewer- en kieuweefsel.	63
4.4.1.1	Vertering van weefsels vir Elektrotermiese Atoom-absorpsie Spektrometer (AAS)	63
4.4.1.2	Opmaak van standaarde vir die standarisering van loodanalises vir die AAS	63
4.4.1.3	Verdunning van weefselmonsters vir AAS – analise	65
4.4.1.4	Die beginsel waarop die AAS werk	65
4.4.1.5	Veranderlikes van die AAS	65
4.4.1.6	Waterpersentasiebepalings van lewer- en kieu filamentweefsel	67
4.4.2.	Bepaling van die konsentrasie lood in weefsels	68
4.4.2.1	Berekening van die hoeveelheid lood in 1 gram droëmassa	68
4.4.2.2	Resultate	70
4.4.2.3	Bespreking	74
4.4.2.4	Gevolgtrekking	75
4.5	Literatuurlys	76
Hoofstuk 5 Loodblootstellingeksperimente: waterchemie van gebruikte Watertipes		79
5.1	Bepaling van die persentasie lood in sintetiese harde- en sagewater na 96-uur	79

5.1.1	Opmaak van sintetiese harde- en sagte water	79
5.1.2	Bepaling van die konsentrasie lood in sintetiese water na 96 uur	79
5.1.3	Resultate	80
5.1.4	Bespreking	82
5.1.5	Gevolgtrekking	82
5.2	Bepaling van die konsentrasie lood in Hardewater en Sagte water na 96 uur	83
5.2.1	Meetmetode	83
5.2.2	Resultate	83
5.2.3	Bespreking	85
5.2.4	Gevolgtrekking	86
5.3	Bepaling van die konsentrasie lood in Harde- en Sagte water na 48 uur: meganiese wateragitasie en nie-meganiese water agitasie.	86
5.3.1	Meetmetode	86
5.3.2	Resultate	87
5.3.3	Bespreking	88
5.3.4	Gevolgtrekking	88
5.4	Literatuurlys	89
	Hoofstuk 6 Algemene bespreking	91

Hoofstuk 1: Inleiding

Die grootste gedeelte van suider Afrika kan geklassifiseer word as 'n ariede of semi-ariete streek. Meer as die helfte van Suid-Afrika ontvang minder as 600 mm reënval per jaar. Die reënval is baie wisselvallig en gaan met hidrologiese ekstreme toestande van lang droogtes tot onvoorspelbare vloede gepaard (Departement van Waterwese, 1986).

Metale is natuurlike komponente van varswaterstelsels wat afkomstig is van die erosie van rotsmateriaal. Dit blyk egter dat daar 'n tendens van 'n toename in die metaalbesoedeling van akwatiese stelsels is wat toegeskryf kan word aan groei van mynbouaktiwiteite, industriële en landbou-aktiwiteite en die steeds groeiende populاسie van Suid-Afrika (Van Vuren *et al.*, 1994).

Die belangrikste metale wat water besoedel is sink, koper, lood, kadmuim, kwik, nikel en chroom (Abel, 1989). Metale kan in twee katogorieë verdeel word, naamlik essensiële spoorelemente vir lewende organismes, byvoorbeeld koper en sink, en nie-essensiële spoorelemente, byvoorbeeld lood en kadmuim, wat geen biologiese funksie in die lewende organisme verrig nie (Keenan & Alikhan, 1991; Sultana & Rao, 1998).

Lood is 'n swaarmetaal wat duisende jare reeds aan die mensdom bekend is. Die Egiptenare van 7000 jaar gelede het lood gebruik as gewigte, ankers, kookware en waterpype (Pain, 1995). Die Roomse en Griekse ryke het lood gebruik om water- en wynkanne mee uit te voer. Loodvergiftiging was een van die redes waarom hierdie twee ryke tot 'n val gekom het (Förstner & Wittmann, 1981). Die Engelse term "plumbing", wat watervervoer aandui, is van die Latynse woord "plumbum" afgelei. Die twee terme is 'n aanduiding dat loodpype reeds honderde jare as watervervoermiddel gebruik word (Hem, 1989).

Die hoeveelheid lood in die omgewing het drasties toegeneem tydens die industriële ontwikkeling van die 18de en 19de eeu. Antropogeniese gebruike van lood het, veral

in die laaste eeu, veroorsaak dat die globale beskikbaarheid en die verspreiding van lood meer toegeneem het as enige ander toksiese stof. Hoë loodvrystellings in stedelike gebiede, as gevolg van die uitlaatgasse van binnebrandmotors, het tot gevolg dat die loodkonsentrasie in stedelike gebiede duisende kere hoër is as wat die loodkonsentrasie voor die industriële revolusie was (Pain, 1995). Die klein loodpartikels wat teenwoordig is in atmosferiese uitlaatgasse word wêreldwyd deur wind vervoer.

Die gevolg hiervan is dat baie landelike gebiede verhoogde loodvlakke het en dat selfs die Suidpool 3 tot 5 keer hoër vlakke besit as voor die industriële revolusie (Pain, 1995).

Volgens Vighi (1981) word ongeveer 400 000 ton lood jaarliks tot die oseane van die wêreld toegevoeg. Die verhoogde loodkonsentrasie in die omgewing het 'n verhoging in bio-akkumulering en toksisiteit van lood in al die trofiese vlakke tot gevolg (Vighi, 1981).

Die toksisiteit van lood by die mens is al vir meer as 2000 jaar bekend. Die Griekse geneesheer, Nicander, het 'n siektetoestand wat bekend staan as "plumbisme" beskryf nadat mense aan akute loodvergiftiging blootgestel is (Förstner & Wittmann, 1981). Die gevolge van akute loodvergiftiging op die mens wissel van assemhalingsprobleme, geheueverlies, maagkrampe, tot selfs die dood van 'n persoon (Fridberg & Tsuchiya, 1979). Die sentrale senuweestelsel word ook deur lood geaffekteer en simptome van pyn, verlamming en spierverswakking word tydens loodvergiftiging opgemerk (Goodman & Gilman, 1996).

In die akwatiese omgewing is daar verskeie faktore wat die toksisiteit en die konsentrasie van lood beïnvloed, naamlik temperatuur, waterhardheid, pH en die opgeloste suurstof in die water (Abel, 1989). Die biologiese monitering van die waterbronne in Suid-Afrika is van groot belang.

Dit is bekend dat bio-akkumulering van swaarmetale in die organe en weefsels van visse plaasvind. Visse kan maklik gevang word en kom oral in die wêreld voor. Die

identifikasie en klassifikasie van die visse, in die algemeen, is reeds goed bekend (Hellowell, 1986).

Een van die varswaterorganismes wat gebruik kan word vir biologiese monitoring is die vleikurper, *Tilapia sparrmanii*.

Tydens hierdie studie is daar gebruik gemaak van die inheemse visspesie, *T. sparrmanii*, om die effek van verskillende loodkonsentrasies op die biologie van die vis te ondersoek. Dié visspesie is gekies vir hierdie studie aangesien dit volop in die Mooirivier-stelsel voorkom. Dit word deur mense as voedselbron en ook in laboratoriumstudies as eksperimentele vis gebruik.

T. sparrmanii is bekend as 'n geharde vis, veral onder hoë temperatuur en hipoksiese toestande (Persoonlike waarnemings). Dit is bekend dat die kurperfamilie, Chichlidae, geharde vissoorte is (Chapman *et al.*, 1995).

Die blootstellingstelsel wat tydens hierdie studie gebruik is, staan as 'n statiese stelsel bekend. In 'n statiese stelsel word die toksiese metaal opgelos tot 'n bepaalde konsentrasie. Die proefdiere word dan in hierdie toksiese water geplaas vir 'n bepaalde blootstellingstydperk, *sonder* dat die water vervang word.

Die drie nadele van hierdie stelsel is volgens Rand *et al.* (1995) dat

- (1) die toksiese metaal se konsentrasie verlaag word deur absorpsie deur die wande van die houër of toetsorganisme. Hierdie nadeel is tydens hierdie studie tot 'n minimum beperk deur van polipropileen blootstellingstenks, van 855 liter water, gebruik te maak.
- (2) Die toksiese metaal kan 'n hoë biochemiese suurstofaanvraag hê, met die gevolg dat die suurstofspanning in die water drasties verlaag word. Tydens hierdie studie met *T. sparrmanii* is lugdeurborreling van die toetsstelsel altyd toegepas.
- (3) Die konsentrasie van die skadelike metaboliese afvalprodukte (ammoniak en ureum) verhoog en kan met die toksiese metaal reageer. Ook kan hierdie metaboliese produkte die suurstofverbruik van die vis beïnvloed. Vir hierdie studie is daar egter gebruik gemaak van 'n 855 liter watertenk, sodat een vis aan 'n volume van 43.8 liter water blootgestel is.

In hierdie ondersoek is 'n deeglike literatuursoektog gedoen om die effek van lood op die suurstofgebruikskoers ($\dot{M}O_2$) van visse vas te stel. Behalwe verwysings dat swaarmetale soos koper, wat die ventilasietempo verhoog (Alexander, 1970) en dat koper die respirasie van die kieuë beïnvloed (Baker, 1969), is geen kennis oor die direkte effek van lood op die suurstofverbruik by varswatervisse gevind nie.

Die redes waarom $\dot{M}O_2$ -studies nog nie gebruik is om die toksisiteit van lood op visse vas te stel nie, kan moontlik die volgende wees: Die kennis om die suurstofverbruikskoers by visse vas te stel word nie altyd verantwoordelik toegepas nie. Dit geld veral by toksikologiese studies, waar respirasie-fisiologie betrokke is. Sonder die kennis van hanteringstres en ander stersverwante faktore, wat $\dot{M}O_2$ beïnvloed, kan hierdie meting nie noukeurig gedoen word nie. 'n Taak van hierdie ondersoek was om 'n deeglike beskrywing te maak van die tegnieke en metodes om $\dot{M}O_2$ te meet.

Lood bio-akkumuleer in vis (Van Vuren *et al.*, 1999; & Heath & Claasen, 1999) veral in die kieuë en lewer (Van Vuren *et al.*, 1994).

Uit die literatuur (Lock *et al.*, 1981; Van Vuren *et al.*, 1994) is gevind dat varswatervis 'n daling in die ioonvlakke van die bloedplasma toon tydens swaarmetaalblootstelling.

Met hierdie studie word daar gepoog om 'n bydrae tot ons kennis van $\dot{M}O_2$ en lood-toksisiteit te maak. Daar is ook gepoog om vas te stel tot watter mate lood bio-akkumuleer in kieu- en lewerweefsel. Die verandering van die totale opgeloste stowwe in die bloedplasma en gal, asook bloedplasma-chloriedkonsentrasie tydens loodblootstellings is bestudeer. Verandering in hierdie biologiese parameters is ondersoek in harde- en sagte watertipes.

Literatuurlys

ABEL, P.D. 1989. Water pollution biology. Chichester: Ellis Horwood Limited Publishers: England. pp. 1-139.

ALEXANDER, R. 1970. Functional design in fishes. 2nd ed. London: Hutchinson.

DEPARTEMENT VAN WATERWESE, 1986. Management of water resources of the Republic of South Africa. Pretoria: Department of Water Affairs: pp. 549.

BAKER, J.T.P. 1969. Histological and electron microscopical observations on copper poisoning in the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26: 2785-2793.

CHAPMAN, L.J., KAUFMAN, L.S., CHAPMAN, C.A. & MCKENZIE, F.E. 1995. Hypoxia tolerance in twelve species of East African Cichlids: Potential for low oxygen refugia in Lake Victoria. *Conservation Biology*, 9: 1274 – 1288.

FRIDBERG, L. & TSUCHIYA, K. 1979. Lead, Handbook on the Toxicology of Metals. Elsevier: North-Holland Biomedical Press, pp 451-484.

FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. 1981. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany: pp. 15-313.

GOODMAN, L. & GILMAN, A. 1996. Pharmacological basis of therapeutics. (9rd ed.) The McGraw-Hill Companies, Inc. United States of America. pp. 1649 – 1670.

HEATH, R.G.M. & CLAASSEN, M. 1999. An overview of the pesticide and metal levels present in populations of the larger indigenous fish species of selected South African rivers. WRC Report No. 428/1/99. pp108 – 114.

HELLAWELL, J.M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Barking, Elsevier Applied Science Publishers LTD: England

HEM, J.D. 1989. Study and interpretation of the chemical characteristics of natural water (3rd ed.). *U.S Geological Survey Water-Supply Paper 2254*, Washington, D.C., pp 56-159.

KEENAN, S. & ALIKHAN, M.A. 1991. Comparative study of cadmium and lead accumulations in *Cambarus bartoni* (Fab.) (Decapoda, Crustacea) from an acidic and a neutral lake. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 47: 91-96.

LOCK, R.A.C., CRUIJSEN & P.M.J.M. VAN OVERBEEKE 1981. A.P. Effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on the osmoregulatory function of the gills in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, *Comparative Biochemistry and Physiology*, 68C: 151-159.

PAIN, D. J. 1995. Lead in the Environment. *In: Royal Society for the Protection of Birds*. CRC Press, INC p 356-391.

RAND, G.M., WELLS, P.G. & MCCARTY, L.S. 1995. Introduction to aquatic toxicology. *In: Fundamentals of aquatic toxicology* (ed. Rand, G.M.). Taylor & Francis, United States of America, Second edition, pp 3-67

SULTANA, R. & RAO, D.P. 1998. Bioaccumulation patterns of zinc, copper, lead, and cadmium in grey mullet, *Mugil cephalus* (L.), from harbour waters of Visakhapatnam, India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 60: 949 – 955.

VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. & DEACON, A.R. 1994. Effect of pollutants on the physiology of fish in the Olifants River (Eastern Transvaal). WRC Report No. 350/1/94. pp142.

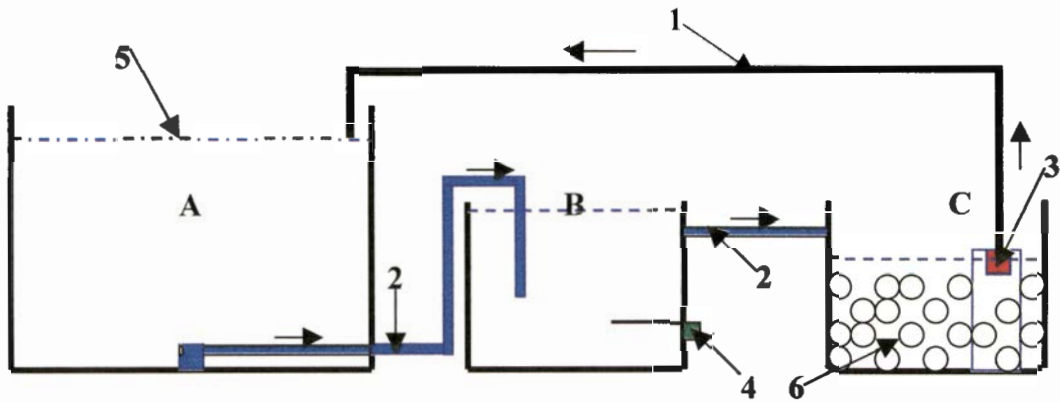
VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H., WEPENER, V., ADENDORFF, A., BARNHOORN, I.E.J., COETZEE, L., KOTZÉ, P. & NUSSEY, G. 1999. Lethal and sublethal effects of metal on the physiology of fish: an experimental approach with monitoring support. WRC Report No. 608/1/99, pp 3-9.

VIGHI, M. 1981. Lead uptake and release in an experimental trophic chain.
Ecotoxicology and Environmental Safety, 5: 177 – 193.

Hoofstuk 2

2.1 Vang, behandeling en aanhouding van vis

Die visse (*Tilapia sparrmanii*) wat vir die eksperiment gebruik is, is met goinette gevang in Boskopdam (koördinate 26°33'40", 27°06'42", kapasiteit 20.703 miljoen m²). Brood is as lokaas gebruik. Die visse word in 'n vervoertenk geplaas (400 liter) wat met 'n lugborrelaar toegerus is. Die temperatuur van die water in die vervoertenk word dieselfde gehou as in die dam deurdat water uit die dam deur die vervoertenk gesirkuleer word. Op dié manier word gesorg dat die visse nie aan temperatuurskommeling blootgestel word nie. Ses kilogram growwesout word by die visse in die vervoertenk gevoeg sodra die visse vervoer word, wat gewoonlik 15 minute duur. Die sout dien as 'n behandeling teen hanteringstres, asook teen fungibesmetting (*Saprolegnia*) wat op die visse mag voorkom. Hierdie fungus affekteer gewoonlik visse wat blootgestel is aan stres en huidbeserings, veral gedurende die winterseisoen. Dit word gekenmerk as haaragtige uitgroeisels op die lyf en kieuë van visse (Skelton, 1993). By die visaanleg te Potchefstroom is die visse dadelik in 'n bak met varswater (met dieselfde temperatuur as die vervoertenk) geplaas om van die oortollige sout af te spoel. Die visse word behandel deurdat hulle vir tien sekondes in 'n malagietgroen-en -formalienoplossing (2 g malagietgroen en 200 ml 40 % formaldehyd in 40 liter water) gedompel word en vervolgens met skoon water afgespuit word. Die visse word in 'n aanhoudingstelsel geplaas vir 'n tydperk van twee weke om te akklimeer. Voeding geskied deur drie maal per week die visse met 'n hoë proteïen Koi-kos te voer (Rainbow).



Figuur 2.1: 'n Skematiese voorstelling van die aanhoudingstelsel: (A) aanhouding-, (B) sedimentasie- en (C) biologiese filtertenk waarin visse aangehou word, (1) 20 mm PVC-pyp, (2) 50 mm PVC-pyp, (3) Dompelpomp met geperforeerde drom, (4) Verhittingselement, (5) Watervlak, (6) Polipropileengaassakke. Skaal: 1 cm = 40cm

Die aanhoudingstelsel (Fig. 2.1) bestaan uit drie komponente, naamlik: 'n aanhoudingstenk (5000 liter), 'n sedimentasietenk (1000 liter) en 'n biologiese filtertenk (1000 liter). In die aanhoudingstenk is daar 'n 50mm deursnee PVC-pyp met 'n sif waardeur die feses en water van die tenk uitgehewel word na die sedimentasietenk. In die sedimentasietenk sak die feses tot op die bodem en die skoon water beweeg met 'n pyp na die biologiese filtertenk. Daar is ook 'n verhittingselement wat funksioneel is om 'n konstante temperatuur van 20°C in die stelsel te handhaaf. In die biologiese filter is daar ongeveer twee ton betonklip (20mm in deursnee) in sakke wat dien as oppervlak waarop bakterieë voorkom. Die bakterieë is verantwoordelik vir die oksidasie van ammonia na nitriete, nitrosomonas bakterie, en die oksidasie van nitriete na nitrate, byvoorbeeld deur nitrobacter bakterie na onskadelike verbindings (Mathews & van Holde, 1996). Die water word met behulp van 'n dompelpomp na die aanhoudingstenk teruggepomp.

2.2 Watertipes gebruik vir die blootstellingseksperimente

Die hardewater wat vir die eksperimente gebruik word is afkomstig van die Potchefstroomse munisipaliteit. Hierdie water het hoë karbonaatvlakke as gevolg van die dolomitiese gesteentes waarin die Mooirivier-opvangsgebied geleë is. In hierdie ondersoek sal na hierdie water verwys word as Hardewater.

Die sagte water is afkomstig van 'n plaas, Rooipoort 162 (26°35'882", 26°50'348").

Volgens Dr. M.S. Coetzee (persoonlike mededeling) is die boorgat (± 30 m diep) geboor op die kontak tussen 'n skalielaag (± 58 meter dik) en oorliggende kwartsietlaag van ongeveer 235 meter dik. Beide is gesteentes van die Witwatersrand-supergroep wat 'n sedimentêre afsetting is (Nel, 1934). Die reënwater (meteoriese water) filtreer deur die kwartsietlaag. Die kwartsietlaag is SiO_2 -ryk en daar word dus byna geen mineraalsoute deur die perkulerende water opgelos nie. Dit verklaar die lae gelydingsvermoë van die water ($90 - 95 \mu\text{S cm}^{-1}$). Die 10 mg L^{-1} nitraat in die water is waarskynlik afkomstig van die mielielande wat aangrensend van die boorgat geleë is.

In hierdie ondersoek sal na hierdie water verwys word as Sagtewater.

2.3 Literatuur

SHELTON, G. 1971. The regulation of breathing. *In: Fish Physiology* (Eds. W.S. Hoar & D.J. Randall), Vol. IV, New York: Academic Press, pp. 293-359.

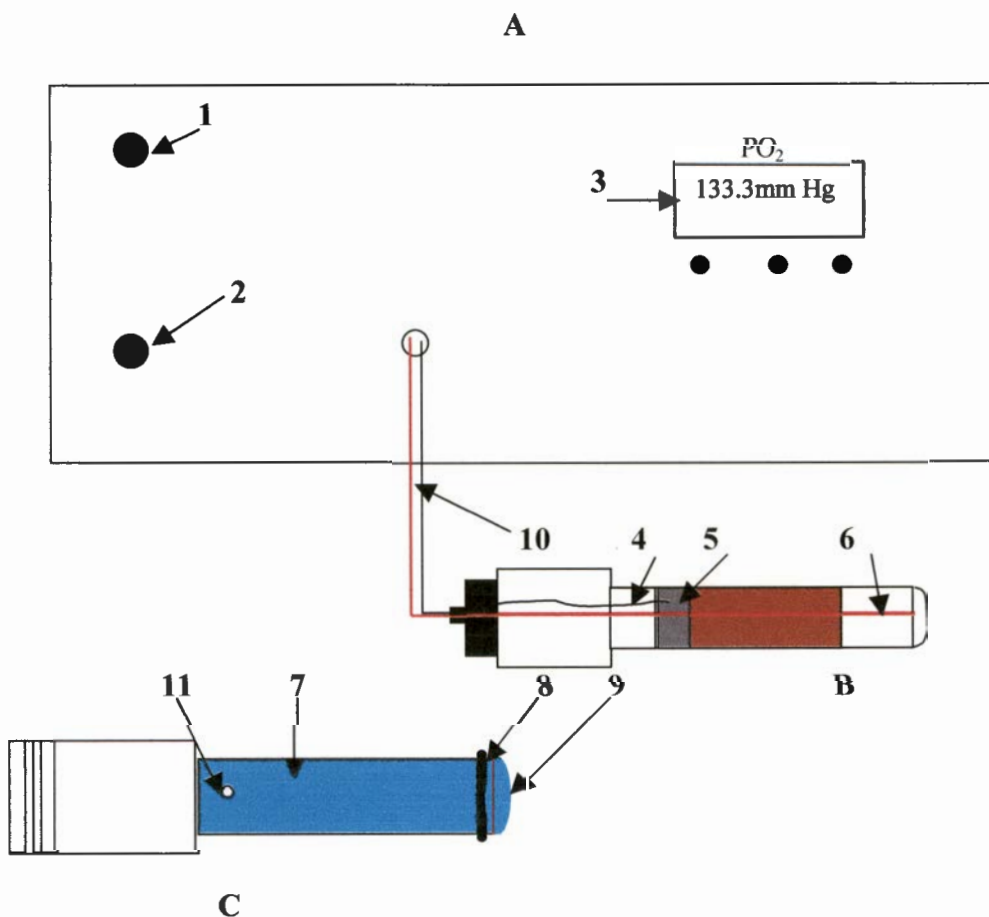
NEL, L.T. 1934. Geologiese kaart Klerksdorp – Ventersdorp. Vel 1 en Vel 2. Geologiese opname, Staatsdrukker Pretoria.

MATHEWS, C.K. & VAN HOLDE, K.E. 1996. Metabolism of nitrogenous compounds: Principles of biosynthesis, utilization, and turnover. *In: Biochemistry*. Menlo Park, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. pp 698 –736.

Hoofstuk 3: Blootstellingseksperimente aan lood: metinge van suurstofverbruikskoers ($\dot{M}O_2$)

3.1 Algemene materiaal en metodes

3.1.1. Beginsel waarop die Clark-polarografiese suurstofelektrode werk Suurstof meetmetodes



Figuur 3.1: 'n Grafiese voorstelling van Clark-polarografiese suurstofelektrode met sy meter: (A) Suurstofmeter, (B) Suurstofelektrode sonder plastiekhuls, (C) Plastiekhuls van suurstofelektrode, (1) Zero-verstelknop, (2) Fyn verstelknop, (3) Leesvenster, (4) Silweranode met (5) Silwer/silwer-chloriedbandjie, (6) Platinakatode, (7) Elektroliet binne plastiekhuls, (8) O-ring, (9) Teflon membraan, (10) Ko-aksiaal kabel, (11) Waterdrukewewigsopening. Skaal: 1cm = 1cm

Die elektrode (Fig. 3.1) bestaan uit in 20 μm deursnee platinumdraad (9) wat in glas ingebed is. Die blootgestelde punt van die draad vorm die katode. Die platinakatode verander die PO_2 met $0.0015 \text{ mmHg min}^{-1}$ in 'n 0.1 ml water by 25°C (Severinghaus & Bradley, 1969). Die anode (7) is gechlorineer. Die anode bestaan uit 'n silwer plaatjie en is $\pm 2\text{cm}$ om die glas vanaf die katode gedraai. Die elektriese verbinding tussen die anode en katode word verkry deur 'n gebufferde KCl-oplossing wat as die elektroliet (7) bekend staan. Die elektroliet bestaan uit $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (5.1g) + KH_2PO_4 (2.5g) + KCL (1g) wat in 100 ml gedeïoniseerde water ($\text{d-H}_2\text{O}$) opgelos is. Hierdie oplossing word binne 'n houer in 'n donkerkas geberg en elke twee maande word nuwe elektroliet opgemaak. Die elektroliet word binne die plastiekhuls gehou deur 'n teflon membraan (9) wat ook dien as 'n deurlatende membraan vir suurstof. Die membraan word aan die punt van die plastiekhuls gehou deur 'n O-ring (8).

Tydens gebruik van die elektrode word daar 'n gepolariseerde spanning van 650 mV tussen die anode en die katode gevorm. Die platinum elektrode wat geleë is naby die membraan word as gevolg van polariserende spanning vanweë die suurstof wat deur die membraan difundeer, gereduseer. Hierdie reduksieproses sal 'n stroom deur die suurstofelektrode laat vloei. Die stroom is proporsioneel met die suurstofdruk.

Kalibrering van die suurstofelektrode geskied twee ure voordat die PO_2 -lesings begin. 'n Zero-oplossing (3.81g di-sodium tetraboraat, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ in 1 liter $\text{d-H}_2\text{O}$) word in 'n beker (20°C) gegooi en 'n mespunt Natriumdithioniet ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) word daarby gevoeg. Die elektrode word in die oplossing geplaas. Die zero-waarde word ingestel deurdat die zeroknop (1) gedraai word totdat die lesing op die leesvenster (3) 0.00 mm Hg O_2 is.

Die PO_2 van lug suurstof versadigde water word as volg bereken.:

Die barometriese druk (BD) word afgelees. Die dampdruk (DD) van water by 20°C (17.515 mm Hg) word afgetrek van die barometriese druk. Hierdie waarde word vermenigvuldig met die persentasie suurstof in die atmosfeer, naamlik 20.93%

$$\frac{(\text{BD} - \text{DD})}{1} \times \frac{20.93}{100}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{653.75 - 17.515}{1} \times \frac{20.93}{100}$$

$$PO_2 = 133.3 \text{ mm Hg } O_2$$

Die suurstofelektrode word in 'n beker water by 20°C, wat versadig is met lugsuurstof, geplaas en die PO₂-waarde word ingestel met behulp van die fyn verstellingsknop (5) totdat die lesing op die leesvenster (6) 133.3 mm Hg O₂ is. Die elektrode is nou geïk en gereed vir meting.

3.1.2 $\dot{M}O_2$ -berekeninge

3.1.2.1 Berekening van $\dot{M}O_2$ – waardes van visse

Stap 1

Eind PO₂ af te trek van die aanvangs PO₂ = ΔPO_2

Byvoorbeeld: 132.8 mm Hg – 118.7 mm Hg = 14.1 mm Hg

Stap 2

Die molêre oplosbaarheid van suurstof per partiële suurstofdrukeenheid in een liter vars water by en 'n watertemperatuur van 20 °C is 1.93 $\mu \text{ mol L}^{-1} \text{ mm Hg}$ (Green & Carrit, 1976). Hierdie waarde word met die ΔPO_2 vermenigvuldig om die konsentrasie van die suurstof in $\mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1}$ te verkry.

$$\Delta PO_2 \times 1.93 = \mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1}$$

Byvoorbeeld: 14.1 mm Hg x 1.93 = 27.213 $\mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1}$

Stap 3

In hierdie stap moet die respirometer se volume in liter verkry word. Dit word as volg bereken: Die massa van 'n vis word gedeel deur die digtheid van die vis (0.983) en dit gee die volume van die vis in milliliter

$$\text{Volume} = \frac{\text{Massa}}{\text{Digtheid}}$$

$$\text{Vol (ml)} = \frac{\text{Totale massa van vis (g)}}{0.983}$$

$$\text{Byvoorbeeld: } \frac{40.8 \text{ (g)}}{0.983} = 41.5 \text{ ml}$$

Om die netto volume van die respirometer te bereken, word die volume van 'n vis afgetrek van die volume van die respirometer.

$$\text{Netto volume van respirometer} = \text{Volume van die respirometer (1.18 liter)} - \text{Volume van vis (41.5 ml)} = 1138,5 \text{ ml}$$

Hierdie waarde word gedeel deur 'n 1000 om milliliter om te skakel na liter

$$1138.5 - 1000 = 1.138 \text{ liter}$$

Stap 4

In hierdie stap moet die konsentrasie suurstof per respirometer wat beskikbaar is vir die vis om te gebruik bereken word.

Dit word verkry deur die suurstofkonsentrasie (Stap 2 = $\mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1}$) te vermenigvuldig met die netto volume van respirometer (NVR) (stap 3).

$$\text{Konsentrasie suurstof beskikbaar in respirometer} = \text{suurstofkonsentrasie} \times \text{NVR}$$

Byvoorbeeld:

$$27.213 \mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1} \times 1.138 \text{ liter} = 30.981 \mu \text{ mol O}_2 \text{ L}^{-1}$$

Stap 5

Die tyd vir vermindering in die PO_2 is 20 minute.

In hierdie stap moet die suurstofkonsentrasie wat die vis in een uur gebruik, bereken word. Dit word gedoen deur die $\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}$ (stap 4 bereken) te deel deur die tyd in minute en daarna te vermenigvuldig met 60.

$$\frac{\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \times 60}{\text{Tyd (min)}} = \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{30.981 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}}{20} \times \frac{60}{1} = 92.945 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Stap 6

In hierdie stap word $\mu \text{ mol vis}^{-1} \text{ h}^{-1}$ omgeskakel na $\text{m mol vis}^{-1} \text{ h}^{-1}$

$$\frac{\mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1}}{1000} = \text{mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{92.945 \mu\text{mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}}{1000} = 0.092 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Stap 7

Wanneer die $\text{m mol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Stap 6) gedeel word deur die massa (kilogram) van die vis word die konsentrasie suurstof per kilogram per uur, wat die vis metabolies verbruik het, bereken.

Byvoorbeeld:

$$\frac{0.092 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}}{0.0408 \text{ kilogram}} = 2.27 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

‘n Samevattende vergelyking van al die stappe lyk soos volg:

$$\frac{\Delta PO_2 (\text{mmHg}) \times 1.93 \times \text{N.V.R (liter)} \times 60 (\text{min})}{\text{tyd (min)} \times \text{Totale massa (g)}} = \dot{M}O_2 (\text{mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1})$$

Byvoorbeeld:

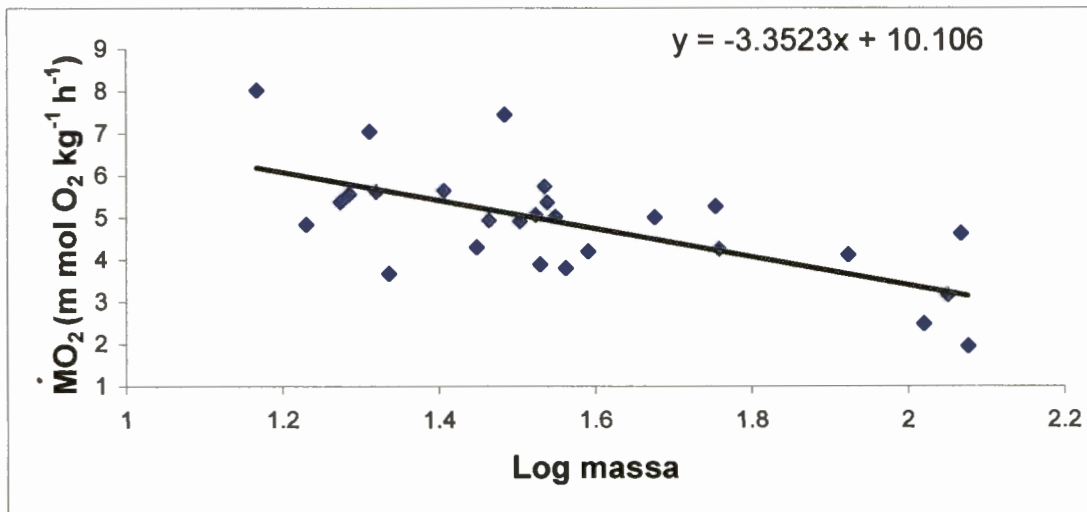
$$\frac{14.1 \times 1.93 \times 1.138 \times 60}{20 \times 40.8} = 2.27 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

3.1.2.2 $\dot{M}O_2$ -korreksies van wisselende vismassas na 'n standaard 30 gram vis

Tydens hierdie korreksie, in die vorm van 'n regressievergelyking van 'n 40.8 gram visaanpassing, moet die $\dot{M}O_2$ – waarde wat in stap 7 bereken is, verwerk word na die $\dot{M}O_2$ -waarde van 'n 30g vis. Met behulp van hierdie vergelyking kan enige $\dot{M}O_2$ -waarde van enige massa vis met 'n ander vis van dieselfde spesie, wat nie dieselfde massa het nie, vergelyk word. Die aangepaste $\dot{M}O_2$ word as volg bereken.

Stap 8

Daar word 'n grafiek getrek van die oorspronklike $\dot{M}O_2$ -waardes teenoor die logmassa van 29 visse. 'n Regressielyn word deur die punte getrek en die vergelyking van die lyn word bereken. Die helling van die lyn in die geval -3.3523 word soos volg in die stap gebruik.



Figuur:3.2: 'n Grafiese voorstelling van die oorspronklike $\dot{M}O_2$ - waardes teenoor die log massa van 29 visse om die helling van die regressielyn te bereken.

Stap 9

Die natuurlike log van 'n 30 g vis word bereken en die natuurlike log van die massa van die vis word bereken, bv. 'n 40.8 g vis:

$$\text{Log } 30 \text{ g} = 1.47712$$

$$\text{Log } 40.8 \text{ g} = 1.6106$$

Stap 10

Die log massa van die 40.8 gram vis word afgetrek van die log massa 30g.

$$\text{Log } 30 - \text{Log massa van } 40.8 \text{ gram vis}$$

Byvoorbeeld:

$$1.47712 - 1.6106 = -0.133$$

Stap 11

Die waarde wat in stap tien verkry is, word met die helling (-3.3523) vermenigvuldig om 'n faktor te verkry waarmee die oorspronklike $\dot{M}O_2$ moet afneem of toeneem.

$$[\text{Log } 30 - \text{Log massa van vis}] \times \text{helling}$$

Byvoorbeeld

$$-0.133 \times -3.352 = 0.447$$

Stap 12

In hierdie stap word die nuwe $\dot{M}O_2$ bereken wat bekend staan as die aangepaste $\dot{M}O_2$. Die aangepaste $\dot{M}O_2$ word verkry deurdat die waarde wat in stap 3 bereken is by die oorspronklike $\dot{M}O_2$ bygetel word.

$$\text{Oorspronklike } \dot{M}O_2 \text{ (stap 7) + faktor (stap 11)}$$

Byvoorbeeld

$$2.27 + 0.447 = 2.72 \text{ mmol O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Alle $\dot{M}O_2$ -waardes is tot die $\dot{M}O_2$ -waardes van 'n 30gram vis aangepas.

3.3 $\dot{M}O_2$ tydens normoksiese toestande (PO_2 : 130mm Hg – 80mm Hg)

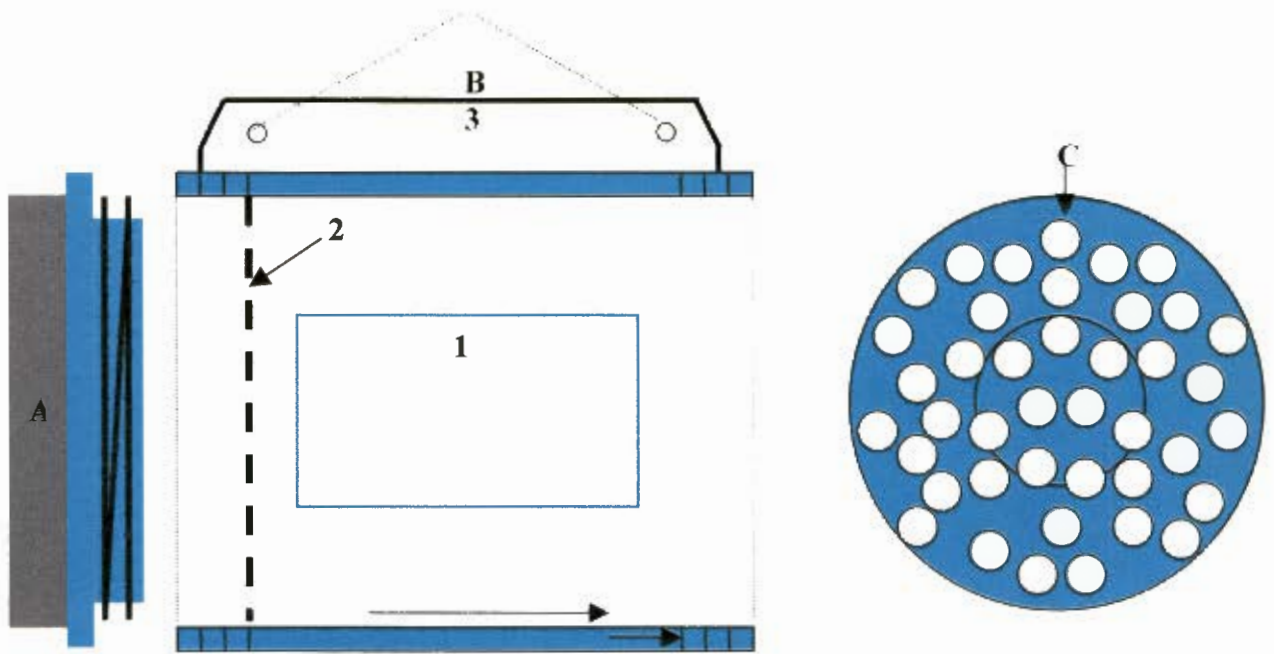
3.3.1 Die effek van hanteringstres op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii*.

3.3.1.1 Eksperimentele opstelling

‘n Eenduisend liter-watertenk, wat toegerus is met lugborreling, word gevul met 855.64 liter kraanwater. Die water word vir 24 uur laat staan sodat die chloorgas verwyder kan word deur middel van lugborreling. Die watertemperatuur word by 20°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) met behulp van ‘n termostaat gereguleer. Na die 24 uur word sestig visse uit die aanhoudingstelsel geneem en in die eenduisendliter- watertenk geplaas.

3.3.1.2 Meetmetode

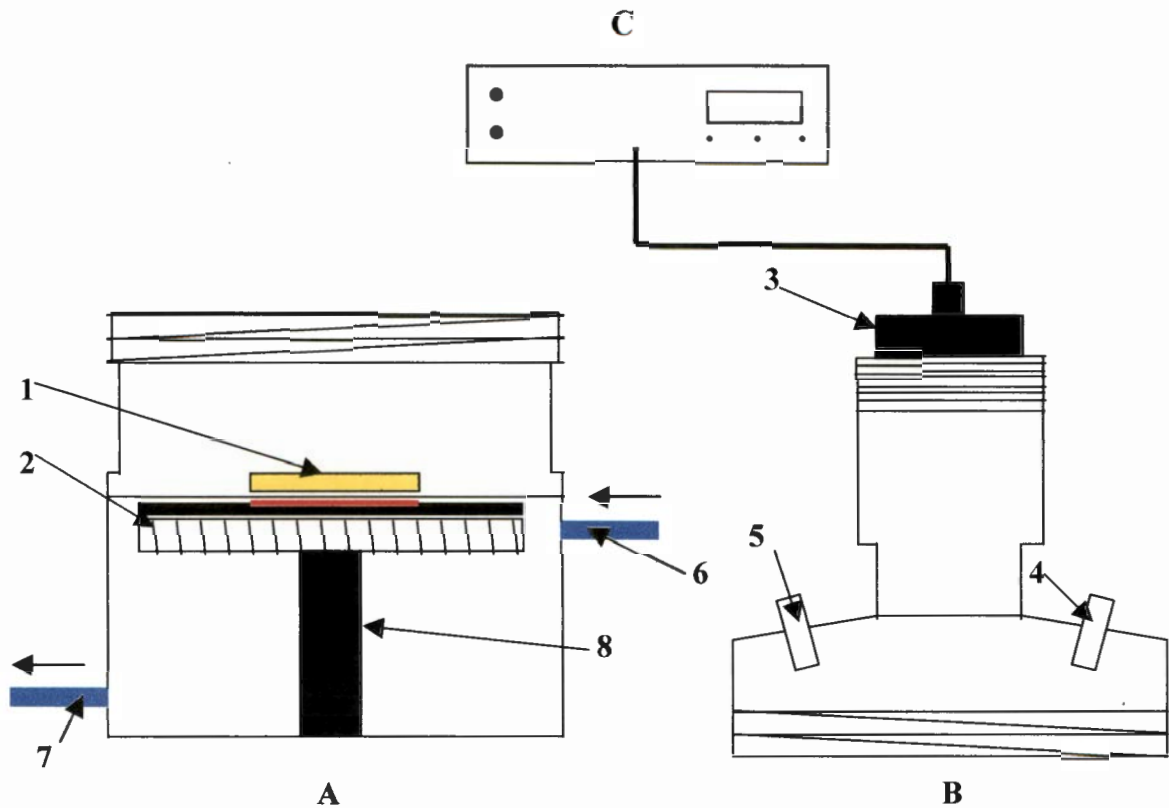
Die 60 visse word in ses groepe, tien in elke groep, verdeel. Groep een (0 ure) word in die respirometer (1.18 liter) gesit en onmiddellik word die aanvangs- PO_2 bepaal en word die respirasiekamers in die eenduisend liter-watertenk geplaas. Vervolgens word die ander vyf groepe vir 2 ure, 4 ure, 8 ure, 10 ure, 13 ure in die respirometer gelaat voordat daar met PO_2 –metinge begin word:



Figuur 3.3: 'n Skematiese voorstelling van die 1.18 liter respirometer: (A) Skroefdeksel, Die tweede skroefdeksel is nie geteken nie., (B) Silindervormige respirasiekamer, (C) Verwyderbare sifdeksel. (1) Deursigtige venster op respirasiekamer, (2) Vaste sifdeksel, (3) Handvatsel met tou waarmee die respirometer in die water van die blootstellingstank gesuspendeer word. Skaal: 1cm = 2cm.

Na die 0 ure, 2 ure, 4 ure, 8 ure, 10 ure, 13 ure verstryk het, word die respirasiekamer se water met behulp van die skroefdeksel vyf keer geventileer. Die respirasiekamer word dig afgesluit met een skroefdeksel. Met behulp van 'n spuit word 'n 50ml watermonster in die respirasiekamer geneem. Terwyl die respirasiekamer onder water is, word die anderkant van die respirometer met die ander skroefdeksel dig gesluit en die tyd word genoteer. Met die 50ml watermonster word die PO_2 (aanvangs- PO_2) bepaal. Na 20 minute word die respirasiekamer uit die eenduisendliter - watertank verwyder, die skroefdeksels word losgedraai en daar word 'n 50 ml watermonster geneem om die eind- PO_2 te bepaal.

Die aanvangs- en eind- PO_2 word bepaal deur die Clark-polarografiese suurstofelektrode te gebruik met 'n Perspex suurstofmeetkamer.



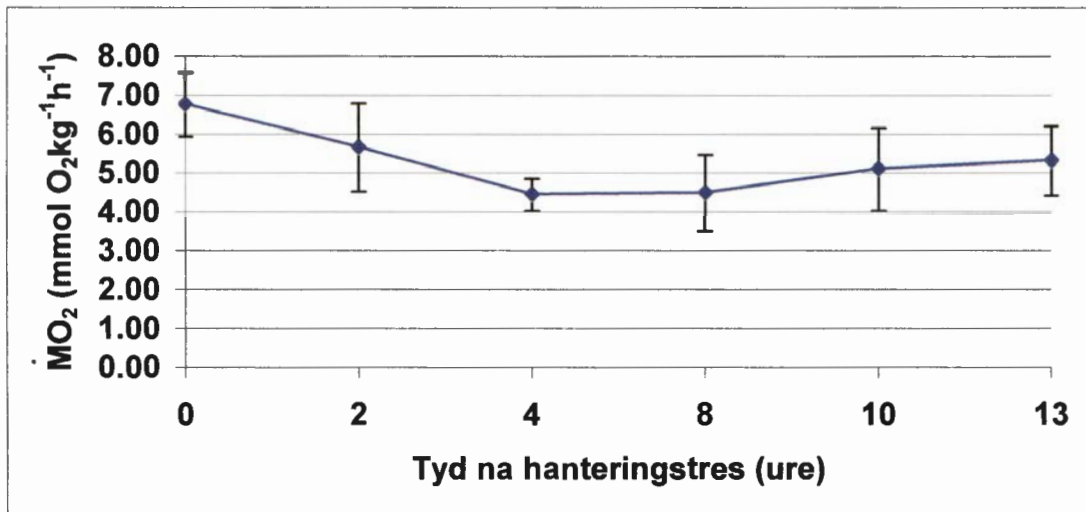
Figuur 3.4: 'n Skematiese voorstelling van die Perspex-suurstofmeetkamer wat gebruik word vir die bepaling van die aanvangs- en eind- PO_2 -waardes: (A) Perspex-suurstof-meetkamer (B) Perspex-kop wat Clark-polarografiese suurstofelektrode bevat, (C) Suurstofmeter, (1) Magnetiese roerder wat water in die meetkamer in beweging hou, (2) Waterturbiene, (3) Clark-polarografiese suurstofelektrode, (4) Watermonster-inlaat, (5) Watermonster-uitlaat, (6) Water-inlaat, (7) Water-uitlaat, (Draai-as). Skaal: 1cm = 1cm.

Die verskil tussen die aanvangs- PO_2 en die eind- PO_2 word bereken en staan as die ΔPO_2 bekend. (Kyk stap 1 van 3.2.) Hierdie metode is gebruik om die $\dot{M}O_2$ te bepaal van die Hardewater-eksperimente en Sagewater-eksperiment.

3.3.1.3 Resultate

Die $\dot{M}O_2$ -waardes na afloop van eksperiment onder normoksiese toestande word in figuur 3.5 voorgestel.

Daar is volgens die resultate gevind dat daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) afname in die $\dot{M}O_2$ tussen 0 ure tot 4 ure is. Geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille is tussen 4 ure en 13 ure waargeneem nie.



Figuur 3.5: Grafiese voorstelling om die effek wat hanteringstres tydens normoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

3.3.1.4 Bespreking

Visse word deur verskeie fisiese en chemiese faktore beïnvloed (Larsson *et al.*, 1985). Onder normale rustende omstandighede vloei water oor die kieuë deur 'n sametrekking en verslapping van die spiere in die mondholte en die operkulum. Hierdie respirasiebewegings is onder fisiologiese beheer en word beïnvloed deur beide interne (suurstofkonsentrasie, koolstofdiksiedkonsentrasie, pH) en eksterne (temperatuur en suurstofkonsentrasie) faktore (Shelton, 1971). Sodra visse onder hanteringstres is, verhoog die respirasiebewegingstempo en groter hoeveelhede suurstof word uit die water per tydseenheid onttrek (Bone *et al.*, 1995).

Uit hierdie eksperiment is daar vasgestel dat hierdie verhoogde respirasierespons ongeveer vier ure neem om te stabiliseer met 'n gepaardgaande afname in die $\dot{M}O_2$ -waardes. Na vier ure verlaag die respirasiebewegingstempo en die $\dot{M}O_2$ -waardes neem af. Dit is dus noodsaaklik dat visse vir tydperke langer as vier ure gelaat word voordat daar met $\dot{M}O_2$ -metinge begin word, aangesien die hanteringstres 'n duidelike toename in die $\dot{M}O_2$ van die visse het.

3.3.1.5 Gevolgtrekking

Hanteringstres het 'n invloed op die $\dot{M}O_2$ -waardes van *Tilapia sparrmanii* en 'n rusperiode van meer as vier ure word aanbeveel om die effek op die $\dot{M}O_2$ deur hanteringstres te elimineer. Vir alle verdere $\dot{M}O_2$ -eksperimente is 'n rusperiode van tien ure gekies om te verseker dat hanteringstres geen effek het op die $\dot{M}O_2$ -waardes van die visse nie.

3.3.2 Sub-akute blootstellings: suurstofverbruik tydens normoksie ($\dot{M}O_2$)

3.3.2.1 Eksperimentele opstelling

Twee eenduisendliter-watertenks (blootstellingstenks), wat toegerus is met lugborreling, word gevul met 855.64 liter Hardewater. Die een tenk dien as kontrole en die ander tenk dien as eksperimentele houer. Die water word vir 24 uur laat staan sodat die chloorgas verwyder kan word, deur middel van lugdeurborreling. Die watertemperatuur word by 20 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) met behulp van 'n termostaat gereguleer. Na die eksperiment word 'n watermonster geneem vir analyses (kyk later).

Berekening om een milligram lood per liter van loodasetaat [$(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$] op te maak.

Die atoommassa van loodasetaat = 379.34g L^{-1}

Die atoommassa van Pb word gedeel deur die molêre massa van loodasetaat om die verhouding van lood tot loodasetaat in die verbinding te bereken

$$\frac{207.2\text{g}}{379.34\text{g}} = 0.546$$

Die omgekeerde van die verhouding van lood tot loodasetaat word verkry om die massa loodasetaat wat afgeweg moet word, om 'n konsentrasie van 1 mg L^{-1} lood te verkry, te bepaal.

$$\frac{1}{0.546} = 1.830\text{ mg loodasetaat}$$

Daar moet dus 1.830 mg loodasetaat in een liter water opgelos word om 'n konsentrasie van 1 mg L^{-1} Pb te verkry.

Vir 855.64 liter word: $1.830 \text{ mg asetaat} \times 855.64 = 1.566 \text{ g loodasetaat}$ in die tenk geplaas.

Wanneer die ander konsentrasies van 5, 10 en 20 mg L^{-1} bereken wil word, word die waarde (1.566 g) vermenigvuldig met die konsentrasie (5, 10, 20) wat bereken moet word.

Wanneer die ander konsentrasies van 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} en 20 mg L^{-1} lood opgemaak word, moet die 1.566g loodasetaat vermenigvuldig word met 5, 10, 20.

Die loodasetaat word opgelos in gedeïoniseerde water en in die blootstellingstank geplaas.

Laat staan die tenk, met ge-dechlorineerde water, vir 24 uur na byvoeging van loodasetaat. 'n Watermonster word dan geneem om die loodkonsentrasie in die blootstellingstank te bepaal. By die kontrole tank word daar geen lood toegevoeg nie. Na die 24 uur word 20 visse uit die aanhoudingstelsel geneem en in die blootstellingstank geplaas. Twintig visse word terselfdertyd in die kontrole tank geplaas. 'n Tenkdeksel word bo-op die tenkopening geplaas om te verhoed dat die visse uitspring en om verdamping tot 'n minimum te beperk. Die visse word vir 96 uur aan lood blootgestel. Vir hierdie blootstellingseksperimente is die volgende konsentrasies lood gedurende die 96 uur gebruik: 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} . Vissterftes word ook genoteer.

3.3.2.2 Meetmetode

Tien van die twintig visse word minstens tien uur voordat die 96 uur verstryk, een vis in elk van die respirasiekamers (1.18 liter), geplaas om toe te laat dat die visse kan herstel van hanteringstres. Die respirasiekamers word in die blootstellingstank geplaas.

Na die tien ure verstryk het, word die respirasiekamer se water met behulp van die skroefdeksel vyf keer geventileer. Die respirasiekamer word dig afgesluit met een skroefdeksel. Met behulp van 'n spuit word 'n 50ml watermonster in die respirasiekamer geneem. Terwyl die respirasiekamer onder water is, word die anderkant van die respirometer met die ander skroefdeksel dig gesluit en die tyd word genoteer. Met die 50ml watermonster word die PO_2 (aanvangs- PO_2) bepaal. Na 20 minute word die respirasiekamer uit die blootstellingstenk verwyder. Een van die skroefdeksels word verwyder en daar word 'n watermonster geneem om die PO_2 (eind- PO_2) te bepaal. Die verskil tussen die aanvangs- PO_2 en die eind- PO_2 word bereken en staan as die ΔPO_2 bekend. (Kyk stap 1 van 3.2.) Hierdie metode is gebruik om die $\dot{M}O_2$ te bepaal van die Hardewatereksperimente en Sagtewatereksperiment.

3.3.2.3 Resultate

Die resultate van die Hardewatereksperimente (Fig.3.6) dui daarop dat daar geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil tussen die kontrole en eksperimentele $\dot{M}O_2$ is nie.

Die resultate van die Sagtewatereksperiment (10 mg L^{-1} loodblootstelling) dui daarop dat daar wel 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil tussen die kontrole en eksperimentele $\dot{M}O_2$ by 'n pH van 6.28 is (Fig. 3.7). Vir hierdie eksperiment is 'n LD_{50} na 96 uur gevind. Vir 'n pH van 7.51 (10 mg L^{-1} loodblootstelling) is daar geen statisties beduidende verskil in die $\dot{M}O_2$ as dit vergelyk word met die kontrole $\dot{M}O_2$ nie. Geen sterftes het ook voorgekom nie. Daar is 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die $\dot{M}O_2$ van 46% ten op sigte van die kontrolewaarde by 10 mg L^{-1} loodblootstelling (pH = 6.28) gevind. Geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille tussen die ander blootstellingseksperimente (1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , en 20 mg L^{-1}) se kontroles, sowel as die eksperimentele $\dot{M}O_2$ -waardes is gevind nie.

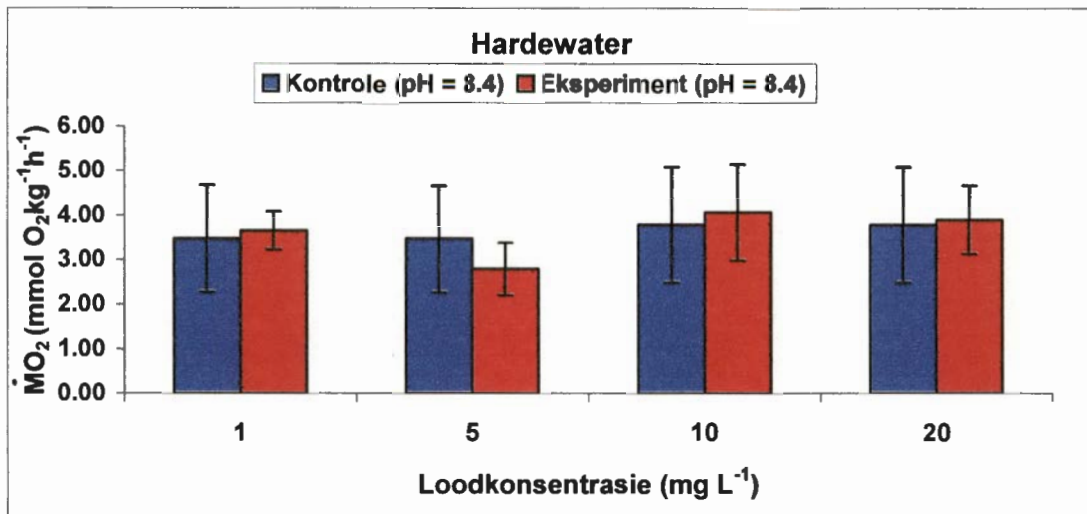
Die resultate van die Harde- en Sagtewatereksperiment (Fig. 3.8) dui daarop dat die $\dot{M}O_2$ van visse wat by 'n pH van 6.28 en 10 mg L^{-1} lood blootgestel is, ten opsigte van kontrole sowel as eksperimentele visse, 'n statisties beduidende hoër suurstofverbruik het. Die toename in suurstofverbruik was meer as 40%. Geen statisties beduidende

($P < 0.05$) verskille tussen 1 mg L^{-1} , 5 mg L^{-1} , en 20 mg L^{-1} se kontroles sowel as die eksperimentele $\dot{M}O_2$, is gevind nie.

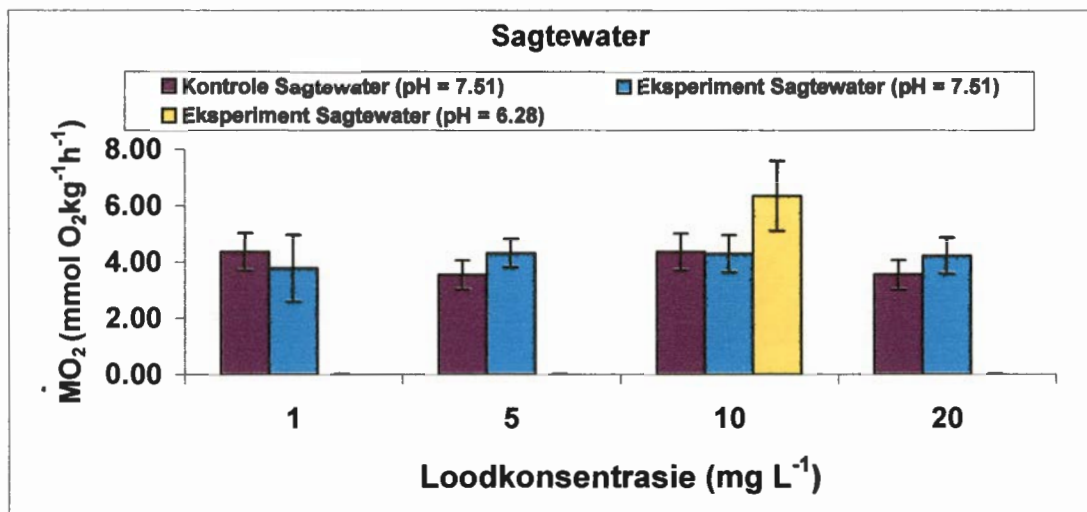
Die resultate van die pH-waardes van Harde- en Sagte-watereksperimente (Tabel 3.2) dui daarop dat daar, behalwe in die geval van die 10 mg L^{-1} loodblootstelling, geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille tussen die kontroles en die eksperimentele pH-waardes is nie.

Tabel 3.1: Die $\dot{M}O_2$ waardes by subakute loodblootstellings tydens normoksie in Harde- en Sagte-water. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

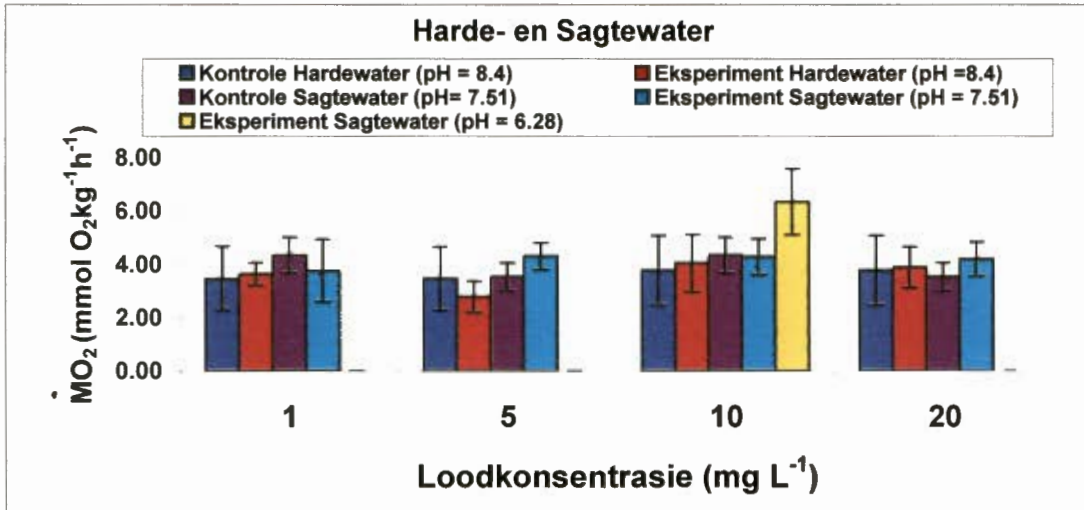
Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole $\dot{M}O_2$ ($\text{mmol O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	Eksperiment $\dot{M}O_2$ ($\text{mmol O}_2 \text{ kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
Harde-water	1 mg L^{-1}	3.48	3.66
	\pm	1.19	0.42
	5 mg L^{-1}	3.48	2.80
	\pm	1.19	0.58
	10 mg L^{-1}	3.79	4.07
	\pm	1.29	1.07
	20 mg L^{-1}	3.79	3.90
	\pm	1.29	0.76
Sagte-water	1 mg L^{-1}	4.37	3.78
	\pm	0.66	1.17
	5 mg L^{-1}	3.55	4.33
	\pm	0.52	0.50
	pH = 6.28 10 mg L^{-1}	4.37	6.36
	\pm	0.66	1.24
	pH = 7.51 10 mg L^{-1}	3.55	4.31
	\pm	0.52	0.67
	20 mg L^{-1}	3.55	4.22
	\pm	0.52	0.63



Figuur 3.6: Grafiese voorstelling om die effek wat subakute loodblootstellings in Hardewater, tydens normoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.



Figuur 3.7: Grafiese voorstelling om die effek wat subakute loodblootstellings in Sagtewater, tydens normoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.



Figuur 3.8: Gesamentlike grafiese voorstelling van Fig. 3.6 en Fig. 3.7 om die effek wat subakute loodblootstellings in Hardewater en Sagtewater, tydens normoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

Tabel 3.2: Die gemiddelde pH-waardes tydens die 96 uur by subakute loodblootstellings onder normoksie-toestande in Harde- en Sagtewater. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrolle pH	Eksperiment pH
Hardewater	1 mg L ⁻¹	8.22	8.26
	\pm	0.04	0.05
	5 mg L ⁻¹	8.22	8.22
	\pm	0.04	0.04
	10 mg L ⁻¹	8.10	8.46
	\pm	0.00	0.05
	20 mg L ⁻¹	8.10	8.42
	\pm	0.00	0.04
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	6.85	7.14
	\pm	0.20	0.50
	5 mg L ⁻¹	7.51	7.43
	\pm	0.11	0.04
	pH = 6.28 10 mg L ⁻¹	6.85	6.28
	\pm	0.20	0.76
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	7.51	7.42
	\pm	0.11	0.15
	20 mg L ⁻¹	7.51	7.13
	\pm	0.11	0.51

3.3.2.4 Bespreking

Waarom die pH-waarde (6.28) vir die Sagtewatereksperiment (10 mg L^{-1}) so laag is in vergelyking met die ander eksperimente is nie duidelik nie.

Een van die biologiese aspekte wat deur lood geaffekteer word, is die suurstofverbruikskoers ($\dot{M}O_2$) van visse (Torreblanca *et al.*, 1987).

Lood het 'n gewoonlik 'n verlaging in die $\dot{M}O_2$ van organismes tot gevolg (Torreblanca *et al.*, 1986).

In die geval van die 10 mg L^{-1} blootstelling in Sagtewater is daar 'n styging in $\dot{M}O_2$ waargeneem. Hierdie waarneming is heeltemal teenstrydig met wat in die literatuur gevind is. Die verhoging in die $\dot{M}O_2$ kan op een van twee maniere verklaar word, naamlik (1) die pH-verlaging self of (2) 'n effek van die lood as gevolg van die pH-verlaging.

(1) Volgens Larsson *et al.* (1985) sal visse wat in water met 'n laer pH geplaas word simptome van 'n sekondêre stresreaksie toon. Dit het die gevolg dat groot hoeveelhede hormone (adrenalin) in die bloed vrygestel word. Hierdie hormone het 'n toename in die hartklop tempo en bloeddruk tot gevolg. 'n Toename in die ventilasietempo van die kieuë volg om in die toenemende suurstofaanvraag te voorsien. Volgens Fromm (1980) het 'n verlaging in pH 'n betekenisvolle toename in die ventileringsrespons. Die metabolisme van die vis styg en daarom is hoë $\dot{M}O_2$ gemeet by visse (Fromm, 1980).

(2) Die verlaging van pH het ook 'n toename in die opgeloste loodkonsentrasie van water tot gevolg (Yang, 1999). Volgens Wang (1987) neem die toksisiteit van lood toe met afname in pH. Meer lood word deur organismes geakkumuleer by laer pH-waardes (Pain, 1995). Volgens Heath (1987) kan die lood die kieuë van die visse histologies beskadig wat weer 'n sekondêre stresreaksie in die vis aktiveer. Dit aktiveer weer 'n toename in kieuventilasie met 'n gepaardgaande toename in $\dot{M}O_2$.

By die 10 mg L^{-1} -blootstelling is 'n 96-h LD_{50} gekry. Die visse wat verwyder is uit die blootstellingstank se liggaamsoppervlak en kieuoppervlak was bedek met 'n laag

mukus. Dit is bekend dat visse wat blootgestel is aan lae pH 'n verandering in die kieuemembrane ondergaan met 'n koagulering van mukus (Fromm,1980). Die skade aan die kieuëpiteel het 'n effek op die gaswisseling, ioonuitruiling oor die kieuë, en die verlies aan lewensbelangrike ione en ekskresievaardighede van die organisme.

Volgens Varanasie en Markey (1978) word mukus ook deur visse gebruik om swaarmetal vas te lê en ook uit te skei. Wanneer die mukusekskresie op die kieuë te dik word, kan dit die effektiwiteit van suurstofopname vanuit die water deur die kieuë belemmer (Anderson, 1978). Saam met die effek wat die verlaagde pH het, kan 'n kombinasie van die twee faktore die dood van die organisme tot gevolg hê.

3.3.2.5 Gevolgtrekking

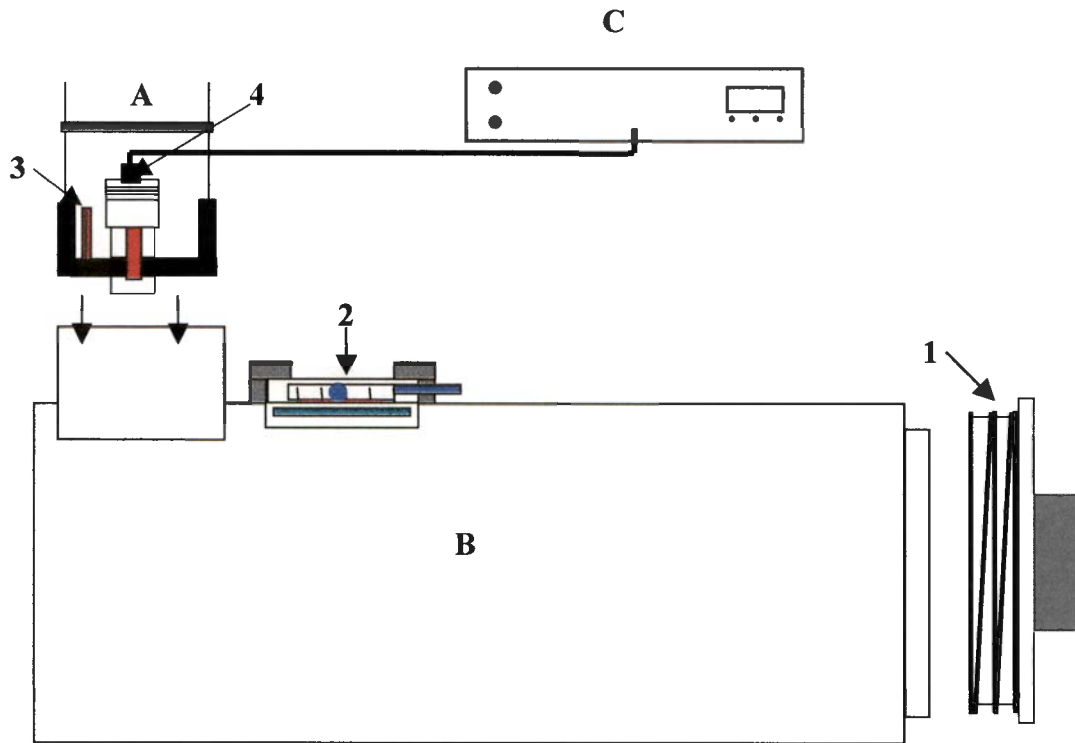
Uit die bogenoemde resultate kan afgelei word dat subakute loodblootstellings geen effek het op *Tilapia sparrmanii* se $\dot{M}O_2$ het nie.

Subakute loodblootstellings, saam met die verlaging in pH, het 'n definitiewe invloed op die $\dot{M}O_2$ van *Tilapia sparrmanii*. Dit is duidelik dat baie ander fisiese faktore, in die geval veral pH, 'n groot invloed op die kieustrukture en 'n styging in die $\dot{M}O_2$ het. Die vorming van mukus is 'n duidelike aanduiding van 'n toename in swaarmetaalkonsentrasies in die wateromgewing met 'n verlaging in die . pH.

3.3.3 Akute loodblootstellings: suurstofverbruikskoers tydens normoksie ($\dot{M}O_2$)

3.3.3.1 Eksperimentele opstelling

Die eksperiment is uitgevoer deur van 'n 23.033 liter respirometer gebruik te maak.



Figuur 3.9: 'n Skematiese voorstelling van die 23.033 liter respirometer: (A) Perspex-kop wat die Clark-polarografiese suurstofelektrode bevat, (B) Perspex-respirasiekamer, (C) Suurstofmeter, (1) Skroefdeksel, (2) Magnetiese roerder wat met 'n waterturbine aangedryf word, (3) Afsluitstopper met kanaal, (4) Clark-polarografiese suurstofelektrode. Skaal: 1cm = 5cm.

Die respirometer word in 'n waterbad by 20°C geplaas. 'n Konsentrasie van 50 mg L⁻¹-lood word in die respirometer bygevoeg. Die massa loodasetaat wat afgeweg moet word om 'n konsentrasie van 50 mg L⁻¹ in die respirometer te verkry, word as volg bereken: 1.830 mg (3.3.1 stap 3) word vermenigvuldig met die volume van die respirometer (23.033 liter) en die produk word weer vermenigvuldig met die konsentrasie lood (50 mg L⁻¹) wat bereken moet word.

Byvoorbeeld:

$$\begin{aligned} 1.830 \text{ mg} \times 23.033 \times 50 &= 2107.5 \text{ mg loodasetaat} \\ &= 2.107 \text{ g loodasetaat} \end{aligned}$$

Die massa loodasetaat wat opgelos moet word is dus 2.107 g.

3.3.3.2 Meetmetode

Tien visse word gelyktydig in die respirometer geplaas en 2,107 g lood word bygevoeg. Die visse is in die respirometer gehou met die volgende tydsintervalle, naamlik 0 uur, 2 uur en 10 uur voordat met PO₂-metinge begin is. Die respirometerkop wat die suurstofelektrode bevat, word versigtig (sonder om die vis te stres) op die respirasiekamer geplaas en afwaarts gedruk totdat die respirometerkop die watervlak in die kamer bereik. Die lugborrels in die respirasiekamer moet verwyder word voordat die kop, met behulp van die gekanaliseerde afsluitstopper, finaal afgeseël word. Die tyd wat dit neem vir die PO₂-waarde om vanaf die beginlesing (PO₂: 125 mm Hg) tot op 80 mm Hg (PO₂-eindlesing) te verander, word genoteer. Dit het gewissel tussen 20 en 40 minute. Die visse word hierna uit die respirometer verwyder en gedroog, geweeg en die gesamentlike massa van die tien visse word bepaal. Die berekening van die $\dot{M}O_2$ van die visse word gedoen soos in 3.2 bespreek is. Hierdie metode is gebruik vir $\dot{M}O_2$ -bepalings van Harde- en Sagtewater eksperimente by akute loodblootstellings.

3.3.3.3 Resultate

Die resultate van die kontrole $\dot{M}O_2$ van Harde- en Sagtewater dui dat geen verskille tussen die kontroles van 'n bepaalde rusperiode was nie. Daar is gevind dat hoe langer die rusperiode is waaraan die vis blootgestel is, hoe laer is die $\dot{M}O_2$ van beide die kontroles van Harde- en Sagtewater. Die kontrole $\dot{M}O_2$ van 0 ure rus is die hoogste (12.07 mmol O₂ kg⁻¹h⁻¹) en 10 ure rusperiode was die laagste (9.77 mmol O₂ kg⁻¹h⁻¹).

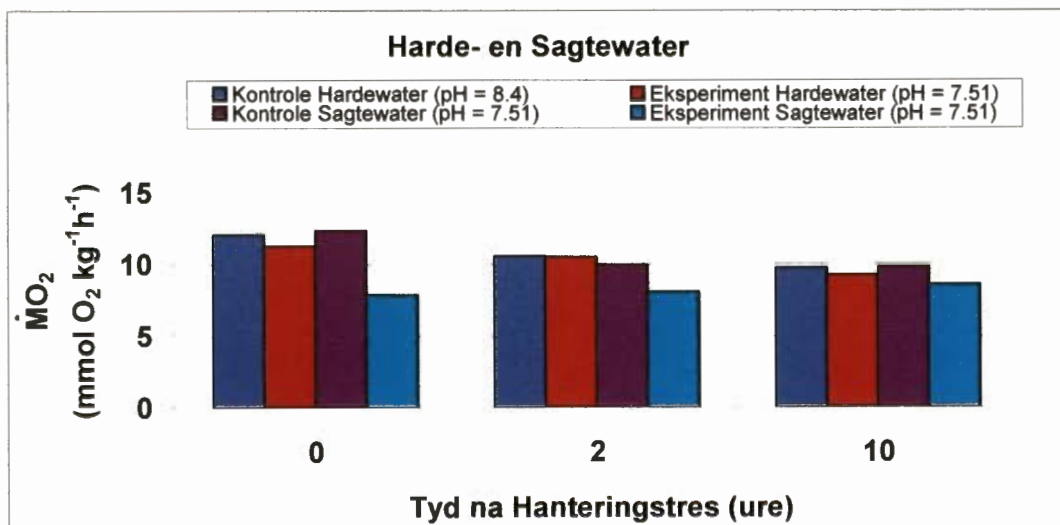
Die resultate van die Sagtewater eksperimente het getoon dat daar wel 'n afname in die eksperimentele $\dot{M}O_2$ in vergelyking met die kontroles was. Dit het geblyk dat, as

die Sagtewatereksperiment se resultate geanaliseer word, daar 'n toename in $\dot{M}O_2$ is met 'n toename in die rusperiode tyd. Die 0 uur rusperiode Sagtewatereksperiment se $\dot{M}O_2$ was $7.89 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$ en die 10 ure rusperiode-eksperiment se $\dot{M}O_2$ was $8.60 \text{ mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$. 'n "Hoesrefleks" van die bukale en operkulêre spiere is tydens die blootstellingstydperk aan slegs Sagtewater by die visse opgemerk. Die frekwensie van die hoesrefleks is nie bepaal nie, maar het gewissel tussen 20 en 30 reflekse per minuut. 'n Verhoogde mukusafskieding is op die kiewe waargeneem.

Daar is geen verskille gevind tussen die kontrole en eksperimentele $\dot{M}O_2$ by die Hardewater-eksperiment nie.

Tabel 3.3: Die $\dot{M}O_2$ -waardes by akute loodblootstellings (50 mg L^{-1}) onder normoksie toestande in Harde- en Sagtewater. Tien eksemplare is gelyktydig in die respirometer geplaas om die $\dot{M}O_2$ te bepaal.

Tyd na Hanteringstres	Hardewater $\dot{M}O_2$ ($\text{mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$)	Sagtewater $\dot{M}O_2$ ($\text{mmol O}_2 \text{ kg}^{-1}\text{h}^{-1}$)
0 uur (Kontrole)	12.07	12.38
0 uur (Eksperiment)	11.30	7.89
2 uur (Kontrole)	10.59	10.01
2 uur (Eksperiment)	10.54	8.11
10 uur (Kontrole)	9.77	9.83
10 uur (Eksperiment)	9.26	8.60



Figuur 3.10: 'n Grafiese voorstelling van die $\dot{M}O_2$ tydens akute loodblootstellings (50 mg L^{-1}) tydens normoksie in Harde- en Sagtewater. Tien eksemplare is gelyktydig in die respirometer geplaas om die $\dot{M}O_2$ te bepaal.

3.3.3.4 Bespreking

Volgens Larsson *et al.* (1985) en Hellowell (1986) het hanteringstres 'n baie groot invloed op die biologie van visse. Wanneer visse gehanteer word, ontstaan daar sekondêre fisiologiese stresresponse wat 'n korttermyn verhoogde hartklopprespons tot gevolg het. Hormone, byvoorbeeld adrenalien, word in die bloed vrygestel wat 'n toename in die metabolisme van visse veroorsaak. Die gevolg hiervan is 'n toename in die $\dot{M}O_2$. Volgens figuur 3.10 is dit duidelik dat die kontrole $\dot{M}O_2$ van Harde- en Sagte water by die 0 uur rusperiode die hoogste was. 'n Afname in die kontrole $\dot{M}O_2$ oor tyd het plaasgevind totdat dit die laagste waarde by 10 ure rusperiode bereik het. Dit dui daarop dat die effek van hanteringstres, waarby hormone betrokke kan wees, by 10 ure rusperiode die laagste was.

Die hoë $\dot{M}O_2$ van hierdie eksperiment, in vergelyking met die ander $\dot{M}O_2$ -bepalings, kan moontlik toegeskryf word aan die feit dat al tien die visse gelyktydig in die respirometer geplaas is. Die "crowding" effek wat moontlik hier ter sprake is, kan 'n verhoging van die $\dot{M}O_2$ tot gevolg hê. Dit is ook waargeneem dat die tien *T. sparrmanii* baie meer aktief is as dit vergelyk word met *T. sparrmanii* wat in 'n respirometer gehou was. Volgens Bache en Lisk (1990) en Bywater (1991) is by die goudvis en tropiese visse gevind dat die swemgedrag gedisorieënt is.

Volgens Depledge *et al.* (1995) en Butler (1978) het swaarmetaalbesoedeling 'n effek op die ventilasie en suurstofverbruik van visse. Epiteelnekrose en barsing van epiteelselle kom hoofsaaklik tydens akute blootstellings aan besoedelingstowwe voor (Mallatt, 1985). Volgens Mallatt (1985) dien hierdie veranderinge in die kieufillamente as 'n verdedigingsmeganisme teen metaalbesoedeling, aangesien die afstand wat die swaarmetale moet diffundeer, voordat die sirkulasiesisteem bereik word, verhoog. Hierdie verdedigingsmeganisme vergroot egter die afstand waarvoor die suurstof moet diffundeer voordat dit die sirkulasiesisteem bereik. Dit kan noodlottig vir visse wees wat in lae suurstofkonsentrasies voorkom (Karlsson-Norrgrén *et al.*, 1985; Van Rensburg, 1989; Wepener, 1990).

Die mukusafskieding is een van die eerste tekens dat die visse aan 'n swaarmetaal blootgestel word (Pain, 1995). Die mukuslaag wat tydens blootstellings aan

swaarmetale afgeskei word, vorm 'n addisionele laag bo-op die epiteelselle, om te verhoed dat ionverlies deur die beskadigde kieu voorkom (Lock & Overbeeke, 1981). Dit blyk dus dat mukus die diffusie van swaarmetaalione deur die beskadigde kieu na die bloed en omgewing belemmer (Heath, 1987). Volgens Burton *et al.* (1972) dien die mukuslaag as 'n beskermingsmeganisme teen die toksisiteit van swaarmetale. Die mukus dien ook as 'n ekskresiemedium waardeur visse ontslae raak van lood (Van Vuuren *et al.*, 1994). Die mukus het egter die nadeel dat dit die oppervlakte wat vir gaswisseling beskikbaar is, verklein en die afstand waarvoor gaswisseling moet plaasvind, vergroot (Jagoe & Hains, 1983; Daoust *et al.* 1984). Dit het, myns insiens, 'n bydraende faktor tot die verlaging in die $\dot{M}O_2$ van die *T. sparrmanii*.

Die "hoesrefleks" wat by hierdie eksperiment waargeneem is, is 'n aanduiding van die gevaar van toksisiteit op kieu-weefsel, want dit kom nie voor by die Hardewatereksperimente nie. Die refleks stel visse in staat om water in 'n teenoorgestelde rigting in die kieu te stuur met die doel om van die toksisiese stowwe in die kieu ontslae te raak. Volgens Davis (1973) en Hellowell (1986) beïnvloed die hoese-refleks die effektiwiteit waarmee suurstof uit die water opgeneem kan word en 'n daling in die $\dot{M}O_2$ word waargeneem.

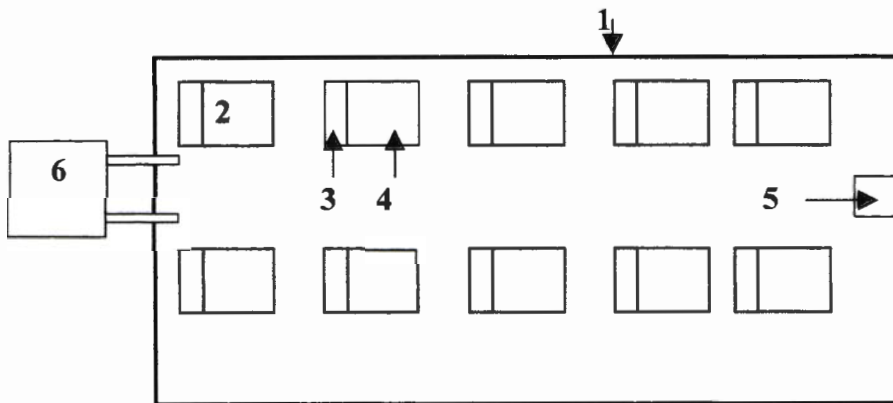
3.3.3.5 Gevolgtrekking

1. Hanteringstres verhoog die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii*. Die effek van hanteringstres word uitgeskakel nadat die visse vir 10 uur in die respirasiekamers gelaat is.
2. Akute blootstelling van *T. sparrmanii* aan lood het 'n afname in die $\dot{M}O_2$ tot gevolg.
3. Tydens akute loodblootstellings is waargeneem dat mukus op die lamellae van *T. sparrmanii* vorm. Mukusvorming kan as 'n aanduiding van loodbesoedeling dien.

4. Die teenwoordigheid van mukus het 'n verlaging van die $\dot{M}O_2$ -waardes in *T. sparrmanii* tot gevolg.
5. Die “hoesrefleks” wat deur *T. sparrmanii* getoon word, is 'n duidelike aanduiding van die teenwoordigheid van 'n loodkonsentrasie in die water.
6. Die hoeseffek het 'n afname in die $\dot{M}O_2$ -waardes tot gevolg.

3.3.4 Subakute blootstellings: suurstofverbruik ($\dot{M}O_2$) tydens hipoksie (130mm Hg – 10 mmHg)

3.3.4.1 Eksperimentele opstelling



Figuur 3.11: 'n Skematiese voorstelling van die waterbad en die 0.75 liter respirometers. (1) Waterbad, (2) Respirometer, (3) Deksel van respirometer, (4) Respirometerkamer, (5) Termostaat, (6) Verkoelingseenheid. Skaal: 1cm = 10cm.

Die eksperiment is uitgevoer deur gebruik te maak van tien polikarbonaat respirometerkamers, elk met 'n volume van 0.75 liter.

3.3.4.2 Meetmetode

Die visse word blootgestel soos in prosedure 3.3.1.1 bespreek is. Die tien visse wat aan lood blootgestel is in die blootstellingstenk, word verwyder en word elk in tien polikarbonaatrespirometers (Fig. 3.11) geplaas.

Die PO_2 -waarde (begin PO_2) van die water word bepaal deurdat 'n 50 ml watermonster met behulp van 'n spuit uit die respirometer onttrek word. Die deksel van die respirometer word, sonder lugborrels, opgeskroef en die aanvangstyd word genoteer.

Die houers met vis word in 'n waterbad (Fig. 3.11), waarvan die temperatuur teen $20^\circ C (\pm 1^\circ C)$ gereguleer word, geplaas. Sodra die vis sy vertikale posisie permanent verloor en op sy sy draai, word die tyd genoteer (eindtyd) en die respirometer word oopgemaak. 'n Watermonster word geneem (eind PO_2) en die PO_2 word bepaal. Die tidsduur tussen die begin PO_2 en eind PO_2 het gewissel tussen 2 en 3 ure. Die $\dot{M}O_2$ word ook vir die kontrole visse gedoen. Die PO_2 -data word verwerk om die $\dot{M}O_2$ te bereken soos in 3.2 verduidelik. Hierdie metode is gebruik vir Harde- en Sagewater eksperimente by subakute loodblootstelling.

3.3.4.3 Resultate

Die resultate van die Hardewatereksperiment (Fig. 3.12) dui daarop dat 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die eksperimentele $\dot{M}O_2$ (van 10 mg L^{-1} en 20 mg L^{-1} loodblootstellings) ten opsigte van die kontrolewaardes is.

Die resultate van die Sagewatereksperiment (Fig. 3.13) dui daarop dat daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die eksperimentele $\dot{M}O_2$ (van 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} en 20 mg L^{-1} loodblootstellings) ten opsigte van die kontrolewaardes is. Die kontrole $\dot{M}O_2$ van die 1 mg L^{-1} loodblootstelling is statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër as die kontrole $\dot{M}O_2$ van die ander kontrole-eksperimente.

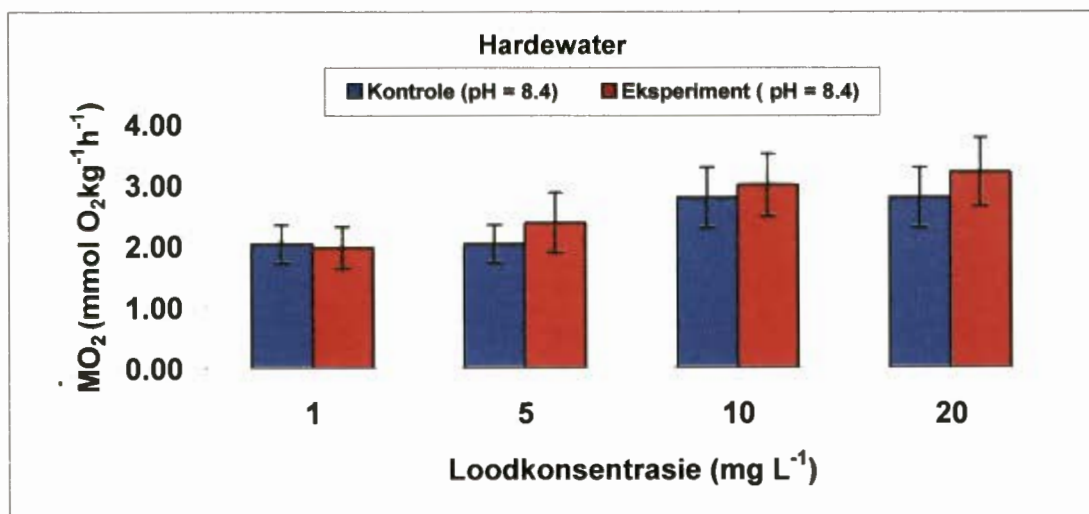
Die suurstofverbruik van die eksperiment en kontrole van die 1 mg L^{-1} Sagewater is statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër as die kontrole en eksperimente van Hardewater. Daar is 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) verlaging in die eksperimentele $\dot{M}O_2$ van 20 mg L^{-1} loodblootstelling van die Sagewatereksperiment ten opsigte van die $\dot{M}O_2$ van die 20 mg L^{-1} loodblootstelling van die Hardewatereksperiment.

Die eksperimentele en kontrole $\dot{M}O_2$ by 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} het geleidelik met toename in loodkonsentrasie gestyg (Fig. 3.12). Dit was egter nie die geval by

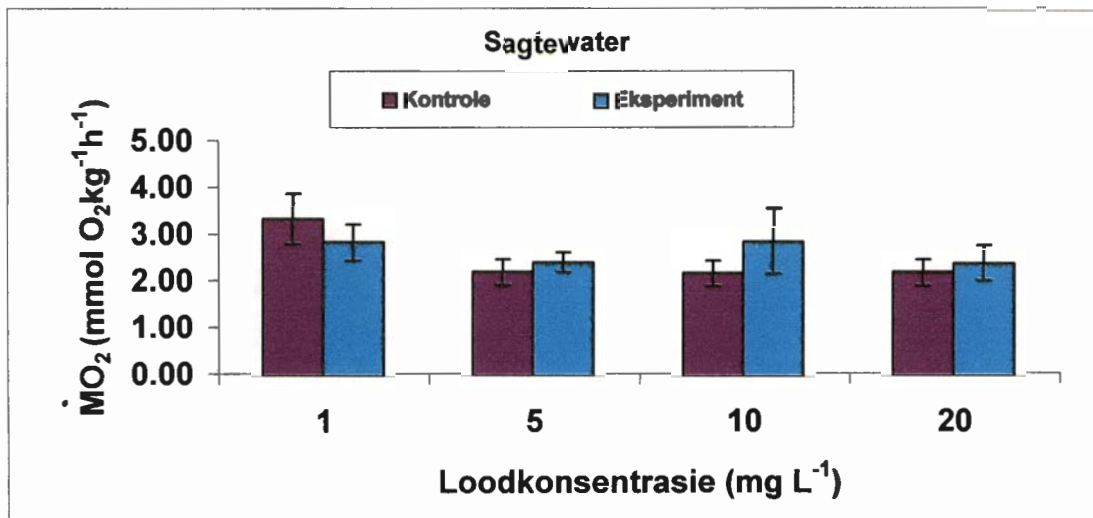
die 1 mg L⁻¹ blootstellings nie, waar die eksperimentele en kontrole waardes van Sagtewater hoër is as die eksperimentele en kontrole waardes van Hardewater.

Tabel 3.4: Die gemiddelde $\dot{M}O_2$ -waardes by subakute loodblootstellings tydens hipoksie in Harde- en Sagtewater. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

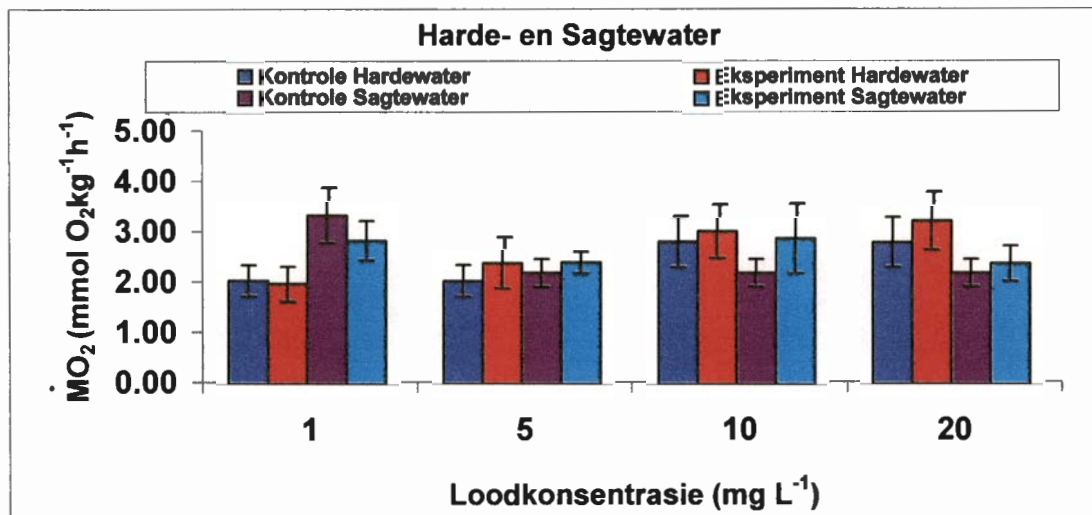
Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole $\dot{M}O_2$ (mmol O ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)	Eksperiment $\dot{M}O_2$ (mmol O ₂ kg ⁻¹ h ⁻¹)
Hardewater	1 mg L ⁻¹	2.04	1.98
	±	0.31	0.34
	5 mg L ⁻¹	2.04	2.39
	±	0.31	0.49
	10 mg L ⁻¹	2.80	3.01
	±	0.49	0.51
	20 mg L ⁻¹	2.80	3.22
	±	0.49	0.56
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	3.33	2.84
	±	0.53	0.38
	5 mg L ⁻¹	2.20	2.41
	±	0.27	0.21
	10 mg L ⁻¹	2.20	2.87
	±	0.27	0.67
	20 mg L ⁻¹	2.20	2.39
	±	0.27	0.35



Figuur 3.12: Grafiese voorstelling om die effek wat subakute loodblootstellings in Hardewater, tydens hipoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.



Figuur 3.13: Grafiese voorstelling om die effek wat subakute loodblootstellings in Sagtewater, tydens hipoksie op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.



Figuur 3.14: Gesamentlike grafiese voorstelling van Fig. 3.12 en Fig. 3.13 om die effek wat subakute loodblootstellings in Hardewater en Sagtewater, tydens hipoksie, op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

3.3.4.4 Bespreking

Die toename in $\dot{M}O_2$ by Hardewater (Fig. 3.12) kan nie toegeskryf word aan loodblootstellings nie om die volgende redes:

- (1) Lood presipiteer uit by 'n hoë pH sodat slegs 0.7% in oplossing bly.
- (2) Die kontrolle visse is nie aan lood blootgestel nie, maar die $\dot{M}O_2$ het ook gestyg.

‘n Ander moontlike verklaring waarom die $\dot{M}O_2$ by Hardewater toe neem en by Sagtewater konstant bly, is dat visse van verskillende seisoene gebruik is. Die visse vir die Hardewatereksperimente is byvoorbeeld gevang voor Julie 2000 terwyl Sagtewatervisse vir die eksperimente na September 2000 gevang is.

‘n Verdere moontlike verklaring waarom die $\dot{M}O_2$ van Sagtewater laer is as by die Hardewatereksperiment is die volgende: ammonium (NH_4^+) wat in die water aanwesig is en ook deur *T. sparrmanii* uitgeskei word, kan $\dot{M}O_2$ verhoog op die volgende wyse: Hardewater wat vir die eksperiment gebruik is, se pH is 8.46. Volgens Dallas en Day (1993) word ongeveer 10 % van die totale Ammonium ($NH_3 + NH_4^+$) by hierdie pH omgesit na die giftige, nie ge-ioniseerde Ammoniak (NH_3).

Analise van die Hardewater het getoon dat 0.4 mg L^{-1} Ammonium (NH_4^+) teenwoordig is, wat beteken dat 0.04 mg L^{-1} Ammoniak (NH_3) in oplossing gaan by 20°C . Die konsentrasie Ammonium (NH_4^+) wat bygedra word deur die urienuitskeiding van *T. sparrmanii* is nie bepaal nie, maar is heelwat meer as die ammoniumvlak in die water (Word, 1996).

Akute NH_3 -vlakke veroorsaak ‘n verhoging in die suurstofopname by visse (Dallas & Day, 1993). Omdat by Sagtewater, weens die lae pH van 7.57, min NH_3 omgesit word vanaf NH_4^+ , kan hierdie faktor ‘n verklaring bied waarom hoër $\dot{M}O_2$ vir die visse as in Hardewater gekry is.

Die effek wat pH het op die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* is duidelik as daar na die resultaat van die 1 mg L^{-1} kontrole en loodblootstellingseksperiment van Sagtewater gekyk word. Die $\dot{M}O_2$ by 1 mg L^{-1} loodblootgestelde vis en sy kontrole is hoër as by 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 20 mg L^{-1} . Die rede hiervoor is waarskynlik toe te skryf aan die pH van die water wat onderskeidelik 6.28 en 6.85 is. Die pH by 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} en 20 mg L^{-1} lood is respektiewelik 7.43, 7.42 en 7.13. Volgens Larsson *et al.* (1985) veroorsaak lae pH by vis ‘n toename in ventilasie wat na my mening ‘n toename in $\dot{M}O_2$ by *T. sparrmanii* tot gevolg het.

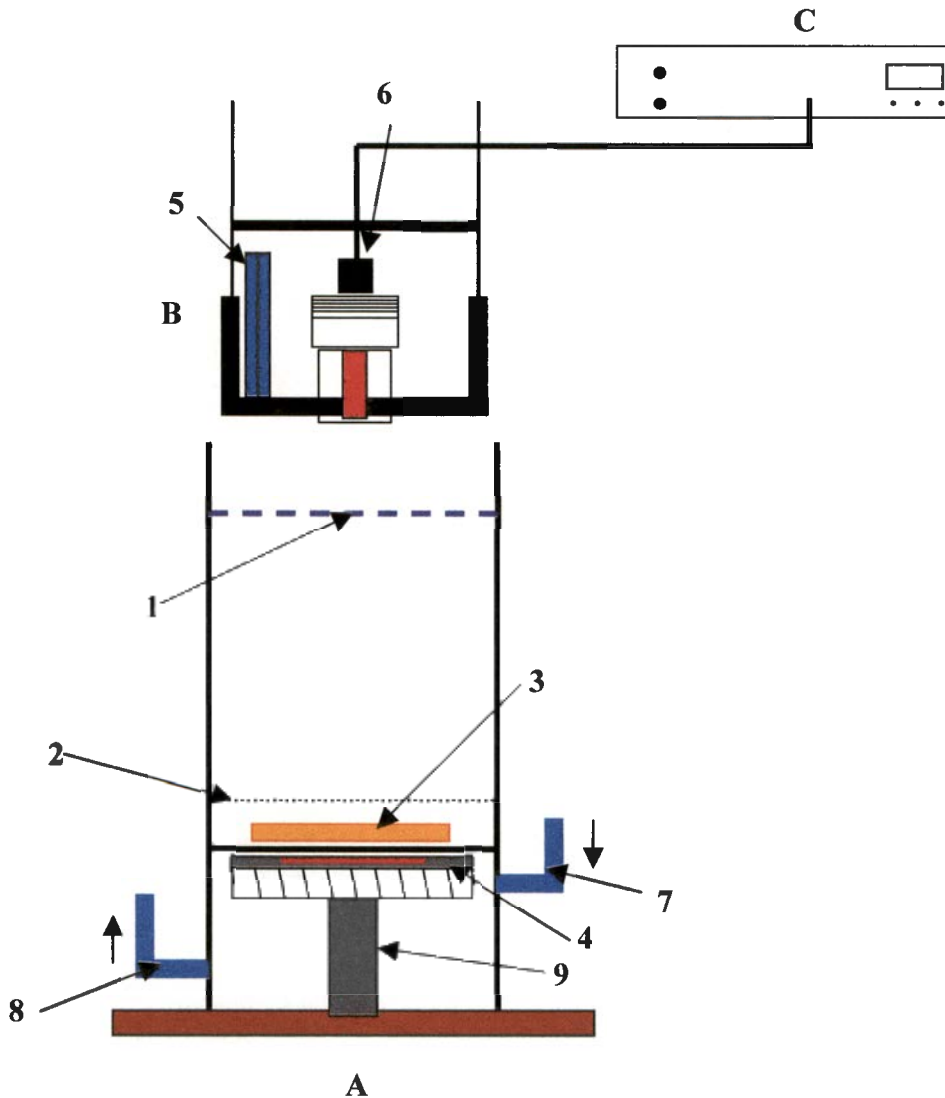
3.3.4.5 Gevolgtrekking

1. Loodblootstelling het geen invloed op die verhoging van $\dot{M}O_2$ nie.
2. Toename in ammoniak (NH_4^+) by hoë pH kan 'n moontlike verklaring bied waarom die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* in Hardewater styg.
3. Lae pH by Sagtewater het 'n sekondêre stresrespons tot gevolg, wat veroorsaak dat $\dot{M}O_2$ toeneem.

3.3.5 Akute loodblootstelling (50 mgPb L^{-1}): bepaling van PO_2 -afnamekoers tydens hipoksie en suurstofverbruik ($\dot{\text{M}}\text{O}_2$) tydens hipoksiese toestande

3.3.5.1 Eksperimentele opstelling

Die eksperiment is uitgevoer deur gebruik te maak van 'n Perspex-respirometer (Fig. 3.15) met 'n volume van een liter.



Figuur 3.15: 'n Grafiese voorstelling van die een liter Perspex-respirometer: (A) Respirometer, (B) Respirometerdeksel, (C) Suurstofmeter, (1) Watervlak in respirometer, (2) Gaasdraad, (3) Magnetiese roerder wat water in die respirometer in beweging hou, (4) Wierturbiene met magneet, (5) Afsluitstopper met kanaal, (6) Clark-polarografiese suurstofelektrode, (7) Water-inlaat, (8) Water-uitlaat, (9) Draai-as. Skaal: $1 \text{ cm} = 3 \text{ cm}$.

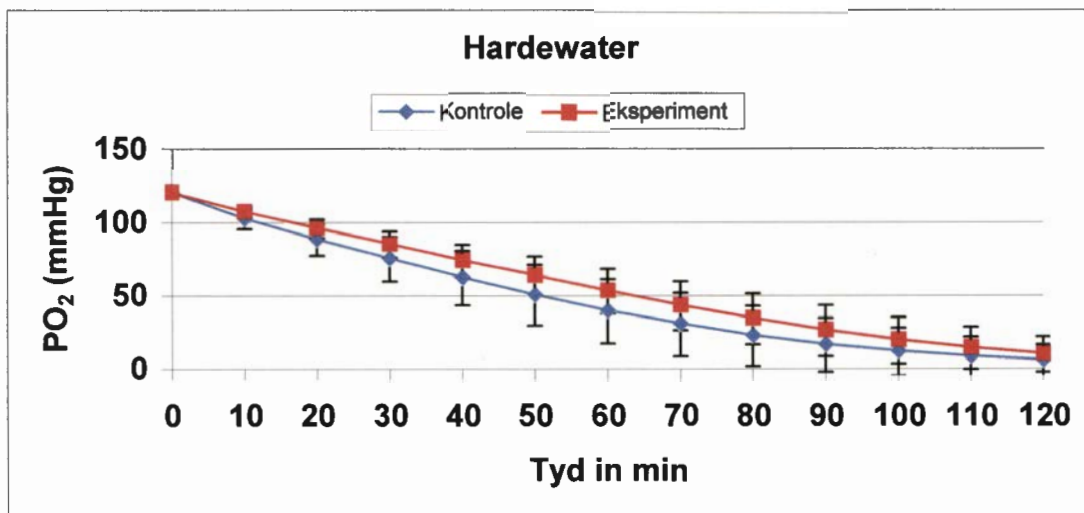
3.3.5.2 Meetmetode

Een vis van ongeveer 30 g word in die respirometer geplaas. Vyf milliliter van die stamoplossing ($10\ 000\ \text{mgPb L}^{-1}$) word in die respirasiekamer ingespuut voordat die respirometerkop (fig. 3.15 no. 2) op gesit word. Die respirometer-kop (1), wat die suurstof elektrode bevat, word versigtig (sonder om die vis te stres) op die respirasiekamer geplaas en afwaarts gedruk totdat die kop die watervlak in die kamer bereik. Die lugborrels in die respirasiekamer moet verwyder word voordat die kop, met behulp van die gekanaliseerde afsluitstopper (5), finaal afgeseël word. Die aanvangslesing word geneem sodra die PO_2 -lesing op die meter 120 mm Hg is en die tyd word genoteer. Die PO_2 word elke 10 minute oor 'n tydperk van twee ure genoteer. Die PO_2 -waardes word in tienminuut-tydsintervalle uitgestip (fig. 3.18). Die tien kontrolevis word op dieselfde wyse geneet, sonder byvoeging van lood. Hierdie metode is gebruik vir Harde- en Sagtewatereksperimente by akute loodblootstelling. Die $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ -waardes van die kontroles en eksperimente van Harde- en Sagtewater akute blootstellingseksperimente is vervolgens bereken en die resultate word apart onder "Akute loodblootstelling: $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ tydens hipoksie (130 – 10 mmHg)" aangebied.

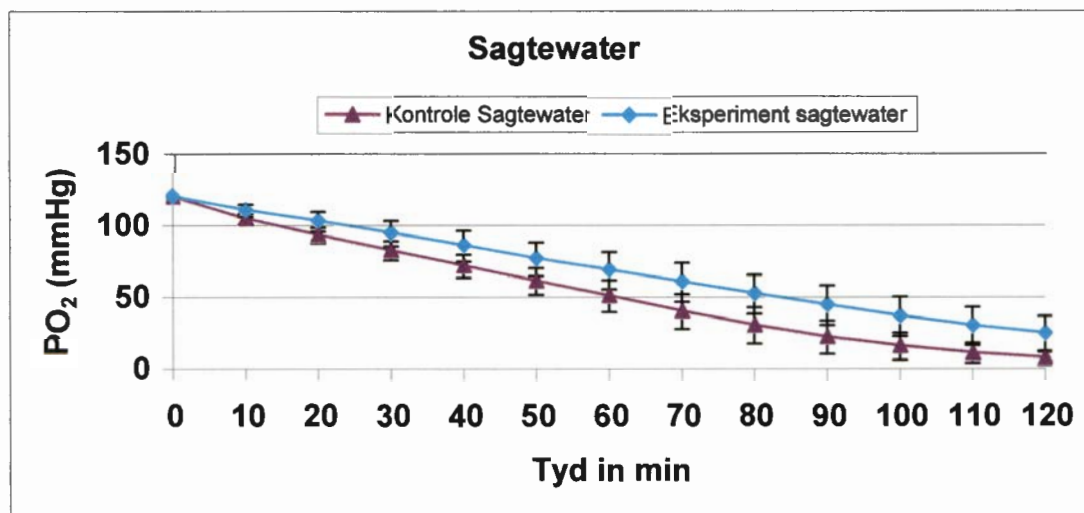
3.3.5.3 Resultate

Daar is 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die eksperimentele PO_2 -waardes ten opsigte van die kontrole van die Sagtewater akute loodblootstellingseksperiment (fig. 3.17).

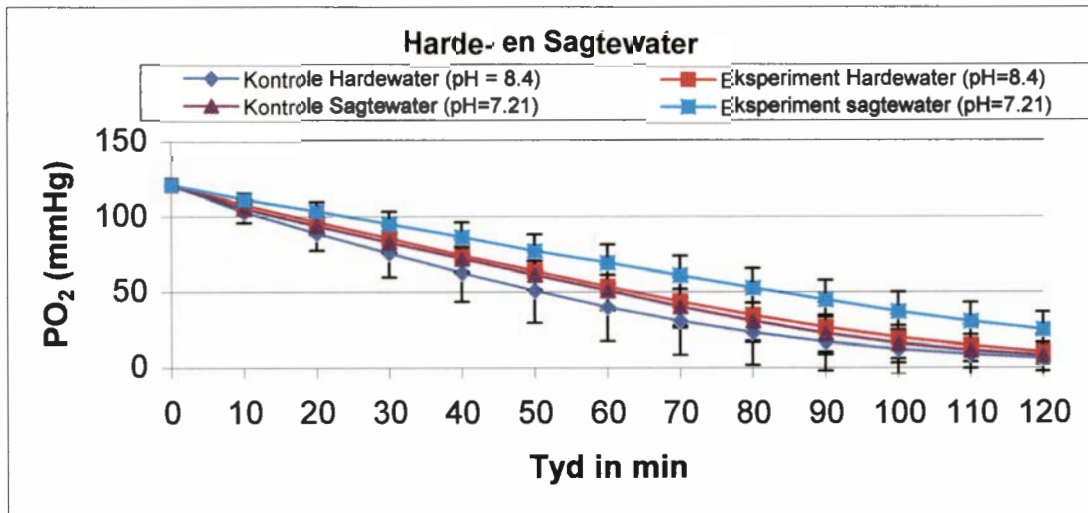
Geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille is tussen die eksperimentele PO_2 -waardes ten opsigte van die kontrole waarde van die Hardewater-akute loodblootstellingseksperiment gevind nie.



Figuur 3.16: Grafiese voorstelling om die effek wat akute loodblootstellings (50 mg Pb L^{-1}) in Hardewater, tydens hipoksie op die PO_2 van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.



Figuur 3.17: Grafiese voorstelling om die effek wat akute loodblootstellings (50 mg Pb L^{-1}) in Sagtewater, tydens hipoksie op die PO_2 van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

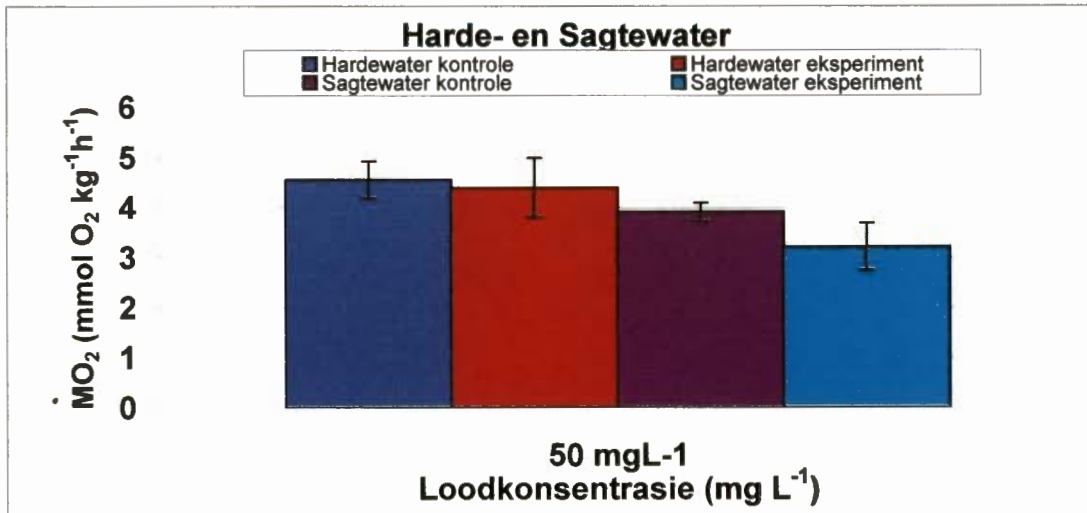


Figuur 3.18: Gesamentlike grafiese voorstelling van Fig. 3.16 en Fig. 3.17 om die effek wat akute loodblootstellings (50 mg Pb L^{-1}) in Hardewater en Sagtewater, tydens hipoksie op die PO_2 van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

Akute loodblootstelling: $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ tydens hipoksie (130 – 10 mmHg)

Daar is 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) afname in die eksperimentele $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ -waardes ten opsigte van die kontrole van die Sagtewater akute loodblootstellingseksperiment. Geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille is tussen die eksperimentele $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ -waardes ten opsigte van die kontrole van die Hardewater akute loodblootstellingseksperiment gevind nie.

Die kontrole $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ van Harde- en Sagtewaterblootstellingseksperimente en die eksperiment van die Hardewatereksperiment verskil nie statisties beduidend ($P < 0.05$) nie. Tydens die byvoeging van die lood is 'n hoesrefleks waargeneem by die visse van die Sagtewaterblootstellingseksperiment. Mukus word gevorm op die kieulamellae se oppervlak.



Figuur 3.19: Grafiese voorstelling om die effek wat akute loodblootstellings (50 mg Pb L⁻¹) in Harde- en Sagtewater, onder hipoksiese toestande op die MO₂ van *T. sparrmanii* het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

3.3.5.4 Bespreking

Die afname in die respirasietempo oor tyd wat tydens die Sagtewatereksperiment waargeneem is, kan die gevolg wees van die verlaagde pH in die water. Volgens Fromm (1980) neem die respirasietempo van visse wat blootgestel is aan laer pH van die water af as gevolg van die vorming van mukus op die kieuë. Die mukus wat vorm op die kieuë het egter die nadeel dat dit die oppervlakte wat vir gaswisseling beskikbaar is, verklein en die afstand waarvoor gaswisseling moet plaasvind, vergroot (Jagoe & Hains, 1983; Daoust *et al.*, 1984).

Die teenwoordigheid van akute lood en 'n verlaagde pH veroorsaak 'n sekondêre stresrespons wat daartoe lei dat die kieuventilasie-tempo verhoog (Butler, 1978).

Visse se kieuë wat onder normale rustende toestande verkeer, ventileer baie stadig. Die respirasieproses is baie doeltreffend en visse verwyder die meeste opgeloste suurstof uit die vloeiende water oor die kieuë. Dit het die gevolg dat die water vinniger oor die kieuë vloei met 'n afname in die kontaktyd tussen die bloedge vulde kieu lamellae en die verby-vloeiende water. Dit het 'n afname in die effektiwiteit van die respirasieproses tot gevolg en minder suurstof word per tydseenheid uit die water verwyder. Berekening van die effektiwiteit van die respirasieproses dui daarop dat rustende visse ongeveer 'n effektiwiteit van 80% toon en visse wat onder stres verkeer, ongeveer 30% (Alexander, 1970).

Die hoesrefleks wat waargeneem word, is 'n aanduiding dat daar lood in die Sagtewater teenwoordig is. Volgens Davis (1973) en Hellowell (1986) beïnvloed die hoesrefleks die effektiwiteit waarmee suurstof uit die water opgeneem kan word en het 'n afname in die respirasietempo tot gevolg.

Tydens die Sagtewatereksperiment was die water pH-waardes laer ($\text{pH} = 7.21$) en die vrye loodioon konsentrasies in die water hoër. Förstner en Wittmann (1981) en Hellowell, (1986) het ook dieselfde resultate verkry. Dit het tot gevolg dat die effek van die lood op die PO_2 -verminderingstempo baie hoër is as tydens die Hardewatereksperiment waar die pH-waardes hoër ($\text{pH} = 8.4$) is. Die bogenoemde faktore van loodkonsentrasie, pH, mukusvorming, hoesrefleks en die sekondêre stresrespons het almal 'n bydrae tot die PO_2 -verminderingstempo oor tyd, asook 'n afname in die $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ -waardes van die Sagtewatereksperiment (Fig 3.18 en Fig. 3.19).

Chichliede is bekend daarvoor dat hulle baie verdraagsaam is teen hipoksiese toestande. Volgens Chapman *et al.* (1995) kan chichliede lae PO_2 -waarde van 11.6 mmHg suurstof trotseer. Tydens hierdie eksperiment is waargeneem dat *T. sparrmanii* 'n PO_2 van 3 mmHg vir tenminste 10 minute kan trotseer sonder om te vrek. Hoe lank hierdie lae PO_2 getrotseer kan word, is nie vasgestel nie.

3.3.5.5 Gevolgtrekking

1. Die dalingstempo van die PO_2 -waardes oor tyd neem af en $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ van *T. sparrmanii* neem af met akute loodblootstelling onder hipoksiese toestande.
2. Faktore soos loodkonsentrasie, pH, mukusvorming, hoesrefleks en die sekondêre stresrespons het almal 'n bydrae tot die toename in die PO_2 -waardes oor tyd en 'n afname in die $\dot{\text{M}}\text{O}_2$ van die Sagtewaterblootstellingseksperiment.

Literatuurlys

ALEXANDER, R. 1970. Functional design in fishes. 2nd ed. London: Hutchinson.

ANDERSON, R.V. 1978. The effects of lead on oxygen uptake in the crayfish, *Orconectes virilis* (HAGEN): *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 20: 394-400

BACHE, C.A. & LISK, D.J. 1989. Cadmium and lead accumulation by goldfish exposed to aqueous refuse incinerator fly ash leachate. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 43: 846-849

BONE, Q., MARSHALL, N.B. & BLAXTER, J.H.S. 1995. Biology of fishes. Suffolk: St Edmundsbury Press, pp 100-110

BURTON, D.T., JONES, A.H. & CAIRNS, J. 1972. Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Confirmation of the hypothesis that death is related to tissue hypoxia. *Journal of Fishing Research Board, Canada*., 29: 1456-1463.

BUTLER, G.C. 1978. Principles of ecotoxicology. Old Working, Surrey: Unwin Brothers Ltd, The Gresham Press, pp 187-221.

BYWATER, J.F., BANACZKOWSKI, R. & BAILEY, M. 1991. Sensitivity to uranium of six species of tropical freshwater fishes and four species of cladocerans from northern Australia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 1449-1458.

CHAPMAN, L.J., KAUFMAN, L.S., CHAPMAN, C.A. & MCKENZIE, F.E. 1995. Hypoxia tolerance in twelve species of east African Cichlids: potential for low oxygen refugia in Lake Victoria. *Conservation Biology*, 9: 1274-1288.

DALLAS, H.F. & DAY, J.A. 1993. The effect of water quality variables on riverine ecosystems: a review. WRC Project No. 351. Pretoria: Water Research Commission, South Africa. pp 240.

DAOUST, P.Y., WOBESER, G. & NEWSTEAD, J.D. 1984. Acute pathological effects of inorganic mercury and copper in gills of rainbow trout. *Vit. Pathol.*, 21: 93–101.

DAVIS, J.C. 1973. Sublethal effects of bleached kraft pulp mill effluent on respiration and circulation in Sockeye salmon (*Oncorhynchus nerko*). *Journal Fish Research Board Canada*, 30: 369-377.

DEPLEDGE, M.H., AAGAARD, A. & GYÖRKÖS, P. 1995. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, 31: 19–27.

FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. 1981. Metal pollution in the Aquatic Environment. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, Germany. pp. 15-313.

FROMM, P.O. 1980. A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Environmetal Biology of Fish*, 5: 79–93.

GREEN, E.J. & CARRIT, D.E. 1967. New tables for oxygen saturation of seawater. *Journal of Marine Research* .25: 140-147.

HEATH, A.C. 1985. Water pollution and fish physiology. Florida: C.R.C. Press, Inc. Boca Ranton, United States of America. pp. 145.

HEATH, A.G. 1987. Water pollution and fish physiology. Florida: C.R.C. Press, Inc. Boca Ranton, United States of America. pp. 245.

HELLAWELL, J.M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Barking: Elsevier Applied Science Publishers LTD. England.

JAGOE, C.H. & HAINES, T.A. 1983. Alterations in gill epithelial morphology of yearling sunapee trout exposed to acute acid stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112: 689–965.

JONES, M.B. 1975. Synergistic effects of salinity, temperature and heavy metals on mortality and osmoregulation in marine and estuarine isopods (Crustacea). *Marine Biology*, 30:13-20.

KARLSSON-NORRGREN, L., RUNN, P., HAUX, C. & FÖRHN, L. 1985. Cadmium-induced channels in gill morphology of zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), and rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). *Journal of Fish Biology*, 27: 81-95.

LARSSON, A., HAUX, C. & SJÖBECK M. 1985. Fish physiology and metal pollution: results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9: 250–281.

LOCK, R.A.C. & OVERBEEKE, A.P. 1981. Effects of mercuric chloride and methylmercuric chloride on mucus secretion in rainbow trout, *Salmo gairdneri* R. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 69C:67.

MALLATT, J. 1985. Fish gill structural changes induced by toxicants and other irritants: a statistical review. *Canadian Journal of Fish. and Aquatic. Science*, 42: 630–648.

PAIN, D. J. 1995. Lead in the Environment. *In: Royal Society for the Protection of Birds*. CRC Press, INC p 356-391.

SEVERINGHAUS, J.W. & BRADLEY, B.A. 1971. Bloodgas electrodes or what the instruktion didn't say radiometer, Copenhagen ST 59 p. 1-64.

SHELTON, G. 1971. The regulation of breathing. *In: Fish Physiology* (Eds. W.S. Hoar & D.J. Randall), Vol. IV, New York: Academic Press, pp. 293-359.

TORREBLANCA, A., DIAZ-MAYANS, J., DEL RAMO, J. & NUÑEZ, A. 1987. Oxygen uptake and gill morphological alterations in *Procambarus clarkii* (Girard) after sublethal exposure to lead. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 86C: 219–224.

VAN RENSBURG, E.L. 1989. Die biokonsentring van atrasien, sink en yster in *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). M.Sc. Verhandeling, Johannesburg: Randse Afrikaanse Universiteit, Suid-Afrika.

VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H., WEPENER, V., ADENDORFF, A., BARNHOORN, I.E.J., COETZEE, L., KOTZÉ, P. & NUSSEY, G. 1999. Lethal and sublethal effects of metal on the physiology of fish: An experimental approach with monitoring support. WRC Report No. 608/1/99

VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. & DEACON, A.R. 1994. Effect of pullants on the physiology of fish in the Olifants River (Eastern Transvaal). WRC Report No. 350/1/94.142

VARANASI, U. & MARKEY, D. 1978. Uptake and release of lead and cadmium in skin and mucus of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 60 C:187-191.

WANG, W. 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms-overview. *Environmental International*, 13:437-457.

WEPENER, V. 1990. Die effek van swaarmetale by variërende pH op die bloedfisiologie en metabolisme ensieme van *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). M.Sc. Verhandeling, Johannesburg: Randse Afrikaanse Universiteit, Suid-Afrika.

WORD, R. 1996. Physiology and biochemistry of fishes of the Amazon. INPA- Brasil pp. 339-357

YANG, C.-Y. 1999. Relationship between trace metal concentrations and hardness in drinking water in Taiwan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63: 59-64.

Hoofstuk 4: Blootstellingseksperiment aan lood: weefselanalises van bloedplasma, gal en weefsels by subakute loodkonsentrasies

4.1 Materiaal en metodes

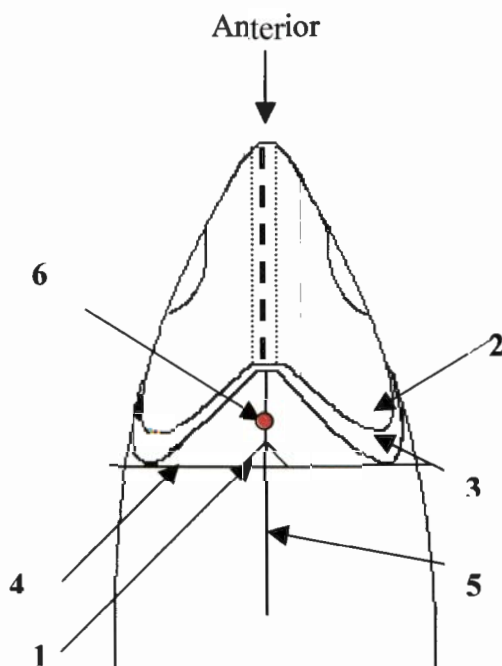
4.1.1 Bloedmonsternemingtegniek

Die vis word met die ventrale kant na bo gedraai en tussen twee lae handdoekpapier met die een hand vasgehou. Bloed word gemonster met 'n 1 ml spuit. Die naald (0.4mm buitedeursnit x 13mm lank) van die spuit word met 0.1 ml heparien (5000 U) gevul.

Om 'n bloedmonster uit die hart te neem (Fig. 4.1), word 'n denkbeeldige lyn tussen die twee agterwande van die kieukamers gemaak. Die naald word presies op die mediale posisie van hierdie lyn geplaas. 'n Ventrale been-uitsteeksel, wat anterior van hierdie mediaanposisie is, kan opgemerk word. Die naald word net anterior van die been-uitsteeksel geplaas sodat die as van die naald 'n hoek van 45 ° met die liggaams-as van die vis vorm. Die hele lengte van die naald word, ingesteeek en die spuit word twee keer in die rondte gedraai om die perikardiumvlies en hartwand te beskadig. Bloed vloei in die perikardiale holte in.

Terwyl die spuitnaald stadig op en af beweeg word, word die spuit baie stadig en geleidelik tot by 0.3ml met bloed gevul.

Die bloed word hierna teen 9500 G vir vyf minute gesentrifugeer deur gebruik te maak van 'n Heraeus-Christ (Combifuge, Duitsland) sentrifugeerder om die plasma van die entrosiete te skei. Die bloedmonster word dan op ys geplaas waarna die totale opgeloste stowwe en die chloriedkonsentrasie van die bloedplasma bepaal word.



Figuur 4.1: 'n Ventrale aansig van *Tilapia sparrmanii* om die posisie van die naald vir bloedtrek te verduidelik. (1) Ventrale been-uitsteeksel, (2) Kieudeksel, (3) Kieukamer, (4) Denkbeeldige lyn tussen die twee kieukamers, (5) Mediale lyn, (6) Posisie van naald

4.1.2 Dissekteertegniek en verwydering van weefsels

Visse word gedissekteer deur die lyf, tussen die anus en die anaalvin, af te kap met behulp van 'n spesiale valbyl. 'n Snit word mediaal-ventraal gemaak, in 'n anterior rigting, vanaf die anus tot teenaan die pektoraalvinne. Vandaar word 'n laterale snit van die liggaamswand, na die dorsale kant, gemaak tot teenaan die sylynorgaan. Die los liggaamswand word verwyder deur 'n snit vanaf die sylynorgaan, diagonaal, tot by die anus te maak. Die volgende organe word deur hierdie snit blootgelê: lewer, maag, derm, swemblaas en die gonade. Wanneer die lewer weggetrek word, word die galblaas (groen van kleur) blootgelê. Gal word uit die galblaas onttrek met behulp van 'n een milliliter spuit. Die galmonster word geanaliseer om die totale opgeloste stowwe in die gal vas te stel.

Die lewer word verwyder nadat die intestinum, galblaas en pankreas versigtig uit die abdominale holte verwyder is. Die lewer word in 'n voorafgeweege verteringsflesie

geplaas en die massa van die lewer word bepaal en genoteer. Die lewer word gevries om uitdroging te voorkom.

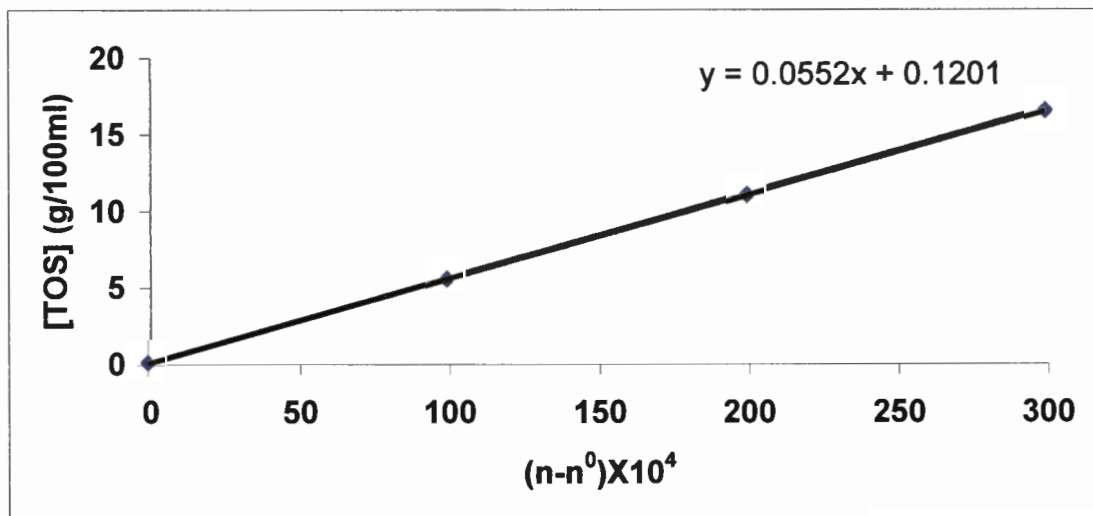
Die kieuë word verwyder deur die kieuëksel na vore te trek. 'n Snit word aan die dorsale en aan die ventrale kant van die kieuëboog gemaak. Die kieuë word verwyder en die kieuëfilamente word afgesny van die kraakbeen kieuëboë en in 'n voorafgeweegde verteringsflesse geplaas. Die massa van die kieuëfilamente word bepaal. Die kieuëfilamente word gevries om uitdroging te voorkom.

4.2 Bepaling van die totale opgeloste stowwe in bloedplasma en gal

4.2.1 Eksperimentele opstelling

Hierdie bepaling word gedoen deur gebruik te maak van 'n refraktometer (T/C Refraktometer, American Optical Corporation, Model 10402). Twintig mikroliter bloedplasma word geneem en op die meetvlak van die refraktometer geplaas. Die waarde word dan afgelees op die regterkantse skaal van die twee skale ($(n-n_0) \times 10^4$)

Die refraktiewe indeks word uitgestip teenoor die totale opgeloste stowwe en 'n regressielyn, met sy vergelyking, word verkry (Fig.4.2)



Figuur 4.2: 'n Grafiese voorstelling van die konsentrasie totale opgeloste stowwe [TOS] in plasma of gal teenoor die refraktiewe indeks waarde $[(n-n_0) \times 10^4]$. Regressielynvergelyking: $y = 0.0552 x + 0.1201$. (Refraktometer instruksieboek, American Optical Corporation)

Die totale opgeloste stowwe in die bloed en gal word deur 'n rekenaar bereken deur die x - afsnit in die vergelyking te vervang met die waarde afgelees op die refraktometer.

Byvoorbeeld:

$$\begin{aligned}x &= 88 \text{ (refraktiewe indeks)} \\y &= 0.0552 (88) + 0.1201 \\&= 4.977 \text{ g } 100\text{ml}^{-1} \text{ Totale opgeloste stowwe}\end{aligned}$$

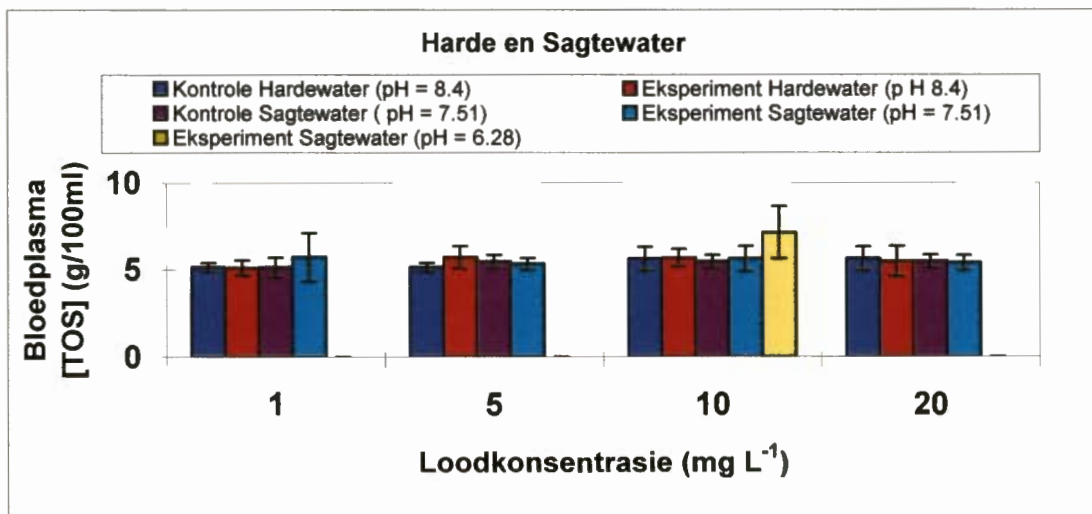
4.2.2 Resultate

Uit die resultate van die totale opgeloste stowwe in bloedplasma is daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die totale opgeloste stowwe tussen 10 mg L^{-1} Sagtewaterloodblootstelling (Fig. 4.3, $\text{pH} = 6.28$) en al die ander loodblootstellings-eksperimente en kontrole van Harde- en Sagtewater gevind. Geen verdere statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille is tussen Hardewater- en Sagtewatereksperimente en kontroles gevind nie.

Die 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} blootstelling by $\text{pH} 6.28$ en 20 mg L^{-1} Sagtewaterloodblootstellingseksperimente (Fig. 4.4) het 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) afname in die totale opgeloste stowwe in die gal ten opsigte van die Hardewatereksperimente getoon. Geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille van galstudies is tussen die kontrole en eksperiment in Hardewater gevind nie (Fig. 4.4).

Tabel 4.1: Gemiddelde totale waardes van opgeloste stowwe waardes in bloedplasma van die verskillende konsentrasies lood van Harde- en Sagtewatereksperimente tydens subakute loodblootstelling. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

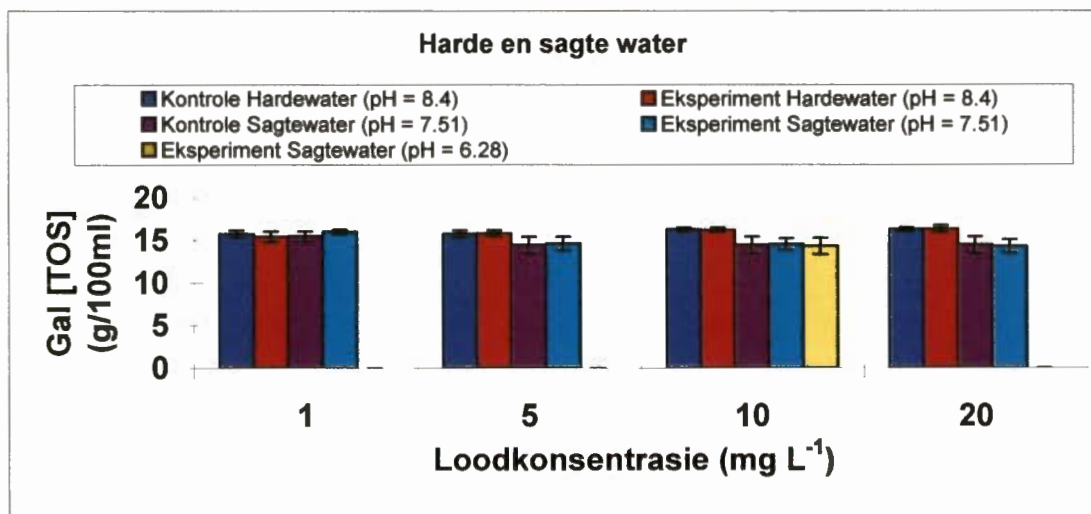
Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole g 100ml ⁻¹	Eksperiment g 100ml ⁻¹
Hardewater	1 mg L ⁻¹	5.15	5.11
	\pm	0.24	0.42
	5 mg L ⁻¹	5.15	5.72
	\pm	0.24	0.62
	10 mg L ⁻¹	5.64	5.68
	\pm	0.66	0.48
	20 mg L ⁻¹	5.64	5.49
	\pm	0.66	0.85
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	5.15	5.74
	\pm	0.55	1.36
	5 mg L ⁻¹	5.47	5.35
	\pm	0.37	0.31
	pH= 6.28 10 mg L ⁻¹	5.15	7.14
	\pm	0.55	1.50
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	5.47	5.64
	\pm	0.37	0.71
	20 mg L ⁻¹	5.47	5.41
	\pm	0.37	0.40



Figuur 4.3: Grafiese voorstelling om die effek wat lood op die gemiddelde totale opgeloste stowwe [TOS] in die bloedplasma van *T. sparrmanii* in Harde- en Sagtewater het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor

Tabel 4.2: Gemiddelde totale opgeloste stowwe in die galrefraksiewaardes van die verskillende konsentrasies lood van Harde- en Sagtewater tydens subakute loodblootstelling. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole g 100ml ⁻¹	Eksperiment g 100ml ⁻¹
Hardewater	1 mg L ⁻¹	15.75	15.44
	\pm	0.40	0.60
	5 mg L ⁻¹	15.75	15.82
	\pm	0.40	0.36
	10 mg L ⁻¹	16.25	16.19
	\pm	0.20	0.24
	20 mg L ⁻¹	16.25	16.30
	\pm	0.20	0.40
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	15.49	15.98
	\pm	0.57	0.24
	5 mg L ⁻¹	14.45	14.63
	\pm	0.96	0.77
	pH = 6.28 10 mg L ⁻¹	15.49	14.30
	\pm	0.57	0.95
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	14.45	14.56
	\pm	0.96	0.64
	20 mg L ⁻¹	14.45	14.30
	\pm	0.96	0.77



Figuur 4.4: Grafiese voorstelling om die effek wat lood op die gemiddelde totale opgeloste stowwe [TOS] in die gal van *T. sparrmanii* in Harde- en Sagtewater het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

4.2.3 Bespreking

Bloedplasma

Verlaging in pH na 6.28 veroorsaak 'n toename in die opgeloste lood in die Sagtewater. Ongeveer 8% lood los op (Kyk Hoofstuk 5.) Dit is ook deur Pain (1995) vasgestel. Dit is bekend dat lood kieuëpiteel, niernefrons en lewerselle beskadig (Larsson *et al.*, 1985).

Die statisties beduidend hoër [TOS]-waardes in die bloedplasma by lae pH is moeilik om te verklaar. 'n Toename in plasmakonsentrasie van *T. sparrmanii* na loodblootstelling kan toegeskryf word aan 'n gestimuleerde immunologiese reaksie. Verhoging in bloedplasmaproteïenkonsentrasie is inderdaad by visse gevind na Cr(VI)-blootstelling (Mikhailov *et al.*, 1967).

Gal

Die [TOS] in galvloeistof van Sagtewater is laer as by Hardewater. 'n Moontlike verklaring is dat visse direk van Hardewater na Sagtewater oorgeplaas is en na 96 uur blootstelling 'n osmotiese beweging van water plaasgevind het, sodat laer [TOS] in gal gevind word. Ook moet vermeld word dat daar 'n seisoenale verskil tussen Hardewater- en Sagtewatervisse is: Sagtewatervisse is in September 2000 en Hardewatervis in April 2000 gevang.

4.2.4 Gevolgtrekking

1. Vir beide bloedplasma en gal vir [TOS] word geen verskille tussen Harde- en Sagtewatervisse verkry nie.
2. Die enigste verskil in [TOS] het voorgekom by die bloedplasma van visse blootgestel by 'n pH 6.28.

4.3 Bepaling van bloedplasmachloriede

4.3.1 Eksperimentele opstelling

Die bloedchloriede is gemeet deur gebruik te maak van 'n chloried-titreerder (Model 4-4495 Clinical Chloride Titrator, American instrument company, VSA) wat gestandaardiseer word deur gebruik te maak van 'n 160 mmol L^{-1} NaCl-standaard-oplossing. Die standaard ($40 \mu\text{l}$) word opgetrek in 'n teflonbuisie waarna dit in 'n analiseflessie gespuit word saam met 4 ml HNO_3 -reagens. Die rooi- en -swartnaald word gedraai tot op $20 \mu \text{ A}$ en die titreerder word op "reset" gestel. Die teller word ge-zero. Die rooi naald word weer terug op $10 \mu \text{ A}$ gestel en die chloried-titeerder word op "titrate" gestel. Die tyd word in sekondes van die teller afgelees. Die prosedure word vyf keer met die standaard herhaal en 'n gemiddelde tyd word bereken.

Die HNO_3 -reagens word as volg opgemaak.

Reagense benodig: 0.1 N salpetersuur (HNO_3); 10% ys-asynsuur; gedeïoniseerde water; Poliviniel-etanoloplossing ($1.8 \text{ gram poliviniel-etanolpoeier opgelos in } 100 \text{ ml gedeïoniseerde water}$).

Die salpetersuur (6.4 ml) en ys-asynsuur (100 ml) word in 800 ml gedeïoniseerde water gevoeg en gemeng. Poliviniel-etanoloplossing (100 ml) word bygevoeg en verhit tot kookpunt. Die HNO_3 -reagens word dan gelaat om af te koel tot by kamertemperatuur.

Die chloriedkonsentrasie in die bloedplasma word op dieselfde wyse bepaal. Die tydwaardes in sekondes word gedeel deur die gemiddelde tyd van die standarde en vermenigvuldig met die konsentrasie van die standaard (160 mmol L^{-1}).

Byvoorbeeld:

Gemiddelde tyd van die standarde = 26.5 sekondes

Tyd op chloriedtitreerder = 25.6 sekondes

Konsentrasie van NaCl – reagens = 160 m mol L^{-1}

Cloriedkonsentrasie van die bloed. = (Tyd op chloriedtitreerder / Gemiddelde tyd van die standaard) x Konsentrasie van NaCl - reagens
= $(25.6 \text{ sekondes} / 26.5 \text{ sekondes}) \times 160 \text{ mMol L}^{-1}$
= $154.5 \text{ mMol L}^{-1}$

4.3.2 Resultate

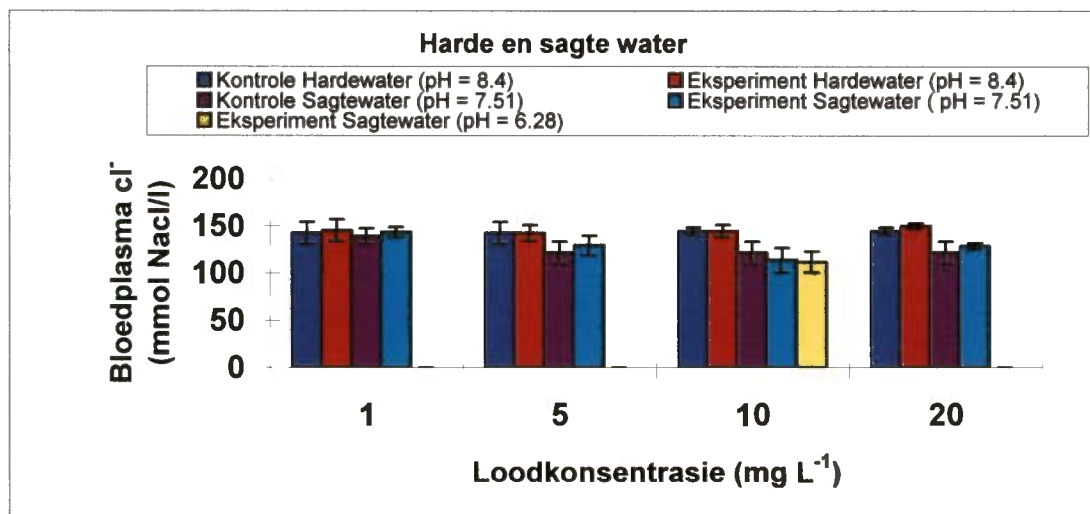
Die resultate van die Sagtewaterblootstellingseksperiment (Fig. 4.5) dui daarop dat daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename in die Cl^- -waardes van die kontrole en die 1 mg L^{-1} loodblootstelling is ten opsigte van die res van die Sagtewaterblootstellingseksperimente.

Die resultate van die Harde- en Sagtewaterblootstellingseksperimente dui daarop dat die Cl^- - waardes van die Sagtewater statisties beduidend ($P < 0.05$) laer is as die Cl^- - waardes van die Hardewatereksperimente, behalwe in die geval van die 1 mg L^{-1} loodblootstelling in Sagtewater.

Die resultate van die Hardewatereksperiment (Fig. 4.5) het geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskille tussen die kontrole en eksperimentele Cl^- -waardes opgelewer nie.

Tabel 4.3: Gemiddelde bloedplasmachloriedwaardes van die verskillende konsentrasies lood van Harde- en Sagtewater tydens subakute loodblootstelling. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole mmol NaCl L ⁻¹	Eksperiment mmol NaCl L ⁻¹
Hardewater	1 mg L ⁻¹	142.61	145.39
	\pm	11.49	11.35
	5 mg L ⁻¹	142.61	142.67
	\pm	11.49	8.08
	10 mg L ⁻¹	144.73	144.52
	\pm	3.45	6.35
	20 mg L ⁻¹	144.73	149.93
	\pm	3.45	2.61
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	139.22	143.63
	\pm	8.05	5.09
	5 mg L ⁻¹	121.88	129.64
	\pm	11.46	9.89
	pH= 6.28 10 mg L ⁻¹	139.22	111.96
	\pm	8.05	11.10
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	121.88	114.08
	\pm	11.46	12.66
	20 mg L ⁻¹	121.88	128.55
	\pm	11.46	3.24



Figuur 4.5: Grafiese voorstelling om die effek wat lood op die gemiddelde bloedplasmachloriedkonsentrasie in die bloed van *T. sparrmanii* in Harde- en Sagtewater het, aan te toon. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

4.3.3 Bespreking

Die handhawing van die interne ioonkonsentrasie (Na^+ , Cl^-) van organismes is essensieël vir die oorlewing van die organisme. Die ioonkonsentrasie word gereguleer deur 'n aktiewe regulering van die invloei en uitvloei van ione in akwatiese organismes.

Verandering in die ioonkonsentrasie in 'n organisme kan veroorsaak word deur stresfaktore wat 'n invloed het op die ioonregulerende organe, interne en eksterne sensoriese reseptors, endokriene sisteme, metabolisme en die aktiewe transportprosesse van die organisme (Huggett *et al.*, 1992).

Die verlaging in die bloedplasma Cl^- -waardes van Sagtewater ten opsigte van Hardewater kan moontlik as gevolg van twee faktore wees, naamlik: (1) Die verhoogde loodkonsentrasie by Sagtewater en (2) pH verlaging in Sagtewater.

Blootstelling van varswatervis aan aluminium het gewoonlik 'n daling in die ioonvlakke van organismes tot gevolg (Staurnes *et al.*, 1984). Volgens Larsson *et al.* (1984) neem die Cl^- -waardes van visse af met toename in loodkonsentrasie. Volgens Pain (1995) neem die lood-ioonkonsentrasie toe met afname in pH. Die loodkonsentrasie van Sagtewater is dus 4% hoër by hierdie eksperiment as dié van Hardewater, aangesien die pH van Sagtewater laer ($\text{pH} = 7.21 \pm 0.3$) is as dié van Hardewater ($\text{pH} = 8.4 \pm 0.3$).

Metale soos lood by lae konsentrasies kan die deurlaatbaarheidseienskappe van membrane verander wat weer die chloriedewewig tussen die eritrosiete en die plasma beïnvloed (Fromm, 1980). Volgens Huggett (1992) veroorsaak verhoogde loodkonsentrasie hiperplasia van die chloriedselle in die kiewe, wat weer tot die verlies van chloriede lei. Die verhoogde loodkonsentrasie beskadig die kiewe deurdat die deurlaatbaarheid vir ione deur die kiewe verhoog, wat weer 'n afname in die plasma Cl^- -waardes tot gevolg het (Wepener, 1990). Volgens Kalay (1999) word die aktiwiteit van ensieme, byvoorbeeld Na, K-ATPase, geïnhibeer deur swaarmetale wat 'n wanbalans in die osmoregulering van die visse tot gevolg het. Chloriedione kan dus nie uit die omgewing opgeneem word om die verlore ione te vervang nie. Niere van visse wat aan lood blootgestel word, word ook beskadig deurdat die

bikarbonaat-chlorieduitruilingsmeganisme beskadig word en chloriedione nie uit die urien geherabsorbeer word nie, met die gevolg dat bloedplasma chloriedione saam met die urien uitgeskei word (Wepener, 1990; Van Vuuren *et al.*, 1994). Dit dra by tot die verlaging in die Cl⁻-waardes as gevolg van verhoogde loodkonsentrasies in die wateromgewing. Die pH van die Hardewatereksperiment was egter te hoog, wat veroorsaak het dat die loodkonsentrasie te laag was om tydens die eksperiment enige toksiese effek te hê (Hellowell, 1986). Daarom is daar geen effek op die Cl⁻-waardes van hierdie eksperiment waargeneem nie.

pH-waardes het op sigself ook 'n invloed op die Cl⁻-waardes van visse. 'n Daling in pH-waardes van die wateromgewing het 'n afname in die Cl⁻-waardes van visse tot gevolg (Fromm, 1980). Volgens Fromm (1980) het die verlaging in pH en 'n toename in H⁺-ione die onderdrukking van die metaboliese tempo van transportselle vir Cl⁻-ione tot gevolg. Die gevolg is dat minder chloriedione per tydseenheid vanuit die omgewing geabsorbeer kan word.

Die vis kan dus nie die verlies en opname van Cl⁻-ione reguleer nie. Aangesien die verlies aan chloriedione hoër is as die opname, verlaag die konsentrasie Cl⁻-ione in die bloedplasma.

4.3.4 Gevolgtrekking

Toenemende loodkonsentrasie met 'n afname in pH-waardes van die water is die primêre faktore wat 'n daling in die Cl⁻-waardes van die bloedplasma van *T. sparrmanii* tot gevolg het.

4.4 Atoom-absorpsie-spektrometrie

4.4.1 Algemene Materiaal en Metodes: loodanalises van lewer- en kieuweefsel

4.4.1.1 Vertering van weefsels vir Elektrotermiese Atoom-absorpsie Spektrometer (AAS)

Die kieu- en lewerweefsel word verteer deur 4 ml HNO_3 (Pro-analiese 0.000001% Pb) by te voeg en met 'n glas albaster op die bek van die verteringsflessie binne 'n waterbad by 70°C vir twaalf ure te plaas. Die monsters word verdun deur van 'n verdunner (Erdmann, 1999) gebruik te maak, tot almal die dieselfde volumes het (10ml). Die monsters word dan in 5ml plastiese houers (Pony vial) gebêre totdat metings op die AAS gedoen word.

4.4.1.2 Opmaak van standaard vir die standaardisering van loodanalises vir die AAS.

Die gedeïoniseerde ($\text{d-H}_2\text{O}$) water wat gebruik word, is aangesuur deur 1 ml HNO_3 by 1000 ml $\text{d-H}_2\text{O}$ voeg.

Die volgende verdunningstappe vir lood is gebruik.

1. Neem 100 μl van 'n stamoplossing met 'n konsentrasie van 1000 mg L^{-1} en voeg 9900 μl $\text{d-H}_2\text{O}$ by. Gebruik 'n hoë digtheid polipropileen proefbuis en roer goed. Dit gee 'n verdunningsfaktor van 100 keer.

$$\frac{10000}{100} = 100\text{x verdunning}$$

Die konsentrasie van die oplossing is nou 10 mg L^{-1} .

2. Neem 100 μl van die 10 mg L^{-1} oplossing en voeg 1900 μl $\text{d-H}_2\text{O}$ by. Gebruik 'n hoë digtheid polipropileen proefbuis en roer goed. Die konsentrasie is nou 0.5 mg L^{-1} , of te wel $500 \mu\text{g L}^{-1}$.

3. Neem 100 μl van die 10 mg L^{-1} oplossing en voeg 9900 μl d- H_2O by. Gebruik 'n hoëdigtheid polipropileen proefbuis en roer goed. Die konsentrasie is nou 0.1 mg L^{-1} , of te wel 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.
4. Neem 500 μl van die 0.1 mg L^{-1} Pb-oplossing. Voeg 500 μl d- H_2O by. (Gebruik die klein AAS monsterflessies.) Dit gee 'n konsentrasie van 50 $\mu\text{g L}^{-1}$.
5. Neem 500 μl van die 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb oplossing. Voeg 500 μl d- H_2O by. (Gebruik die klein AAS monsterflessies.) Dit gee 'n konsentrasie van 25 $\mu\text{g L}^{-1}$.
6. Neem 500 μl van die 25 $\mu\text{g L}^{-1}$ Pb oplossing. Voeg 500 μl d- H_2O by. (Gebruik die klein AAS monsterflessies). Dit gee 'n konsentrasie van 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

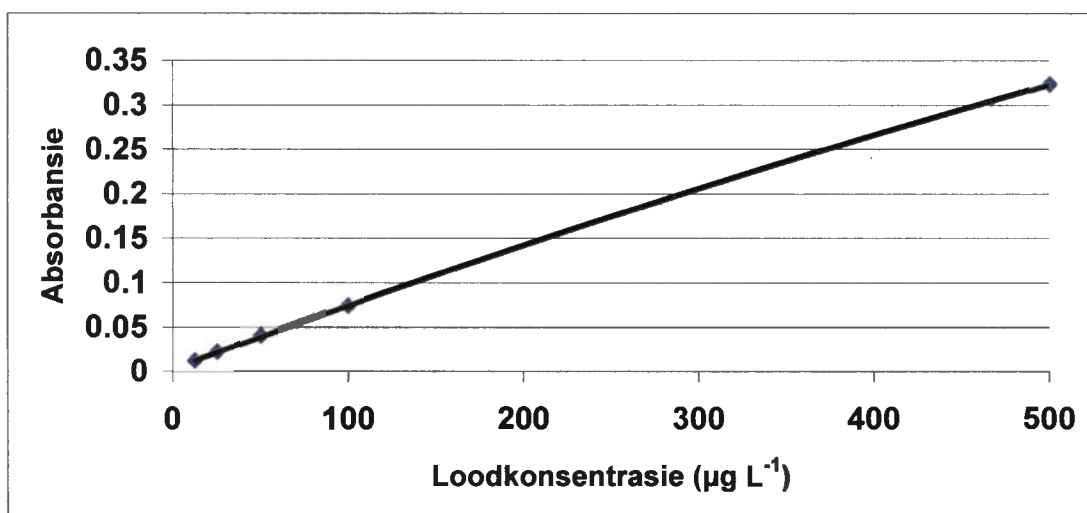
Die volgende konsentrasies is gebruik vir standaardisering:

Standaard 1 : 12.5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Standaard 2 : 25 $\mu\text{g L}^{-1}$

Standaard 3 : 50 $\mu\text{g L}^{-1}$

Standaard 4 : 100 $\mu\text{g L}^{-1}$.



Figuur 4.6: 'n Grafiese voorstelling van die standaardkromme wat gebruik is.

4.4.1.3 Verdunning van weefselmonsters vir AAS-analise

Vir die opmaak van die monsters word 100 µl van die monster geneem en daar word 1900 µl aangesuurde, gedeïoniseerdewater ($d\text{-H}_2\text{O}$) bygevoeg in 'n 2ml Varian-kuvet. Dit is 'n verdunning van 20 keer. Trek 500 µl van die verdunde monster-oplossing en plaas dit in die Varian-kuvette.

4.4.1.4 Die beginsel waarop die AAS werk

Die eksterne ligbron (hol-katodelamp) straal 'n lig uit met 'n bepaalde frekwensie wat genoeg is om die spesifieke element se elektrone te eksiteer. Die hoeveelheid lig wat geabsorbeer word, deur elektrone in die grondtoestand, is 'n aanduiding van die konsentrasie van die element in die monster. Die verskil tussen die aanvanklike hoeveelheid lig wat uitgestraal word deur die hol-katodelamp en die lig wat die detektor bereik, is die hoeveelheid lig wat deur die element (metaal) geabsorbeer is. Die metaal in die monster word in dampvorm gemeet. Dit word gedoen deur van 'n hol-katodelamp (wat spesifiek vir 'n element ontwerp is, bv. Pb het 'n Pb-hol-katodelamp) gebruik te maak. Die hol-katodelamp straal 'n vooraf bepaalde frekwensie lig uit wat die energie voorsien om die elektrone van die metaal te eksiteer. Na eksitasie moet die elektrone weer terugval na die grondtoestand. As dit plaasvind, vind atoom-emissie plaas en lig van dieselfde frekwensie as wat oorspronklik van die hol-katodelamp afkomstig is, word deur atoomemissie uitgestraal. Van die lig wat deur emissie uitgestraal word, word ook deur die detektor opgetel, maar omdat die emissie in alle rigtings plaasvind, is die lig wat deur emissie bygedra word, nalaatbaar klein. Die lig van die eksterne bron beweeg in 'n reguit baan, dus kan net daardie lig wat in dieselfde baan beweeg, deur die detektor opgetel.

4.4.1.5 Veranderlikes van die AAS

Die apparaat wat gebruik is vir die analise is die Varian Spectra 250 Plus en die GTA95 elektrotermiese oond (Vona, Australia).

Die volgende tabelle stel die instrumentinstellings wat op die AAS gedoen moet word om die analise van lood te optimaliseer voor.

Tabel 4.4: Die instellings van die verskillende instrumeterparameters.

Instrumentmodus	absorbansie
Kalibrasiemodus	konsentrasie
Metingsmodus	piek area
Lampposisie	1
Lampstroom (mA)	5
Spektraal - Spleetwydte (nm)	0.5
Spleethoogte	normaal
Golflengte (nm)	283.3
Monsterbekendstelling	voorafbereide monster
Replikate	3
Metingstyd (sekondes)	3.0
Agtergrondskorreksie	Aan

Tabel 4.5: Tabel van die grafietoondveranderlikes om die analise te optimaliseer. * = verassingstemperatuur, ⊗ = atomiseringstemperatuur.

Stap no.	Temp °C	Tyd (sek)	Gasvloei (l min ⁻¹)	Gas tipe	Lees bevel
1	85	5	3.0	normaal	nee
2	95	40	3.0	normaal	nee
3	120	10	3.0	normaal	nee
4 *	400	5	3.0	normaal	nee
5 *	400	1	3.0	normaal	nee
6 *	800	1	0.0	normaal	nee
7 ⊗	2300	1	0.0	normaal	ja
8 ⊗	2300	2	0.0	normaal	ja
9	2500	2	3.0	normaal	nee

Tabel 4.6: Die verskillende volumes soos gebruik deur die monsterner. Volume van die oplossing (weefselmonster), Blanko (1% Askorbiensuur + gedeïoniseerde water) en 'n modifiseerder (Palladium). Volumes in μl

	Weefselmonster	Blanko	Modifiseerder
Blanko	-	12	4
Standaard 1	10	2	4
Standaard 2	10	2	4
Standaard 3	10	2	4
Standaard 4	10	2	4
Standaard 5	10	2	4
Monster	15	2	4

Daar is van twee modifiseerders gebruik gemaak, naamlik palladium en askorbiensuur om die analyses te optimaliseer 'n Een persent askorbiensuurooplossing is as blanko gebruik aangesien askorbiensuur palladium reduseer en dus nie in een houër gemeng kan word nie. Daar is onderskeidelik gebruik gemaak van 2 μl palladium en 4 μl askorbiensuur per analise.

4.4.1.6 Waterpersentasiebepalings van lewer- en kieufilamentweefsel

Die persentasie water in die visweefsel word bepaal deur sewe visse te neem en weefsels van die lewer en kieu te verwyder. Vir elke weefsel word daar 'n afsonderlike alluminiumfoeliehouertjie gemaak waarvan die massa bepaal word. Die massa van die weefsels word gemeet en genoteer (aanvangslesing). Die weefsel word dan in 'n drogingsoond geplaas by 60°C tot die massa konstant bly en die eindlesing word geneem. Deur die volgende bewerking word die waterpersentasie bepaal.

$$\frac{(\text{Aanvangslesing} - \text{Eindlesing})}{\text{Aanvangslesing}} \times \frac{100}{1} = x \% \text{ Water in weefsels.}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{(0.2779 - 0.083)}{0.2779} \times \frac{100}{1} = 70.3 \%$$

Die droëmassa as 'n persentasie van die natmassa is bepaal deur 100% - x %

Byvoorbeeld:

$$100 \% - 70.3 \% = 29.7 \%$$

Tabel 4.7: Die % droëmassa van natmassa van die lewer- en kieuweefsel van *T. sparrmanii*.

Droëmassa as 'n % van die natmassa	Lewer	Kieu
	29.96	17.62

4.4.2. Bepaling van die konsentrasies lood in weefsels

4.4.2.1 Berekening van die hoeveelheid lood in 1 gram droëmassa

Die resultate word voorgestel as droëmassa as 'n persentasie van die natmassa.

Die droëmassa as 'n persentasie van die natmassa vir lewer is 29.962%

Die AA-konsentrasiewaarde is $\mu\text{g L}^{-1}$.

Die standaard verdunning is 20 keer.

Stap 1

Alle natmassawaardes van lewer is bereken deur die natmassa (0.2779 g) te vermenigvuldig met die persentasie natmassa wat droë massa is, byvoorbeeld 29.962%

$$\text{Natmassa (g)} \times \frac{29.962}{100} = x \text{ gram droëmassa in monster}$$

Byvoorbeeld:

$$0.2779\text{g} \times \frac{29.962}{100} = 0.083 \text{ g droëmassa in monster}$$

Stap 2

Die droëmassa, uitgedruk as een gram droëmassa, moet die faktor bereken waarmee die droëmassa (0.083 g) vermenigvuldig moet word om een gram droëmassa te verkry. Dit word bereken deur een gram te deel deur die waarde van die droëmassa (stap 1) in die monster.

$$\frac{1 \text{ g}}{\text{Droë massa (g)}} = b \text{ keer}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{1}{0.083} = 12.04 \text{ keer}$$

Stap 3

In hierdie stap moet die verdunningsfaktor bereken word wat deur die verdunner teweeg gebring word. Die verdunner vul die glasflessies op tot tien milliliter. Die verdunningsfaktor word bereken deur die volume van tien milliliter te deel deur die natmassa van die monsters (0.2779 gram).

$$\frac{10 \text{ ml}}{\text{Natmassa (g)}} = e \text{ keer verdunning}$$

Byvoorbeeld:

$$\frac{10 \text{ ml}}{0.2779 \text{ g}} = 35.984 \text{ keer verdunning}$$

Stap 4

Die berekening van die hoeveelheid lood in 1 droëmassa.

Konsentrasie verkry van AA ($\mu\text{g L}^{-1}$) x na 1gram faktor (stap 2) x verdunning (stap 3) x Standaard verdunning van monster (20) = $\mu\text{g Pb g}^{-1}$ weefsel droëmassa

Byvoorbeeld:

$$0.1 \times 12.04 \times 35.984 \times 20 = 866.49 \mu\text{g Pb g}^{-1} \text{ weefsel droëmassa}$$

4.4.2.2 Resultate

Lewer

Volgens die resultate van die Hardewater-loodblootstellingseksperiment (Fig. 4.7) is daar 'n tendens van 'n toename in die gemiddelde konsentrasie loodwaardes in die lewerweefsels met 'n toename in blootstellingskonsentrasie. Die loodkonsentrasiewaardes van die 20 mg L⁻¹ blootstelling dui op 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename ten opsigte van die kontrolewaardes.

Volgens die resultate van die Sagtewater-loodblootstellingseksperiment (Tabel 4.8, Fig. 4.7) is daar 'n tendens van toename in die gemiddelde konsentrasie loodwaardes in die weefsels met 'n toename in blootstellingskonsentrasie by 5mg L⁻¹, en 20mg L⁻¹. Die gemiddelde loodkonsentrasiewaardes van die 1 mg L⁻¹ en 10 mg L⁻¹ is hoër as dié van die kontroles, maar die loodkonsentrasiewaardes is nie statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër nie.

Die gemiddelde loodkonsentrasiewaarde van dié 10 mg L⁻¹ (pH = 6.28) is hoër as die van die 10 mg L⁻¹ (pH = 7.51), maar daar is geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil tussen die loodkonsentrasiewaardes nie.

Die loodkonsentrasiewaardes van die 20 mg L⁻¹ blootstellingseksperiment is statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër ten opsigte van die kontrolewaardes.

As die waardes van die Harde- en Sagtewater met mekaar vergelyk word (Tabel 4.8, Fig. 4.7), is daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil in die loodkonsentrasie van die 20 mg L⁻¹ ten opsigte van die kontroles.

Kieu

Uit die kieuresultate van die Hardewater-loodblootstellingseksperiment (Tabel 4.9, Fig. 4.8) is daar 'n tendens van toename in die gemiddelde loodkonsentrasiewaardes in die kieu met 'n toename in blootstellingskonsentrasie. Die loodkonsentrasiewaardes van die 20 mg L⁻¹ blootstellingseksperiment dui op 'n

statisties beduidende ($P < 0.05$) toename ten opsigte van die kontroleloodkonsentrasies.

Uit die kieuresultate van die Sagtewater-loodblootstellingseksperiment is daar 'n tendens van 'n toename in die gemiddelde loodkonsentrasiewaardes in die kieu met 'n toename in blootstellingskonsentrasie by 5 mg L^{-1} , 10 mg L^{-1} herhaling en 20 mg L^{-1} .

Die gemiddelde loodkonsentrasiewaardes van die 1 mg L^{-1} en 10 mg L^{-1} is hoër as dié van die kontroles, maar net die 10 mg L^{-1} loodblootstellingkonsentrasiewaardes is statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër ten opsigte van die kontrole loodkonsentrasie.

Die gemiddelde loodkonsentrasiewaarde van die 10 mg L^{-1} ($\text{pH} = 6.28$) is statisties beduidend ($P < 0.05$) hoër as dié van die 10 mg L^{-1} ($\text{pH}=7.51$).

Die loodkonsentrasiewaardes van die 20 mg L^{-1} blootstellingseksperiment dui op 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) toename ten opsigte van die kontrole waardes. Daar is geen statisties beduidende verskil tussen die loodkonsentrasiewaardes van 10 mg L^{-1} en die 20 mg L^{-1} blootstellingseksperimente nie.

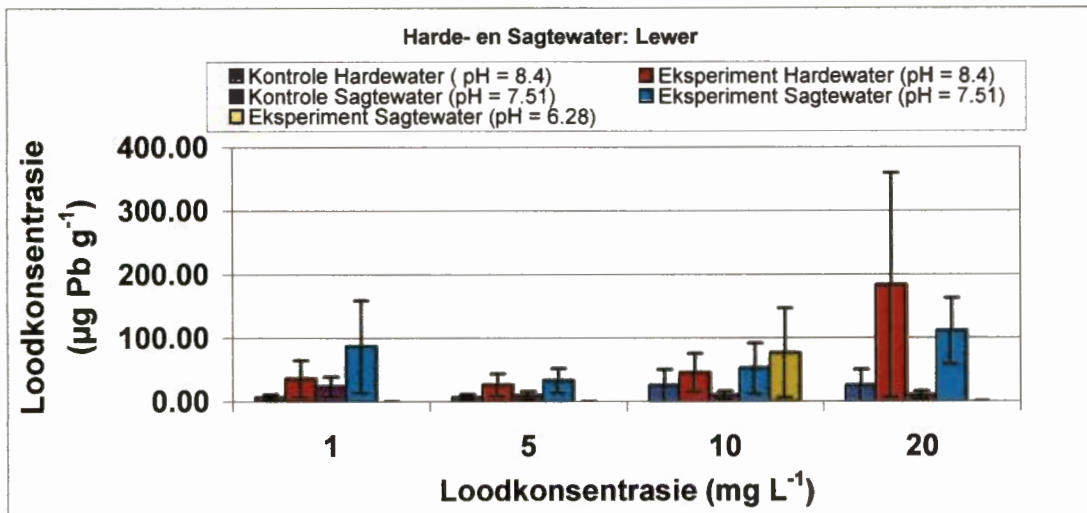
As die waardes van die Harde- en Sagtewater met mekaar vergelyk word (Tabel 4.9, Fig. 4.8) is daar 'n statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil in die loodkonsentrasie van 20 mg L^{-1} ten opsigte van die kontroles.

Die gemiddelde loodkonsentrasiewaardes van die 1 mg L^{-1} en 10 mg L^{-1} van Sagtewater (Tabel 4.9, Fig. 4.7) is hoër as dié van Hardewater, maar daar is geen statisties beduidende ($P < 0.05$) verskil tussen die loodkonsentrasiewaardes nie. Die gemiddelde loodkonsentrasiewaarde van die 20 mg L^{-1} van Hardewater is statisties beduidende ($P < 0.05$) hoër as die loodkonsentrasiewaardes van die 20 mg L^{-1} lood blootstellingseksperiment van Sagtewater.

Die kieuweefsel van Harde- en Sagtewater het oor die algemeen 'n hoër loodkonsentrasie bevat as die lewerweefsels van Harde- en Sagtewater.

Tabel 4.8: Die hoeveelheid lood in 1 gram lewer droëmassa na subakute loodblootstellings (96 uur) onder normoksietoestande in Harde- en Sagte water. Standaardafwyking word met \pm voorgestel.

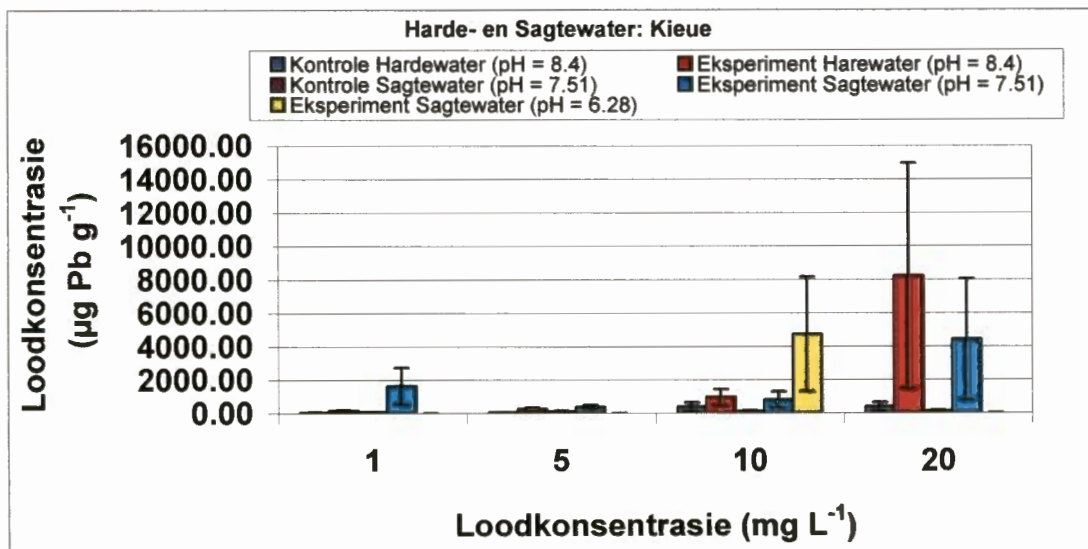
Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole $\mu\text{g Pb in 1g}$	Eksperiment $\mu\text{g Pb in 1g}$
Hardewater	1 mg L ⁻¹	6.49	36.01
	\pm	4.48	28.64
	5 mg L ⁻¹	6.49	26.20
	\pm	4.48	17.39
	10 mg L ⁻¹	25.13	45.28
	\pm	25.09	29.85
	20 mg L ⁻¹	25.13	182.98
	\pm	25.09	176.12
Sagte water	1 mg L ⁻¹	23.75	86.63
	\pm	14.84	72.06
	5 mg L ⁻¹	9.54	33.04
	\pm	5.86	18.60
	pH= 6.28 10 mg L ⁻¹	23.75	76.32
	\pm	14.84	70.46
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	9.54	52.17
	\pm	5.86	39.03
	20 mg L ⁻¹	9.54	110.76
	\pm	5.86	51.58



Figuur 4.7: Grafiese voorstelling van die loodkonsentrasie in 1 gram droëmassa lewerweefsel na 96 – uur subakute loodblootstellings van *T. sparrmanii* in Harde- en Sagte water. Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor.

Tabel 4.9: Die hoeveelheid lood in 1 gram kieu-droëmassa na subakute loodblootstellings (96 uur) onder normoksie toestande in Harde- en Sagtewater. Standaardafwyking word met \pm voorgestel

Tipe water	Blootstellings-konsentrasies	Kontrole $\mu\text{g Pb in 1g}$	Eksperiment $\mu\text{g Pb in 1g}$
Hardewater	1 mg L ⁻¹	34.39	150.55
	\pm	14.43	40.38
	5 mg L ⁻¹	34.39	256.99
	\pm	14.43	63.48
	10 mg L ⁻¹	373.00	950.48
	\pm	250.60	487.02
	20 mg L ⁻¹	373.00	8215.21
	\pm	250.60	6741.66
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	76.88	1651.08
	\pm	27.69	1094.61
	5 mg L ⁻¹	103.01	358.42
	\pm	58.05	116.05
	pH= 6.28 10 mg L ⁻¹	76.88	4717.14
	\pm	27.69	3436.28
	pH = 7.51 10 mg L ⁻¹	103.01	791.97
	\pm	58.05	488.80
	20 mg L ⁻¹	103.01	4408.19
	\pm	58.05	3625.16



Figuur 4.8: Grafiese voorstelling van die loodkonsentrasie in 1 gram droëmassa kieuweefsel na 96-uur subakute lood blootstellings van *T. sparrmanii* in Harde- en Sagtewater . Die vertikale lyne stel die standaardafwyking voor

4.4.2.3 Bespreking

Die kieuë van visse word in die literatuur uitgewys as die orgaan van visse waar die hoogste vlakke van loodbioakkumulering plaasvind, met lewerweefsel as die tweede hoogste bioakkumulering van lood (Robinson; 1996, Kargin, 1998; Kalay *et al.*, 1999; Heath & Claassen, 1999; Van Vuuren *et al.*, 1999). 'n Soortgelyke bevinding is ook met hierdie eksperiment gemaak.

Volgens Al-Yakoop *et al.* (1994) is daar twee moontlike redes waarom bioakkumulering van lood in die kieuë die hoogste van alle organe is. Die kieuë is direk met die lood in die water in aanraking en het 'n baie groot oppervlakte area.

Volgens Pain (1995) is een van die eerste tekens van die teenwoordigheid van 'n swaarmetaalbesoedeling die toename in die vorming van mukus op die kieuë. Wanneer loodsoute opgelos word in Hardewater, vorm daar 'n onoplosbare loodkompleks in suspensie in die water (Lloyd *et al.*, 1962; Long *et al.*, 1977; Wepener, 1990). Volgens Doudoroff *et al.* (1953) en Marx *et al.* (1998) bind die onoplosbare loodkompleks aan die mukus op die kieuë en sodoende word die loodkonsentrasie in die omgewing van die kieuë verhoog. Aangesien die mukus in hierdie ondersoek nie van die kieuë afgewas is nie, kan dit 'n verklaring bied waarom die loodkonsentrasie op die kieuëweefsel van die 20 mg L⁻¹ van die Hardewaterblootstellingeksperiment statisties beduidend hoër is as dié van die Sagtewaterblootstelling. Die onoplosbare loodkompleks is by Hardewater baie meer as by Sagtewater. Volgens Doudoroff *et al.* (1953) en Heath en Claassen (1999) sal die konsentrasie lood wat in die kieuë "gebioakkumuleer" het laer wees as die mukuslaag eers afgewas is voordat daar met loodanalises begin is.

Die lewer van visse het 'n hoër kapasiteit vir die binding van swaarmetale met proteïene as ander organe, aangesien groot volumes bloed deur die lewer vloei en die bloedvate baie deurdringbaar is vir hidrofiliese molekules en metale (Marx *et al.*, 1998). Die lewer is 'n orgaan wat verantwoordelik is vir die detoksifisering van skadelike stowwe soos swaarmetale (Heath & Claassen, 1999). Lood word in die lewer gedetoksifiseer deurdat intrasellulêre proteïene (metallothioniene) die metaal

omhul en sodoende die biobeskikbaarheid van die metaal verminder (Huggett *et al.*, 1992; Kargin, 1998).

Dit is bekend dat bioakkumulering van lood toeneem in organe van visse met 'n toename in die loodkonsentrasie in die akwatiese omgewing (Robinson, 1996; Van Vuuren *et al.*, 1999). Dit ondersteun die resultate van die Hardewater- en Sagtewater-eksperimente waar 'n soortgelyke toename in die loodkonsentrasie in die lewer- en kieuweefsel met 'n toename in die loodkonsentrasie gevind is.

Die biobeskikbaarheid van lood vir bioakkumulering word deur baie faktore soos temperatuur, pH en konsentrasie opgeloste suurstof beïnvloed (Hellawell, 1986). Volgens Villegas-Navarro *et al.* (1989) en Robinson (1996) is daar gevind dat bioakkumulering van metale hoër is by Sagtewater met 'n laer pH as by Hardewater met 'n hoër pH. Lood los makliker op in water met 'n laer pH as by 'n hoër pH. Die resultate van die 10 mg L⁻¹ loodblootstelling in Sagtewater het 'n pH-waarde van 6.28. Die konsentrasie lood wat beskikbaar is vir bioakkumulering was dus veel hoër by hierdie pH en bevestig dergelyke bevindinge in die literatuur.

4.4.2.4 Gevolgtrekking

1. 'n Toename in loodkonsentrasie in die akwatiese omgewing het 'n toename in die loodkonsentrasie van die kieu- en lewerweefsel getoon.
2. Kieuweefsel bioakkumuleer 40 keer meer lood in vergelyking met lewer.
3. Lae pH bevorder akkumulering van lood in lewer- en kieuweefsel.
4. Waarskynlik het die loodkompleks wat met die mukus bind 'n verhoging in loodkonsentrasie tot gevolg.
5. Die bioakkumulering van lood in kieu- en lewerweefsel van *Tilapia sparrmanii* kan gebruik word as 'n bio-indikator vir loodbesoedeling in akwatiese sisteme.

4.5 Literatuurlyys

AL-YAKOUB, S., BOU-OLAYAN, A.H. & BAHLOUL, M. 1994. Trace metals in gills of fish from the Arabian Gulf. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 53: 718–725.

DOUDOROFF, P. & KATZ, M. 1953. Critical review of literature on the toxicity of industrial wastes and their components to fish. *Sewage and industrial wastes*. 25: 802–839.

FROMM, P.O. 1980. A review of some physiological and toxicological responses of freshwater fish to acid stress. *Envirometal Biology of Fish*, 5: 79–93.

HEATH, R.G.M. & CLAASSEN, M. 1999. An overview of the pesticide and metal levels present in populations of the larger indigenous fish species of selected South African rivers. WRC Report No. 428/1/99 .pp108–114.

HELLAWELL, J.M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and enviromental management. Elsevier Applied Science Publishers LTD. Barking, England

HUGGETT, R.J., KIMERLE, R.A., MEHRLE, P.M. & BERGMAN, H.L. 1992. Biomarkers biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. Chelsea:Lewis Publishers, pp 16 – 193.

KALAY, M., TAMER, L. & CANLI, M. 1999. Copper and lead accumulation in tissues of a freshwater fish *Tilapia zillii* and its effects on the branchial Na, K-ATPase activity. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, .62:160–168.

KALAY, M., AY, Ö. & CANLI, M. 1999. Heavy metal concentrations in fish tissues from the Northeast Mediterranean Sea. *Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology*, 63: 673–681.

KARGIN, F. 1998. Metal concentrations in tissues of the freshwater fish *Capoeta barroisi* from the Seyhan River (Turkey). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60: 822–828.

LARSSON, A., HAUX, C. & SJÖBECK, M. 1985. Fish physiology and metal pollution: Results and experiences from laboratory and field studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 9: 250–281.

LLOYD, R. & HERBERT, D.W.M. 1962. The effect of the environment on the toxicity of poisons to fish. *Journal of the Institution of Public Health Engineers*, 61: 132–145.

LONG, D.T., & ANGINO, E.E. 1977. Chemical speciation of Cd, Cu, Pb, and Zn in mixed freshwater, seawater, and brine solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41: 1183–1191.

MARX, H.H. & AVENANT-OLDEWAGE, A. 1998. A further investigation into the bioaccumulation of lead and zinc in the organs and tissues of the African sharptooth catfish, *Clarias gariepinus* from two localities in the Olifants River, Kruger National Park. *Koedoe*, 41: 27–43.

MIKHAILOV, V.A., KLYACHINA, K.N., BELYAEVA, L.N., SADILOVA, M.S., KAZANTSEVA, T.S., TROP, F.S., KLEINER, A.M. & BLOBRAGIVA, G.W. 1967. The results and prospects for studies of the pathogenesis, therapy and individual prophylaxis of industrial poisoning with manganese, chromium and fluorine compounds. *General Problems in Industrial Toxicology*. Moscow, pp 124-127

PAIN, D. J. 1995. Lead in the Environment. *In: Royal Society for the Protection of Birds*. CRC Press, INC p 356-391.

ROBINSON, J. 1996. Evaluation of a health assessment index with reference to bioaccumulation of metals in *Oreochromis mossambicus* (Peters, 1852) and aspects of the morphology of *Lernaea cyprinacea* (Linnaeus, 1785) M. Sc. Thesis, Rand Afrikaans University, South Africa.

STAURNES, M., SIGHOLT, T. & REITE, O.B. 1984. Reduce carbonic anhydrase and Na-K-ATPase activity in gills of Salmonids exposed to aluminum-containing acid water; *Experientia*, 40: 226-227.

VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. & DEACON, A.R. 1994. Effect of pollutants on the physiology of fish in the Olifants River (Eastern Transvaal). WRC Report No. 350/1/94. pp142

VAN VUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H., WEPENER, V., ADENDORFF, A., BARNHOORN, I.E.J., COETZEE, L., KOTZÉ, P. & NUSSEY, G. 1999. Lethal and sublethal effects of metal on the physiology of fish: an experimental approach with monitoring support. WRC Report No. 608/1/99, pp 3-9.

VILLEGAS-NAVARRO, A. & VILLARREAL-TREVINO, M. 1989. Differential uptake of zinc, copper and lead in Texas Cichlid (*Cichlasoma cyanoguttatum*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42: 761-768.

WEPENER, V. 1990. Die effek van swaarmetale by variërende pH op die bloedfisiologie en metabolisme ensieme van *Tilapia sparrmanii* (Cichlidae). M.Sc. Verhandeling, Johannesburg, Randse Afrikaanse Universiteit, Suid- Afrika.

Hoofstuk 5 Loodblootstellingseksperimente: waterchemie van gebruikte watertipes

5.1 Vaststelling van die persentasie lood in sintetiese water na 96-uur

5.1.1 Opmaak van sintetiese harde- en sagtewater

Sintetiese Harde- en Sagtewater word opgemaak deur die volgende verbindings in twee liter gedeïoniseerdewater op te los: NaHCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en KCl . Die volgende tabel stel die massas in gram voor van die verbindings wat by die gedeïoniseerde water toegevoeg is.

Tabel 5.1: Die verskillende tipes sintetiese Harde- en Sagtewater wat opgemaak is met verskillende konsentrasies (gram per twee liter) chemikalieë opgelos in twee liter gedeïoniseerde water.

Watertipe	NaHCO_3	$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	KCl
Baie sag	0.024	0.019	0.024	0.001
Sag	0.096	0.076	0.095	0.004
Hard	0.384	0.303	0.378	0.016
Baie Hard	0.768	0.607	0.756	0.032

5.1.2 Bepaling van die konsentrasie lood in sintetiese water na 96 uur

Die sintetiese harde- en sagtewater is in tien 2 liter poli-etileen bottels geplaas. Vyf bottels dien as eksperiment en vyf bottels dien as kontrole. Die bottels is in 'n waterbad by 20°C geplaas en lugborreling is in elkeen van die tien bottels toegepas. Die fisies-chemiese toestande (pH, temperatuur, lugborreling, geleiding, salinitiet, redokspotensiaal) in hierdie eksperiment en in die blootstellingstenks is presies dieselfde gehou. Die water is vir 10 uur lank deurgeborrel soos toegepas in die 1000 liter tenks. Daarna is een mg L^{-1} lood in elkeen van die eksperimentele bottels geplaas en deurborreling is hervat vir 'n tydperk van 96 uur. Tydens die 96 uur is die fisiese faktore by tyd nul en elke dag op dieselfde tyd gemeet, maar slegs die gemiddelde waardes word in Tabel 2 voorgestel.. Na 96 uur is die water vir lood

geanaliseer deur gebruik te maak van 'n fotometer (Nanocolor, 300D, Duitsland) en 'n loodanalisesetel (Macherey–Nagel, Stel nommer 10). Die bepaling is in duplikaat gedoen. Die waarde word uitgedruk as 'n persentasie van die oorspronklike loodkonsentrasie wat bygevoeg is.

5.1.3 Resultate

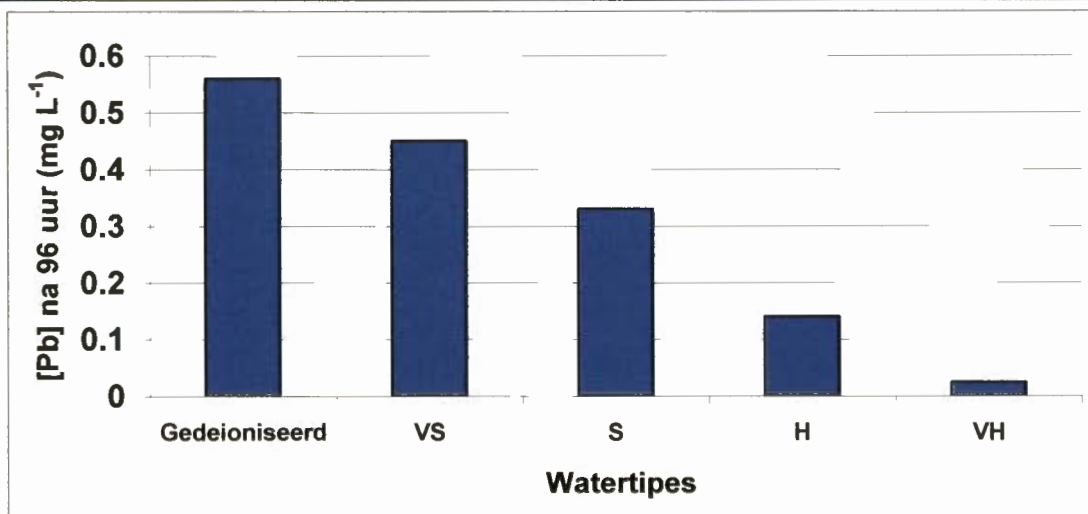
Die resultate wat uit die eksperimente verkry is, dui daarop dat daar 'n toename in die konsentrasie lood na 96-uur met 'n afname in waterhardheid en 'n afname in pH (Tabel 2). Die duplikaat analise van lood het nie meer as 0.5% van mekaar verskil nie. Vir gedeïoniseerde-water is daar 56.9% van die lood in oplossing terwyl vir hardewater slegs 2.4% lood in oplossing was na 96 uur. Die pH van gedeïoniseerde water is 8.19 wat hoër is as die verwagte pH van 7.0.

Die pH styg met toename in die hardheid van die water en word nie deur die 1 mg L^{-1} loodkonsentrasie beïnvloed nie.

Die geleidingsvermoë tussen kontroles en eksperimente is byna dieselfde, maar die waardes van die geleidingsvermoë word deur die 1 mg L^{-1} lood verhoog. Geen verskille is tussen kontrole en eksperimentele water ten opsigte van die redokspotensiaal gevind nie.

Tabel 5.1: Die fisiese veranderlikes (pH, geleiding, redokspotensiaal) van die verskillende tipes water by 20°C en die % lood wat na 96 uur in oplossing in die water bly. Die standaardafwyking word met ± voorgestel

Tipe water	Kontr. % Pb na 96 uur	Eksp. % Pb na 96 uur	Kontr. pH	Eksp. pH	Kontr. Geleiding ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Eksp Geleiding ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Kontr. Redoks. (mV)	Eksp. Redoks (mV)
Gedeïoniseerde water	< 0.05	56.9	8.19	8.14	14.60	26.80	427.80	428.20
±			0.08	0.06	6.66	15.99	27.27	18.13
Baie Sagtewater	< 0.05	45	8.23	8.25	179.40	182.80	439.20	444.00
±			0.19	0.17	10.64	11.43	9.83	6.67
Sagtewater	< 0.05	33	8.23	8.25	179.40	182.80	439.20	444.00
±			0.19	0.17	10.64	11.43	9.83	6.67
Hardewater	< 0.05	14	8.69	8.69	560.00	563.60	434.00	433.80
±			0.08	0.07	5.24	1.95	3.74	7.19
Baie Hardewater	< 0.05	2.4	8.76	8.78	937.20	943.00	429.60	428.20
±			0.02	0.02	18.24	18.23	9.61	11.50



Figuur 5.1: Grafiese voorstelling van die persentasie lood wat in oplossing bly 96 uur nadat 1 mg L^{-1} lood {lood(II) aetaat 3-hidraat} in verskillende sintetiese watertipes opgelos is. (VS = Baie sagtewater; S = sagtewater; H = hardewater; VH = Baie hardewater).

5.1.4 Bespreking

Die gedeeltelike presipitasie van lood in gedeïoniseerde water kan waarskynlik toegeskryf word aan die hoë pH-waarde. Die chemiese spesiëring van loodasetaat by 'n hoë pH is in gedeïoniseerde water nog onbekend.

Die hardheid van die water is 'n belangrike faktor aangesien lood aan CaCO_3 in watersisteme bind om 'n onoplosbare kompleks, wat as 'n wit presipitaat waargeneem word, te vorm met die gevolg dat die loodkonsentrasie in die oplossing verlaag (Lloyd *et al.*, 1962; Long *et al.*, 1977). In die literatuur word hardewater bestempel as water waarvan die CaCO_3 -konsentrasie hoër is as 150mg L^{-1} en sagewater word bestempel as water waarvan die CaCO_3 -konsentrasie laer as 75mg L^{-1} is (Pain, 1995; Yang, 1999). Hoe meer CaCO_3 daar dus in 'n akwatiese sisteem is, hoe meer bindings kan daar met lood plaasvind en hoe laer is die konsentrasie lood in die oplossing.

pH in die akwatiese omgewing is 'n fisiese faktor wat die konsentrasie en toksisiteit van lood, wat in die akwatiese omgewing teenwoordig is, bepaal (Hellowell, 1986; Pain, 1995; Van Vuren *et al.*, 1994; Van Vuren *et al.*, 1999)

Die verandering (verlaging) in pH het tot gevolg dat die verbindings van lood met CaCO_3 opbreek en sodoende verhoog die loodkonsentrasie en die loodione in die water (Förstner *et al.*, 1981).

5.1.5 Gevolgtrekking

1. 'n Afname in die hardheid van die water het 'n toename in die loodkonsentrasie in die water tot gevolg.
2. Die effense verlaging in pH, tesame met die verlaging in hardheid van die water, beïnvloed die graad van oplosbaarheid van loodasetaat.
3. Lugdeurborreling veroorsaak dat die onoplosbare loodpresipitaat in suspensie gaan sodat meer lood geanaliseer is.

5.2 Bepaling van die konsentrasie lood in Hardewater en Sagtewater na 96 uur

5.2.1 Meetmetode

Dieselfde eksperimentele opstelling en analisemetodes soos beskryf vir Sintestiese harde- en sagtewater, is uitgevoer met Hardewater (Potchefstroom-munisipale water), Sagtewater (Rooipoortwater, kyk Hfst. 2) en gedeïoniseerdewater (kyk 5.1.1).

5.2.2 Resultate

Die resultate van die eksperiment dui daarop dat daar 'n toename in die loodkonsentrasie met afname in waterhardheid en pH plaasgevind het. Sagtewater (pH = 7.74) het die hoogste loodkonsentrasie gevolg deur gedeïoniseerde water (pH = 8.19) en Hardewater (pH = 8.8).

Die duplikaat analise van lood het nie meer as 0.5% van mekaar verskil nie.

Die loodpersentasie van lood in die 10mg L⁻¹-en 20 mg L⁻¹-blootstelling is hoër as tydens die 1 mg L⁻¹ en 5 mg L⁻¹. Die loodpersentasie van 10 mg L⁻¹ en 20 mg L⁻¹ van Sagtewater is egter hoër as dié van Hardewater by dieselfde konsentrasies.

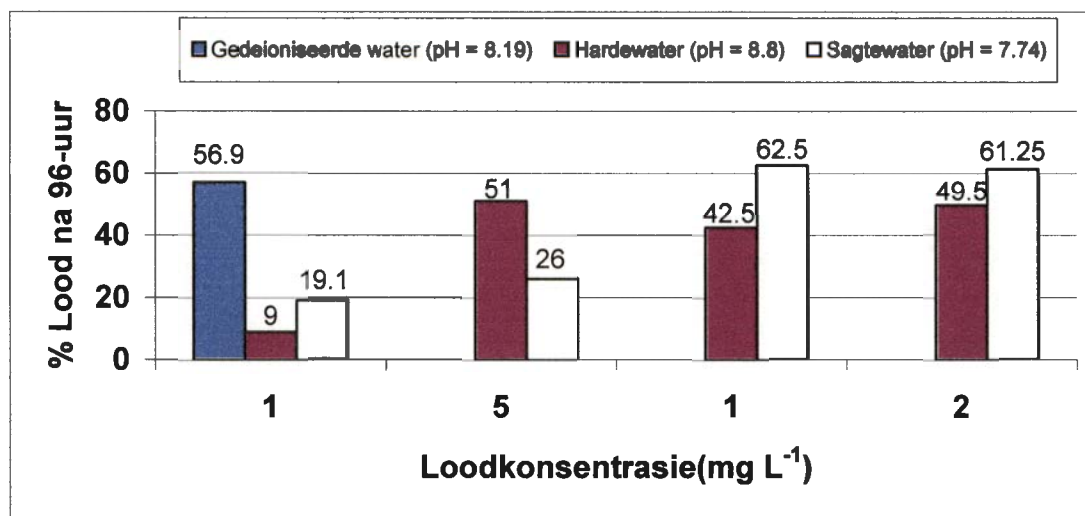
Die pH-waardes van Sagtewater (pH = 7.74) is deurgans laer as dié van Hardewater (pH=8.85). Die pH-waardes tussen die kontroles en die eksperimente van Harde- en Sagtewater word nie beïnvloed deur die byvoeging van lood nie.

Die geleiding van die Sagtewater is ongeveer vyf keer laer as die geleidingswaardes van Hardewater. Lood het nie 'n invloed op die geleidingswaardes van Harde- en Sagtewater nie.

Die redokspotensiaal van Sagtewater is hoër as dié van Hardewater. Die toevoeging van lood tydens die eksperimentele fase het 'n verhoging in die redokspotensiaal tot gevolg.

Tabel 5.2: Die fisiese veranderlikes (pH, geleiding, redokspotensiaal) van Harde- en Sagtewater by 20°C en die % lood wat na 96 uur in oplossing in die water bly. Die standaardafwyking word met ± voorgestel

Tipe water	Blootstellings- konsentrasies	Kontr. % Pb na 96 uur	Eksp. %Pb na 96 uur	Kontr. pH	Eksp. pH	Kontr. Geleiding ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Eksp. Geleiding ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	Kontr. Redoks (mV)	Eksp. Redoks (mV)
Harde water	1 mg L ⁻¹	< 0.05	9	8.85	8.79	649.20	609.60	387.80	391.00
	±			0.02	0.04	2.77	24.96	17.40	13.71
	5 mg L ⁻¹	< 0.05	65	8.85	8.81	649.20	635.00	387.80	396.60
	±			0.02	0.03	2.77	9.57	17.40	12.76
	10 mg L ⁻¹	< 0.05	42.5	8.85	8.84	649.20	645.40	387.80	403.60
	±			0.02	0.02	2.77	1.67	17.40	14.05
	20 mg L ⁻¹	< 0.05	49.5	8.85	8.78	649.20	624.80	387.80	409.00
	±			0.02	0.06	2.77	26.02	17.40	9.51
Sagtewater	1 mg L ⁻¹	< 0.05	19.1	7.74	7.73	117.60	128.00	417.60	430.20
	±			0.03	0.06	7.40	5.43	4.16	6.34
	5 mg L ⁻¹	< 0.05	26	7.74	7.71	117.60	115.80	417.60	429.00
	±			0.03	0.04	7.40	4.44	4.16	3.54
	10 mg L ⁻¹	< 0.05	62.5	7.74	7.74	117.60	117.60	417.60	427.40
	±			0.03	0.05	7.40	5.41	4.16	4.16
	20 mg L ⁻¹	< 0.05	61.25	7.74	7.71	117.60	110.00	417.60	425.20
	±			0.03	0.07	7.40	8.75	4.16	4.44



Figuur 5.2: Grafiese voorstelling van die persentasie lood wat in oplossing bly na 96 uur met behulp van deurborreling, nadat verskillende konsentrasies lood {lood(II) asetaat 3-hidraat} by gedeïoniseerde-, Harde- en Sagtewater toegevoeg is. Twee-liter houers is vir die eksperiment gebruik.

5.2.3 Bespreking

Volgens Abel (1989) het 'n daling in pH die verhoging van metaalkonsentrasies in akwatiese stelsels tot gevolg. Uit Fig. 5.2 kan gesien word dat Sagtewater met die laagste pH-waarde (pH = 7.74) die hoogste konsentrasie lood bevat, gevolg deur gedeïoniseerde water (pH = 8.19) en Hardewater (pH = 8.8).

Die hoë CaCO₃-konsentrasie in Hardewater, in vergelyking met Sagtewater, het die verlaging in loodkonsentrasie in Hardewater tot gevolg, aangesien lood aan die karbonate (CO₃²⁻) bind om 'n onoplosbare presipitaat te vorm (Long *et al.*, 1977). Die hoë loodkonsentrasies wat vasgestel is tydens die eksperiment, kan toegeskryf word aan die deurborreling van die presipitaat wat dit in suspensie plaas en wat dan saam met die water geanaliseer word.

'n Moontlike rede waarom die persentasie lood in Hardewater vir die 5 mg L⁻¹, 10 mg L⁻¹, 20 mg L⁻¹loodblootstelling ook hoog is as dit vergelyk word met die Sagtewater, is dat lugborreling toegepas is. Die loodpresipitaat word deur die agitatie met lugborreling in suspensie gehou. Watermonsters is tydens lugborreling vir analise

geneem. Presipitasie van lood, waar karbonate betrokke is, is reeds deur Long *et al.* (1977) teoreties bereken en voorspel. Die karbonaatkonsentrasie in Potchefstroom munisipale water is meer as 3.75 mmol L^{-1} (Morris & Van Aardt, 1998), terwyl 20 mg lood, as loodasetaat/ $0.096 \text{ mmol Pb-asetaat}$ voorstel. Dit beteken dat alle lood tot 'n konsentrasie van meer as 700 mg loodasetaat kan uit presipiteer.

5.2.4 Gevolgtrekking

1. 'n Verlaging in pH by Sagtewater (subakute blootstelling) het 'n styging in die loodkonsentrasie van 'n deurgeborrelde twee-liter waterhouer tot gevolg.
2. Die karbonate in Hardewater is omtrent 40 keer hoër as die loodasetaat-konsentrasie, wat beteken dat, met chemiese spesiëring, al die lood as loodkarbonaat kan presipiteer.

5.3 Bepaling van die konsentrasie lood in Harde- en Sagtewater na 48 uur: meganiese wateragitasie en nie-meganiese wateragitasie.

5.3.1 Meetmetode

Daar is onderskeidelik een liter Hardewater en 23.033 liter Hardewater uit een van die drie aanhoudingstelsels verkry en onderskeidelik in die een liter Perspex-respirometer en in die 23.033 L Perspex-respirometer geplaas. Die respirometers besit elk 'n meganiese roerder wat die water in beweging hou. Die water word vir 'n tydperk van 10 uur deurgeborrel waarna 50 mg L^{-1} lood by die water gevoeg word. Loodasetaat (2.107g) word in die 23.033 liter respirometer geplaas om 'n konsentrasie van 50 mg L^{-1} te verkry. 'n Stamoplossing ($10\,000 \text{ mg L}^{-1}$) word opgemaak vir die 1 liter respirometer (kyk 3.5.1) waarvan 1 ml in die respirometer gepipeteer word. Die eksperiment word gelaat, sonder deurborreling, vir twee ure en daarna word die water geanaliseer om die konsentrasie lood in die water te bepaal. Dieselfde prosedure word gevolg om die konsentrasie lood in die Sagtewater te bepaal.

In die geval van die een liter Perspex-respirometer word een van die meganiese roerders na 'n tydperk van twee uur ontkoppel. Na 46 uur word die konsentrasie lood bepaal om vas te stel of die meganiese roerder 'n invloed het op die uitsaktempo van lood oor 'n tydperk van 46 uur.

5.3.2 Resultate

Volgens die resultate het die Sagte water deurgans 'n hoër loodkonsentrasie as die Harde water getoon (Tabel 5.3). In Sagte water is gevind dat die loodkonsentrasie in die water van die nie-geroerde respirometer laer is as die loodkonsentrasie in die geroerde respirometer.

Geen verskil is by die Harde water eksperiment tussen die geroerde en nie geroerde respirometer aangetref nie. Die konsentrasie van die lood in Harde water, na 46 uur, is egter laer as dié van Sagte water.

Tabel 5.3: Die persentasie lood (50 mg L^{-1}) wat in oplossing bly na 2 ure (die water in beide respirometers is geroer) en 46 uur (een respirometer is geroer en die ander nie)

Tyd in ure	Harde water		Sagte water	
	Roer	Nie roer	Roer	Nie-roer
0	100	100	100	100
2	69	62	74	78
46	0.9	0.7	15	6

5.3.3 Bespreking

Vir beide die Harde- en Sagtewatereksperimente (roer en nie-roer) word 'n loodpresipitaat gevorm. Long *et al.* (1977) het met sy teoretiese model aangedui dat lood kan presipiteer as 'n mengsel van vars- en seewater vir sy model gebruik word. Tydens hierdie ondersoek is sy model nie toegepas nie, maar is die lood direk geanaliseer.

Vir Sagtewater is die effek minder as by Hardewater en kan moontlik toegeskryf word aan laer pH en die karbonaatinhoud van die Sagtewater.

Magnetiese roering van die water het beslis 'n verhoging in die loodkonsentrasie tot gevolg, omdat die wit presipitaat in suspensie gedwing word. Die suspensie word geanaliseer as lood.

5.3.4 Gevolgtrekking

1. 'n Verlaging in pH by Sagtewater (akute loodblootstellings) het 'n styging in die loodkonsentrasie van die geroerde en nie-geroerde respirometer tot gevolg.
2. Meganiese roering van die water het 'n toename in loodsuspensie tot gevolg sodat meer lood geanaliseer kan word.
3. Long *et al.* (1977) het met sy teoretiese berekening van die hoeveelheid lood in oplossing by hoë pH en 'n mengsel van vars- en seewater gevind dat ongeveer 10% van die lood in oplossing bly, terwyl by hierdie ondersoek minder as 1% lood in oplossing by hoë pH en Hardewater gevind is.

5.4 Literatuurlys

ABEL, P.D. 1989. Water pollution biology. Chichester: Ellis Horwood Limited Publishers, England.

FÖRSTNER, U. & WITTMANN, G.T.W. 1981. Metalpollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, Germany. pp. 15-313

HELLAWELL, J.M. 1986. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Elsevier Applied Science Publishers LTD. Barking, England

LONG, D.T. & ANGINO, E.E. 1977. Chemical speciation of Cd, Cu, Pb, and Zn in mixed freshwater, seawater, and brine solutions. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 41: 1183–1191.

LLOYD, R. & HERBERT, D.W.M. 1962. The effect of the environment on the toxicity of poisons to fish. *Journal of the Institution of Public Health Engineers*, 61: 132–145.

MORRIS, S. & VAN AARDT, W.J. 1998. Salt and water relations, and nitrogen excretion, in the amphibious African freshwater crab, *Potamonautes warreni* in water and in air. *The Journal of Experimental Biology*, 201: 883-893

PAIN, D. J. 1995. Lead in the Environment. *In*: Royal Society for the Protection of Birds. CRC Press, INC p 356-391.

VAN VUUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H., WEPENER, V., ADENDORFF, A., BARNHOORN, I.E.J., COETZEE, L., KOTZÉ, P. & NUSSEY, G. 1999. Lethal and sublethal effects of metal on the physiology of fish: an experimental approach with monitoring support. WRC Report No. 608/1/99

VAN VUUREN, J.H.J., DU PREEZ, H.H. & DEACON, A.R. 1994. Effect of pollutants on the physiology of fish in the Olifants River (Eastern Transvaal). WRC Report No. 350/1/94. pp 51 - 53

YANG, C.-Y. 1999. Relationship between trace metal concentrations and hardness in drinking water in Taiwan. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 63:59-64.

Hoofstuk 6 Algemene Bespreking

Tydens subakute normoksieloodblootstellings in Hardewater is daar gevind dat lood geen effek het op die suurstofverbruikskoers ($\dot{M}O_2$), die totale opgeloste stowwe in die bloedplasma, gal en die plasmachloried-konsentrasie van *Tilapia sparrmanii* nie. Hierdie bevinding kan verklaar word met behulp van die waterchemie-eksperimente. Die konsentrasie lood in Hardewater (hoë pH) is minder as 1% van die aanvanklike blootstellingskonsentrasie. Die konsentrasie lood in oplossing was dus te laag om enige effek op die biologie van *T. sparrmanii* te hê. Die hoë loodkonsentrasies wat tydens die eksperimente bepaal is, kan toegeskryf word aan suspensie van loodverbindings wat veroorsaak word deur lugdeurborrelling en meganiese roering van die water. Die onoplosbare loodpresipitaat in suspensie word dan as lood geanaliseer.

Die Sagewater normoksieloodblootstelling het 'n verhoging in die $\dot{M}O_2$, 'n afname in die totale opgeloste stowwe en 'n toename in die plasmachloried-konsentrasie van *T. sparrmanii* getoon. Uit hierdie eksperiment is daar gevind dat die verlaging in pH die primêre faktor is wat die toksisiteit van lood bepaal. 'n Verlaging in pH het 'n toename in die loodkonsentrasie in die water, 'n toename in mukusvorming op kieulamella, 'n toename in die stresrespons en 'n verhoging in die akkumulering van lood in die lewer en kieuë van *T. sparrmanii* tot gevolg.

Tydens subakute hipoksieloodblootstellings is gevind dat die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* toeneem en kan toegeskryf word aan die toksisiteit van ammoniak (NH_4^+) wat in die wateromgewing aanwesig was tydens die uitvoering van die eksperiment.

Tydens die akute normoksie- en hipoksieloodblootstellings is gevind dat by die Hardewater daar geen verandering in die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* plaasgevind het nie. Dit kan toegeskryf word aan die hoë pH-waardes waarby die eksperiment uitgevoer is, aangesien lood uitpresipiteer by hoë pH om 'n onoplosbare presipitaat te vorm en sodoende die loodkonsentrasie in die water verlaag tot onder toksiese vlakke. By Sagewater is egter gevind dat die loodkonsentrasie in die water hoër is as gevolg van

die verlaging in pH. Dit het weer verhoogde mukusvorming op die kieularneilla en 'n "hoesrefleks" van *T. sparrmanii* met 'n verlaging in die $\dot{M}O_2$ tot gevolg.

Tydens eksperimente waar daar tien *T. sparrmanii* in die 23.033 liter respirometer vir $\dot{M}O_2$ gemeet is, is gevind dat die $\dot{M}O_2$ 2.5 keer hoër is as wat $\dot{M}O_2$ vir individuele visse in 1.15 liter grootte respirometer gemeet is. Hierdie verskil word moontlik aan 'n "crowding"-effek toegeskryf.

In hierdie toksikologiese studie is gevind dat 'n afname in pH in Sagtewater, 'n verhoogde toksisiteit van lood tot gevolg het. Die versuring van ons varswatersisteme in Suid-Afrika as gevolg van industrieë en mynaktiwiteite kan katastrofiese gevolge vir die omgewing en vir die mens inhou. Die hardewater in die Mooirivier, weens die dolemitiese gesteentes in die opvanggebied, het 'n neutraliseringseffek. Die gevolg hiervan is dat swaarmetaaltoksisiteit soos dié van lood bykans uitgeskakel word.

Afgesien van die presipitasie van lood in Hardewater kan $\dot{M}O_2$ -bepalinge gebruik word as biomonitor. Uit die resultate kan afgelei word dat ongeveer 700 mg L^{-1} loodasetaat in dolemitiese water 'n effek op die $\dot{M}O_2$ sal hê. In sagtewater riviere en damme soos in die Olifantsrivier, Mpumalanga, met 'n lae pH en sagtewater, kan $\dot{M}O_2$ as bio-indikator gebruik word om loodbesoedeling vas te stel. In hierdie ondersoek is gevind dat meer as 50 mgL^{-1} lood in die water 'n verlaging in die $\dot{M}O_2$ van *T. sparrmanii* tot gevolg het.