

ASPEKTE VAN DIE RESPIRASIEFISIOLOGIE VAN BIOMPHALARIA
GLABRATA (SAY).

K. NAUDE

DEPARTEMENT DIERKUNDE

POTCHEFSTROOMSE UNIVERSITEIT VIR CHO

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

LEIER: PROF. W.J. VAN AARDT D.SC.

POTCHEFSTROOM

JULIE 1987

ABSTRACT

Various aspects concerning the respiration physiology of the snail, Biomphalaria glabrata were investigated. The metabolic rate of Biomphalaria glabrata was determined by measuring the rate of oxygen consumption in microlitres per kilogram per hour. This value was plotted against the dry body mass. The following allometric relationship was obtained:

$$\dot{V}O_2 = 0,04 Mb^{0,849},$$

where, $\dot{V}O_2$ = oxygen consumption

0,04 = intercept on Y-axis

Mb = dry mass

0,849 = mass exponent

An allometric relationship between the shell width of the snail and its dry mass was obtained and is shown by the following equation:

$$y = 0,416 x + 5,8$$

where, y = shell width

x = dry mass

Biomphalaria glabrata displayed no preference for a specific PO_2 in an oxygen gradient from 5 to 132 mmHg. For a specific oxygen choice between 5 and 132 mmHg in an oxygen choice box, specimens of Biomphalaria glabrata showed no preference.

Success was achieved in limiting the formation of meterythro-
cruorin by using the following buffer: 0,05 M TRIS;
0,1 M $MgCl_2$; 1,0 mM PMSF and 0,5 mM Dithioerythritol. The
formation of meterythro-cruorin was further limited using
freezing incubation for two hours. The use of cooling incu=

bation at 4°C for 24 hours, furthermore, decreased the formation of meterythrocrucorin. By using the above mentioned buffer, oxygen dissociation curves of the Biomphalaria glabrata could be plotted.

By using the thinlayer reaction cell of Dolman and Gill (1978) a Bohr-effect of -0,25 between a pH of 7,1 and 7,86 was shown by the erythrocrucorin of Biomphalaria glabrata. A maximum n-value of 1,46 was obtained with a pH of 7,86 and a temperature of 25°C. A maximum P₅₀-value for chemical impure erythrocrucorin of 5,192 mmHg (pH 7,51) was obtained at 25°C and minimum value of 1,16 mmHg at 7°C. Using Sephadex G-75, pure erythrocrucorin gave a maximum P₅₀-value of 1,73 mmHg (pH 7,40) at 25°C and a minimum value of 0,32 mmHg (pH 7,76) at 7°C. The P₅₀-values were especially influenced by temperatures above 15°C, while the n-values gave a linear relationship with respect to temperature. High pH-values had a large influence on the n-values. The use of the cold light technique to remove carbonmonoxide from the sample was successful. The erythrocrucorin molecule of Biomphalaria glabrata has a low affinity for the binding of its oxygen binding domains with carbonmonoxide.

INHOUDSOPGAWE

	Bladsynommer
1. Inleiding	1
2. Materiaal en metodes	5
2.1 Teling en onderhoud van <u>B.glabrata</u> in die laboratorium	5
2.2 Die werking en gebruik van die Gilson-Respirometer	6
2.2.1 Massabepaling van die slakke	9
2.2.2 Doodmaaktegniek	10
2.2.3 Droging van slakke	10
2.3 Bepaling van die suurstofvoorkeure van <u>B.glabrata</u>	11
2.3.1 Perspex-silinders vir die gasversadiging van water	12
2.3.2 Die suurstofgradiëntkas	14
2.3.3 Die suurstofkeusekas	16
2.4 Suiwering en verkryging van 'n meteritro=kruorienvrye eritrokruorienmonster	18
2.4.1 Versameling van die slakhemolinf	18
2.4.2 Verkryging van 'n gesuiwerde en 'n gekonsentreerde eritrokruorienmonster	19
2.4.3 Die toetsing en seleksie van 'n geskikte buffer vir suurstofdissosiasiekrommes (SDK)	21
2.4.4 Suiwering van eritrokruorien deur middel van dialise	22
2.4.5 Laetemperatuurinkubasie	25
2.4.6 Die gebruik van Gel-filtrasie vir die suiwering van <u>B.glabrata</u> -eritrokruorien	26

2.4.6.1	Die versadiging van die buffer met koolstof= monoksied	28
2.4.6.2	Die kolomopstelling vir die suiwing van die eritrokruorienmonster	28
2.4.6.3	Die metode om die gebonde koolstofmonok= sied aan eritrokruorien te verwyder	31
2.5	Die dunlaagmetode (Gill-sel) vir suurstof= binding met eritrokruorien	32
2.5.1	Werksmetode	34
2.5.2	Berekeninge	38
3.	Eksperimentele Beskrywings, Resultate en Besprekings	42
3.1	Bepaling van die suurstofopnametempo ($\dot{V}O_2$) by <u>B.Glabrata</u>	42
3.1.1	Bespreking	46
3.2	Die bepaling van die suurstofvoorkeur van <u>B.glabrata</u>	50
3.2.1	Die suurstofgradiëntkas	50
3.2.1.1	Bepaling van 'n suurstofvoorkeur in 'n diere= kamer wat 'n lagie lug bevat	52 ;
3.2.1.2	Bepaling van die suurstofvoorkeur van <u>B.glabrata</u> in 'n totaal gevulde dierekamer	53
3.2.2	Die suurstofkeusekas	53
3.2.2.1	Die gebruik van 'n dierekamer met 'n lagie lug	66
3.2.2.2	Die gebruik van 'n totaal gevulde dierekamer	66
3.2.3	Bespreking	66
3.3	Die vermindering in die vorming van meteri= trokruorien in die monster deur die gebruik van verskillende buffers	69

3.3.1	Bespreking	78
3.4	Suurstoferitrokrorienewewigskrommes (SEK) van <u>B.glabrata</u>	80
3.4.1	SEK van eritrokrorien sonder Sephadex- suiwering	80
3.4.1.1	Bespreking van die resultate	84
3.4.2	SEK vir eritrokrorien van <u>B.Glabrata</u> nadat dit deur middel van Sephadex ge= suiwer is	95
3.4.2.1	Bespreking van die resultate	99
4.	Algemene bespreking	102
5.	Opsomming	109
6.	Bedankings	112
7.	Literatuurlys	113

LYS VAN FIGURE

FIGUUR 1:	7
FIGUUR 2:	13
FIGUUR 3:	15
FIGUUR 4:	17
FIGUUR 5:	24
FIGUUR 6:	29
FIGUUR 7:	33
FIGUUR 8:	36
FIGUUR 9:	44
FIGUUR 10:	45
FIGUUR 11:	47
FIGUUR 12:	51
FIGUUR 13:	54
FIGUUR 14:	55
FIGUUR 15:	56
FIGUUR 16:	57
FIGUUR 17:	58
FIGUUR 18:	59
FIGUUR 19:	60
FIGUUR 20:	61
FIGUUR 21:	62
FIGUUR 22:	63
FIGUUR 23:	64
FIGUUR 24:	65
FIGUUR 25:	88
FIGUUR 26:	89
FIGUUR 27:	90
FIGUUR 28:	91

FIGUUR 29:	92
FIGUUR 30:	93
FIGUUR 31:	97
FIGUUR 32:	98

LYS VAN TABELLE

TABEL 1:	72
TABEL 2:	72
TABEL 3:	73
TABEL 4A:	73
TABEL 4B:	74
TABEL 4C:	74
TABEL 4D:	75
TABEL 5:	77
TABEL 6:	82
TABEL 7:	82
TABEL 8:	82
TABEL 9:	83
TABEL 10:	83
TABEL 11:	83
TABEL 12:	85
TABEL 13:	85
TABEL 14:	85
TABEL 15:	86

1. INLEIDING

Biomphalaria glabrata (Say), voorheen in die literatuur ook bekend as Australorbis glabratus Say, is 'n varswaterslak wat medies baie belangrik is omdat hierdie spesie as tussengasheer optree vir die bilharzia-parasiet Schistosoma mansoni. Nog baie min is bekend oor die respirasiefisiologie van hierdie slak. Figueiredo, Gomez, Heneine, Santos en Hardgraves (1974) het sy respirasiepigment, eritrokruorien (Vinogradov, 1985) bestudeer. Nascimento, Daniel en Heneine (1982) het die teenwoordigheid en effek van sulfhidriël-groepe en disulfiedbande op die molekules se funksie ondersoek. Dat so min navorsing oor die bloedfisiologie van pulmonaatslakke gedoen is, kan hoofsaaklik toegeskryf word aan praktiese tekortkominge om met hemolimfmonsters van so klein as 2 μ l te kan werk.

In hierdie laboratorium is die suurstofewewigskrommes (SEK), suurstofverbruikstempo en die keuse van slakke in 'n suurstofgradiënt getoets ten opsigte van Bulinus globosus (Van Aardt en Frey, 1979). Tegnieke wat gebruik is om die SEK-metinge van Bulinus globosus-eritrokruorien te doen, het bevredigend op mikroskaal gewerk. 'n Groot nadeel was egter dat meteritrokruorien voor en tydens metinge gevorm het. Dit het die resultate onbetroubaar gemaak. 'n Ander nadeel was dat die partiële suurstofdruk (PO_2) nooit presies by baie lae waardes gemeet kon word nie. Dit het die resultate dermate beïnvloed dat byvoorbeeld die SDK 'n hiperbool vorm wat nie tipies van die eritrokruoriene is nie (Vinogradov, 1985). Die eritrokruorien van B. glabrata is 'n ekstrasellulêre

hemoglobien (Vinogradov, 1985). Hierdie ekstrasellulêre hemoglobien bestaan uit twee of meer polipeptiedkettings wat elk van 8 tot 20 heem-bindingsareas wat liniêr gerangskik is, bevat (Vinogradov, 1985). Die totale persentasie proteïene in B.glabrata hemolimf varieer tussen 0,63 en 3,52%, wanneer 97% van die totale proteïenvolume eritrokuorien is. Die ysterinhoud van die gesuiwerde eritrokuorien, vasgestel deur middel van DEAE-sellulose, is 0,315%. Die berekende minimum molekulêre massa is 17 700. Die sedimentasiekoëffisiënt was 34,83 wat 'n molekulêre massa van eritrokuorien gee van $1,69 \times 10^6$. Die eritrokuorien besit ook 96 heme per molekule (Figueiredo et al., 1973). Bogenoemde eienskappe van die respirasiepigment beteken ekofisiologies dat B.glabrata 'n slak is wat in wateromgewings bly waar die suurstof baie laag kan daal. Daarom is in hierdie ondersoek eksperimente ontwerp om vas te stel of B.glabrata voorkeure vir bepaalde suurstofwaardes in 'n suurstofgradiënt het of nie. Omdat B.glabrata 'n lid is van die Pulmonata-groep, is ook eksperimente gedoen om sy vermoë om in lug te respireer na te gaan. Hierdie eksperimente was veral belangrik omdat vasgestel is dat die suurstofopname by Bulinus (Physopsis) africanus, Bulinus (Bulinus) tropicus en Lymnaea natalensis deur die mantelholte en die huid plaasvind (Alberts, 1966). Innes, Marsden en Wong (1984) het bevind dat die akwatiese respirasie en die lugrespirasie van die pulmonate Benhamia obliquata en Siphonaria zelandica nie betekenisvol van mekaar verskil nie. Dit is vasgestel dat Bulinus (Physopsis) globosus, 'n ander pulmonaat, 'n duidelike voorkeur vir water met 'n hoë suurstofkonsentrasie toon (Van Aardt en Frey, 1979).

Die ontwikkeling van 'n dunlaagmetode om SEK van hemoglobienmonsters te konstrueer, het sedert Sick en Gersonde se publikasie in 1969 met drastiese skrede ontwikkel. 'n Groot voordeel van hierdie metode was dat besonder klein monsters (2 tot 5 mikroliter) met hoë hemoglobienkonsentrasies vir hul binding met suurstof bestudeer kon word. Waarskynlik die grootste voordeel van hierdie dunlaagmetode was dat tonometrie uitgeskakel kon word. Hierdie prosedure om die monster met suurstof te versadig, het, via fisiese prosesse, die pigment gedenatureer en methemoglobienvorming bevorder (Sick en Gersonde, 1969; Bonaventura en Bonaventura, 1981).

Die verskyning van die Hem-o-scan (Aminco, VSA.) op die kommersiële mark as 'n apparaat om, via dunlaagtegnieke, SEK-metinge te doen, was nie geslaag nie. Met die wysigings wat deur Bonaventura en Bonaventura (1981) voorgestel is, kon egter redelik betroubare metinge gedoen word op hemoglobiene wat nie 'n te hoë affiniteit vir suurstof het nie. Die dunlaagmetode, soos deur Dolman en Gill (1978) voorgestel, het die meeste van die tekortkominge van die Hem-o-scan uitgeskakel. Verder het die dunlaagtegniek van Dolman en Gill (1978) die voordeel gehad dat die suurstof wat aan die monster blootgestel is, baie noukeurig in P_{50} -waardes gemeet kon word. So min as 0,03 mmHg in die PO_2 -waarde kon aan die monster blootgestel word met 'n foutgrens van 1 - 3% (Dolman en Gill, 1978). In die onderhawige ondersoek is ook vir die eerste keer gebruik gemaak van die dunlaagmetode van Dolman en Gill (1978) vir SDK-metinge op eritrokuorien afkomstig van B.glabrata.

Vir die beperking van meteritrokuorienvorming is daar gebruik

gemaak van 'n buffer tesame met 'n skoonmaaktegniek en 'n inku=
basietegniek. Die skoonmaaktegniek het bestaan uit die af=
swaai van die hemosiete en dan die konsentrering van die
eritrokruorien. Die monster is vervolgens verkoel, geïnku=
beer by 4°C en weer gekonsentreer. Die SEK is dan van hier=
die monster by verskillende pH-waardes en temperature bepaal.

2. MATERIAAL EN METODEDES

2.1 TELING EN ONDERHOUD VAN B. GLABRATA IN DIE LABORATORIUM

Die slakke is geteel in 'n geslote sirkulasiesisteen soos beskryf deur De Kock en Van Eeden (1980).

Die slakke is geteel en aangehou in ronde polivinielslakbakke waarvan die gaasbodems 'n maasgrootte van 45 μm het. Die maasgrootte verhoed dat die klein slakkies en die verpoeierte voedsel deurval. Die slakbakke is twee-twee aan alluminiumstafies in die waterbakke in die sirkulasiesisteen gehang so dat een tot twee sentimeter van die slakbakke bokant die wateroppervlak uitsteek. Water word gedurig in die slakbakke gedrup. Hierdie water is goed belug met behulp van 'n lugborrelsteentjie wat deur middel van 'n poli-etileenpypie aan die lugdrukstelsel verbind is.

Na twee weke is die klein slakkies uit die slakbakke verwyder en oorgeplaas na gewone akwariumbakke (61 x 31 x 30 cm) en is dan toegelaat om daarin selfstandig verder te teel en te vermeerder. Die water is elke week aangevul om 'n geleidingsvermoë binne die slakke se verdraagsaamheid van 300 tot 600 μs te verseker. Die watertemperatuur het daaglik gewissel tussen 18 en 22°C.

Die jong en volwasse slakke is gevoed op voedsel vir tropiese vis. Die pas uitgebroeide slakkies is daaglik gevoed op verpoeierte "Tetra conditioning food" (Tetra-Werke, Wes Duitsland). Nadat die slakke in die akwariumbakke oorgeplaas is, is hulle

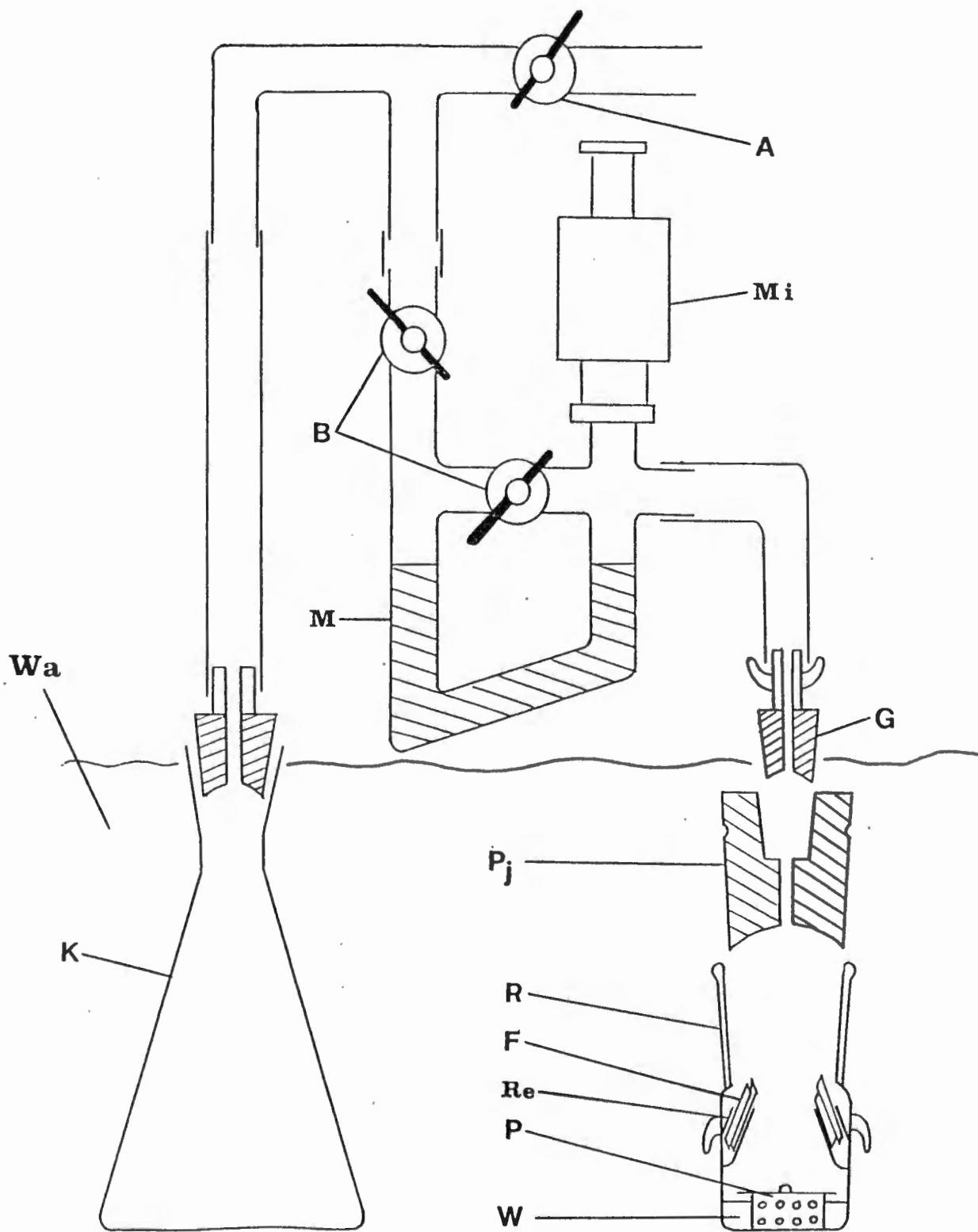
gevoed op 'n een tot een mengsel van "Tetra conditioning food" en "Marple staple flakes" (Tetra Werke, Wes Duitsland). Elke maand is 'n toevoeging van kalk in die vorm van swartbordkryt in die water gemaak om in die slakke se behoeftes te voorsien.

2.2 DIE WERKING EN GEBRUIK VAN DIE GILSON-RESPIROMETER

Die suurstofopname van B.glabrata is vasgestel met behulp van 'n Gilson-respirometer (Model GR14, Gilson Medical Electronics, V.S.A.) (Figuur 1). Die werksbeginsel van die konstante-druk-respirometer berus op die volgende: Die volumeverandering van die gasfase in die respirasieflesse by 'n konstante druk word gemeet (Gilson, 1963).

Volgens Umbreit, Burris & Stauffer (1972) besit die Gilson-respirometer die volgende voordele bo dié van bestaende konstante-volume-respirometers: Metings is minder sensitief vir temperatuur- en drukveranderinge in die onmiddellike omgewing. Al veertien manometers met hulle onderskeie flesse word gelyktydig in werking gestel deur 'n gemeenskaplike hefboom. Die volumeveranderinge word dan, elk afsonderlik, op veertien mikrometers afgelees.

Die spesiaal ontwerpte respirasieflesse word voortdurend in 'n horisontale vlak in 'n waterbad teen 'n baie stadige tempo geskud. Die tempo van skudaksies was 56 per minuut en sodanig dat die slakke nie gesteur is en gevolglik in hulle skulpe in teruggetrek het nie. Verder was die skudaksie bevorderlik vir die temperatuurewewig tussen die water in die respirasieflesse en die waterbad, en vir 'n diffusie-ewewig tussen die



Figuur 1. Diagrammatiese voorstelling van 'n werkseenheid van die Gilson-respirometer. (A): klep om werkseenheid van die atmosfeer af te sluit; (B): kleppe om werkseenheid in werking te stel; (Mi): mikrometer; (M): manometer (K): kompensasiefles; (G): manometerkoppelstuk; (Pj): Perspex-sluitstuk; (R): respirasiefles; (F): filtreerpapiertjie; (Re): KOH-reservoir; (P): geperforeerde houertjie met deksel; (Wa): waterbad; (W): water.

water- en gasfase.

Om die respirasietempo van die slakke te bepaal is gebruik gemaak van 'n spesiaal ontwerpte 40 ml respirasiefles, aangesien die standaard-respirasiefles van die Gilson-respirometer nie groot genoeg was nie. Die respirasiefles (R) (Figuur 1) is so ontwerp dat 'n geperforeerde houertjie (P) gemaak van Perspex op die bodem van die fles pas. Die slak is gedurende 'n bepaling binne-in die houertjie met sy deksel toegemaak. So doende kon die slak se bewegingsaktiwiteit beheer word. Die suurstofopnametempo van baie klein slakke is bepaal deur meer as een slak in die Perspex-houer te plaas. Die suurstofopnametempo van 'n individuele slak is dan bereken deur die gemete waarde deur die aantal slakke te deel. In elke KOH-reservoir (Re) is 'n 1 x 0,5 cm Watman no. 1 filtreerpapiertertjie (F), wat soos 'n konsertina gevou is, geplaas. Die voumetode vergroot die absorpsie-oppervlak vir CO₂ (Umbreit et al., 1972). Elke filtreerpapiertertjie is met 0,05 ml 20% KOH oplossing benat.

Met die aanvang van elke bepaling is die respirasieflesse (R) dig gesluit met behulp van 'n Perspex-sluitstuk (Pj). Die respirasiefles met sy sluitstuk is aan die manometer (M) gekoppel deur middel van 'n manometerkoppelstuk (G). 'n Periode van 30 minute is toegelaat sodat 'n ewewig tussen die respirasieflesse en die waterbad, ten opsigte van temperatuur en druk, kon plaasvind. Na hierdie periode is die respirasieflesse sowel as die kompensatiefles (K) van die atmosfeer afgesluit met behulp van klep (A) (Figuur 1). Die manometers van die respirometer is vervolgens met kleppe B in werking gestel. Na 'n gegewe tydsinterval is die suurstofopnametempo van elke slak

op die mikrometers afgelees. Al die eksperimente is by 'n konstante temperatuur van $25^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ uitgevoer.

Om die bogenoemde mikrometerlesing te verwerk na suurstofopname in mikroliter suurstof by standaardtemperatuur, standaarddruk en droë lug (STD.D), moet die volgende vergelyking (Dunn en Arditti, 1969) gebruik word:

$$f = \frac{(273) \cdot (P_b - 3 - P_w)}{(t+273) \cdot (760)}$$

waar f = mikroliter suurstof verbruik per tydseenheid

t = waterbadtemperatuur in $^{\circ}\text{C}$

P_b = barometriese druk in mmHg

P_w = waterdampdruk in mmHg

Die getal drie word afgetrek van die barometriese druk om te kompenseer vir die soortlike massa van kwik by kamertemperatuur (25°C). Die getal 760 is die standaard- barometriese druk en die getal 273 is die grade Kelvin by 0°C .

Lesings op elke mikrometer (M_i) is elke 20 minute geneem vir 'n periode van twee uur. Die slakke word een vir een verwyder en volgens die doodmaaktegniek in Coertze (1976) gedood.

2.2.1 MASSABEPALING VAN DIE SLAKKE

In die literatuur word die metaboliese aktiwiteit van 'n slak gewoonlik uitgedruk in terme van sy massa sonder sy skulp. Aangesien die persentasie waterinhoud van slakke hoër is as

80% en ook heelwat kan fluktueer (Coertze, 1976), is daar vir hierdie eksperimente gebruik gemaak van die droë massa van die slakke soos beskryf deur Innes, Marsden en Wong (1983). Alle verdere verwysings na slakmassa word bedoel die slak se droë massa sonder die skulp, gedroog by 65°C. Verwysing in die teks na slakliggame stel die natmassa van die slakke voor sonder hulle skulpe.

2.2.2 DOODMAAKTEGNIK

Coertze (1976) het bevind dat eksemplare van B.tropicus na indompeling in kookwater 'n onbekende volume liggaamsvloeistof verloor. Om hierdie verlies te beperk, is die metode soos beskryf in Coertze (1976) gebruik. Met die metode word die slakke droog in 'n proefbuis geplaas. Die proefbuis word dan in kokende water gedompel. Die indompeling duur van een tot twee minute afhangende van die grootte van die slak. Die slak word sodoende met droë hitte gedood en massaverlies as gevolg van verlore liggaamsvloeistowwe word tot 'n minimum beperk. Die droë hitte waaraan die slak blootgestel word, het tot gevolg dat die kolumellaspier maklik los gaan van sy aanhegtingspunte in die skulp. Die liggaam word nou as 'n geheel versigtig aan die voetgedeelte uit die skulp getrek met behulp van 'n pinset.

2.2.3 DROGING VAN SLAKKE

Alluminiumfoelie (dik tipe) is in groottes van 2 x 2 cm gesny. Die foelie is dan genommer, bootvormig gevou en by 65°C vir 24 uur in 'n oond gedroog. Na 24 uur is die massa van die

foelie met behulp van 'n Sartorius-balans bepaal. Die slakliggame is op die foelie geplaas. Droging geskied dan vir 24 uur by 65°C.

Na die drogingsperiode is die massa van die foelie met die gedroogde slakliggame daarop weer eens met 'n Sartorius-balans bepaal. In die gevalle waar daar meer as een slak in 'n geperforeerde Perspex-houer geplaas is, is al die slakliggame saam op een foelie geplaas. Die gemiddelde massawaarde vir elke slak is bereken deur die totale massa te deel deur die getal slakke. Die skulpbreedte van die slakke is gemeet met die skulpopening na bo gerig. Die breedste deel van die skulp is dan gemeet.

2.3 BEPALING VAN DIE SUURSTOFVOORKEURE VAN B.GLABRATA

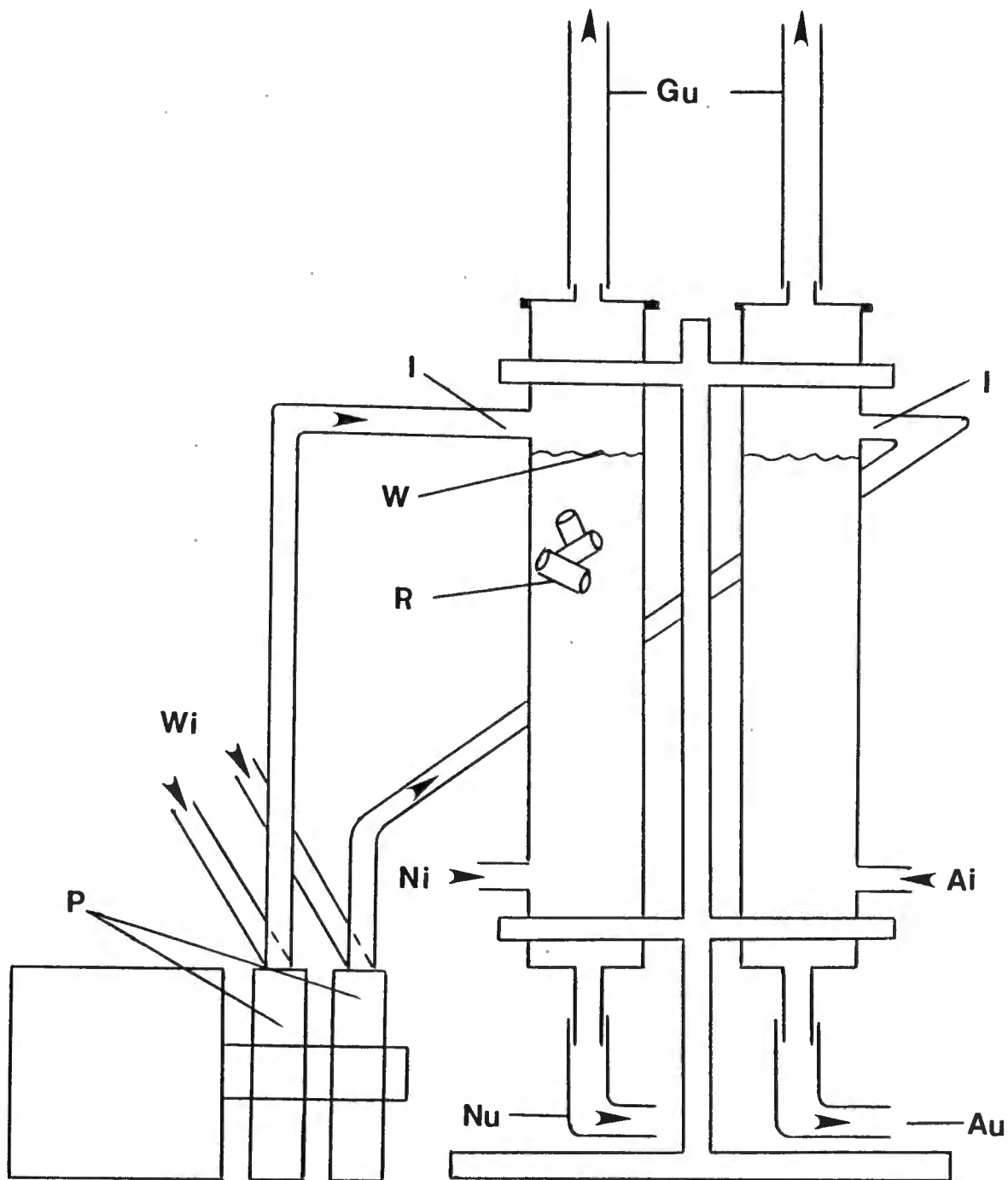
Daar bestaan in beginsel twee metodes om die suurstofvoorkoor by akwatiese organismes te bepaal (Jones, 1952; Höglund, 1951). Een van die metodes is om die suurstofkonsentrasiegradiënt parallel met die water se vloeirigting te hou terwyl by die tweede metode die vloeirigting van die water reghoekig met of teenoorstaande aan die suurstofkonsentrasiegradiënt is.

Volgens Gamble (1971) het die eerste metode die nadeel dat die konsentrasiegradiënt maklik verander word met verandering in die watervloeirigting. Verder is daar die moontlikheid dat rheotakse response die suurstofkeuse of -voorkeure kan beïnvloed. Die tweede metode, ook bekend as die fluviummetode van Höglund (1951), is in hierdie eksperiment gebruik.

2.3.1 PERSPEX-SILINDERS VIR DIE GASVERSADIGING VAN WATER

Daar is gebruik gemaak van twee Perspex-silinders, elk met 'n lengte van 120,0 cm en 'n binne-deursnee van 3,5 cm (Figuur 2). Elke silinder word gevul met Raschig-ringe (R) met 'n lengte van 1,5 cm en 'n buite-deursnee van 1,0 cm. Die water word by elke silinder ingepomp by (I) deur middel van 'n dubbele peristaltiese pomp (P). Elke pomp lewer water teen 'n konstante tempo van 89 ml. min^{-1} . 'n Konstante lugstroom word deur 'n kompressor voorsien en by (Ai) teen 'n tempo van $8,0 \text{ liter. min}^{-1}$ ingelaat. Stikstofgas word vanuit 'n gas-silinder verkry en by (Ni) teen 'n konstante tempo van $2,0 \text{ liter. min}^{-1}$ ingelaat. Die water word effektief in ewewig gebring gedurende die gasfase deur die effek van die teenstroomvloeiemechanisme. 'n Waterstroom (Nu) wat geen suurstof in oplossing bevat nie, word sodoende aan die een inlaat (B1) van die kas verskaf (Figuur 3, 4). 'n Waterstroom (Au) wat met lugsuurstof versadig is en kan wissel tussen 'n suurstofspanning van 120 en 130 mmHg, word aan die teenoorgestelde kant van (B1) verskaf (B2) (Figuur 3.4).

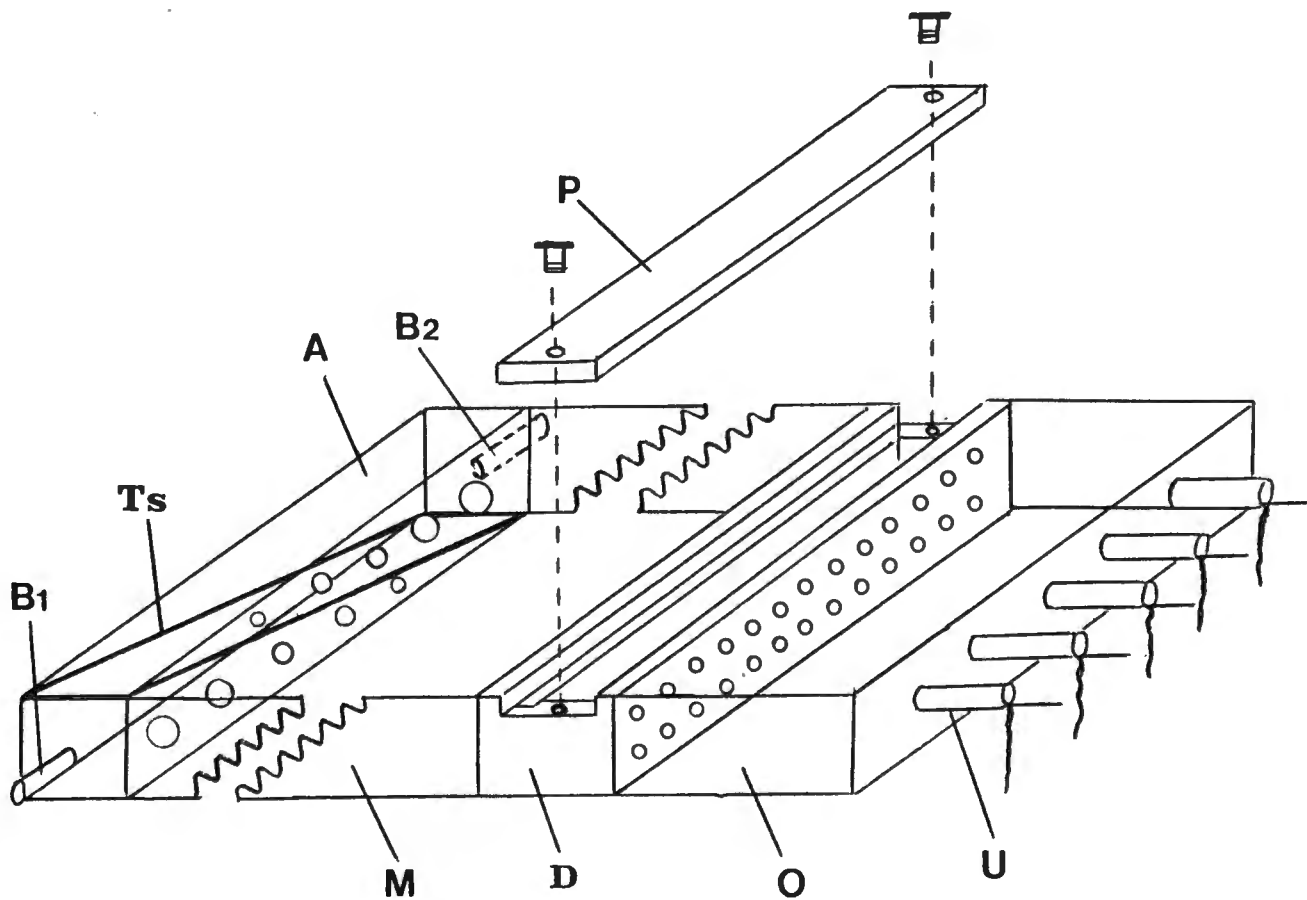
Om te verhoed dat die twee Perspex-silinders deur gravitasie leegloop en die peristaltiese pomp te min water lewer, word die keusekas of gradiëntkas op so 'n hoogte geplaas dat 'n ewewig tussen hierdie twee effekte bereik word. Sodoende bly die Perspex-silinders altyd driekwart vol (W). Albei gasversadigde waterstrome loop dus teen dieselfde vloeitempo van 89 ml. min^{-1} na die gradiëntkas of keusekas.



Figuur 2. Diagrammatiese voorstelling van die apparaat wat gebruik is om twee waterstrome onderskeidelik te oksigeneer en te deoksigeneer.
 (Gu): gasuitlate; (I): waterinlate; (W): watervlak;
 (R): Raschig-ringe; (Wi): waterinlate; (P): peristaltiese pompe; (Ni): stikstofgasinlaat; (Ai): luginlaat;
 (Nu): stikstofgasversadigde wateruitlaat; (Au): lugversadigde wateruitlaat.

2.3.2 DIE SUURSTOFGRADIËNTKAS

Die apparaat is gemaak volgens die aanwysings van Gamble (1971), alhoewel die afmetings van die dierekamer twee keer groter gemaak is (Figuur 3). Die suurstofgradiëntkas is in vier kompartemente verdeel. Kompartement (A) is die verspreidingskompartement. Hierdie verspreidingskompartement word diagonaal, van die bokant na die bodemkant, deur middel van 'n tussenskot (Ts) verdeel. Hierdeur ontstaan twee verspreidingskamers wat met die kantinate, (B1) en (B2), verbind is. Aan die kant van die mengkompartement (M) word vir elke verspreidingskamer 'n ry openinge gemaak. Nadat die gasversadigde water die verspreidingskamers binnegevloei het, verlaat dit weer die kamers deur middel van hierdie ry van vyf openinge. Die openinge word kleiner vanaf 'n maksimum deursnee van ses millimeter aan die breë kant, tot 2,99 mm aan die smal kant van die verspreidingskompartement. In die mengkompartement (M) meng die twee watervolumes, met hul gasse in oplossing, sodat 'n suurstofkonsentrasiegradiënt, reghoekig met die watervloei rigting in die dierekamer (D), tot stand kom. Die hoogte van die water in die dierekamer word bepaal deur die volume van die oorloopkompartement (O). Hierdie volume word gereguleer deur die keuse- of gradiëntkas effens op te lig. Sodoende kan die dierekamer totaal gevul word met water. As die kas nie gelig word nie is die dierekamer gevul met water en 'n lagie (3mm) lug. Om die voorkoms van waterstrome met verskillende snelhede in die dierekamer te verhoed en om watervloei aan die gang te sit, is gebruik gemaak van glaskapillêre waaraan garingtoutjies vasgegom is. Dit is in elk van die uitlaatpypies (U) geplaas, soos in figuur 3 en 4 aangedui.



Figuur 3. Diagrammatiese voorstelling van die suurstofgradiëntkas
 (P): dierekamerdeksel; (B1) en (B2): waterinlate; (A):
 verspreidingskompartement; (M): mengkompartement; (D):
 dierekamer; (O): oorloopkompartement; (Ts): tussenskot;
 (U): uitlaatpypies.

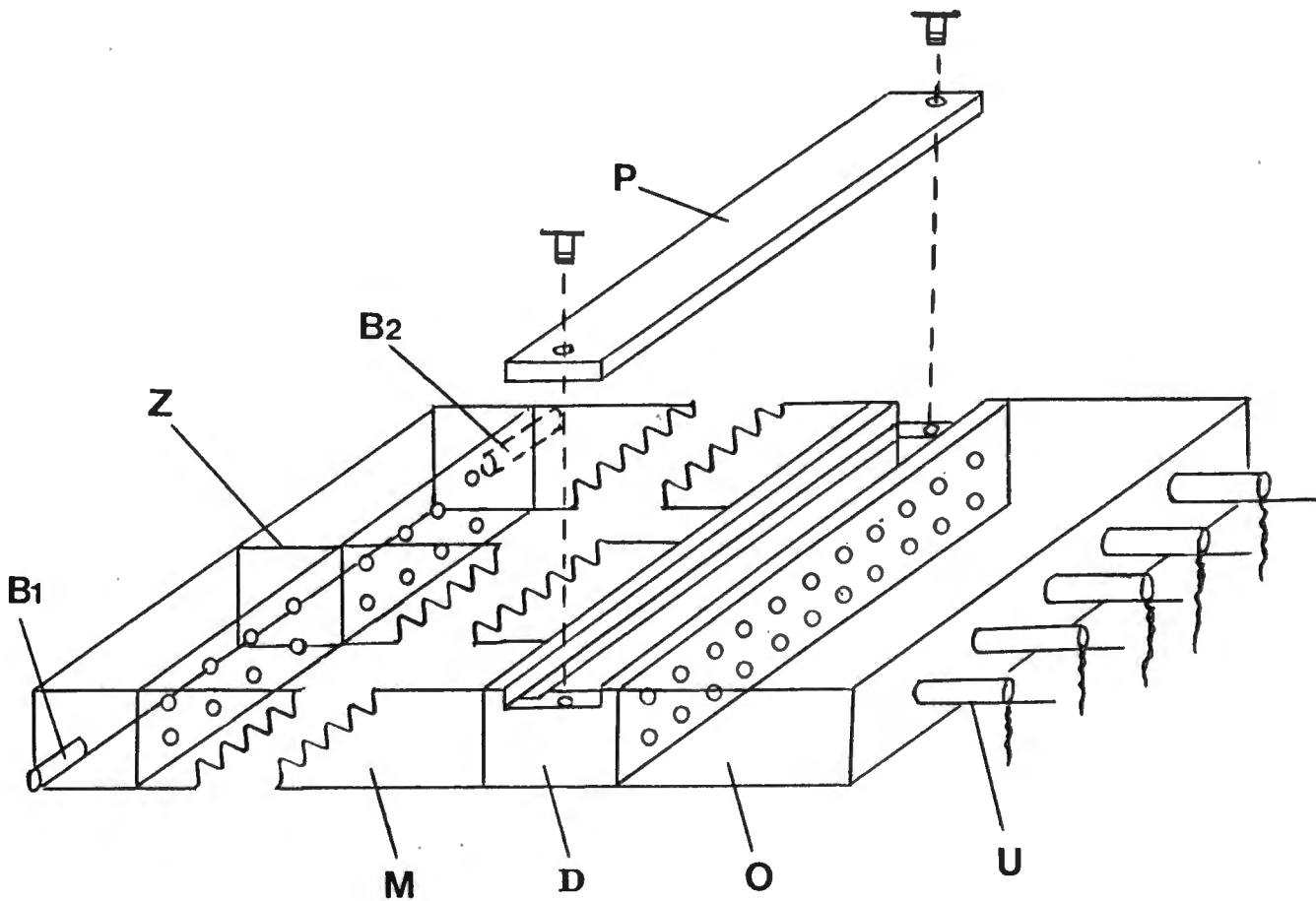
h Veel egaliger watervloei uit die oorloopkamer is bewerkstellig deur die garingtoutjies elk sowat tien sentimeter lank te laat afhang.

Die dierekamer is in agt ewe groot gebiede verdeel deur lyne wat op die Perspex-deksel (P) aangebring is. In elke gebied is die suurstofspanning vasgestel met h PO_2 -elektrode (Model E 5046/0) wat gekoppel is aan h suurbasis-analiseerder (Model PHM 71b), beide van Radiometer, Denemarke. h Vloeitempo 178 ml. min^{-1} gasversadigde water met h vloeisnelheid van $0,10 \text{ cm. sekonde}^{-1}$ beweeg deur die suurstofgradiëntkas.

2.3.3 DIE SUURSTOFKEUSEKAS

Die buiteafmetings en die grootte van die dierekamer van die suurstofkeusekas is dieselfde as dié van die suurstofgradiëntkas. Die skerp skeiding van die suurstofspanning in die middel van die dierekamer is verkry deur die verspreidings- en mengkompartemente in twee ewe groot lengteverlopende kamers te verdeel deur middel van h lengteverlopende tussenskot (Z, Figuur 4). Verder is die reeks openinge tussen die twee mengkompartemente en verspreidingskompartemente, anders as die geval met die gradiëntkas, almal twee millimeter in deursnee. Die grootte van die openinge is van so h aard dat dit dieselfde vloeitempo het as die vloeitempo van die suurstofgradiëntkas. Dieselfde metode wat vir die gradiëntkas gevolg is om die voorkoms van waterstrome met verskillende snelhede in die dierekamer te verhoed, is gevolg.

Nadat die slakke in die dierekamer geplaas is, word die diere=



Figuur 4. Diagrammatiese voorstelling van die suurstofkeusekas. (P): dierekamerdeksel; (B1) en (B2): waterinlate; (M): mengkompartement; (D): dierekamer; (O): oorloopkompartement; (U): uitlaatpypies; (Z): lengteverlopende tussen-skot.

kamer deur middel van die deksel (P) afgesluit en word die eksperiment aan die gang gesit. Met sommige eksperimente is doelbewus 'n lagie lug bo die dierekamer gelaat, terwyl met ander eksperimente die dierekamer volledig met water gevul was.

2.4 SUIWERING EN VERKRYGING VAN METERITROKRUORIENVRYE ERITROKRUORIENMONSTERS

2.4.1 VERSAMELING VAN DIE SLAKHEMOLIMF

Figueiredo, Gomez, Heneine, Santos en Hargreaves (1973) het hemolimf by B.glabrata versamel deur 'n opening in die skulp te maak naby die slak se hart. Hemolimf is dan deur middel van 'n naald wat die mantel perforeer, versamel. Hulle het ook slakke tussen twee glasplate fyn gedruk en die hemolimf dan deur middel van sentrifugering van die res van die materiaal geskei. Nascimento, Daniel en Heneine (1982) het ook van dieselfde metode gebruik gemaak. Hulle het egter die slakke in petribakkies fyn gedruk voordat dit gesentrifugeer is.

In hierdie studie is daar gebruik gemaak van 'n vinniger en makliker metode. Omdat B.glabrata ook hemolimf afstoot met meganiese prikkeling (waarskynlik die Bekius-effek) (Lever en Bekius, 1965), is dit op dié wyse versamel. Dieselfde metode is ook deur Frey (1974) vir die versameling van bloed by Bulinus (Physopsis) globosus gebruik: Dit is die proses waardeur 'n varswaterslak se spiervoet met 'n stomp voorwerp soos 'n pipetpunt geprikkel word. Gedurende die terugtrekke-

fleks van die slak word hemolimf spontaan, waarskynlik deur die hemale porie (Lever en Bekius, 1965), afgegee. Die hemolimf versamel dan in die laaste winding van die skulp tussen die teruggetrekte voetspier en die skulpopening. Die hemolimf word dan deur 'n glaskapillêr, wat aan 'n suigpipet geheg is, opgesuig. Ongeveer 40 - 60 μ l hemolimf kan so uit 'n volwasse slak verkry word. Direk na die hemolimf opgesuig is, word dit oorgedra na 'n 200 μ l-poli-etileenhouertjie (mikrokuvette) met 'n deksel (Beckman, V.S.A.) wat by 0°C gehou word. Die buffer (kyk later) word dan in die verhouding van een tot een by die hemolimf gevoeg.

2.4.2 VERKRYGING VAN 'N GESUIWERDE EN 'N GEKONSENTEERDE ERITROKRUORIENMONSTER

Omdat die eritrokruorienkonsentrasie van normale hemolimf te laag is vir spektrofotometrie en die maak van suurstofhemoglobienewewigskrommes, moes die monsters se eritrokruorien gekonsentreer word. Tydens hierdie prosedure is die eritrokruorien ook in 'n groot mate gesuiwer van veral kleiner proteïene wat in die dryfvloeistof agter bly. Die volgende metode is gevolg:

1. Die mikrokuvette (3 cm lank, gevul met hemolimf) word in 'n Heraeus-sentrifugeerder (Heraeuschrist combifuge, Wes-Duitsland) geplaas. Die hemolimf word vir vyf minute by 10 000 G uitgeswaai.
2. Hierna word die dryfvloeistof afgesuig met 'n spesiale pipet (Transferpettor, nommer 701815, Brand, Wes-Duits-

land). Die opening van die pipette is sodanig dat meganiese spanninge op die makromolekule sover moontlik vermy word. Die dryfvloeistof word vervolgens in sentrifugeerbuisies met 'n volume van 150 μ l geplaas.

3. Die hemolimfmonster word dan vir 30 minute by 175 000 G afgeswaai in 'n Beckman Airfuge . Die temperatuur van die monsters het nooit bokant 30°C gestyg nie.
4. Hierna word die dryfvloeistof versigtig verwyder. Die buffer (kyk later) word in 'n volumeverhouding van een tot een by die gekompakteerde eritrokrurien gevoeg en in oplossing gebring.
5. Vir 'n enkele preparaat vir die Gill-sel (Dolman en Gill, 1978) word twee tot vier mikroliter van hierdie oplossing gebruik.

By 'n tweede metode om verdere proteïene wat moontlik proteolities op die eritrokrurien kan inwerk te verwyder is die volgende prosedure gevolg:

1. Na stap een van bogenoemde metode word die dryfvloeistof deur middel van die "Transferpettor" afgesuig en in 'n een milliliter insulien spuit (Terumo, R.S.A.) geplaas. Aan die spuitpunt se Luer-koppeling word 'n filter (Millex, HV4,) met 'n poriegrootte van 0,45 μ m gekoppel. Die hemolimf met die bufferoplossing, word nou stadig deur die filter in die sentrifugeerbuisies van die Beckman Airfuge gespuit.
2. Stappe drie, vier en vyf van die eerste metode word dan

weer herhaal.

Die derde metode van suiwering is toegepas om die hemosiëte uit die monster af te swaai sodat moontlike proteolitiese ensieme in die betrokke selle, as dit vrykom, nie die eritrokruorien sou fragmenteer of oksideer nie:

1. Die versamelde hemolimf en die bygevoegde buffer word in mikrokuvette geplaas.
2. Die uitswaai van die hemolimf geskied dan by 50G vir vyftien minute.
3. Na hierdie periode word die dryfvloeistof versigtig verwyder en oorgeplaas in sentrifugeerbuisies van die Beckman Airfuge.
4. Stappe drie, vier en vyf van die eerste metode word herhaal.

2.4.3 DIE TOETSING EN SELEKSIE VAN 'N GESKIKTE BUFFER VIR SUURSTOFDISSOSIASIEKROMMES (SDK)

Dit is algemeen bekend dat ekstrasellulêre hemoglobiene (eritrokruorien, chlorokruorien) makliker oksideer tot methemoglobien (Vinogradov, 1985; Bonaventura en Bonaventura, 1981) as gewone hemoglobien sodra dit uit die dier verwyder word. Van die buffers wat deur Bonaventura en Bonaventura (1981); Terwilliger, Terwilliger, Bonaventura en Bonaventura (1977); Nascimento et al. (1982) Figueiredo et al. (1973) gebruik is,

het 'n oksiderende effek gehad op die dunlaagpreparaat wat van B.glabrata hemolimf voorberei is vir SDK-bepalings (kyk later). Die gebruik van 'n geskikte buffer is dus noodsaaklik om die eritrokruorienmonster in 'n nie-oksiderende toestand te hou gedurende SDK-eksperimente. Eksperimente is dus uitgevoer om 'n reeks buffers van verskillende buffersamestellings op B.glabrata se eritrokruorien te toets.

2.4.4 SUIWERING VAN ERITROKRUORIEN DEUR MIDDEL VAN DIALISE

Die mees algemene gebruik van dialise is die voorbereiding en suiwering van makromolekule. Dit word bewerkstellig deur die verwydering of uitruiling van kontaminante met 'n lae molekulêre massa, soos elektroliete en ander anorganiese stowwe. Verder hang die sukses van die dialiseproses af van die samestelling van die dialisemembraan sowel as van sy selektiwiteit ten opsigte van die volgende:

1. Die relatiewe area van die dialisemembraan ten opsigte van die volume van die oplossing wat gedialiseer word.
2. Die volume van die oplossing buite die dialisemembraan ten opsigte van die volume van die monster wat gedialiseer word.
3. Die konsentrasie van deurlaatbare substansie buite die dialisemembraan.

Die dialisemembrane wat gebruik is, had 'n poriegrootte van 2,4 nm. Die membrane is op die volgende wyses voorberei:

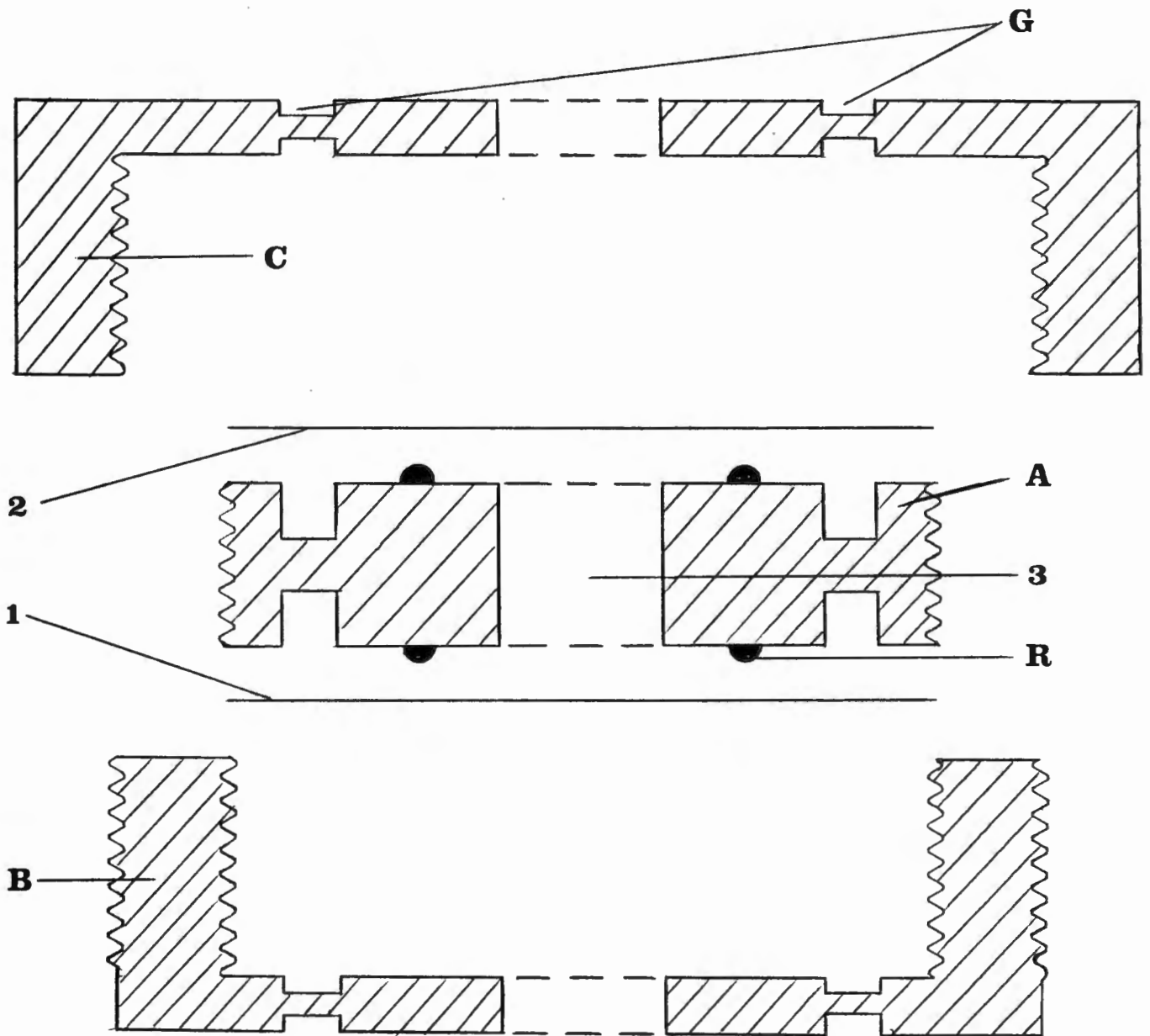
1. Membrane is in grootes van 13,5 mm in deursnee gepons.
2. Membrane is daarna 'n uur lank in 1,0 liter 50% etanol in water by 100°C gekook. Hierdie proses is herhaal met vars etanol-water oplossing.
3. Die kookproses is daarna twee maal herhaal vir een uur in 'n oplossing wat bestaan het uit 10 mM Na_2HCO_3 en 1,0M EDTA.
4. Hierna is die membrane een uur lank in gedistilleerde water gekook. Hierdie proses is herhaal met vars gedistilleerde water.

Die membrane is daarna by 4°C gestoor in gedistilleerde water waarby 5% natriumazied gevoeg is.

Die dialiseapparaatjie wat in die dialiseproses gebruik is, word in Figuur 5 voorgestel. Om die membraan te monteer is soos volg te werk gegaan:

1. Membraan (1) word onder (A) geplaas en deur middel van (B) vasgeskroef.
2. 'n Bloedmonster van 42 μl word in monsterputjie (3) geplaas.
3. Membraan (2) word oor die monster en bo-op (A) geplaas en deur middel van (C) vasgeskroef.

Die dialise apparaat, met die bloedmonster daarin, word op 'n rotasieskyf vasgeknyp. Die rotasieskyf is deur middel van



Skaal:  1mm

Figuur 5. Diagrammatiese voorstelling van die uitmekaargehaalde dialise apparaat. (A), (B) en (C): Dele van dialise apparaat wat inmekaar vasskroef; (1) en (2): membrane; (3) monsterputjie; (R): rif; (G): gaatjies waarin die sleuteltjie pas waarmee die dialise apparaat vasgeskroef word.

h as aan 'n elektriese motor verbind wat die skyf ongeveer 20 omwentelinge per minuut laat draai. Die rotasieskyf met die twee dialise aparate word 12 uur lank in 'n buffer van twee liters by 10°C gehou.

2.4.5 LAETEMPERATUURINKUBASIE

Hierdie metode om eritrokrurien te stabiliseer ten opsigte van sy oksidasie na meteritrokrurien, kom ooreen met die metode soos beskryf in Tomita, Inoki, Santa, Yoshida en Yasumitsu (1968). Daarvolgens word versamelde mensbloed 24 uur lank voor die eksperiment by 4°C gestoor. Die methemoglobien-reduktase wat in selle in die bloed voorkom, het dan die omskakeling van methemoglobien na ferro-hemoglobien tot gevolg (Tomita et al., 1968).

Vir slakbloed is bogenoemde soos volg gewysig:

1. Die versamelde hemolimfvolume van die slak en die bygevoegde buffervolume (een tot een) word vir 15 minute by 50G afgeswaai.
2. Die boonste driekwart van die dryfvloeistof word versigtig verwyder en in die Beckman Airfuge se sentrifugeerbuisies geplaas en dan 30 minute lank by 175 000G afgeswaai.
3. Die dryfvloeistof word versigtig verwyder en die gekonsentreerde eritrokrurienmonster word dan vir 24 uur by 4°C geïnkubeer.

4. Hierna word twee tot vier μ l-hoeveelhede van die monster vir die SDK-werk gebruik.

2.4.6 DIE GEBRUIK VAN GEL-FILTRASIE VIR DIE SUIWERING VAN B. GLABRATA-ERITROKRUORIEN

Read en Terwilliger (1973) het die proses gebruik om mioglobien uit slakke te suiwer. Davis en Riggs (1986) het 'n soortgelyke metode gebruik vir die suiwing van Artemia franciscana se eritrokruorien. Garlick, Bonaventura, Martin en Powers (1979) het hierdie proses gebruik vir die suiwing van die hemoglobien van 'n beervis, naamlik Sternopygus macrurus. Deur die gebruik van gel-filtrasië word die elektroliete sowel as klein proteïenmolekules uit die monster verwyder. In die onderhawige studie is gebruik gemaak van Sephadex-G75. Die beginsel van gel-filtrasië kom op die volgende neer: Molekule wat te groot is om in die Sephadex-mikrosfeer in te beweeg, beweeg buite om die sfeer. Hulle beweeg dan vinniger deur die kolom en is die eerste molekule om onder opgevang te word. Baie klein molekule, waarvan die groottes kleiner is as die poriegroottes van Sephadex-G75, soos elektroliete, beweeg in die Sephadex-sfeer in en sal dus die laaste wees om die kolom te verlaat. Van die molekule met dimensies wat ooreenstem met die porieë in die Sephadex-sfeer, sal in die porieë inbeweeg. Hierdie mediumgrootte molekule sal dus die kolom verlaat op 'n tydstip tussen die baie groot en die baie klein molekule. Die kolom werk dus soos 'n molekulêre sif (Read en Terwilliger, 1973). Na die verkryging van 'n hemolimfmonster word dit geplaas in mikrosentrifugeerbuisies waarin 'n koolstofmonoksied-versadigde buffer in 'n verhouding van een tot

een (volume/volume) met die hemolimfmonster gemeng word. Die hemolimfmonster word soos volg voorberei:

1. Die bloedmonster word by 50G vir vyftien minute afgeswaai.
2. Die dryfvloeistof word deur middel van 'n "Transferpettor" afgesuig en in die sentrifugeerbuisies van die "Airfuge" oorgeplaas.
3. Afswaai daarvan geskied by 175 000G vir 30 minute.
4. Die dryfvloeistof word verwyder en die eritrokruorienmonster, op die bodem van elke sentrifugeerbuisie, van elke slak, word saamgevoeg.
5. Die gekonsentreerde eritrokruorienmonster word deur die Sephadex-G75 kolom gestuur met 'n vloeitempo van 8 ml per cm deursnee per uur by 4°C.
6. Die gesulwerde eritrokruorienmonster wat onder die kolom opgevang is, word weereens in die sentrifugeerbuisies van die "Airfuge" geplaas en vir 30 minute by 175 000G afgeswaai.
7. Die dryfvloeistof is nog eens verwyder en die eritrokruorien, afkomstig van verskeie slakke, is in 'n enkele monster saamgevoeg.
8. Die koolstofmonoksied-versadigde buffer is vervolgens in die verhouding van een tot twee (volume/volume) by die

eritrokruorienmonster gevoeg.

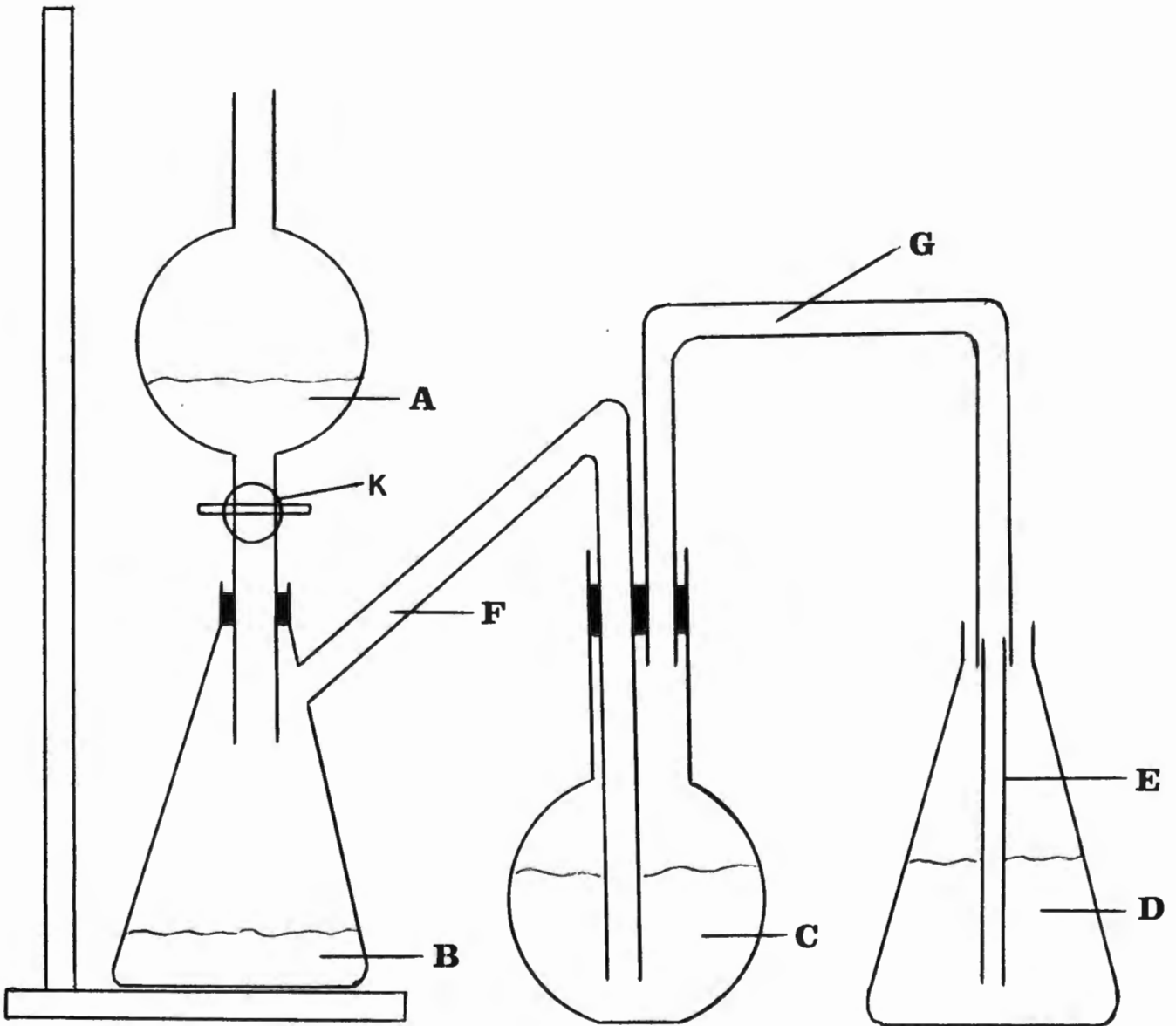
9. Van die monster is 3 μ l in die Gill-sel gebruik vir elke SDK wat gemaak is.
10. Koolstofmonoksied, gebind aan die eritrokruorien, is uit die monster verwyder nadat dit in die Gill-sel aangebring is. Die metode word later in die teks beskryf.

2.4.6.1 Die versadiging van die buffer met koolstofmonoksied

Koolstofmonoksied is volgens die aanwysings van Read en Terwilliger (1973) geproduseer. Die opstelling word voorgestel in figuur 6. Daarvolgens is gekonsentreerde swaelsuur (B) in 'n fles geplaas. Gekonsentreerde mieresuur (A) is drupsgewys in die swaelsuur gevoeg. Koolstofmonoksied word sodoende gevorm. Dit word vervolgens deur middel van 'n verbindingspyp (F) stadig deur water (C) geborrel. Daarna beweeg die koolstofmonoksied deur die verbindingspyp (G) en deur die glaspyp (E) wat in die buffer (D) is. Die koolstofmonoksied word 'n uur lank deur die buffer geborrel vir versadiging.

2.4.6.2 Die kolomopstelling vir die suiwing van die eritrokruorienmonster

Die afmetings van die kolom wat hiervoor gebruik is, is vyftien sentimeter lank, het 'n bedhoogte van veertien sentimeter en 'n binnedeursnee van 0,9 cm (Pharmacia (Swede)).



Figuur 6. Diagrammatiese voorstelling van die apparaat om koolstofmonoksied te produseer, te suiwer en om 'n buffer daarmee te versadig. (A): gekonsentreerde mieresuur; (B): gekonsentreerde swaelsuur; (C): water (D): buffer; (E): glaspyp; (F) en (G): verbindingspype; (K): reguleerkraan

Voordat die Sephadex-G75 in die kolom ingegooi is, is dit toegelaat om vir 24 uur by kamertemperatuur in die buffer wat in die eksperiment gebruik sou word, te swel. Hierna is goed geroerde flodder by kamertemperatuur in die kolom ingegooi tot op die juiste hoogte. Die flodder is vervolgens toegelaat om vir een uur vas te sak. Die opstelling is toe by 'n temperatuur van 4°C geplaas. Direk voor die aanvang van 'n eksperiment is twee kolomvolumes van die buffer deur die kolom laat vloei teen 'n tempo van 8 ml per uur. 'n Buffer met 'n ioniese sterkte groter as 0,2M is gebruik om die interaksies tussen die teenoorgestelde ladings van die Sephadex en die proteïene tot 'n minimum te beperk (Read en Terwilliger, 1973). Die bloedmonster is op die volgende wyse op die kolom geplaas:

1. Die buffer-reservoir is van die kolom ontkoppel.
2. Die boonste vlak van die buffer is toegelaat om tot 1 mm bokant die oppervlak van die gepakte Sephadex-kolom te loop.
3. Die eritrokruorienmonster is daarna deur middel van 'n Transferpettor op die oppervlak van die gepakte kolom geplaas. Die punt van die pipette was so naby as moontlik by die Sephadex-G75 se oppervlak gehou. Die monster is toegelaat om in die Sephadex in weg te sak deur die kolom in werking te stel.
4. Die buffer is dan versigtig op die Sephadex geplaas soos vir die monster en toegelaat om ook in die Sephadex in

weg te sak.

5. Genoeg buffer is weer bo-op die Sephadex geplaas en die reservoir is met die buisie aan die kolom gekoppel sodat die punt van hierdie verbindingsbuis onder die bufferoppervlak is.
6. Teen 'n vloeitempo van $8 \text{ ml. cm}^{-2} \cdot \text{uur}^{-1}$ is die eritrokruorien toegelaat om deur die kolom te beweeg.
7. Die middeldeel van die eritrokruorienband is versamel vanaf die Sephadex kolom, en in die Beckman Airfuge geplaas. Die "Airfuge" is gebruik om die verdunde monster weer te konsentreer deur dit uit te swaai vir 30 minute by 175 000G.

2.4.6.3 Die metode om die gebonde koolstofmonoksied aan eritrokruorien te verwyder

Die metode wat gebruik is, is soortgelyk aan die wat deur Davis en Riggs (1986) toegepas is:

1. Die eritrokruorienmonster is volgens die standaardprosedure in die Gill-sel in die spektrofotometer geplaas.
2. Suurstof vanaf 'n silinder is teen 'n druk van 2,5 kPa oor die gasdeurlatende membraan in die Gill-sel geblaas. Gelyktydig hiermee is die eritrokruorienmonster met behulp van 'n "koue" ligbron bestaande uit optiese veselgeleiding (Scott Mainz, model KL 150B, gloeilampsterkte: 200W)

bestraal.

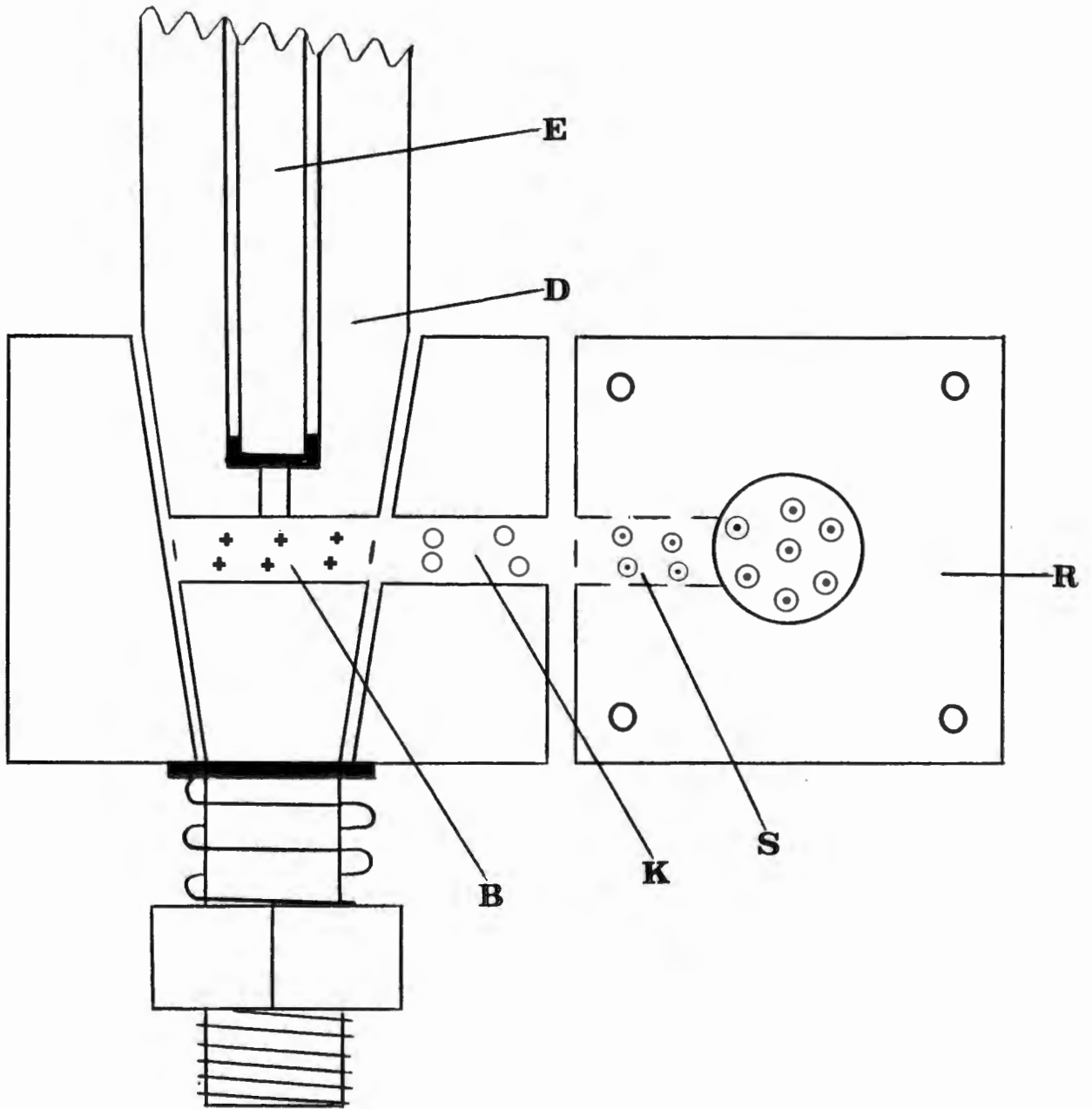
3. Die ligbron is vir vyf sekondes toegelaat om deur die membraan op die eritrokruorien te skyn waarna die ligstraal met 'n skerm bedek is vir 'n verdere vyf sekondes. Hierdie beligtingsproses is tien maal herhaal.

Hierna is die suurstofbinding van B.glabrata-eritrokruorien gemeet volgens die metode soos onder 2.5 beskryf.

2.5 DIE DUNLAAGMETODE (GILL-SEL) VIR SUURSTOFBINDING MET ERITROKRUORIEN

Vir hierdie studie is daar gebruik gemaak van 'n dunlaagreaksiesel (Dolman en Gill, 1978). Die gebruik van die reaksiesel maak dit moontlik om met bloedmonsters so klein soos twee tot drie μl te werk. Volgens Dolman en Gill (1978) kan hoë konsentrasies (0,5 tot 15 mmol heem) met 'n minimum tetra- en dimeer-dissosiasie met die hulp van die dunlaagreaksiesel bestudeer word. Die beginsel waarop spektrofotometriese suurstof-hemoglobienbinding bestudeer word, berus op die feit dat die absorbansiewaarde van oksihemoglobien liniêr verander met 'n afnemende suurstofspanning in die hemoglobienmonster. Die verandering in absorbansie is direk eweredig met die konsentrasieafname van suurstof.

Om die suurstofspanning (PO_2) in die monster van gemiddeld 131 mmHg (parsieële suurstofdruk in Potchefstroom) in stappe te verminder tot 0,21 mmHg, en selfs minder, is 15 tot 25 ver-



Figuur 7. Diagrammatiese voorstelling van die verbinding van die draaiklepstelsel aan die reaksiesel. (E): PO_2 -elektrode (D): draaiklepstelsel; (R): reaksiesel; (B): boorkamer; (K): koppelkamer; (S): selkamer.

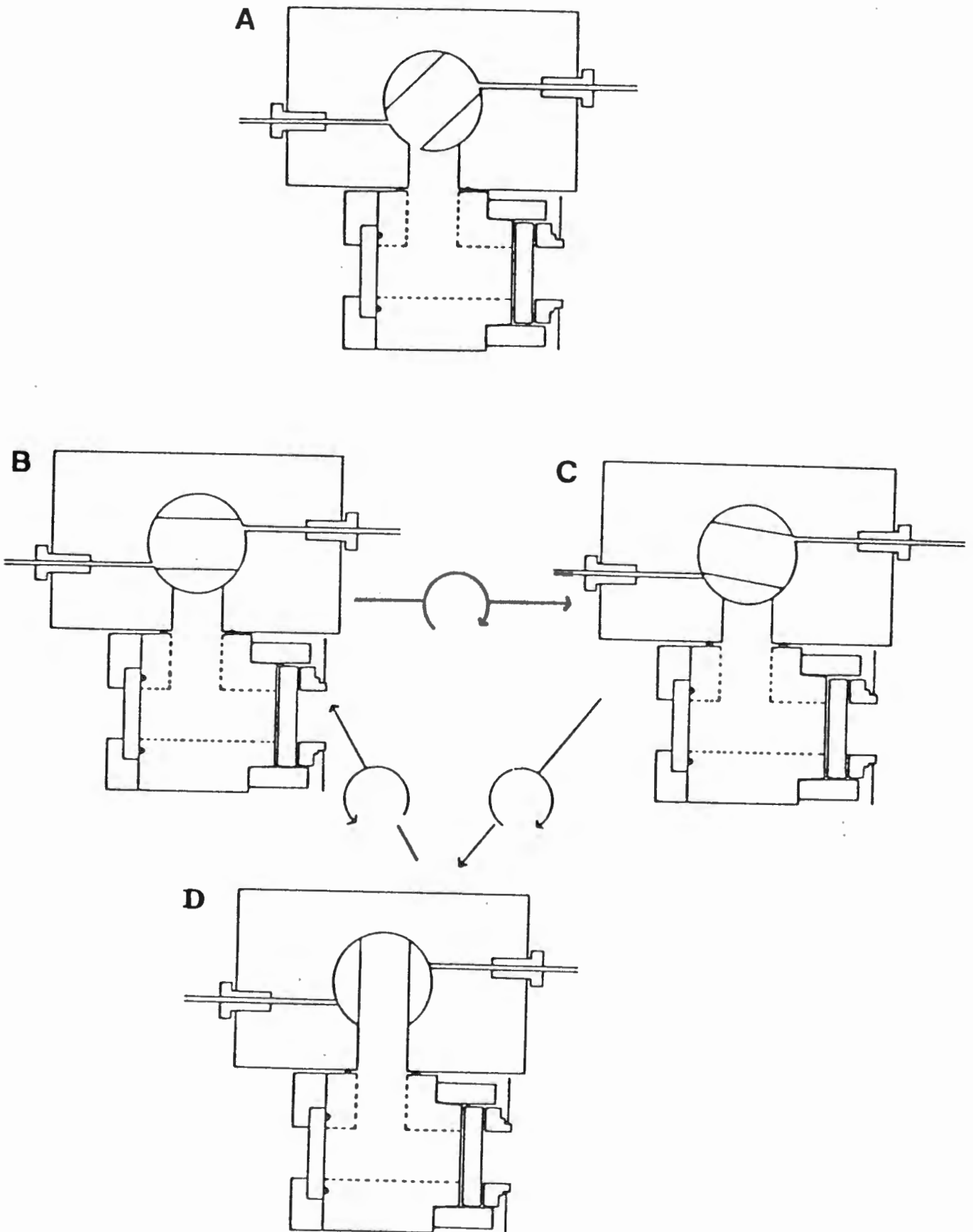
dunningstappe met behulp van stikstof uitgevoer. Dit is bewerkstellig deur 'n draaiklepstelsel te verbind aan die reaksiesiel waarin die eritrokruorienmonster hom bevind (Figuur 7). Omdat die volume van boorkamer (+), waarin stikstof is, en die volume lug van koppelkamer (0) en selkamer (θ) nou bekend is, kan die PO_2 van elke opeenvolgende verdunningstap bereken word, as die barometriese druk vir daardie dag ook bekend is. Omdat die absorpsie van die eritrokruorienoplossing direk eweredig is met die persentasie versadiging van die eritrokruorienoplossing met suurstof, kan 'n suurstofewigskromme gevolglik grafies opgestel word.

2.5.1 WERKSMETODE

1. Die suurstofelektrode (Model E 5046/0, Radiometer, Denemarke) word ingestel op die berekende waarde van die dag (vergelyking 5) (kyk later). Daar word ook seker gemaak dat die verdunningsklep goed ingevet is met Apiezon N sodat daar geen lekkasies kan plaasvind nie.
2. Die dunlaagreaksiesiel word aanmekaar gesit nadat 'n monstergrootte van twee tot drie μ l tussen die kwartsvenster en die glasdeurlatende membraan aangebring is.
3. Die reaksiesiel word dan in die spektrofotometer geplaas sodat die selkamer (θ) met die boorkamer (+) via die koppelkamer (0) in verbinding is (Figuur 7).
4. Die dubbelstraalspektrofotometer (Phillips, Pye Unicam, PU 8800) word ingestel om die absorpsie van eritrokruo-

rien in die sigbare gebied vanaf 700 nm tot 480 nm te bepaal. 'n Spektrum met twee duidelike absorpsiepeke, wat kenmerkend is van oksihemoglobien, word geteken (Dolman en Gill, 1978), sodat die persentasie meteritro= kruorienvorming presies vasgestel kan word, soos beskryf deur Fushitani, Imai en Riggs (1986).

5. Hierna word die spektrofotometer ingestel om die absorpsie in die Soret-gebied vir oksieritrokruorien (480 - 360 nm) te bepaal, sodat verdere inligting van meteritro= kruorienvorming verkry kan word. As die absorpsiepiek by 412 nm is, is dit 'n goeie aanduiding van min meteritro= kruorienvorming.
6. Die spektrofotometer word daarna ingestel op 412 nm en vir sestien tot twintig minute word die absorpsie geregistreer, beide deur 'n drukker (Epson, FX80) en 'n grafiese registreerder (Phillips, Pye Unicam, PU 8800). As die eritrokruorien stabiel is, wat beteken dat byna geen meteritrokruorien gevorm word nie, sal die absorpsiewaardes en dus die posisie van die lyn van die registreerder nie verander nie.
7. Die spektrofotometer word vervolgens ingestel op 428 nm. Dit is die deoksi-eritrokruoriengolflengte waar 'n maksimum verskil tussen die absorpsiepeke van oksie- en deoksieritrokruorien in die Soret-gebied gevind word. Die aanvangsabsorpsie van die monster by 100%-versadiging word dan gemeet. Die konsentrasie van eritrokruorien was in die geval van hierdie studie optimaal $33,7 \text{ mg. ml}^{-1}$ met



Figuur 8. Die werking van die verdunningsklep. (A): Stikstofspoel van die boorkamer, koppelkamer en selkamer; (B): Stikstofspoel van slegs die boorkamer; (C): boorkamer met gasuitlaat in verbinding; (D): boorkamer, koppelkamer en selkamer in verbinding met mekaar. Hierdie aansig is van bo-af gesien op die hoogte van die koppelkamer.

h onderste perk van $23,4 \text{ mg. ml}^{-1}$ en h boonste perk van $53,3 \text{ mg. ml}^{-1}$.

8. Die klep (Figuur 8) word nou gedraai soos aangetoon in figuur 8B. Die boor word hierna met suiwer stikstof gespoel totdat die suurstofelektrode h PO_2 -waarde van nul registreer.
9. Die klep word na die posisie, soos in figuur 8D aangetoon, gedraai sodat daar deur diffusie h verdunning in die luginhoud en dus PO_2 in al drie die kamers plaasvind, met behulp van stikstof. Hierdie verdunning van die partiële suurstof word ook via die suurstofdeurlatende membraan in die eritrokruorienmonster voortgesit. Dit veroorsaak dat die absorbansiewaarde van die monster geleidelik styg maar by voltooiing van suurstofdiffusie by daardie bepaalde verdunningstap afplat en h reguit lyn deur die registreerder getrek word (Figuur 32 B).
10. Sodra die registrasiepen h reguit lyn vertoon (Figuur 32 B) word die absorbansiewaarde outomaties uitgetik.
11. Prosedures 8, 9 en 10 is in hierdie studie gewoonlik staps-gewys agtien tot twintig keer herhaal totdat die toename in absorbansie h minimum was en die suurstofspanning van die monster tot $0,21 \text{ mmHg}$ en selfs laer gedaal het.
12. Die klep is dan na posisie, soos in figuur 8A aangetoon, gedraai en al die suurstof is sodoende deur middel van stikstof uit die kamers en monster gespoel (Figuur 31 C

en Figuur 32 C).

13. Die absorpsie van gedeoksigeneerde eritrokruorien is weer aan die einde van die eksperiment in die Soret-gebied van die spektrum bepaal om hiermee die graad van meteritrokruorien vas te stel.
14. Die klep is daarna weer met lugsuurstof gespoel totdat die eritrokruorienmonster met suurstof versadig is. Procedure 4 en 5 is herhaal sodat absorpsiepieke van eritrokruorien by die Soret-gebied sowel as in die sigbare gebied gemaak is. Sodoende kon maklik 'n grafiese vergelyking gemaak word van hierdie absorpsiepiek voor en na SDK-metinge, sodat meteritrokruorien uitgewys kon word.

2.5.2 BEREKENINGE

1. Bepaling van die konsentrasie eritrokruorien van monsterfilm in Gill-sel

$$C = \frac{\text{Absorbansie}}{E \times l}$$

Waar E = ekstinksiekoeffisiënt by 540 nm. (Die aanname is gemaak dat die ekstinksiekoeffisiënt van 14,27 vir hemoglobien (Van Assendelft, 1970) dieselfde is as vir slakeritrokruorien soos ook aanvaar is vir Artemia (Davis en Riggs, 1986), 'n soutgarnaal se hemoglobien.

l = die optiese weglengte van die monster wat gewoonlik 0,0025 cm dik was en bepaal word deur die vlekvrystaalskeiding in die Gill-sel (vergelyk ook Dolman en Gill, 1978).

2. Bepaling van die aantal moleeritrokuorien in die Gill-sel. (Die molariteit van eritrokuorien word as 16 114 geneem.)

$$\text{mol eritrokuorien} = \frac{\text{vol}(\ell) \times \text{monster massa}}{\text{mol massa (16114)}}$$

Die volume van die monster was een van die volgende drie volumes, afhangende van die dikte van die skeiding wat gebruik is: dun skeiding = 1,27 μl ; medium skeiding = 2,55 μl en die dik skeiding = 6,38 μl . Die volume is in liter (ℓ) uitgedruk.

3. Die fraksieversadiging, (θ), van 'n eritrokuorienmonster met suurstof vanaf verdunning stap een (= i^{ste} stap) tot laaste stap is die volgende:

$$\theta = \frac{\text{Abs (by } i^{\text{ste}} \text{ stap)} - \text{Abs. van deoksieritrokuorien}}{\text{Abs. van oksieritrokuorien} - \text{Abs. van deoksieritrokuorien}}$$

4. Die Hill-vergelyking kon met θ voorgestel word:

$$\frac{\theta}{1 - \theta} \quad \text{of} \quad \log \frac{\theta}{1 - \theta}$$

Die logaritmiëse waarde, verkry uit die Hill-vergelyking kan uitgestip word teenoor die logaritmiëse waarde van PO_2 van die verskillende i^{ste} stappe. Hierdeur word 'n Hill-

grafiek verkry waar die waardes op 'n reguit lyn lê.

5. Om die PO_2 van elke i^{ste} stap vas te stel is van die volgende vergelyking gebruik gemaak (Dolman en Gill, 1978).

$$P_i = QP_{(i-1)} + \frac{n(Q_{(i-1)} - Q_i) \times RT}{V} \text{ mmHg}$$

Q = die verdunningsverhouding. Dit word verkry deur die volume van boorkamer (B in figuur 7) te deel deur die volume van die koppelkamer (K in figuur 7) plus die volume van die selkamer (S in figuur 7). 'n Waarde van om en by 0,7097 word verkry, afhangende van die temperatuur.

P_i = die partiële suurstofdruk in mmHg

n = die aantal mol van monster

Q_i = die fraksie van eritrokruorien versadiging by die i^{ste} verdunningstap

V = die volume van die Gill-sel (selkamer) asook die boorkamer en koppelkamer (figuur 7) in liters

R = die gaskonstante. Dit is 62,37 mmHg per liter per $^{\circ}K$ per mol

T = temperatuur in grade Kelvin ($273^{\circ}K = 0^{\circ}C$)

6. Die begin PO_2 (P_{O_2}) word bepaal deur 'n bekende gasmengsel (gewoonlik lug) in die stelstel by atmosferiese druk te plaas.

$$P_{O_2} = B - a \times \frac{20,94}{100}$$

Waar B = Barometriese druk (mmHg)

a = dampdruk van water by die eksperimentele temperatuur

$\frac{20,94}{100}$ = die persentasie suurstofsamestelling van lug.

3. EKSPERIMENTELE BESKRYWINGS, RESULTATE EN BESPREKINGS

3.1 BEPALING VAN DIE SUURSTOFOPNAMETEMPO ($\dot{V}O_2$) BY B.GLABRATA

Heelwat navorsing is alreeds gedoen op die $\dot{V}O_2$ van varswaterslakke. Jones (1961, 1964) het die duikfrekwensie van die slak B.sudanica bepaal tydens toestande waar geen suurstof en toe= stande waar wel suurstof in die water teenwoordig was. Innes, Marsden en Wong (1984) het, deur die gebruik van Scholander= respirometers, die $\dot{V}O_2$ van twee intergety-pulmonate vasge= stel. Hulle het bevind dat soveel as 25% van die totale lug= respirasie van die twee pulmonate deur die kop- voetoppervlak plaasvind. Alberts (1966) het bevind dat kutaneuse respira= sie by Bulinus africanus, B.tropicus en Lymnaea natalensis tot agt maal meer is as pulmonale respirasie.

Met hierdie studie is die $\dot{V}O_2$ van B.glabrata in water sowel as in lug bepaal. Daar is ook 'n onderskeid getref tussen die gepigmenteerde (melanien) en die albino-variasie van hierdie spesie. Ver= der is die verhouding van die slakke se droë massa teenoor die skulpbreedte ook bepaal.

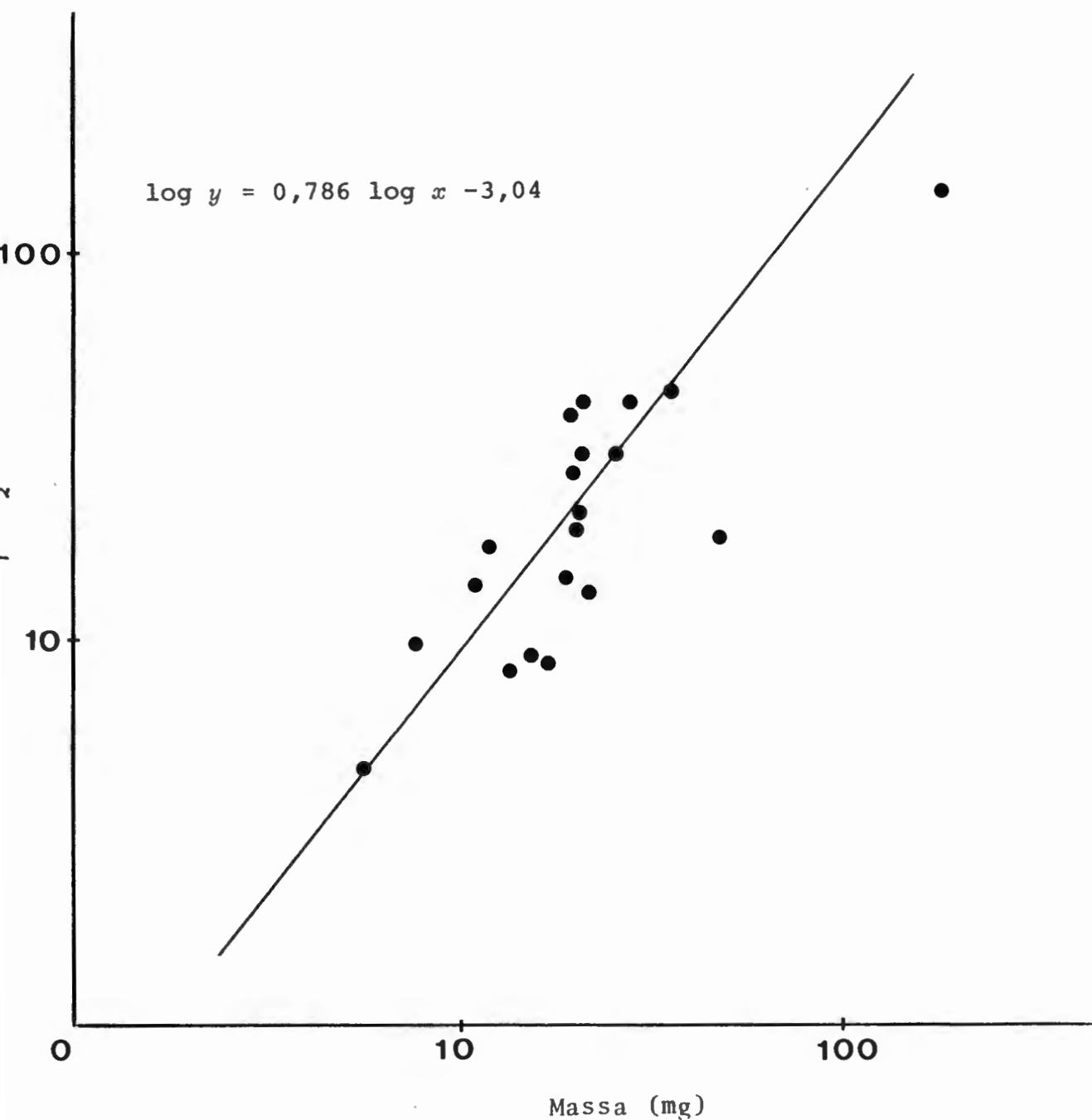
Vir elke eksperiment in hierdie studie is daar telkens gebruik gemaak van 'n maksimum van veertien slakke. Die water waarin die slakke in die respirasieflesse geplaas is, was afkomstig uit die akwariumbakke waarin die slakke aangehou is. Elke eksperiment het gewoonlik van 1,5 tot 2 ure geduur.

In die eerste eksperimente is die slak se suurstofverbruik gemeet wanneer dit van kutaneuse sowel as pulmonale respirasie

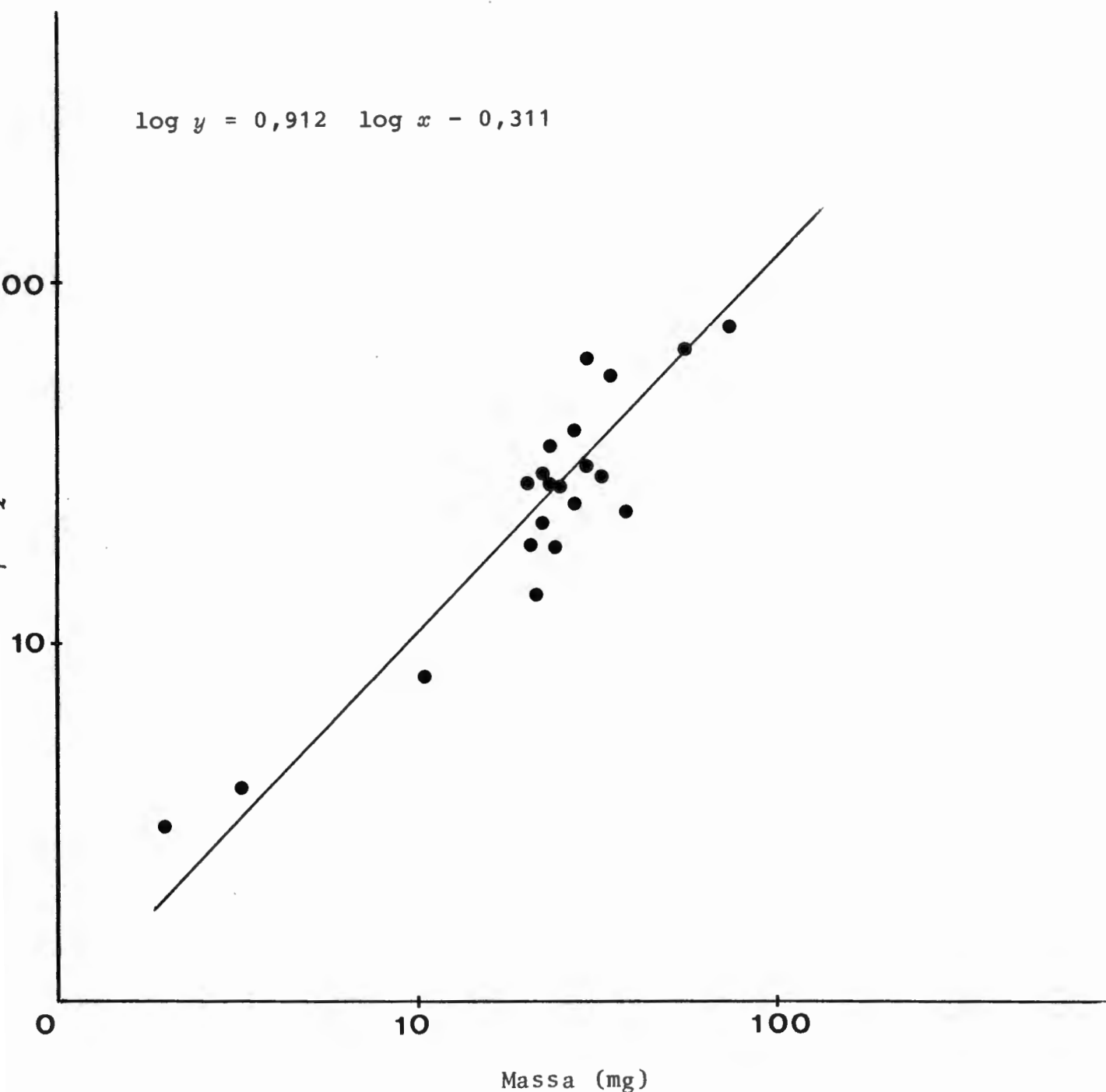
gebruik gemaak het. Die slakke is in die geperforeerde houertjies onder water in die respirasieflesse geplaas. Die lesings op die mikrometers is elke twintig minute geneem. Sodra drie of vier lesings opeenvolgend verkry is wat nie meer as 10% van mekaar verskil het nie, is die eksperiment gestaak. Die Gemiddelde waarde van hierdie lesings is bereken. Die waarde is verwerk tot die hoeveelheid suurstof in mikroliters by STDD (Standaard temperatuur, druk en droë lug) wat deur die slakke verbruik is. In die geval van die albino-variasie is gebruik gemaak van 21 slakke, en twintig slakke is gebruik by die gepigmenteerde tipe.

Die resultate uit die eksperiment (Figuur 9, 10) dui aan dat die massa-eksponent, b , van albinoslakke 0,912 is, met 'n lynpassing van 0,918. Die massa-eksponent, b , van die gepigmenteerde slakke is 0,786, met 'n lynpassing van 0,849. As die waardes van die massa-eksponent van beide variante bymekaar gevoeg word dan word 'n massa-eksponent-waarde, b , van 0,849 verkry, met 'n lynpassing van 0,884. Hierdie waarde is heelwat hoër as die massa-eksponentwaardes van 0,67 (intraspesifiek) en 0,75 (interspesifiek) soos uiteengesit deur Wieser (1984) vir soogdiere.

In die tweede reeks eksperimente is die respirasietempo van slakke in lug bepaal. Dit is gedoen deur eers die slakke deeglik te droog sodat geen water as 'n medium vir respirasie deur hulle gebruik kon word nie. Vir hierdie eksperiment is daar slegs van albino slakke gebruik gemaak. Die afgedroogde slakke is op die bodem van die respirasieflesse geplaas en hul suurstofverbruik is, net soos in die geval van akwatiese



Figuur 9 . Die suurstofopnametempo van 20 gepigmenteerde B.glabrata eksemplare. Gedurende die eksperiment is die slak in 'n Perspex-houertjie gehou wat onder water in die respirasiefles was. In die vergelyking stel y die suurstofverbruik voor, x die liggaamsmassa van die slak.



$$\log y = 0,912 \log x - 0,311$$

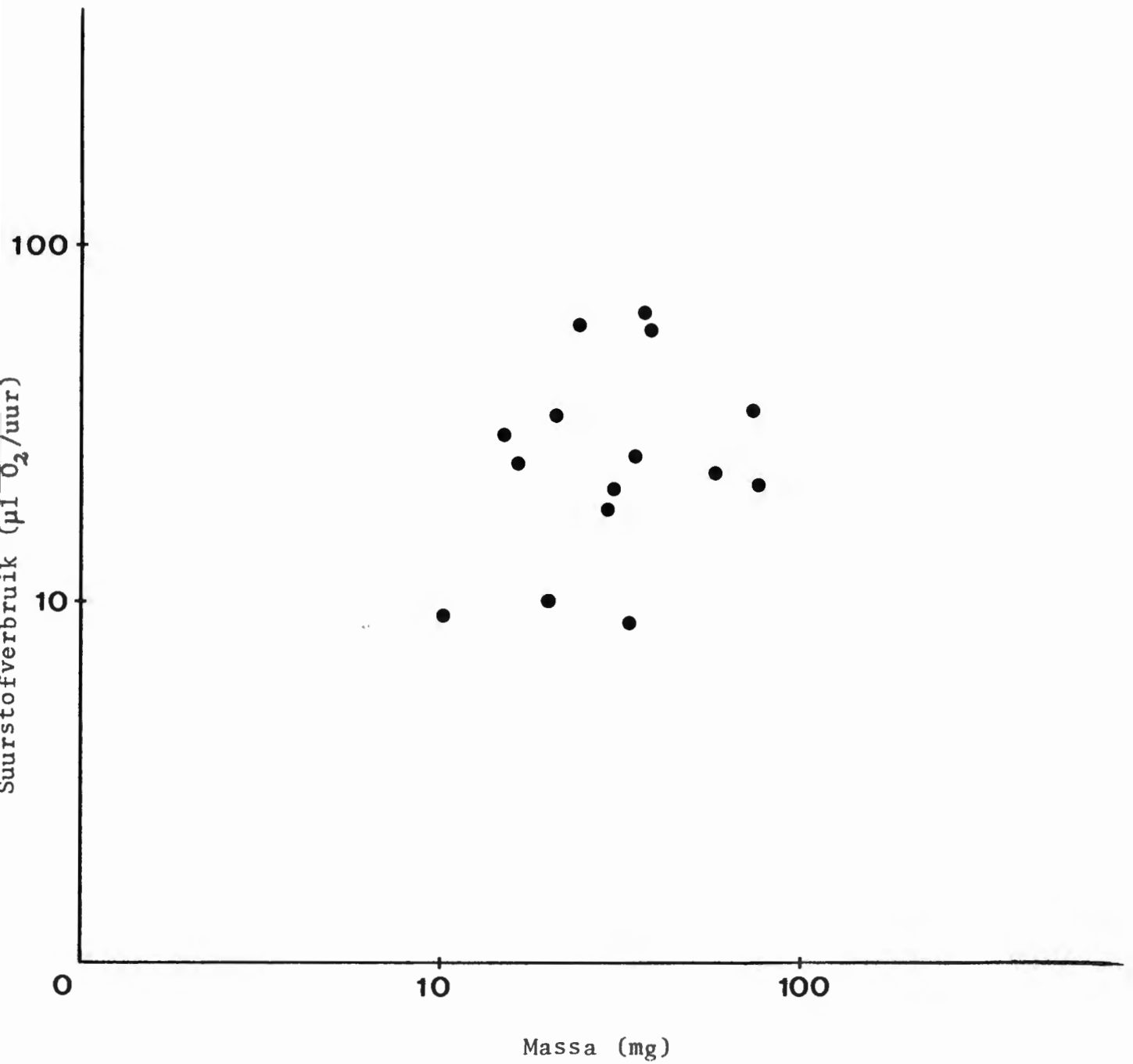
Figuur 10. Die suurstofverbruik van 21 albino B.glabrata slakke. Die slakke is gedurende die eksperiment in 'n Perspex-houertjie gehou wat onder water in die respirasiefles was. In die vergelyking stel y die suurstofverbruik voor en x die liggaamsmassa van die slak.

respirasie, met die Gilson-respirometer bepaal. Gedurende die eksperiment het geeneen van die slakke sy voetgedeelte uitgestulp nie maar het hulle almal onaktief in die skulpe gebly. Die resultate, as dit grafies voorgestel word, dui op 'n kolverspreiding (Figuur 11). Die helling van die regressielyn is 0,252, met 'n lynpassing van 0,28, wat daarop dui dat daar geen verband bestaan tussen die suurstofverbruik en die droë massa van die slakke by hierdie toestand nie.

Met die bepaling van die droë massa van die slakke, is terselfdertyd die skulpbreedte van elkeen gemeet. Die slakke se droë massa (sonder skulp) het gewissel van 1,9 mg tot 133,0 mg, terwyl die skulpbreedte van 4,0 mm tot 25,6 mm gewissel het. As die resultate op 'n logaritmiëse assestelsel uitgestip word, kan in Figuur 12 gesien word dat die hellingwaarde van die skulpbreedte teenoor die droë massa 0,416 is, met 'n lynpassing van 0,973.

3.1.1 BESPREKING

Wieser (1984) het 'n duidelike onderskeid getref tussen die interspesifieke massa-eksponent van 0,75 en die intraspesifieke massa-eksponent van 0,66. Volgens Depledge (1985) word die waarde van die intraspesifieke massa-eksponent nie slegs deur die dier se liggaamsgrootte en vorm beïnvloed nie, maar ook deur die dier se aktiwiteitsvlak. As die muise byvoorbeeld aktief is, styg die waarde van die massa-eksponent (Depledge, 1985). Berg en Onckelman (1959) het bevind dat die massa-eksponentwaarde by pulmonate slakke heelwat hoër is as 0,75 en het 'n waarde van 1,0 gevind.



Figuur 11. Die suurstofopnametempo van 15 albino slakke wanneer slegs van lugrespirasie gebruik gemaak is.

As daar na die massa-eksponentwaardes van albinoslakke en gepigmenteerde slakke afsonderlik gekyk word, is dit duidelik dat dit in albei gevalle heelwat hoër is as die waarde van 0,66 wat deur Wieser (1984) voorgestel is. So is ook die gesamentlike massa-eksponentwaardes heelwat hoër as 0,75, naamlik 0,849. Altman en Dittmer (1966) het 'n lys van meer as 200 invertebrate massa-eksponentwaardes saamgestel. Daarvolgens wissel die waardes vanaf 0,67 tot oor 1,0. Innes et al. (1984) het by twee pulmonaat-intergety-slakke waardes gekry van 0,627 en 0,772 wanneer hulle in rus verkeer.

Alhoewel daar tydens die eksperimente beheer uitgeoefen is oor die aktiwiteite van B.glabrata, is daar nie bo alle twyfel gesorg dat die slakke in 'n rustoestand verkeer het nie. In sommige gevalle is gesien dat van die slakke in die Perspex-houertjie tog rondbeweeg het. 'n Hoër aktiwiteit kan dus verantwoordelik wees vir die hoër massa-eksponentwaardes soos deur Depledge (1985) verduidelik is. Die spiraalgedraaide skulp van Biomphalaria glabrata kon 'n rol speel om die waarde van die massa-eksponent te beïnvloed. As B.glabrata in 'n rustoestand verkeer, is die voetgedeelte gewoonlik in die skulp teruggetrek en het dit tot gevolg dat 'n baie klein gedeelte van die voet aan die suurstofryke water blootgestel is. As in aanmerking geneem word dat, volgens Alberts (1966), die kutaneuse suurstofopname tot soveel as agt maal meer is as die pulmonale opname by sy drie ondersoekte pulmonate, sal die vermindering van die blootstellingsoppervlak van die slak se voet by hierdie eksperimente 'n merkbare invloed op die suurstofopname behoort te hê. Dit kan die waarde van die massa-eksponent beïnvloed. 'n Verdere probleem van die slak se terugtrekking

in sy skulp is dat die longholte toegedruk kan word, wat 'n negatiewe effek sal hê op die suurstofopnamekoers. Bogenoemde effekte word waarskynlik vererger tydens lugrespirasie by B.glabrata. By al die onderhawige eksperimente het die slak teruggetrek in sy skulp as dit in 'n droë, lugge vulde respirasiefles geplaas is. Die kolverspreiding van die resultate (Figuur 11) en ook die gevolglike lae massa-eksponentwaarde van 0,252 is bewys dat suurstofverbruik so wisselvallig is dat geen gevolgtrekking uit die resultate gemaak kan word nie. Tydens lugrespirasie kan slakke dus nie gebruik word om suurstofopnametempo's vas te stel nie aangesien die gaswisselingsoppervlakte nie funksioneel is nie. Hierdie pulmonate reageer dus totaal anders as dit vergelyk word met die intergety-pulmonate Benhamia obliquata en Siphonaria zelandica (Innes et al., 1984). Hemmingsen (1950, 1960) het uitgewys dat die hellings van die regressielyne van verskillende invertebraatgroepe groot variasie vertoon. As egter na die invertebrate as hele groep gekyk word, sal gemerk word dat die regressielyn 0,75 is.

As die resultate van die droë massas van die slakke teenoor die waardes van die skulpbreedte uitgestip word, is dit duidelik dat daar 'n verband is. Die helling van 0,416 dui aan dat die toename in skulpbreedte baie stadiger is as die toename in droë massa. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die laaste skulpwinding se totale deursnee ook vinnig toeneem en dat dit weerspieël word in die vinnige massatoename. Hierdie allometriese verwantskap tussen skulpbreedte en deursnee van die skulpwinding kom ook by ander diere voor (Schmidt-Nielsen, 1984). Uit die resultate van figuur 12 kan die droë massa van

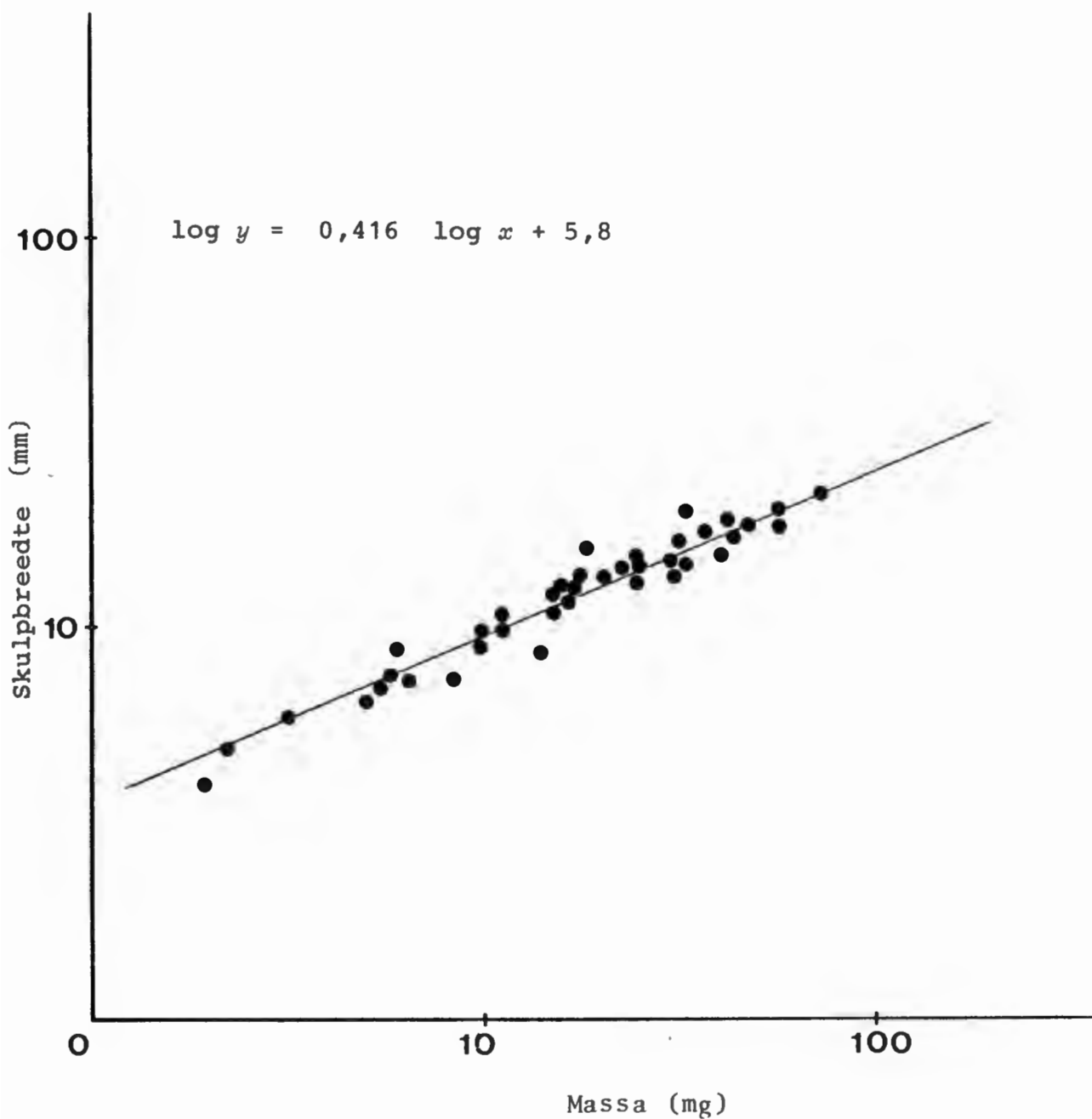
’n eksemplaar van B.glabrata dus baie noukeurig vasgestel word deur die skulpbreedte te meet. Een voordeel hiervan is dat die slak nie hiervoor doodgemaak hoef te word nie.

3.2 DIE BEPALING VAN DIE SUURSTOFVOORKEUR VAN B.GLABRATA

Die hoeveelheid opgeloste suurstof vir beide keusekas en gradiëntkas is vir elke keusegebied eksperimenteel vasgestel met ’n suurstofelektrode (Model E 5046/0, Radiometer, Denemarke). Die waardes wat verkry is, het ooreengestem met dié soos verkry deur Gamble (1971). Geeneen van die slakke se lugborrels is uit hul mantelholtes verwyder (Van Aardt en Frey, 1979) voor die aanvang van die eksperiment nie.

3.2.1 DIE SUURSTOFGRADIËNTKAS

Gamble (1971) het suurstofvoorkeure intensief by twee soorte Amphipoda bestudeer. Hy het gevind dat die meeste Amphipoda ’n voorkeur vertoon het vir ’n hoë konsentrasie suurstof in die water. Van Hoven (1973) het bevind dat vier akwatiese Annelida-spesies ook ’n hoë konsentrasie opgeloste suurstof verkies. Jones (1964) het egter bevind dat eksemplare van Biomphalaria sudanica in moeraswater met ’n baie lae opgeloste suurstofkonsentrasie voorkom. Volgens Alberts (1966) kom die meeste varswaterpulmonate voor in water wat goed met suurstof belug is. Verder het Van Someren (1946) bevind dat Lymnaea caillaudi water, wat laer as 75% met suurstof versadig is, vermy. By suurstofkonsentrasies laer as 10% het hierdie slak gevrek.



Figuur 12. Die verband tussen B.glabrata se skulpbreedte en droë massa. In vergelyking stel y die skulpbreedte en x die liggaamsmassa van die slak voor.

Vir die onderhawige ondersoek is twee eksperimente uitgevoer. Vir die eerste eksperiment is daar gewerk met 'n dierekamer waarvan die watervlak nie die deksel bereik het nie. Die tweede eksperiment is gedoen met 'n dierekamer wat geheel en al met water gevul was.

3.2.1.1 Bepaling van die suurstofvoorkeur in 'n dierekamer wat 'n lagie lug bevat

In hierdie eksperiment is 'n dierekamer met 'n lagie lug gevul. Die slakke is dus toegelaat om met die lug in aanraking te kom. Vier slakke is op 'n keer gebruik. Direk voor die aanvang van die eksperiment is die slakke uit goed geoksigeneerde akwariums gehaal. Die slakke is dan met 'n swart merkpen gemerk. Vier slakke is gelyktydig in keusegebied vyf geplaas. Die keusekamer is dan lugdig verseël om kontak met atmosferiese lug uit te skakel. Die posisie van elke slak word daarna elke 60 sekondes genoteer.

Die eksperiment is herhaal totdat tien slakke bruikbare lesings verskaf het. Slakke wat vir 'n tydperk onaktief op een plek stilgesit het, is nie in aanmerking geneem vir die finale resultate nie. Die watertemperatuur is konstant op 20°C gehou. Uit die resultate in figuur 13 - 15 kan gesien word dat B.glabarata geen voorkeur vir hoë suurstofkonsentrasiegebiede vertoon nie. Die slakke het egter langer vertoef by die kante van die dierekamer en ook in die gebied waar hulle ingeplaas is, naamlik keusegebied vyf. Dié resultate is ook verkry wanneer die posisie van die slakke, na elke halfuur genoteer is. Hieruit is bevind dat die slakke, veral in die eer-

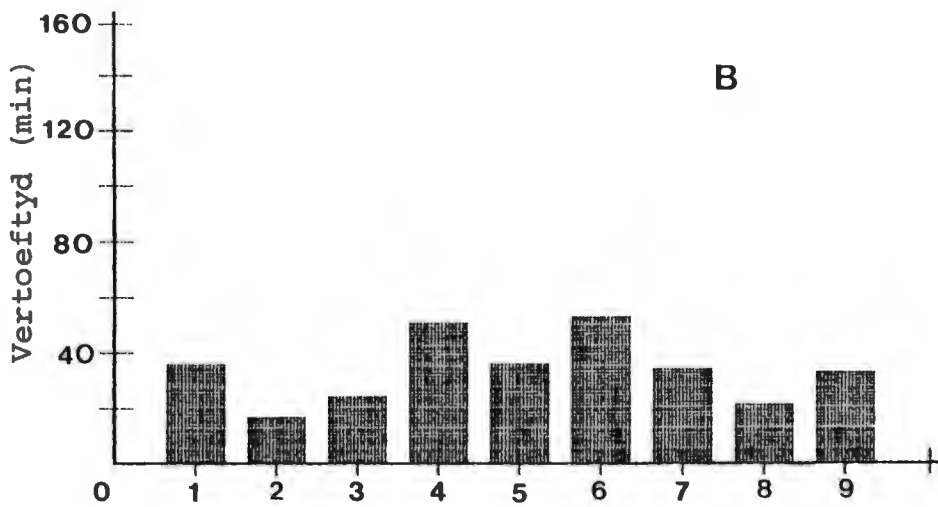
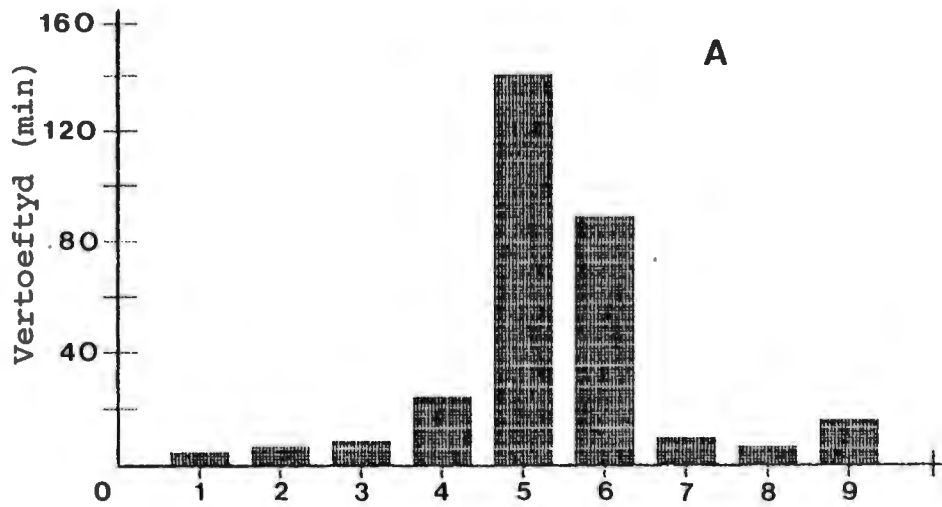
ste halfuur, besluiteloos by keusegebied vyf vertoef het (Figuur 13 A). Gedurende die ander halfuurvertoefte hulle geen voorkeur vir 'n bepaalde suurstofkonsentrasie in die gradiënt vertoon nie (Figuur 13B, C en D).

3.2.1.2 Bepaling van die suurstofvoorkeur van B.glabrata in 'n totaal gevulde dierekamer

In hierdie eksperiment is die slakke nie toegelaat om met lug in aanraking te kom nie. Dit is bewerkstellig deur die dierekamer heeltemal vol te laat loop voordat die slakke in keusegebied vyf geplaas is. Die dierekamer is dan deur middel van die deksel waterdig afgesluit. Dieselfde prosedure as in die geval waar die dierekamer 'n lagie lug bo-op die water bevat het, is gevolg. Die totale vertoef tyd in elke keusegebied word aangedui in figuur 16. Die vertoefte, opgedeel in halfuurintervalle vir elke keusegebied, word in figuur 17 en 18 aangedui. Die resultate dui 'n ewekansige verspreiding van die tien slakke vir die nege keusegebiede aan, alhoewel hulle langer by keusegebiede 1 en 9 vertoef het. 'n Interessante verskynsel wat tydens die eksperiment waargeneem is, was die feit dat al tien slakke na inplasing in die dierekamer by keusegebied vyf eers in die rigting van keusegebiede met hoër suurstofkonsentrasies begin beweeg het voordat hulle omgedraai het.

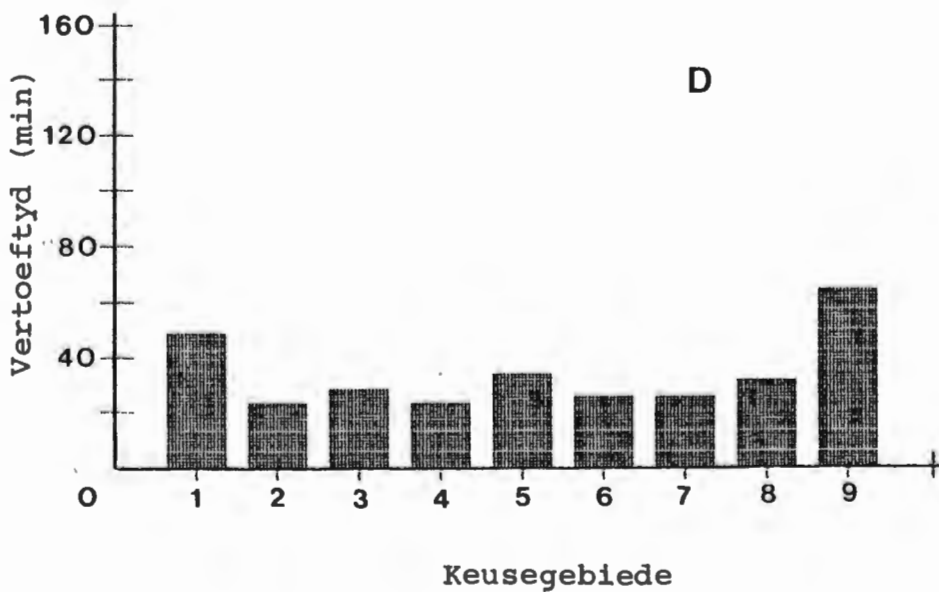
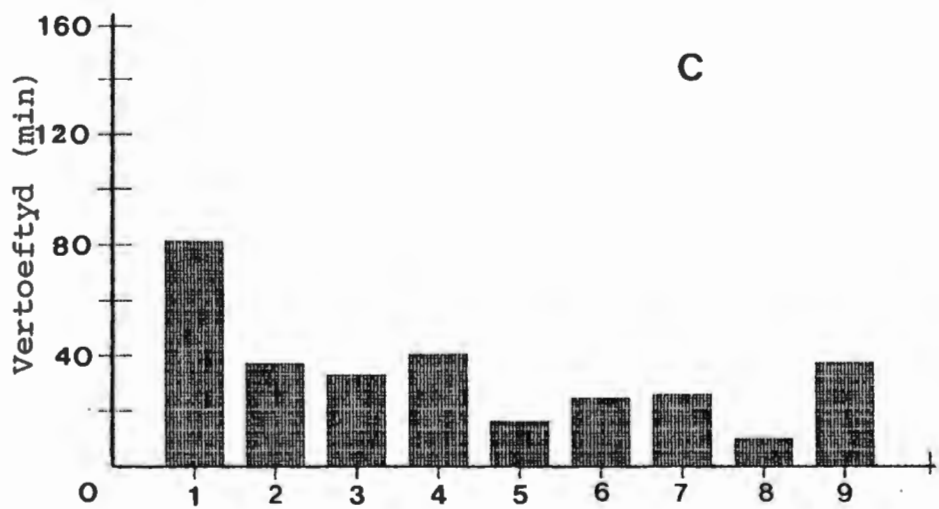
3.2.2 DIE SUURSTOFKEUSEKAS

Dieselfde metode en prosedure wat gevolg is by die gradiëntkas, is ook by die keusekas gevolg.

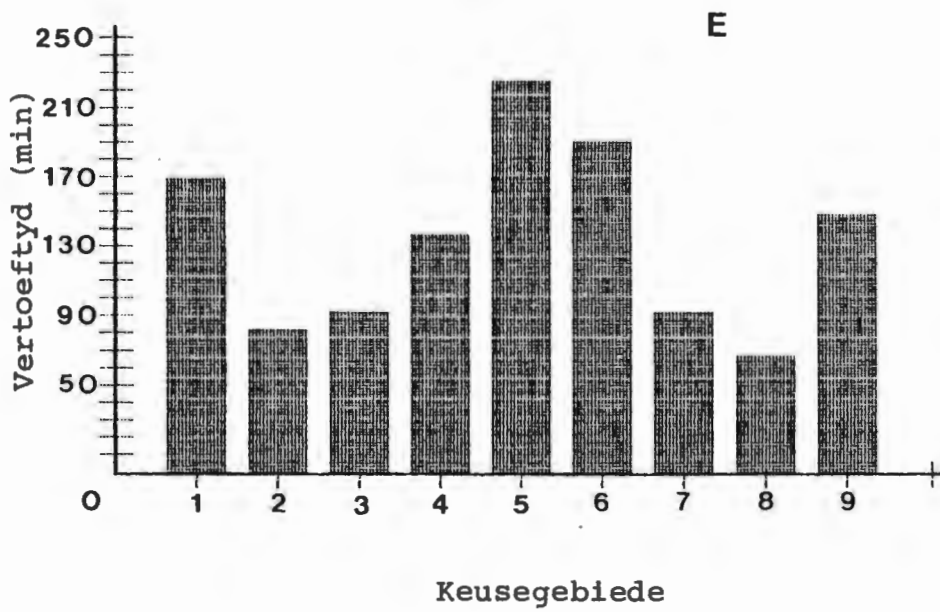


Keusegebiede

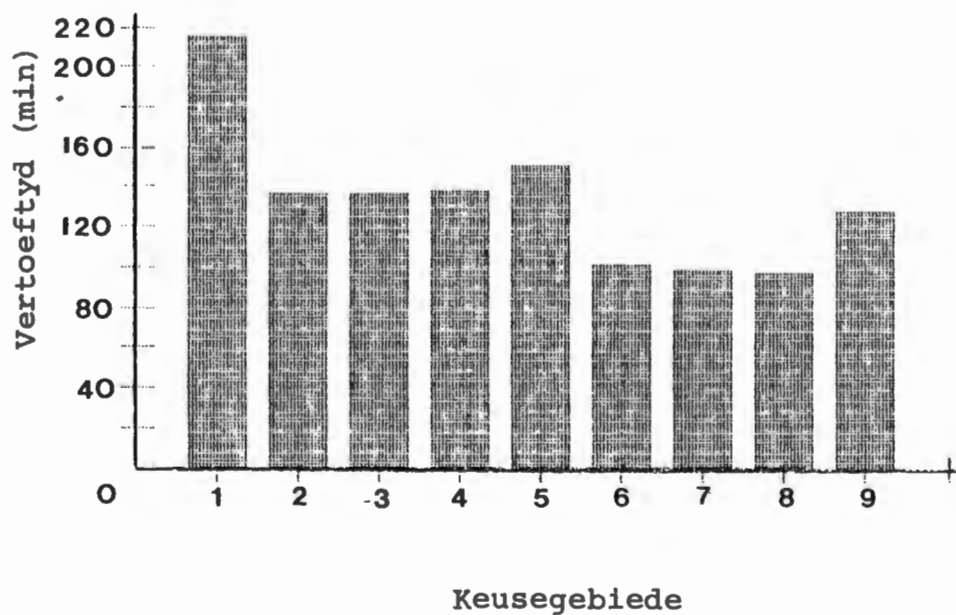
Figuur 13. Die suurstofgradiëntkas. Suurstofvoorkeur van *B.glabrata* by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug gevul. A: eerste halfuurinterval; B: tweede halfuurinterval.



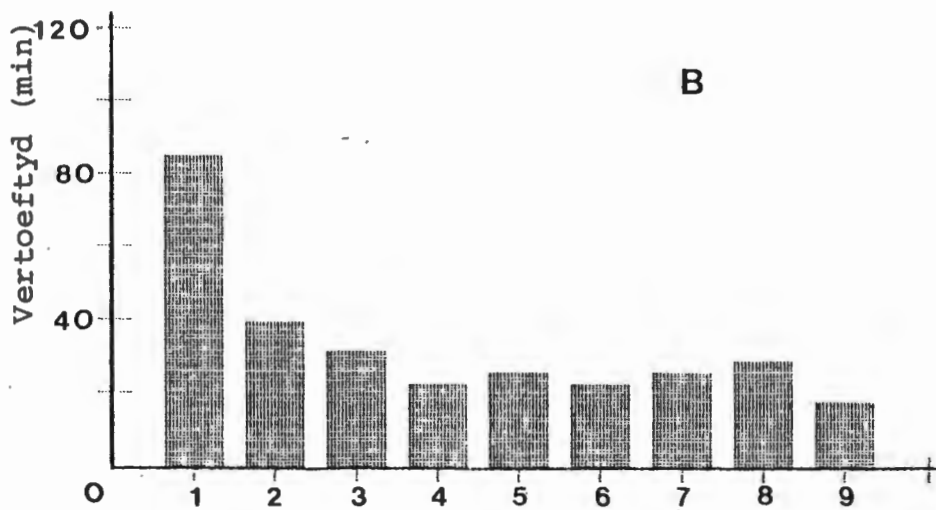
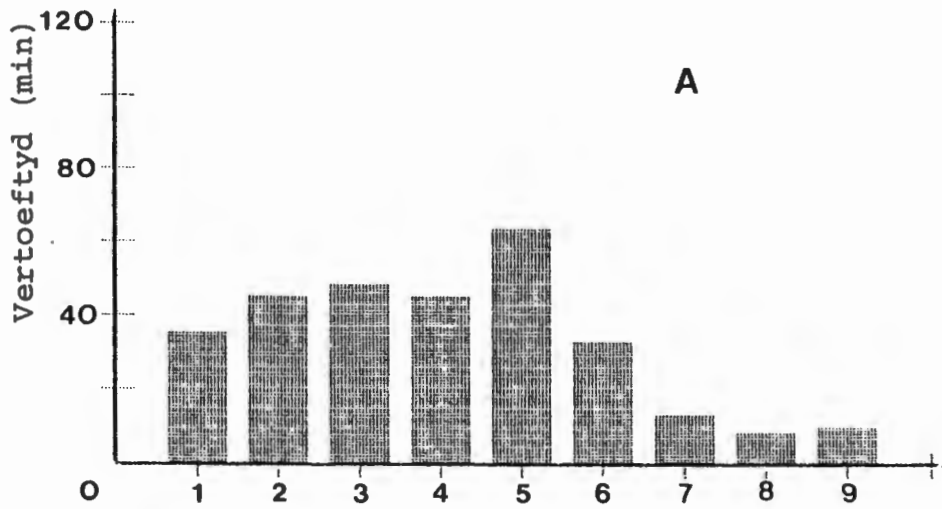
Figuur 14. Die suurstofgradiëntkas. Suurstofvoorkeur van *B.glabrata* by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug gevul. C: derde halfuurinterval; D: vierde halfuurinterval.



Figuur 15. Die suurstofgradiëntkas. Die suurstofvoorkeur van B.glabrata by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug gevul. E: vertoeftyd tydens 'n totale tyd van 2 uur.

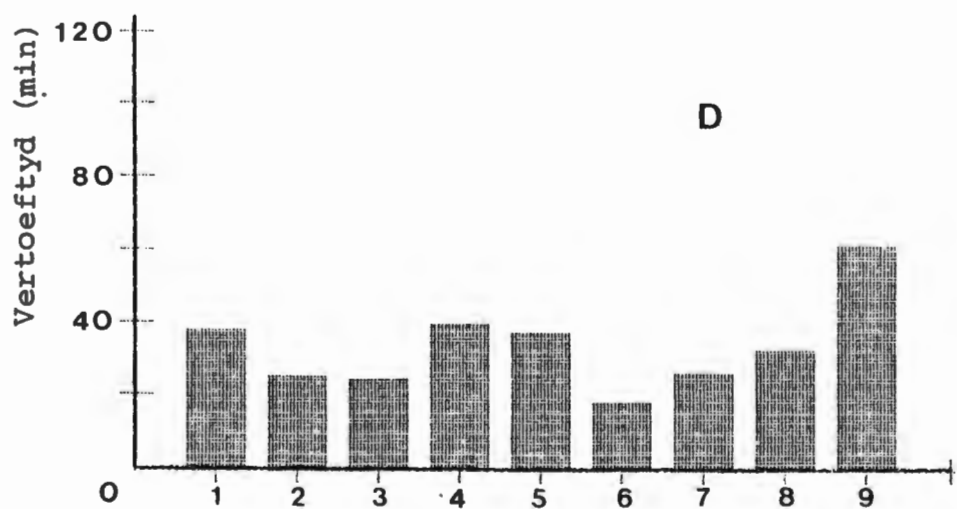
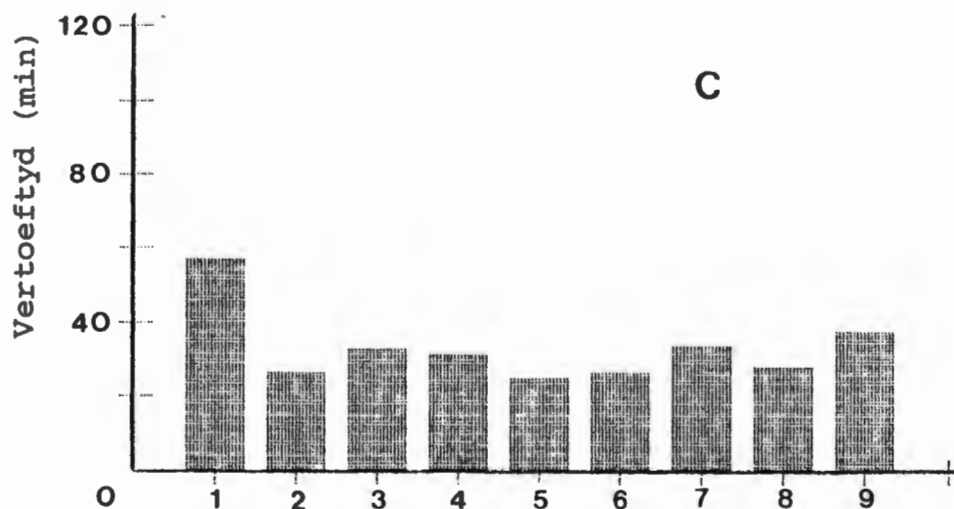


Figuur 16. Die gradiëntkas. Die suurstofvoorkeur van B.glabrata by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer, vir die volle duur van twee ure.



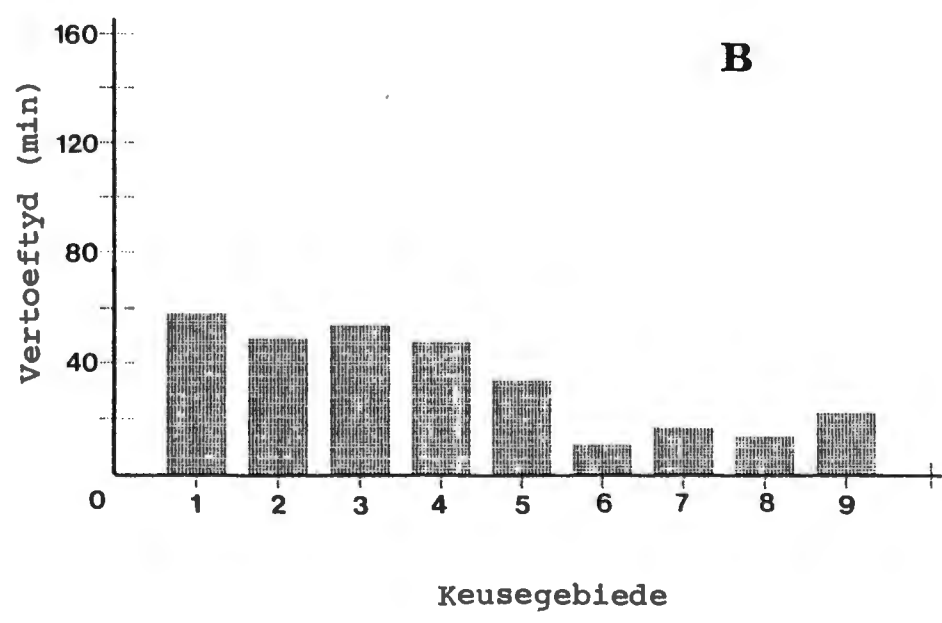
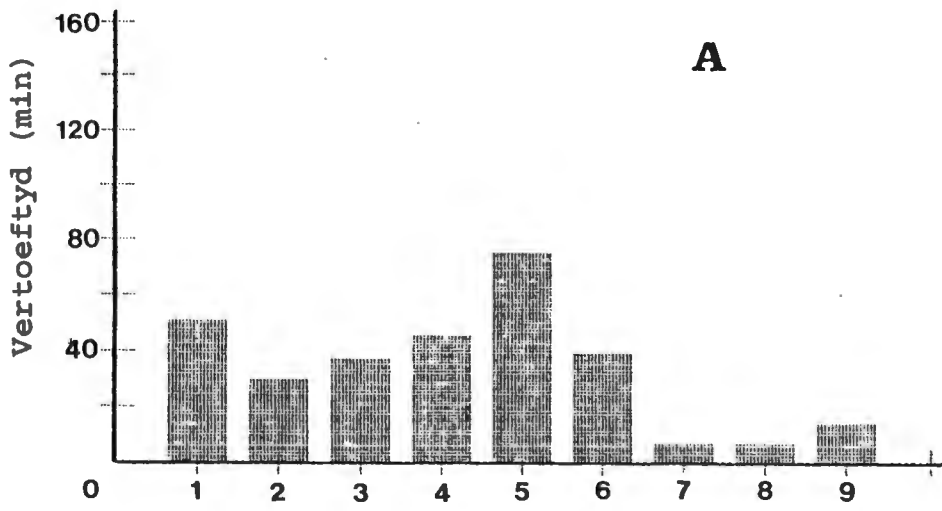
Keusegebiede

Figuur 17. Die suurstofgradiëntkas. Die suurstofvoorkeur van *B. glabrata* by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer. (A): eerste halfuurinterval; (B): tweede halfuurinterval.

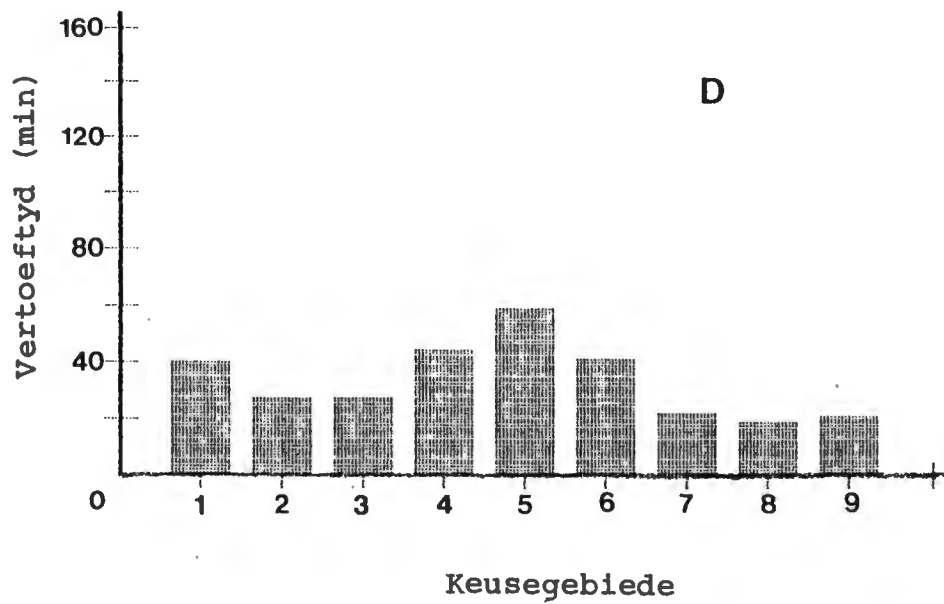
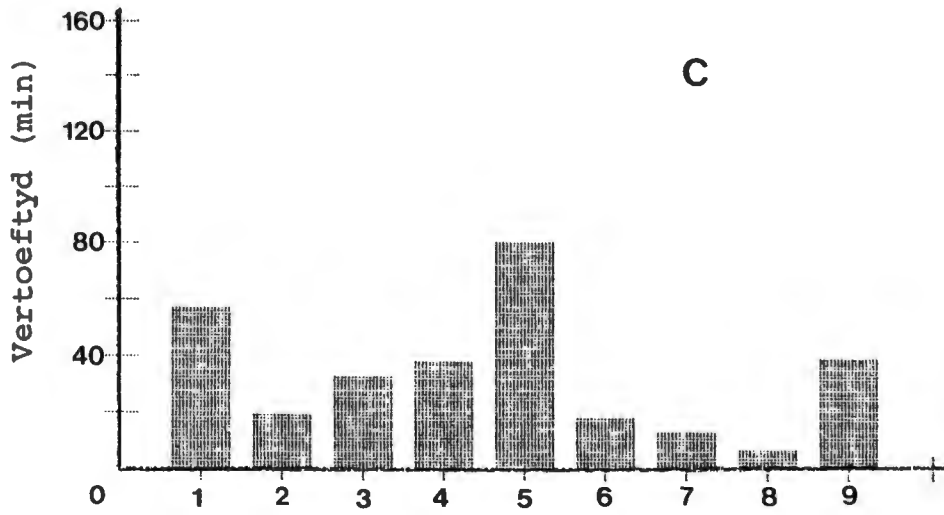


Keusegebiede

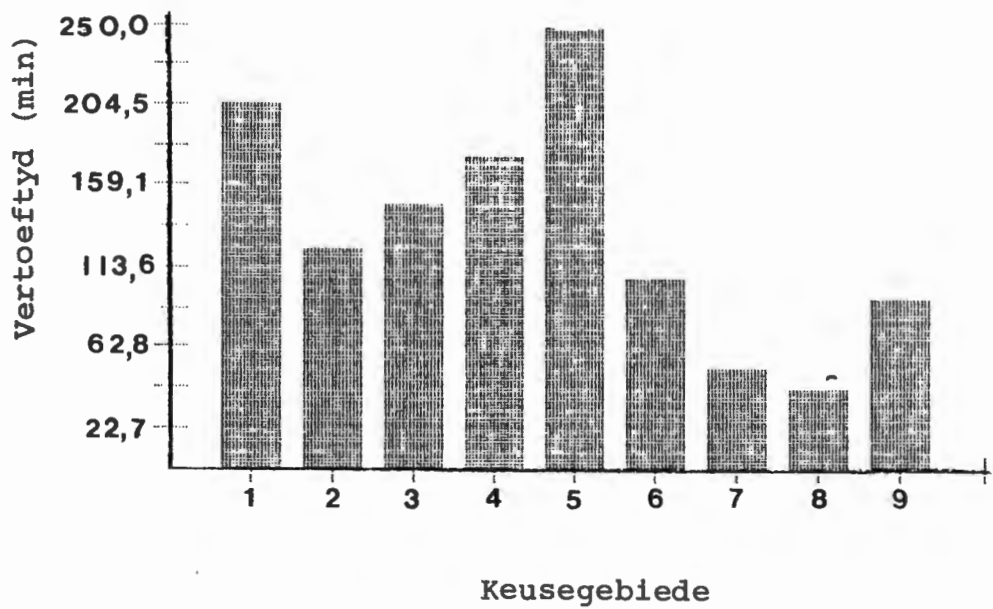
Figuur 18. Die suurstofgradiëntkas. Die suurstofvoerkeur van *B. glabrata* by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer. (C): derde halfuurinterval; (D): vierde halfuurinterval.



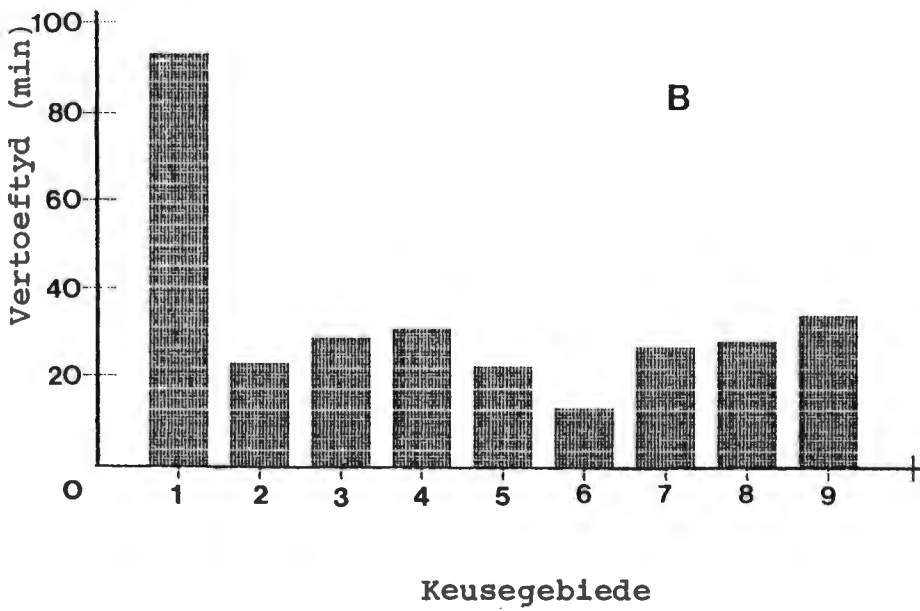
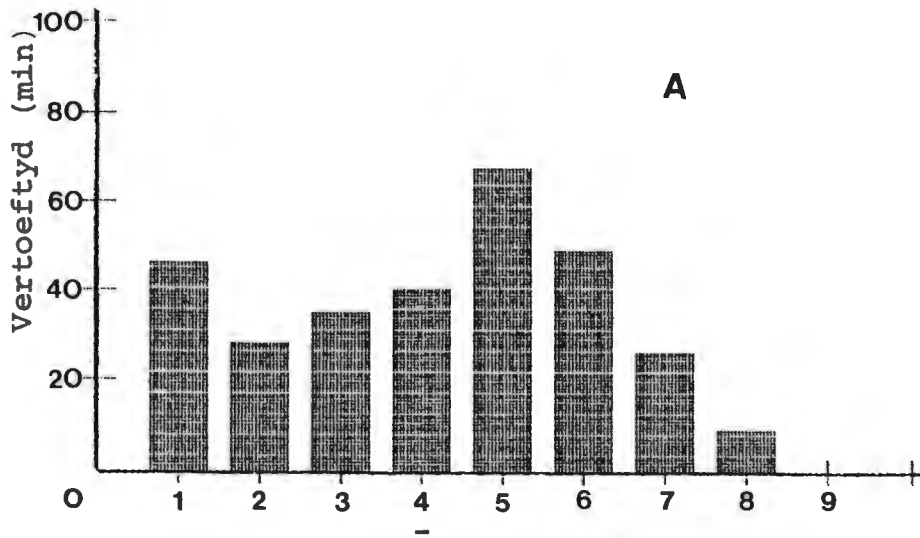
Figuur 19. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeur van *B.glabrata* by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug. (A): eerste halfuurinterval; (B): tweede halfuurinterval.



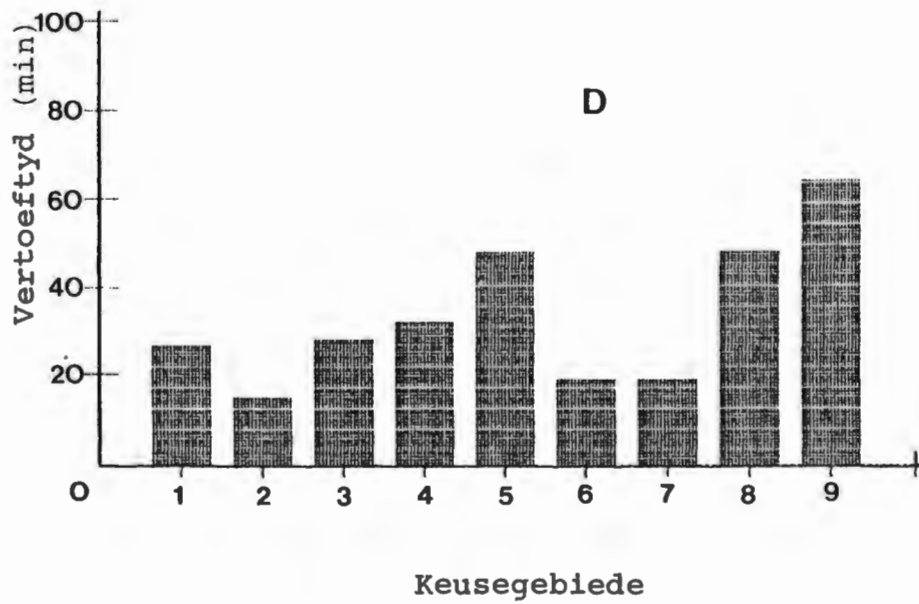
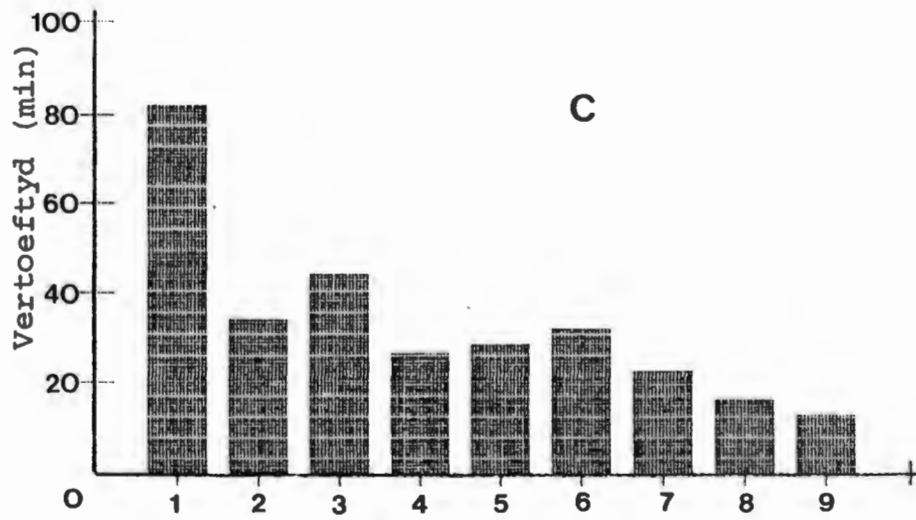
Figuur 20. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeur van *B. glabrata* by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug. (C): derde halfuurinterval. (D): vierde halfuurinterval.



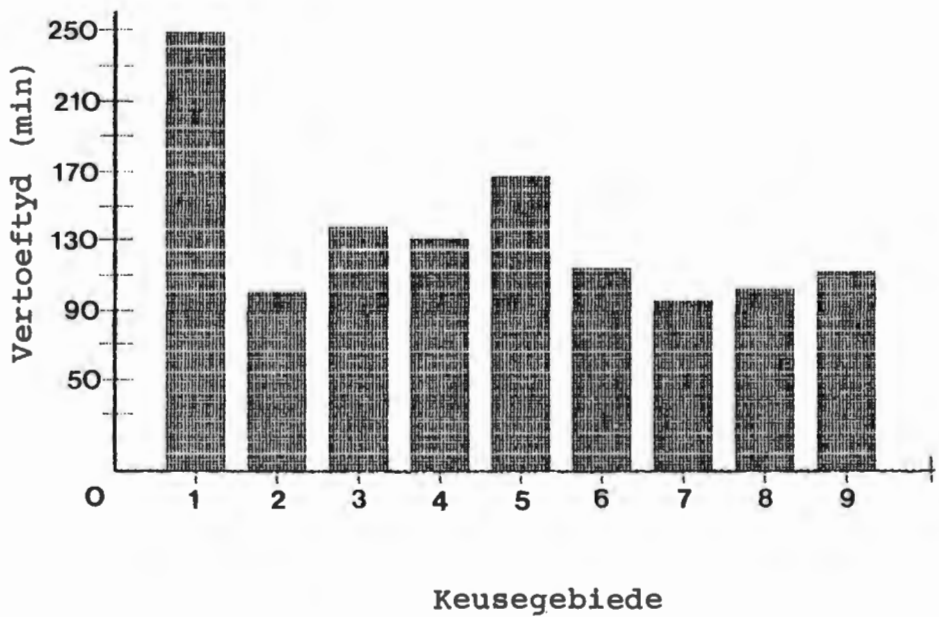
Figuur 21. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeur van B.glabrata by 20°C in 'n dierekamer met 'n lagie lug vir 'n twee uur tydperk.



Figuur 22. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeur van *B.glabrata* by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer. (A): eerste halfuurinterval; (B): tweede halfuurinterval.



Figuur 23. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeure van *B.glabrata* by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer. (C): derde halfuurinterval; (D): vierde halfuurinterval.



Figuur 24. Die suurstofkeusekas. Die suurstofvoorkeur van B.glabrata by 20°C in 'n totaal gevulde dierekamer vir die volle duur van twee ure.

3.2.2.1 Die gebruik van 'n dierekamer met 'n lagie lug

Die resultate (Figuur 19 - 21) wat verkry is, dui so 'n verspreiding aan waar die slakke weer eens die meeste tyd vertoef het by die keusegebiede 1 en 9 en in die middel van die dierekamer.

3.2.2.2 Die gebruik van 'n totaal gevulde dierekamer

Die resultate (Figuur 22 - 24) stem ooreen met die wat verkry is tydens die gebruik van 'n dierekamer met 'n lagie lug. Die resultate toon dat daar geen duidelike voorkeur vir 'n spesifieke suurstofkonsentrasie in die water vir B.glabrata bestaan nie.

3.2.3 BESPREKING

Al die slakke het met die aanvang van die eksperimente lug in hulle mantelholtes gehad. Jones (1964) het by B.sucanica bevind dat die lugborrel vir hoogstens 60 sekondes voldoende suurstof aan die weefsels kan verskaf voordat dit uitgeput raak. Van Aardt en Frey (1979) het ook bevind dat die mantelholtegas by Bulinus physopsis wel 'n respirasiefunksie besit. Volgens hierdie outeurs sal B.(P).globosus daarop staatmaak by laer suurstofspannings in die water. Die feit dat die suurstof in die mantelholte na+ 60 sekondes by B.sudanica opgebruik is (Jones, 1964), bring mee dat die slak dan slegs van huidrespirasie gebruik moet maak. Volgens Alberts (1966) is die huidrespirasie by L.natalensis, B.(P).globosus en B.tropicus baie effektief, maar nogtans beweeg eksemplare van hierdie drie

slakspesies na gebiede van hoër partiële suurstofspanning in die waterhouer.

Die resultate verkry waar B.glabrata toegelaat is in die keuse- en gradiëntkas om met atmosferiese lug in aanraking te kom, kan soos volg verklaar word. Die mantelholtegas word hernuwe in die luglagie van die dierekamer. Omdat hierdie lug nie 'n suurstofgradiënt het nie en as normale lug beskou kan word, sal die slak, nadat dit in sy mantelholte opgeneem is, nie 'n keuse hoef te maak ten opsigte van die suurstofgradiënt in die water nie. Die slak verloor egter nie die respirasiefunksie van sy mantelholte nie en het dus nie nodig om na die hoë suurstofspannings in die water van die dierekamer te beweeg nie. Op grond van die werk wat gedoen is op B.(P).globosus (Van Aardt en Frey, 1979), is verwag dat die slakke wat nie toegelaat is om hul mantelholte se lugborrel tydens die suurstofgradiënt- en keuse eksperimente te hernuwe nie, 'n voorkeur ten opsigte van die hoër suurstofspanning in die keusegebiede sou vertoon. Uit die resultate rakende B.glabrata is dit egter duidelik dat daar geen bepaalde suurstofvoorkeur by die slakke gevind is nie. Daar is ook nie 'n verskil gevind tussen die resultate van die gradiëntkas en die van die keusekas nie.

Die langer vertoeftye in keusegebied 1 en 9 van die dierekamer kan verklaar word, op grond van die slak se skulporiëntering en bou. In die hoeke van die dierekamer wat gevorm is tussen die kort sy en die lang sy (Figuur 3 en 4), en tussen die kort sy en die deksel asook die kort sy en die vloer van die dierekamer, het dit die slakke langer geneem om om te draai.

Hierdie tydsverlies kan moontlik toegeskryf word aan die obstruksies wat die hoeke lewer vir die ronde skulp en die wankelrige voethegting met die res van die sagte liggaam. Daarom is hulle totale vertoef tyd in keusegebied 1 en 9 baie langer (Figuur 13 - 24). Die langer vertoef tyde by keusegebied vyf is weer te wyte aan die feit dat die slakke ooreen mekaar beweeg het nadat hulle aanvanklik in hierdie keusegebied geplaas is. Ook in hierdie geval het hul skulporiëntering en bou hulle bewegings vertraag en 'n langer vertoef tyd is verkry.

Indien B.glabrata tydens hierdie eksperimente van anaerobiese asemhaling gebruik gemaak het, sou dit ook 'n goeie verklaring vir die verkreeë resultate kon wees. Wijsman, van der Lugt en Hoogland (1985) het bevind dat L.stagnalis alreeds na een uur in anoksia anaerobies respireer. Wolmarans (in druk) het bevind dat B.glabrata 'n fakultatief anaerobiese dier is sodra dit in water geplaas word wat geen suurstof bevat nie.

B.glabrata het waarskynlik alreeds na een uur as gevolg van 'n fisiologiese spanning wat in die dierekamer ondervind is weens die lae suurstofkonsentrasie in keusegebiede 1 - 4, begin om anaerobies te respireer. Hierdie anaerobiese omskakeling kan B.glabrata se ewekansige verspreiding verklaar in die keusegebiede van sowel die keuse- as gradiëntkas.

Volgens Figueiredo et al. (1973) besit die eritrokruorien van B.glabrata 'n P_{50} -waarde van minder as 10 mmHg. Die moontlikheid dat B.glabrata 'n tipe eritrokruorien besit met 'n baie hoë suurstofaffiniteit, sal tot gevolg hê dat die slak wat sy keuse tussen hoë en lae suurstofkonsentrasies in die water

betref, nie geaffekteer sal word nie. Dit word in die volgende hoofstuk breedvoerig ondersoek.

3.3 DIE VERMINDERING IN DIE VORMING VAN METEITROKRUORIEN IN DIE MONSTER DEUR DIE GEBRUIK VAN VERSKILLENDE BUFFERS

Die twaalf buffers en hul buffersamestellings wat in die eksperiment by 25°C getoets is, is die volgende:

1. 0,5 M TRIS
 0,1 M NaCl
 1,0 mM EDTA

2. 0,1 M Natriumfosfaat
 0,4 M NaCl

3. 50,0 mM TRIS
 0,1 M NaCl
 1,0 mM EDTA

4. 0,1 M TRIS
 0,01 M MgCl₂
 0,1 M NaCl

5. 1,0 M TRIS
 1,0 mM EDTA
 0,1 M NaCl
 0,5 mM PMSF (fenielmetielsulfonielfluoried)
 1,0 mM Dithioeritritol

6. 1,0 mM MgCl₂
10,0 mM CaCl₂
50,0 mM TRIS
0,1 M NaCl

7. 0,1 M Kaliumfosfaat
0,5 mM EDTA
0,5 mM PMSF

8. 50,0 mM TES
1,0 mM EDTA
0,1 M NaCl
0,5 mM PMSF
1,0 mM Dithioeritritol

9. 0,1 M Kaliumfosfaat
0,1 mM EDTA

10. 0,1 M Ammoniumasetaat
0,1 M CaCl₂
1,0 mM PMSF

11. 50,0 mM TRIS
0,1 M MgCl₂
0,5 mM PMSF
1,0 mM Dithioeritritol

12. 0,05 M TRIS
0,2 M KCL
1,0 mM EDTA

Hierdie buffers is gebruik om die eritrokruorien te isoleer soos bespreek onder 2.4. Meteritrokruorienvorming is getoets met behulp van die Gill-sel en die spektrofotometer.

Om die stabiliteit en dus die meteritrokruorienvorming in die monster te toets, is dit vir 16 minute by 'n golflengte van 412 nm gehou. Die % absorpsieafname by kolom A (Tabel 1) is slegs by 412 nm geregistreer na 'n periode van 16 minute blootstelling van die monster aan lug. Die % absorpsieafname by kolomme B en C (Tabel 1 en Tabelle 2 en 3) is gedoen na die volgende behandeling van die monster: Die monster is eers vir 16 minute geoksigeneer waarna die absorpsie dadelik geneem is by 540 nm, sowel as vir die Soret gebied by 412 nm. Na deoksigenering vir 30 minute is die monster weer geoksigeneer en die absorpsie weer by 540 nm en 412 nm gemeet.

Die resultate in Tabel 4 A en B is verkry na 'n periode van blootstelling van die monster van 30 minute tot drie ure. Dit is die tyd wat nodig is vir die maak van 'n volledige suurstofdissosiasiekromme.

Die resultate van Tabel 1 dui aan dat 'n gemiddelde % absorpsieafname van 4,1% (Kolom B) en 5,3% (Kolom C) verkry word. As die monster met 'n Millipore-filter (0,45 μm) gesuiwer word (Tabel 2), word 'n groter % absorpsieafname as by Tabel 1 in kolom A, B en C gevind. Slegs buffer nommer 11 (Tabel 2) het die monster vir meteritrokruorienvorming gestabiliseer sodat byna geen absorpsieafname by 412 nm plaasvind nie. Hierdie buffer is later deurgaans gebruik vir alle SDK-metinge.

Tabel 1. Die effek van die verskillende buffers op die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes vir 'n periode van 16 minute.

Buffer-nommer	% absorpsieafname		
	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
1	2,0	-	-
3	0,0	-	-
12	1,0	-	-
5	2,0	3,4	6,0
6	3,0	5,8	6,0
11	1,8	3,0	4,0
$\bar{x} \pm SA$	1,6 \pm 1,0	4,1 \pm 1,5	5,3 \pm 1,1

Tabel 2. Die gebruik van 'n Millipore-filter vir die skoonmaakproses in kombinasie met verskillende buffers om die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes te bepaal vir 'n periode van 30 minute.

Buffer nommer	% absorpsieafname		
	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
1	6,0	8,2	5,3
3	2,0	3,4	5,2
12	2,0	3,5	5,2
5	1,0	7,8	5,0
6	2,0	6,2	-
11	0,0	0,2	0,1
7	1,2	2,3	3,4
8	1,6	5,2	6,7
2	0,4	5,0	4,8
9	2,2	7,7	11,5
10	4,0	10,0	5,8
$\bar{x} \pm SA$	2,0 \pm 1,7	5,4 \pm 2,9	5,3 \pm 2,8

Tabel 3. Die gebruik van 'n Millipore-filter en dialise as skoonmaaktegniek in kombinasie met verskillende buffers om die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes te bepaal na 'n periode van 30 minute.

Buffer nommer	% absorpsieafname		
	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
3	1,9	3,0	2,8
12	2,0	2,8	4,1
5	4,4	3,0	4,8
11	3,2	5,4	6,0
7	1,9	2,2	3,0
8	3,0	3,3	5,7
2	3,2	5,0	7,0
10	7,0	7,8	5,8
$\bar{x} \pm SA$	3,3 \pm 1,7	4,1 \pm 1,9	4,9 \pm 1,5

Tabel 4A. Die gebruik van die vriesinkubasietegniek en die afswaaitegniek by 50G om die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes te bepaal.

Buffer nommer	% absorpsieafname		
	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
11	0,2	2,0	3,1
11	1,2	2,2	4,0
11	0,4	1,4	3,9
11	0,4	2,2	1,9
11	2,6	2,5	6,0
$\bar{x} \pm SA$	1,0 \pm 1,0	2,1 \pm 0,4	3,8 \pm 1,5

Tabel 4B. Die gebruik van die verkoelde inkubasietegniek en die afswaaitegniek by 50G om die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes te bepaal.

% absorpsieafname			
Buffer nommer	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
11	0,0	1,1	2,1
11	1,6	4,0	5,9
11	0,8	1,2	2,2
\bar{X}	0,8	2,1	3,4

Tabel 4C. Die gebruik van die afswaaitegniek by 50G om die persentasie absorpsieafname by bepaalde golflengtes te bepaal.

% absorpsieafname			
Buffer nommer	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
11	2,0	1,2	3,9
11	0,8	2,2	6,1
\bar{X}	1,4	1,7	5,0

Tabel 4D. Die gebruik van Sephadex-G75, tesame met die afswaai-
 tegniek by 50G en die verkoelde inkubasietegniek om
 die persentasie, absorbansieafname by bepaalde golf-
 lengtes te bepaal.

Buffer nommer	% absorbansieafname		
	A 412 nm	B 540 nm	C 412 nm
11	0,1	1,8	2,1
11	0,8	2,0	2,5
11	0,2	1,2	2,3
\bar{X}	0,4	1,7	2,3

Die tweede beste buffer was nommer 2. Die gebruik van dialise en 'n Millipore-filter om meteritrokruorien te onderdruk was minder suksesvol (Tabel 3). Die gemiddelde persentasie absorpsieafname het vermeerder na 3,3% in kolom A (Tabel 3) terwyl kolom B en C se gemiddelde persentasie absorpsieafname ooreenstem met die waardes wat verkry is vir Tabel 1 en 2. Nadat die monster gedialiseer is, kon selfs nie buffer nommer 11 en 2 dit stabiliseer ten opsigte van metvorming nie (Tabel 3). Die gebruik van die skoonmaaktegniek waar die eritrokruorienmonster vir 15 minute by 50 G afgeswaai word vir die verwydering van die hemosiëte, is ook met buffer nommer 11 getoets. Dit het die volgende resultate opgelewer: Die gemiddelde persentasie absorpsieafname by 412 nm na 16 minute was 1,4%. Na die voltooiing van 'n SDK, drie uur later, was die gemiddelde persentasie absorpsieafname by 540 nm 1,7% en by 412 nm 5,0%. Hierdie resultate is beter as alle vorige resultate omdat die hemosiëte uit die monster verwyder is (Tabel 4C).

Die volgende eritrokruorienstabiliseringstegniek wat getoets is, het bestaan uit 'n vriesinkubasie van twee uur of 'n verkoelde inkubasie van 24 uur by 4°C (Tomita et al., 1968) (Tabel 4A en B). Na ontvriësing en toetsing het die monsters 'n gemiddelde persentasie absorpsieafname van 1,0% by kolom A vertoon terwyl die B- en C-kolomme waardes van 2,1 en 3,8% getoon het (Tabel 4A). Die verkoelde inkubasietegniek se persentasie absorpsieafname was 0,8% in kolom A, terwyl kolom B 'n waarde van 2,1% en kolom C 'n waarde van 3,4% vertoon het (Tabel 4B). Die verkoelde inkubasietegniek om die vorming van meteritrokruorien in die monsters te verhoed, is,

Tabel 5. Die persentasie meteritrokrorien wat gevorm is gedurende die verloop van 'n eksperiment by twee tipes inkubasietoestande van die pigment.

Inkubasietoestand	% meteritrokrorien	
	voor eksperiment	na eksperiment
gevries	6,06	6,48
	6,54	7,03
	6,02	6,75
	6,86	7,28
	5,81	6,54
	6,39	6,91
$\bar{x} \pm SA$	6,28 \pm 0,4	6,83 \pm 0,3
verkoel(4°C)	6,86	7,28
	6,44	6,59
	6,29	6,75
	6,39	6,54
	5,07	5,65
	5,10	6,54
6,24	6,97	
$\bar{x} \pm SA$	6,06 \pm 0,7	6,62 \pm 0,5

volgens die resultate, die beste tegniek om die betrokke tipe oksidasie te beperk. In alle opvolgende eksperimente is hierdie tegniek toegepas.

Die persentasie meteritrokruorien wat in 'n monster van eritrokruorien gevorm is, is bepaal volgens die metode van Fushitani, Imai en Riggs (1986). Die ekstinksiekoëffisiënt van eritrokruorien by 540 nm is aanvaar as dieselfde as die van menshemoglobien, naamlik 14,6. Deur die toepassing van hierdie metode is vasgestel dat die persentasie meteritrokruorien voor en na die bepaling van 'n SDK respektiewelik $6,28 \pm 0,4$ en $6,83 \pm 0,3\%$ is met die gebruik van die vriesinkubasietegniek. Met die gebruik van die verkoelde inkubasietegniek was die persentasie meteritrokruorien voor en na die bepaling van 'n SDK respektiewelik $6,06 \pm 0,7$ en $6,62 \pm 0,5\%$ (Tabel 5).

3.3.1 BESPREKING

Volgens die resultate is dit duidelik dat daar nie slegs van 'n buffer gebruik gemaak kan word om die eritrokruorienmonster in die ferro-toestand te hou nie. Bykomende suiwerings- en stabiliseertegnieke is nodig. Die tegniek waar die hemosiete eers verwyder is deur sentrifugering en die monster daarna by 4°C geïnkubeer is, het die beste resultate gelewer (Tomita et al., 1968). Alhoewel die gebruik van 'n Millipore-filter redelike resultate gelewer het, is 'n groot afname in die absorpsiepieke na die eksperiment verkry. Dit dui op 'n groot hoeveelheid meteritrokruorienvorming gedurende die drie uur wat die eksperiment geduur het. Slegs buffer nommer 11, het

na die gebruik van 'n Millipore-filter vir die suiwing van die eritrokuorienmonster, metvorming gedurende die eksperiment beperk. Dit word afgelei uit die lae persentasie afname in die absorpsiepieke na die voltooiing van die eksperiment.

Die metode van Tomita et al. (1968) is die enigste proses wat 'n konstante stabiele monster verskaf. 'n Lae persentasie absorpsieafname word by 412 nm verkry en ook verminderde absorpsiewaardes by pieke 540 nm en 412 nm. Aangesien meteritrokuorien maklik gevorm word (Bonaventura en Bonaventura, 1981) deur die oordrag van elektrone van eritrokuorien na meteritrokuorien en dus 'n reduksieproduk vorm, moet daar by die slakhemolinf 'n reduktase-stelsel teenwoordig wees om die betrokke gesamentlike oksidasie-reduksie te verhoed. Deur die gebruik van die metode van Tomita et al. (1968) is meteritrokuorien dus oornag deur hierdie reduktase-stelsel tot ferro-eritrokuorien gereduseer. Slegs gedurende die verloop van die eksperiment, waar die eritrokuorienmonster by 25°C as 'n dun filmlaag in die Gill-sel geplaas is, het meteritrokuorienvorming plaasgevind. Die verwydering van die reduktase-stelsel uit die monster na 24 uur verkoelde inkubasie, deur konsentrering met die hulp van die "Airfuge", was noodsaaklik om twee redes. (1) Die belangrikste rede was dat die monster so ver moontlik gesuiver moes wees van stowwe wat die binding van suurstof met eritrokuorien beïnvloed. (2) Die ander rede was dat die eritrokuorienkonsentrasie te min was vir die maak van SEK. Nogtans is dit duidelik uit die resultate dat die aard van buffer nommer 11 'n belangrike bydrae gelewer het ten opsigte van die verminderde outo-oksidasie van die monster. Bonaventura en Bonaventura (1981) maak

spesiaal melding daarvan dat kalsium- en magnesiumione die oksidasieproses inhibeer.

Volgens Tabel 5 is die persentasie meteritrokruorien in die monster ongeveer 2% hoër as wat Fushitani et al. (1986) vir erdwurmeritrokruorien verkry het. Na die drie-uur SDK-eksperiment is bevind dat die meteritrokruorien tot 6,8% gestyg het, wat dan ooreenkom met die gegewens van Fushitani et al. (1986) nadat sy eksperiment voltooi is met erdwurm eritrokruorien.

3.4 SUURSTOFERITROKRUORIENEWIGSKROMMES (SEK) VAN B. GLABRATA

3.4.1 SEK VAN ERITROKRUORIEN SONDER SEPHADEX-SUIWERING

Figueiredo et al. (1973) het bevind dat die eritrokruorien van B. glabrata geen Bohr-effek vertoon tussen pH 6,71 en 7,61 nie. Verder het hulle bevind dat die maksimum n-waarde 1,08 was en dus baie min heem-heem interaksies toon. Nascimento et al. (1982) het bevind dat die hoogste suurstofaffiniteit van B. glabrata-eritrokruorien gevind word by pH 7,6 naamlik $n P_{50}$ van 3,6 mmHg (25°C). Verder het Nascimento et al. (1982) wel 'n Bohr-effek gevind tussen pH 6,8 tot 7,6 wat beïnvloed is ten opsigte van verskillende bufferkonsentrasies. 'n Klok-vormige grafiek is verkry as die Bohr-effek teen die log van die molariteit van die buffer grafies voorgestel word. Dit beteken dat lae en hoë bufferkonsentrasies die Bohr-effek verminder. Verder het hulle bevind dat die n-waarde afneem vanaf 'n maksimum van 1,7 by pH 7,6 tot 1,3 by pH 6,8. Fushitani

et al. (1986) wat met Imai (1981) se outomatiese oksigeneringsapparaat gewerk het, het bevind dat die bloed van L.terrestis 'n Bohr-effek van $-0,77$ vertoon by 'n pH van $7,4$. Verder het hulle bevind dat die n-waarde 'n maksimum van $7,9$ by 'n pH van $7,73$ vertoon. Hulle het ook bevind dat daar twee tot vier persent meteritrokruorien in die getoetste eritrokruorienmonster voorkom. Na die eksperiment het dit toegeneem na ses tot agt persent meteritrokruorien.

Die suurstofewewigskrommes is gekonstrueer by die verskillende temperature van 25° , 15° en by 7°C en by 'n pH van $7,51$, $7,57$ en $7,68$. Uit die resultate is bevind dat die gemiddelde n-waarde vanaf $1,34$ by 25°C na 'n waarde van $1,16$ by 7°C verlaag (Tabel 5, 9 en 10). In die onderhawige eksperiment het die gemiddelde P_{50} -waarde afgeneem vanaf $5,92$ mmHg na $1,11$ mmHg wanneer die temperatuur van die eritrokruorienmonster van 25°C na 7°C verlaag is. As die P_{50} -waardes teenoor die temperatuur uitgestip word, word 'n kromme verkry wat by lae temperature afplat, terwyl dit by hoë temperature 'n skerp styging vertoon (Figuur 27). As die gemiddelde n-maksimum-waarde teenoor die temperatuur uitgestip word, gee dit 'n liniêre verband met 'n helling van $0,130$ (Figuur 26). Toe die pH-waardes van die monsters van $7,10$ na $7,86$ verhoog is, deur middel van die byvoeging van NaOH en die monsters by 'n konstante temperatuur van 25°C gehou is, het die gemiddelde n-waardes vanaf $1,28$ by 'n pH van $7,10$ toegeneem tot 'n waarde van $1,46$ by pH $7,86$ (Tabel 6, 7, 8 en 9). In figuur 25 waar die gemiddelde n-waardes teen die pH-waardes uitgestip word, word 'n kromme verkry wat by die hoë pH-waardes 'n steiler helling vertoon. Daar moet altyd ingedagte gehou word dat 'n

Tabel 6. Die log P_{50} , P_{50} en n-waardes gemeet by 25°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur vier monsters voorgestel, is gemeet by 25°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,49	0,73	5,46	1,21
7,52	0,79	5,23	1,50
7,52	0,72	5,24	1,26
7,53	0,83	6,76	1,41
\bar{x} 7,51	0,77	5,92	1,34

Tabel 7. Die log P_{50} , P_{50} en n-waarde gemeet by 25°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur vier monsters voorgestel, is gemeet by 25°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,76	0,74	5,49	1,46
7,78	0,69	4,46	1,35
7,77	0,70	5,06	1,41
7,73	0,73	5,37	1,36
\bar{x} 7,76	0,71	5,09	1,39

Tabel 8. Die log P_{50} , P_{50} en n-waarde gemeet by 25°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur vier monsters voorgestel, is gemeet by 25°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,88	0,67	4,67	1,41
7,88	0,67	4,67	1,40
7,85	0,63	4,34	1,38
7,82	0,69	4,95	1,66
\bar{x} 7,86	0,67	4,65	1,46

Tabel 9. Die log P_{50} , P_{50} en n-waarde gemeet by 25°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur vier monsters voorgestel, is gemeet by 25°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,11	0,87	7,41	1,36
7,15	0,83	6,72	1,23
6,99	0,92	8,46	1,30
7,15	0,89	7,76	1,23
\bar{x} 7,10	0,87	7,58	1,28

Tabel 10. Die log P_{50} , P_{50} en n-waarde gemeet by 15°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur vier monsters voorgestel, is gemeet by 15°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,62	0,31	2,07	1,12
7,40	0,45	2,86	1,41
7,67	0,29	1,97	1,15
7,57	0,33	2,13	1,28
\bar{x} 7,57	0,34	2,23	1,24

Tabel 11. Die log P_{50} , P_{50} en n-waardes gemeet by 7°C. Elke pH-waarde van die eritrokruorienmonster, soos deur drie monsters voorgestel, is gemeet by 7°C vyf minute voordat met 'n SEK-meting begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,65	0,010	1,02	1,15
7,69	0,095	1,24	1,16
7,69	0,073	1,07	1,16
\bar{x} 7,68	0,059	1,11	1,16

dalende temperatuur by waterige oplossings die pH laat toeneem (Schmidt-Nielsen, 1983; Rahn, 1966). In hierdie geval het die gemiddelde pH-waardes van die monsters, weens die fisiese effek van dalende temperatuur, van 7,51 by 25°C na 7,68 by 7°C toegeneem. Met die verandering in pH-waardes in die monsters word 'n Bohr-effek van -0,25 (Figuur 28) deur die eritrokruorien van B.glabrata vertoon.

3.4.1.1 Bespreking van die resultate

Jones (1964) het bevind dat die eritrokruorien van B.sudanica by 26°C 'n n-waarde vertoon van 1,4 tot 1,5 en dat 'n duidelike Bohr-effek ook waargeneem word. Die P_{50} van B.sudanica is deur Jones (1964) vasgestel op 1,6 mmHg by 26°C wat verlaag het na 0,8 mmHg by 16°C.

In die onderhawige ondersoek op die eritrokruorien by B.glabrata is bevind dat die n-waarde by 25°C en pH van 7,51 laer was as die waardes gevind deur Jones (1964) wat op B.sudanica geëksperimenteer het. Figueiredo et al. (1973) wat met 'n temperatuur van tussen 23°C en 25°C by 'n pH van 7,0 gewerk het, het 'n n-waarde van 1,08 vir B.glabrata-bloed verkry, wat laer is as die waarde verkry in hierdie eksperimente, sonder suiwering van Sephadex-G75, wat by 25°C en ook by 'n pH van 7,10 uitgevoer is. Die hoogste n-waarde is egter, soos reeds vermeld, by 'n pH van 7,86 verkry, naamlik 1,46. Nascimento et al. (1982) het bevind dat die hoogste n-waarde by 'n pH van 7,6 (25°C) en 'n bufferkonsentrasie (NaPO_4) van 0,05 M, 1,7 is. Met 'n verhoging in die bufferkonsentrasie het Nascimento et al. (1982) bevind dat die n-waarde verander na 1,5.

Tabel 12. Die log P_{50} , P_{50} en n-waardes van eritrokruorien nadat dit deur 'n Sephadex-G75 kolom gestuur is. Meting is by 25°C gedoen en die pH is 5 minute voor die tyd gemeet.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,43	0,26	1,79	1,31
7,34	0,22	1,65	1,31
7,43	0,24	1,73	1,31
\bar{x} 7,40	0,24	1,73	1,31

Tabel 13. Die log P_{50} , P_{50} en n-waardes by 15°C van eritrokruorien nadat dit deur 'n Sephadex-G75 kolom gestuur is. Die pH van die monsters is gemeet by 15°C, vyf minute voordat met die meting van 'n SEK begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,57	-0,26	0,55	1,18
7,61	-0,22	0,59	1,20
7,60	-0,45	0,35	1,23
\bar{x} 7,59	-0,31	0,49	1,20

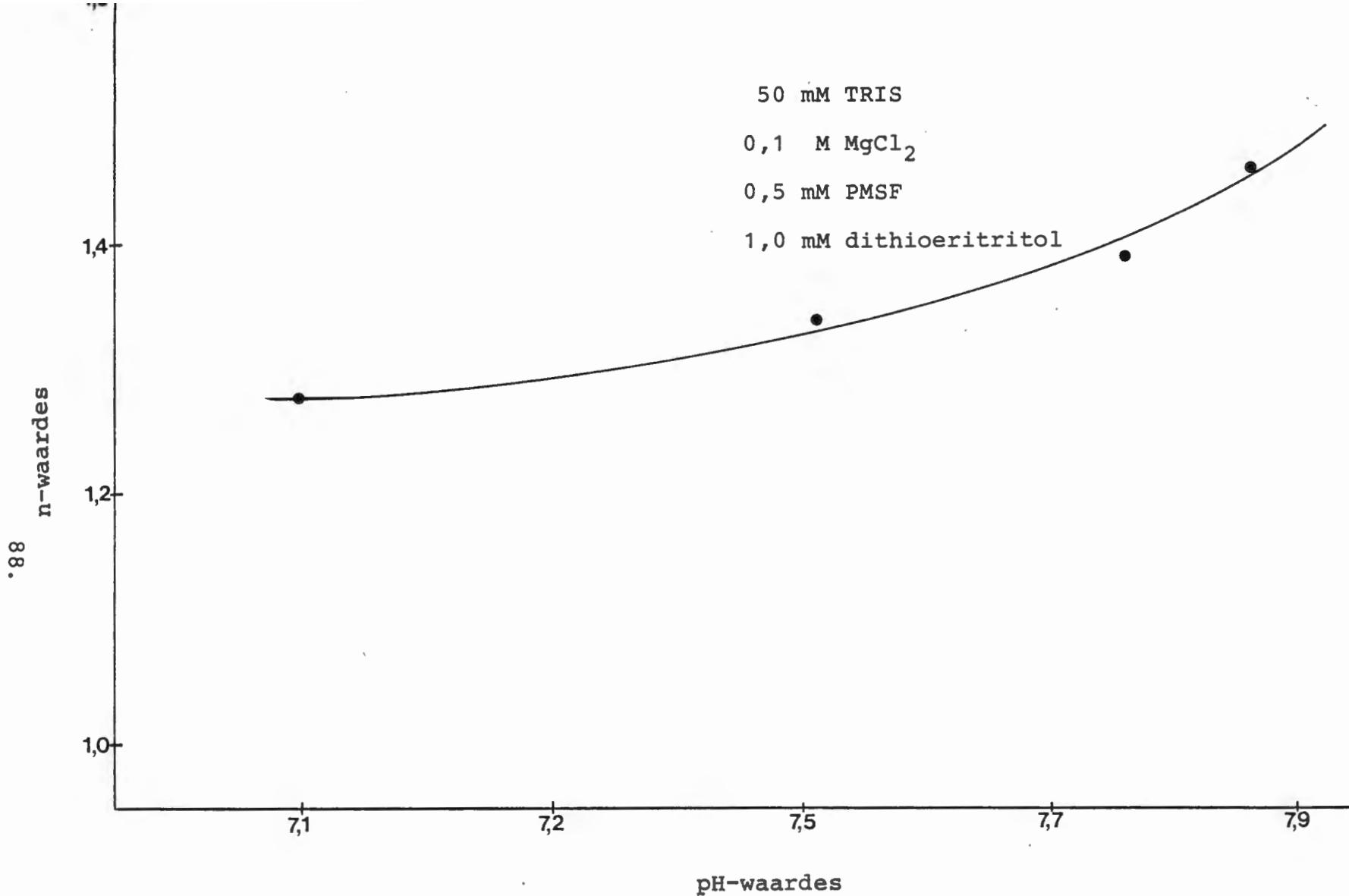
Tabel 14. Die log P_{50} , P_{50} en n-waardes by 7°C van eritrokruorien nadat dit deur 'n Sephadex-G75 kolom gestuur is. Die pH van die drie monsters is gemeet by 7°C, vyf minute voordat met die meting van 'n SEK begin is.

pH	log P_{50}	P_{50}	n-waarde
7,76	-0,60	0,25	0,95
7,76	-0,46	0,34	1,12
7,77	-0,44	0,36	1,17
\bar{x} 7,76	-0,50	0,32	1,08

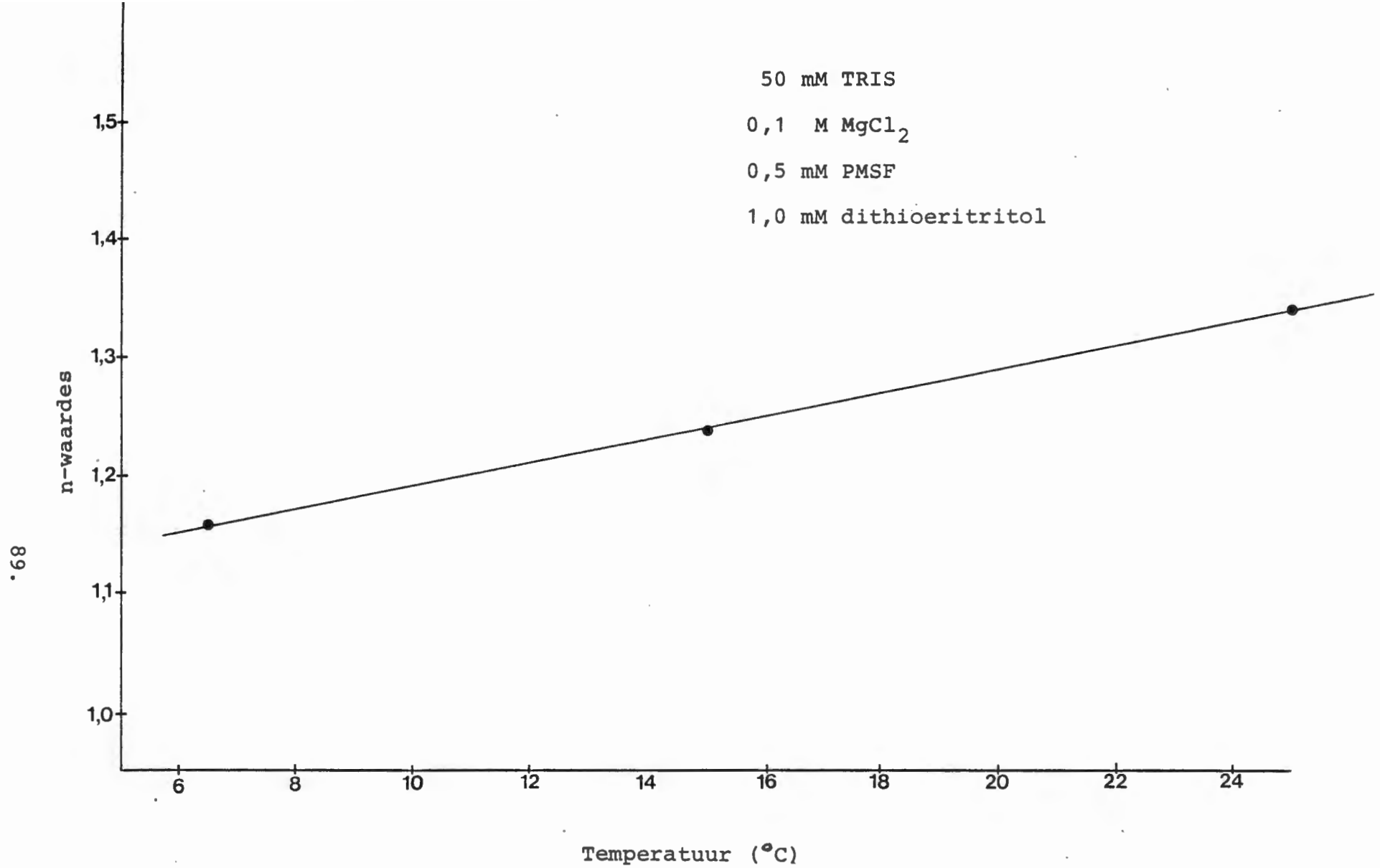
Tabel 15. Die absorpsiepieke by verskillende temperature van B.glabrata eritrokruorien wat met koolstofmonoksied of met suurstof verbind.

Temperatuur	Golflengte van die piek in Soret-gebied (nm)		Golflengte van pieke in die sigbare gebied (nm)			
			Alpha-piek		Beta-piek	
	Met CO	Sonder CO	Met CO	Sonder CO	Met CO	Sonder CO
25	415	412	572	573	540	539
	416	412	571	572	539	539
	414	412	571	572	537	537
15	415	412	573	572	538	537
	415	413	574	574	539	538
	415	413	573	572	538	537
7	413	412	572	573	537	537
	414	412	572	574	538	538
	412	411	574	574	537	537
\bar{x}	414 \pm 1,2	412 \pm 0,6	572 \pm 1,1	573 \pm 0,8	538 \pm 1,1	538 \pm 0,8

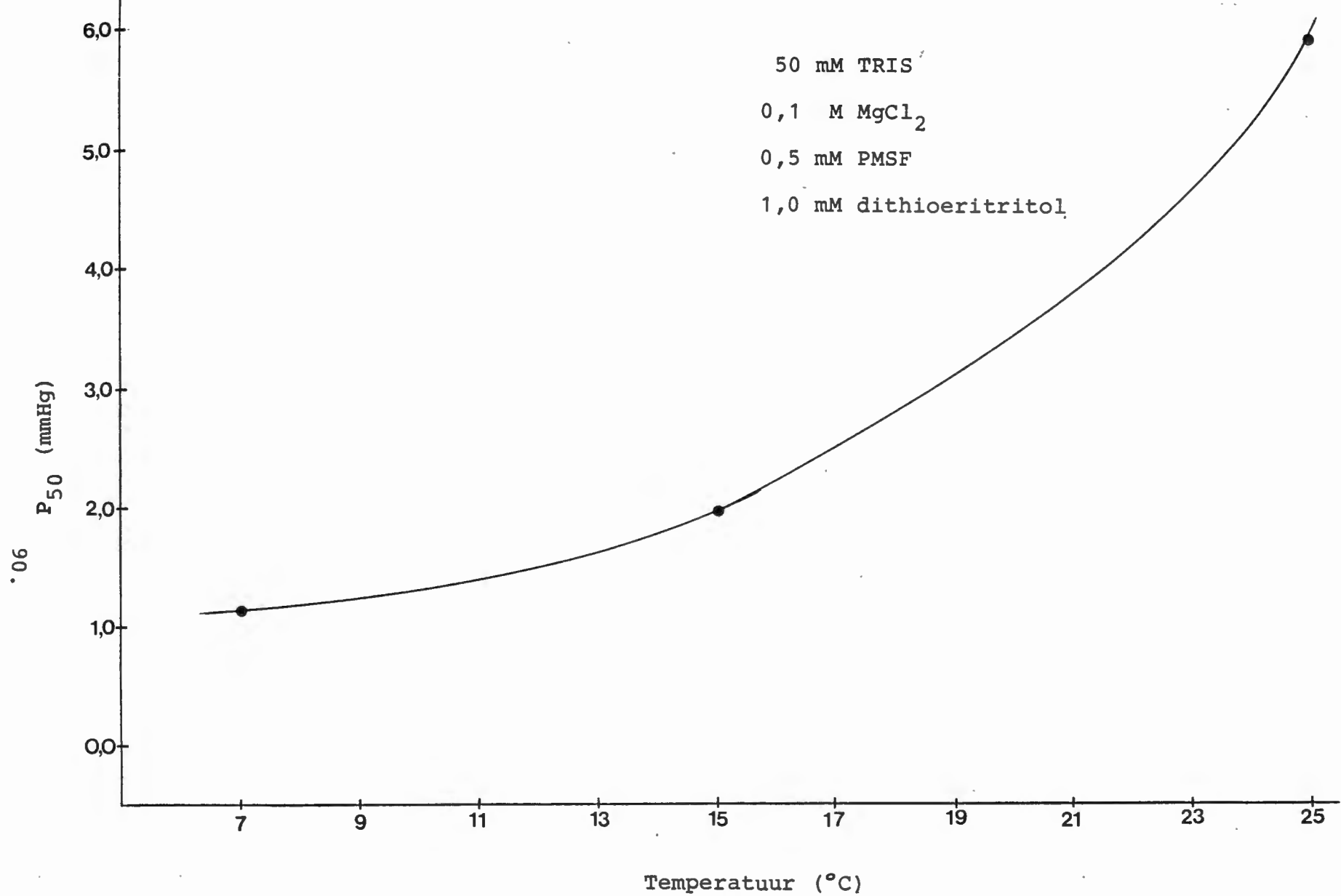
Laasgenoemde outeurs het ook bevind dat die n-waarde verlaag met 'n verlaging in die pH van die monster. By 'n pH van 6,8 was die n-waarde naamlik 1,3. Die resultate van die onderhawige ondersoek stem dus ooreen met die bevindinge van Nascimento et al. (1982). In hierdie ondersoek is met 'n bufferkonsentrasie van 0,15 M TRIS by 25°C gewerk. 'n Verlaging in die pH-waarde het ook 'n verlaging in die n-waarde tot gevolg gehad, en by 'n pH van 7,10 was die n-waarde dan ook 1,28. Die resultate, volgens figuur 25, dui aan dat met 'n verhoging in pH bokant 7,86, 'n verdere verhoging in die n-waarde verwag kan word. Fushitani et al. (1986) het egter bevind dat die n-waarde van L.terrestis-hemoglobien bokant 'n pH van 8 weer begin afneem. Aangesien die pH van B.glabrata-eritrokruorien nie bokant 7,86 verhoog is tydens metinge nie, kan 'n voorspelling dat die n-waarde met 'n hoër temperatuur sal toeneem, dus nie gemaak word nie. As die n-waardes van B.glabrata-eritrokruorien teen temperatuur uitgestip word, word 'n helling van 0,130 verkry. Die helling is 'n bewys dat die koöperatiwiteit van die eritrokruorien van B.glabrata baie min deur temperatuurveranderinge beïnvloed word. Die n-waarde van die eritrokruorien van B.glabrata soos gevind deur Figueiredo et al. (1973), is tot 'n groot mate beïnvloed deur 'n te lae pH-waarde van 7,0 en is ook by 'n hoë bufferkonsentrasie van 0,25 M TRIS gemeet. Nascimento et al. (1982) het die hoogste P₅₀-waarde vir die eritrokruorien van B.glabrata by 'n pH van 7,6 en 'n bufferkonsentrasie (NaPO₄) van 0,1 M gevind. Verder bevind hulle dat by hoë bufferkonsentrasies die eritrokruorien se P₅₀-waarde nie beïnvloed word deur pH-veranderings nie. Die hoogste Bohr-effek is dan ook deur Nascimento et al. (1982) gevind by 'n bufferkonsentrasie



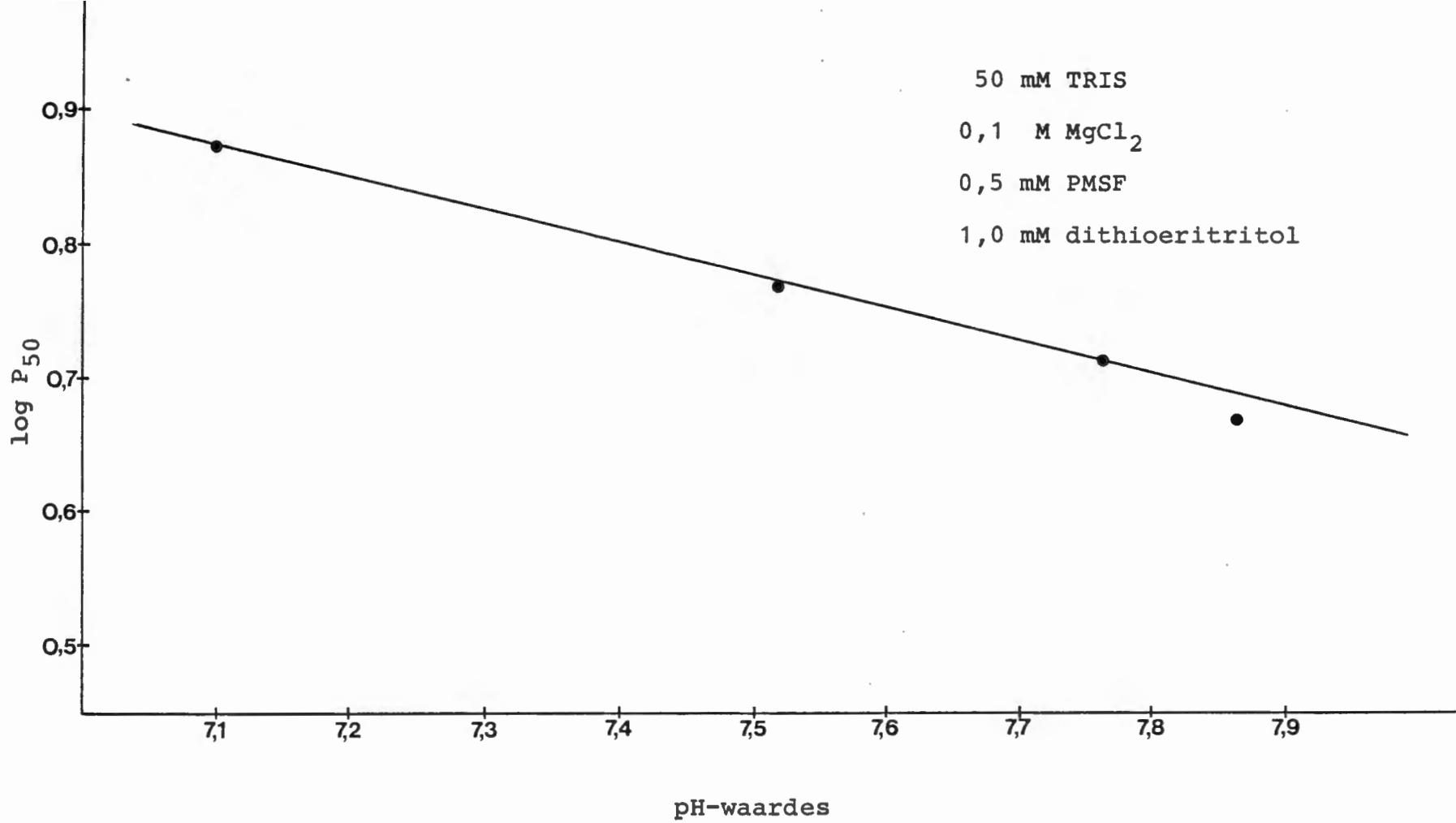
Figuur 25. Die n-waardes uitgestip teenoor die pH van B.glabrata eritrokruorien by 25°C.
Die eritrokruorien is nie vooraf met Sephadex-G75 gesuiwer nie.



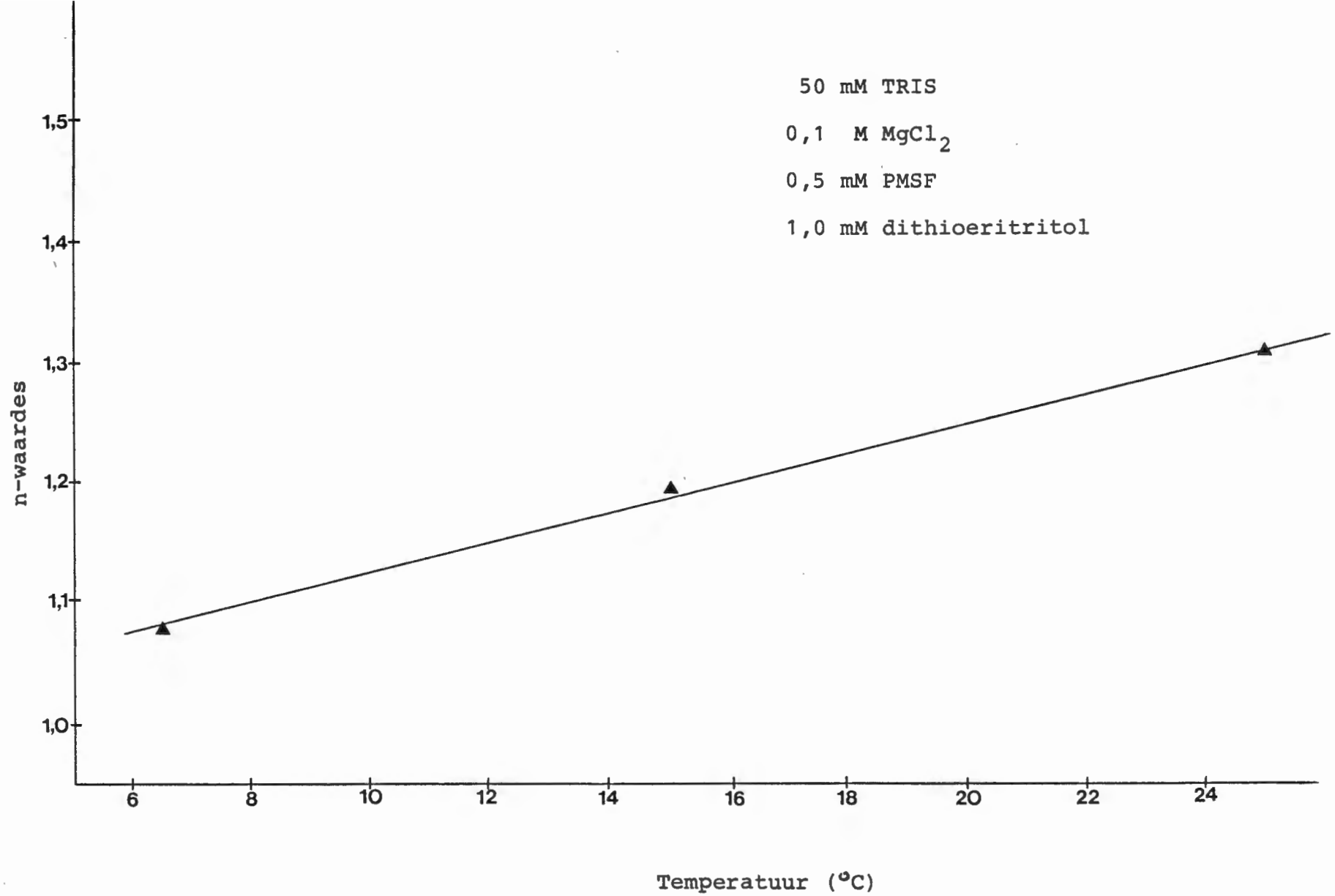
Figuur 26. Die n-waardes uitgestip teenoor die temperatuur waarby B.glabrata eritrokruorien se SDK gemeet is. Die eritrokruorien is nie vooraf met Sephadex-G75 gesuiwer nie. Die waardes stel die gemiddelde voor van vier monsters.



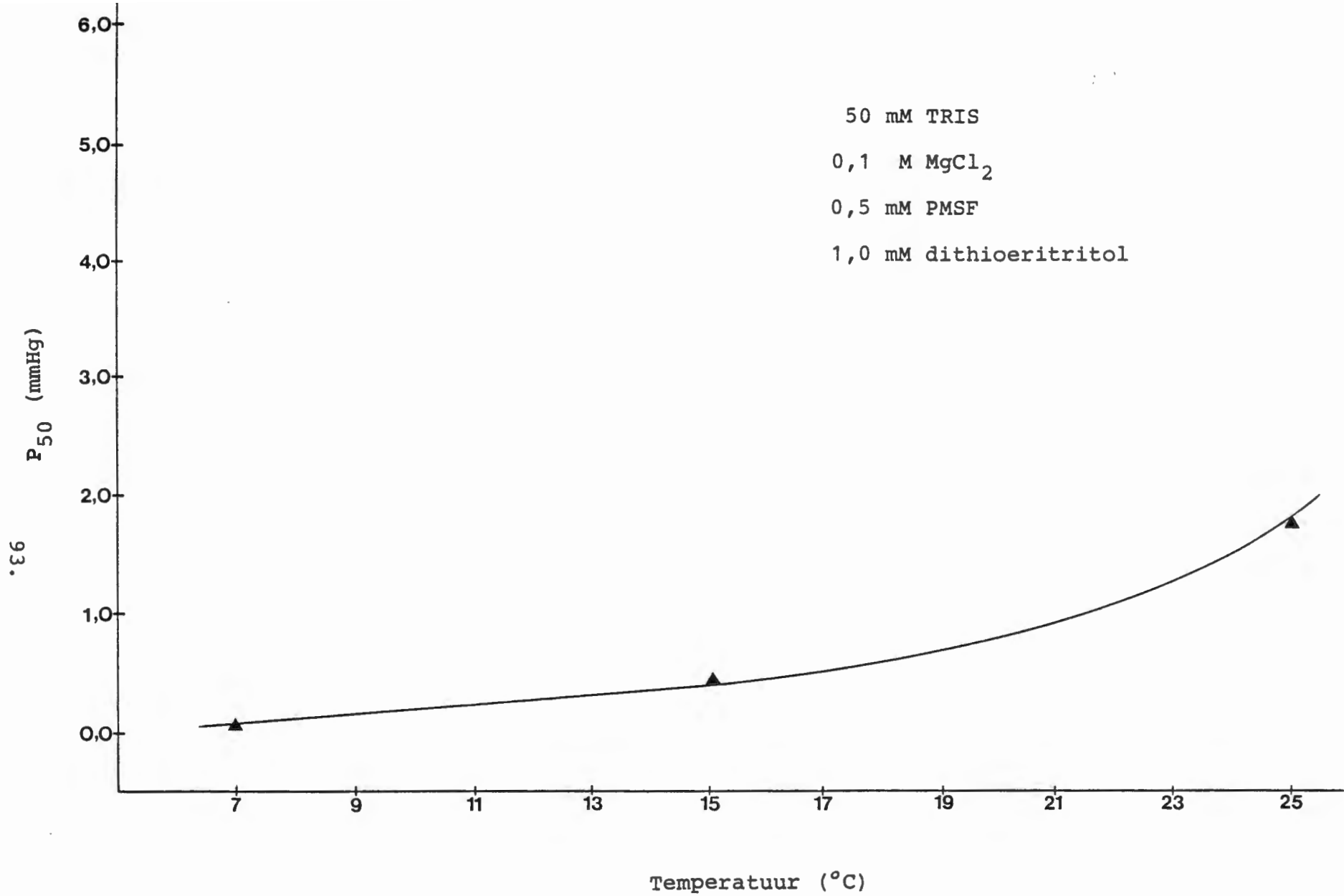
Figuur 27. Die P₅₀ -waardes uitgestip teenoor die temperatuur van B.glabrata eritrokrüorien. Die eritrokrüorien is nie met Sephadex-G75 gesuiwer nie. Waardes stel die gemiddelde voor van vier monsters.



Figuur 28. Die log P₅₀ -waardes uitgestip teenoor die pH-waardes van B.glabrata eritrokrurien by 25°C. Die monster is nie chemies met Sephadex-G75 gesuiwer nie.



Figuur 29. Die n-waardes uitgestip teenoor die temperatuur van 'n eritrokruorienmonster van B.glabrata wat gesuiwer is met Sephadex-G75.



Figuur 30. Die P₅₀ -waardes uitgestip teenoor die temperatuur van 'n eritrokruorienmonster van B.glabrata wat gesuiwer is met Sephadex-G75.

(NaPO_4) van 0,1 M, naamlik -0,25, terwyl die Bohr-effek by 'n bufferkonsentrasie (NaPO_4) van 0,25 M heeltemal afwesig was. Die resultate van die onderhawige studie het aangedui dat by 'n bufferkonsentrasie van 0,15 M TRIS 'n Bohr-effek van -0,25 gevind word oor die pH-reeks van 7,10 tot 7,86 (Figuur 28). Die bevindinge stem dus ooreen met die resultate soos verkry deur Nascimento et al. (1982). Die feit dat Figueiredo et al. (1973) geen Bohr-effek gevind het nie, kan waarskynlik verklaar word deur die feit dat hulle met 'n te hoë bufferkonsentrasie van 0,25 M TRIS gewerk het. As die P_{50} -waardes van B.glabrata-eritrokruorien teen toenemende temperatuur uitgestip word, word bevind dat die kromme by lae temperature afplat, terwyl dit by hoë temperature vinniger toeneem (Figuur 27). Dit beteken dat die suurstofaffiniteit van hierdie respirasiepigment vinnig afneem by temperature bokant 23°C en dus 'n fisiologiese voordeel inhou as meer suurstof by hoër temperature benodig word. Die omgekeerde geld ook by temperature laer as 10°C . Die eritrokruorien verloor dus sy affiniteit vir suurstof makliker by temperature hoër as 23°C , wat ooreenstem met die resultate van Fushitani et al. (1986) wat op die hemoglobien van L.terrestis gewerk het. By temperature bokant 30°C het hulle egter bevind dat outo-oksidasie baie vinnig plaasgevind het in die hemoglobien van L.terrestis en dat die erdwurm sy suurstofbindingseienskappe met die pigment totaal verloor.

As al die bogenoemde gegewens oor pH, n-waardes en P_{50} -waardes in perspektief gestel word, kan tot die gevolgtrekking gekom word dat die eritrokruorien van B.glabrata, voordat dit deur Sephadex gesuiwer is, wel 'n Bohr-effek vertoon, wat deur die

molariteit van die buffer beïnvloed word, soos gevind deur Nascimento et al. (1982). Die koöperatiwiteit van die eritrokruorien word nie maklik deur temperatuurveranderinge beïnvloed nie, wat daarop dui dat hoë temperatuur die binding van suurstof met eritrokruorien positief beïnvloed. Koöperatiwiteit word egter positief beïnvloed by pH-waardes bokant 7,7.

3.4.2 SEK VIR ERITROKRUORIEN VAN B.GLABRATA NADAT DIT DEUR MIDDEL VAN SEPHADEX GESUIWER IS

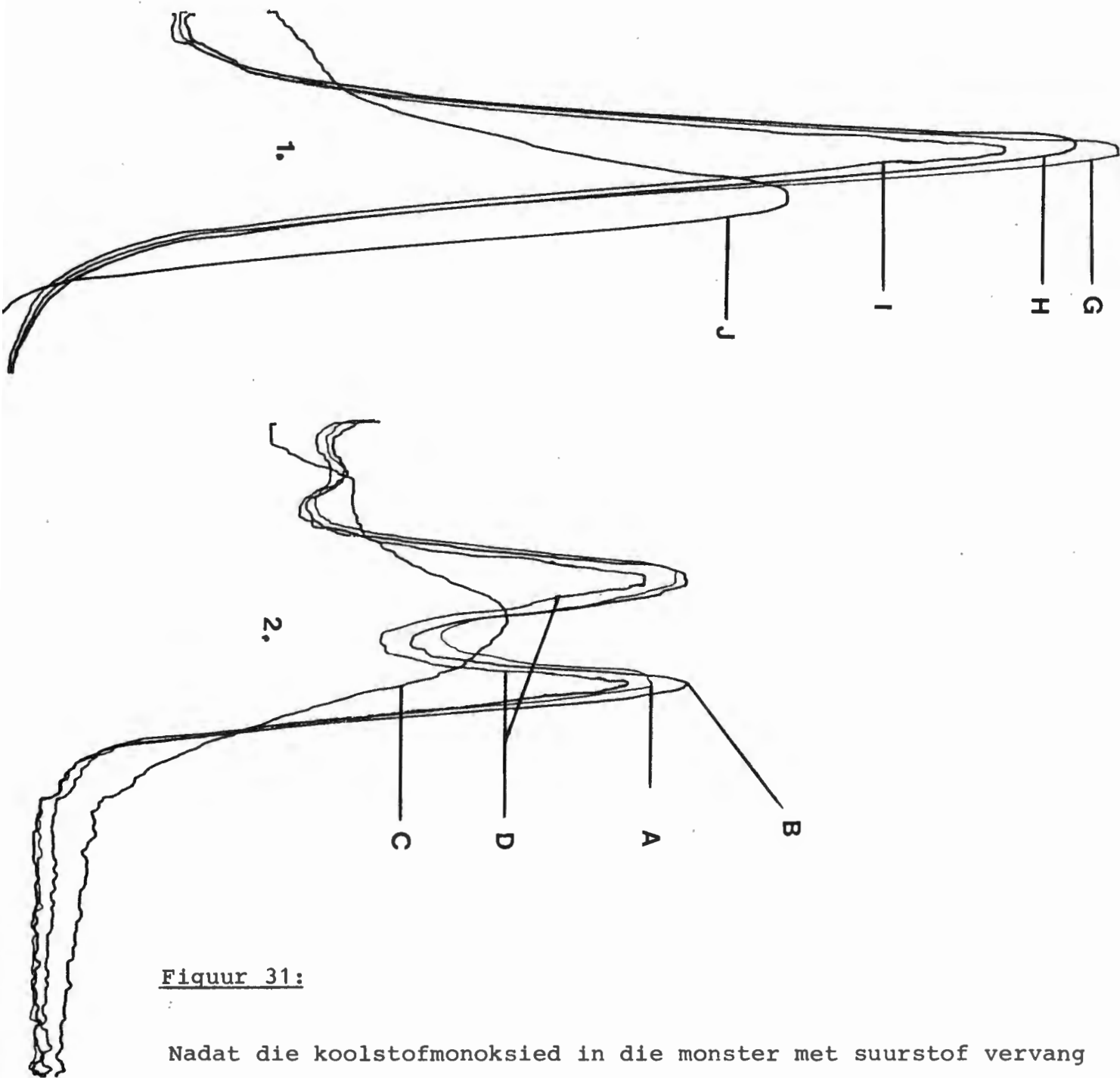
Met suiwing word bedoel dat veral elektroliete en onbekende organiese allosteriese kontrole faktore van die eritrokruorien oplossing verwyder word.

In die voorafgaande eksperimente is die suurstofbinding van eritrokruorien afkomstig uit B.glabrata, nie doeltreffend genoeg gesuiwer nie. 'n Belangrike rede hiervoor was dat as suiwingstegnieke toegepas word (dialise, verdunning van die monster), outo-oksidasie van die pigment na meteritrokruorien 'n wesenlike probleem word (Bonaventura en Bonaventura, 1981). Vir die suiwing van veral elektroliete en proteïene is die respirasiepigment deur 'n Sephadex-G75 kolom gechromatografeer. Noble, Kwiatkowski, De Young, Davis, Haedrich, Tam en Riggs (1986) het organiese fosfate uit die bloed van diepseevisse, Antimore rostrata, Bathysaurus mollis en Alepocephalus-spesies, verwyder met die deurbeweg van die hemoglobienoplossing deur 'n kolom met Sephadex G100 Garlick, Bonaventura, Martin en Powers (1979) het die bloed van Sternopygus macrurus gesuiwer met Sephadex G25 en daarna die monster deur 'n loon-

uitruilingskolom gestuur. Figueiredo et al. (1973) het die hemolimf van B.glabrata gesuiwer met die deurbeweeg van die hemolimf deur 'n DEAE-sellulose kolom. Nascimento et al. (1982) het die hemolimf van B.glabrata deur dieselfde metode soos deur Figueiredo et al. (1973) toegepas, gesuiwer. Geen een van hierdie navorsers op B.glabrata het die eritrokruorien in die hemolimf eers gekonsentreer deur middel van ultrasentrifugering nie.

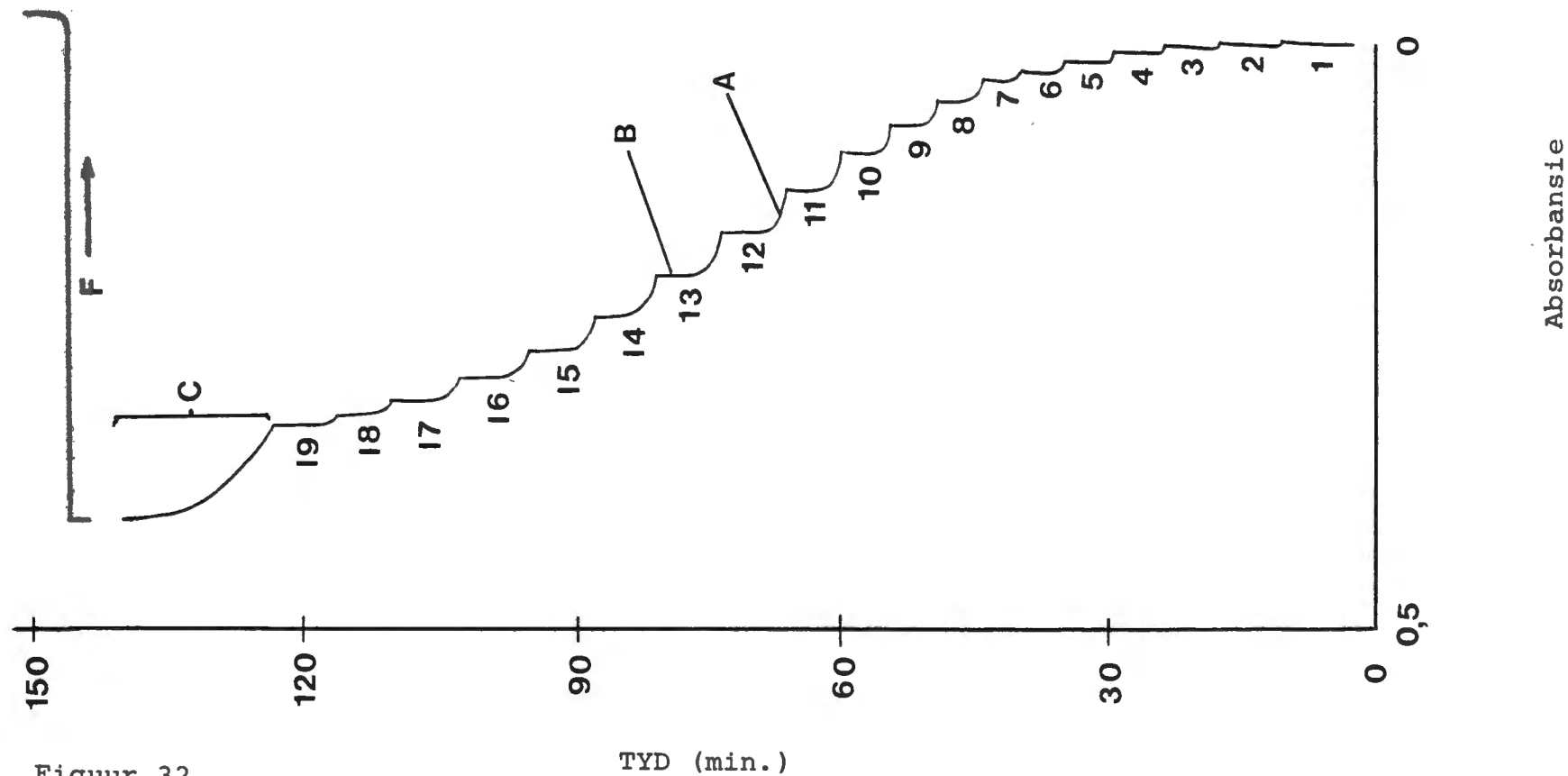
Die buffer wat in die volgende eksperimente vir suiwing en konsentrering gebruik is, was: 0,1 M TRIS; 0,1 M MgCl₂; 0,5 mM PMSF; 1,0 mM Dithioeritritol; (pH = 8). Die buffer is direk voor die aanvang van die suiwingseksperimente met koolstofmonoksied versadig soos reeds onder materiaal en metodes beskryf. Hierdie buffer is ook gebruik om die kolom voor te berei vir die deurbeweeg van die eritrokruorienmonster van B.glabrata. Vir hierdie voorbereiding is 25 ml buffer met 'n uitloopspoed van 8 ml per uur deur die kolom laat beweeg. Die eritrokruorienmonster met 'n volume van 100 mikroliter het van 25 tot 30 minute geneem om deur die kolom te beweeg met 'n vloeitempo van 8 ml uur⁻¹. Die persentasie absorpsieafname, wat goeie weergawe van outo-oksidase vir die eritrokruorienmolekule is, was baie min (Tabel 4D). By 412 nm vir die duur van 16 minute, en by 540 nm en 412 nm na drie ure (Tabel 4D), by 25°C, was die persentasie absorpsieafname net so min soos die absorpsieafname wat gevind is met die gebruik van die verkoelde inkubasietegniek.

Nadat die eritrokruorienoplossing gesuiwer is, kon die eksperimente vir die bepaling van die SDK by drie temperature



Figuur 31:

Nadat die koolstofmonoksied in die monster met suurstof vervang is, het daar 'n toename van 0,002 (A na B) in die absorbansewaarde van die alpha-piek in die spektrum en 'n daling van 0,003 in die absorbansewaarde tussen die alpha en die betapiiek voorgekom. In die Soret-gebied (1) is die piek by 416 nm (G) solank koolstofmonoksied nog aan die monster gebind is, en die piek verander na 412 nm (H) sodra die koolstofmonoksied met suurstof in die monster vervang is. Absorbansiepeke (C) en (J) verteenwoordig die spektrum vir die deoksieritrokruiere. Absorbansiepeke (D) en (I) is die spektra van oksieritrokruiere na 'n tydsverloop van drie ure.



Figuur 32.

Werklike verloop van die "absorbansiekrommes" tydens 18 verdunningstappe soos toegepas deur die verdunningsklep op die eritrokruorienmonster in die Gill-sel. (A): Absorbansiestyging weens diffusieverlies van suurstof in monster veroorsaak deur byvoeging in stikstofgas; (B): Stabiele lyn (reguitgedeelte) dui aan dat 'n ewewig tussen eritrokruorien en suurstof bestaan; (C): Totale uitspoel van monster met stikstofgas; (F): blootstelling van monster aan lugsuurstof. Die PO_2 van elke stap asook sy ooreenstemmende absorbansiewaarde is gebruik om 'n suurstofewewigskromme op te stel.

uitgevoer word, naamlik by 25°, 15° en 7°C. Die pH-waardes van die eritrokrurienmonsters is ook by hierdie temperature gemeet en die volgende waardes is verkry: 7,40 (25°C), 7,59 (15°C) en 7,76 (7°C). Die resultate word in tabelle 12, 13 en 14 aangetoon. Die P₅₀-waardes het vanaf 'n n-waarde van 1,73 mmHg by 25°C afgeneem na 'n waarde van 0,32 by 7°C. Op dieselfde manier het die n-waarde afgeneem vanaf 1,31 by 25°C en pH 7,40 na 1,08 by 7°C en pH 7,76.

3.4.2.1 Bespreking van die resultate

Dit is deur Terwilliger en Terwilliger (1977) en Bonaventura en Bonaventura (1981) bewys dat die chemiese suiwering met Sephadex en Sepharose van respirasiepigmentoplossing tot gevolg het dat die suurstofaffiniteit van die respirasiepigment drasties verhoog. Wat hierdie allosteriese modifikasies presies is kan nog nie met sekerheid gesê word nie. Daar is wel gevind dat byvoorbeeld katione soos lithium, magnesium en natrium die suurstofaffiniteit van invertebraterespirasiepigment verlaag (Fushitani et al. 1986; Davis en Riggs, 1986). Dat die eritrokrurien deur Sephadex-G75 gesuiwer is, word onder andere bewys deur die volgende: Die P₅₀-waardes van die eritrokrurien wat deur die Sephadex-G75 kolom gestuur is, getoets by 25°C, 15°C en 7°C is baie laer as die P₅₀-waarde van die eritrokrurien wat nie chemies gesuiwer is nie (vergelyk Tabele 9, 10 en 11 met Tabele 12, 13 en 14). Die grootste afname in die P₅₀-waarde word verkry by 25°C, naamlik 3,19 mmHg, terwyl die verskil in die P₅₀-waardes by 15°C 1,74 mmHg en by 7°C 0,84 mmHg was. As die P₅₀-waardes teenoor die temperatuur uitgestip word, word gevind dat die temperatuur effek op die P₅₀-

waardes vir die ongesuiwerde eritrokruorien en gesuiwerde eritrokruorien dieselfde is. Gesuiwerde eritrokruorien het egter 'n baie hoër affiniteit vir suurstof (Figuur 30).

Die n-waardes van die gesuiwerde eritrokruorienmonster by al drie die temperature is laer as die n-waardes van 'n ongesuiwerde eritrokruorienmonster. Uit figuur 29 waar die n-waardes teenoor die temperatuur van 'n gesuiwerde eritrokruorienmonster uitgestip is, word 'n steiler helling verkry as die ooreenstemmende helling van die kromme van 'n ongesuiwerde eritrokruorienmonster (Figuur 25). Die kooperatiewiteit van 'n gesuiwerde eritrokruorienmonster word dus meer beïnvloed deur temperatuur as 'n ongesuiwerde eritrokruorienmonster. Uit al die bogenoemde gegewens is dit duidelik dat die verwydering van al die katione behalwe magnesium uit die eritrokruorienmonster die suurstofaffiniteit van die eritrokruorienmonster laat toeneem (Figuur 30) terwyl die kooperatiewiteit effens afneem (Figuur 29).

Die gebruik van koolstofmonoksied vir die beperking van meteritrokruorienvorming in die monster gedurende voorbereiding en die deurbeweeg van die monster deur die Sephadex-G75 kolom was suksesvol. Die persentasie absorpsieafname wat gemeet is in die eritrokruorienmonster, nadat die koolstofmonoksied daaruit verwyder is, het ooreengestem met die persentasie absorpsieafname wat gemeet is in 'n ongesuiwerde eritrokruorienmonster nadat dit met die "Airfuge" afgeswaai en met die verkoelde inkubasietegniek behandel is.

Die eritrokruorienmonster wat met koolstofmonoksied verbind was,

het nie 'n groot verskil in die posisie en grootte van die absorpsiepieke in die sigbare gebied vertoon in vergelyking met dieselfde eritrokruorienmonster waarvan die koolstofmonoksied met suurstof vervang is nie. Van Assendelft(1970) het baie groter verskille gekry tussen die absorpsiepiek van menshemoglobien wat met koolstofmonoksied of suurstof verbind is. Waarom die golflengte verskille so klein is by slak eritrokruorien is nie duidelik nie en kan dus nie hier verklaar word nie.

4. ALGEMENE BESPREKING

Volgens Depledge (1985) word 'n interspesifieke massa eksponentwaarde van 0,75 vir alle diere gevind. Berg en Ockelman (1959) het bevind dat die massa-eksponentwaarde van pulmonaatslakke heelwat hoër is as 0,75 en soms ook meer as die waarde een kan wees. B.glabrata vertoon dan ook 'n massa eksponentwaarde van 0,849 wat hoër is as die waarde van 0,75. Innes et al. (1984) het massa eksponentwaardes van 0,709 tot 0,77 verkry van hul twee pulmonaatslaksoorte wat in rus verkeer het. Dit beteken dat slakke se suurstofverbruik per tydseenheid vir klein en groot slakke byna dieselfde is. Dit staan in teenstelling met die meeste Vertebrate waar groter diere van dieselfde soort minder suurstof verbruik per tydseenheid per eenheid liggaamsmassa. Waarom hierdie andersheid by slakke gevind word, is nog nie verklaar nie. B.glabrata het minder suurstof verbruik sodra die slak in sy skulp in teruggetrek het. Hierdie toestand het voorgekom tydens die bepaling van die slakke se vermoë om in lug te respireer. Die massa-eksponentwaarde van die slakke tydens lugrespirasie kon nie uit die resultate bereken word nie, aangesien die waardes van die resultate baie wisselvallig vertoon het. Die moontlikheid dat die pneumostoom toegedruk word en die mantelholte platgedruk word sodra B.glabrata in sy skulp in terugtrek, kan as 'n moontlike rede vir die wisselvallige waardes van die resultate aangevoer word. Daar moet ook in aanmerking geneem word dat, sodra B.glabrata in sy skulp in terugtrek, die area van die spiervoet wat aan die water blootgestel word vir kutaneuse gaswisseling, ook verklein. Die verkleining van die gaswisselingsoppervlakte kan dus ook 'n

verdere bydrae lewer tot hierdie wisselvallige resultate. 'n Massa eksponentwaarde van 0,75 sal volgens Hemmingson (1950, 1960) slegs verkry word as daar na die respirasie van die invertebrate as 'n geheel gekyk word. Die variasie wat daar tussen verskillende invertebrategroepe voorkom, sal, as dit bereken word as 'n gemiddelde, 'n waarde van 0,75 gee.

Die hellingwaarde van die gemete skulpbreedte van B.glabrata uitgestip teenoor die droë massa is nog 'n bewys van 'n allometrieë verwantskap wat ook by ander diere kan voorkom (Schmidt-Nielsen, 1984). Die feit dat die skulpbreedte baie stadiger toeneem as die droë massa van die slak, kan toegeskryf word aan die feit dat lengte slegs een dimensie verteenwoordig terwyl die massa eerder verband hou met die driedimensionele begrip van volume (Combrink, 1968; Schmidt-Nielsen, 1984). Om dus 'n meer korrekte regressielyn vir die verwantskap tussen die slak se toename in skulpgrootte en die massatoename van die slak te verkry, sal die toename in skulpdikte, skulpbreedte en deursnee van die skulpwinding in aanmerking geneem moet word.

By varswaterpulmonate (Jones, 1961; Alberts, 1966; Frey, 1974) dien die lugborrel in die mantelholte hoofsaaklik as 'n suurstofverskaffer wanneer die slakke by lae suurstofspannings in water voorkom. Dit is, in teenstelling met die lugborrel wat tipies as fisiese kieuë funksioneer, soos gevind by akwatiese insekte (Schmidt-Nielsen, 1983). Volgens Jones (1972) is daar gedurig 'n vervanging van suurstof in die mantelholte van pulmonate deur 'n gereelde hernuwing van die mantelholtegas deur borrelhenuwing. Jones (1964) het bevind dat

die lugborrel in die mantelholte vir hoogstens 60 sekondes voldoende suurstof aan die weefsels kan verskaf voordat dit uitgeput raak. As die slak dus nie gereeld die lugborrel hernu nie of nie kan hernu nie, sal hy dan slegs op huidrespirasie moet staatmaak. Al is die huidrespirasie agt maal meer effektief as pulmonale respirasie (Alberts, 1966), beweeg die slakke dan nog steeds na die hoër suurstofkonsentrasies in die water. B.glabrata het geen voorkeur vir spesifieke suurstofkonsentrasies in die water vertoon solank as wat hy toegelaat is om sy mantelholtegas te hernu nie. In dié geval tree die mantelholtegas dus as hoofverskaffer van suurstof op. Dit stem ooreen met die resultate verkry deur Alberts (1966) en Jones (1961). B.glabrata het egter geen voorkeur vir die hoër suurstofkonsentrasies in die water vertoon nie, al word hy nie toegelaat om sy mantelholtegas te vervang nie. Die slak het net langer in gebiede van hoë en baie lae suurstofkonsentrasies vertoef as gevolg van die fisiese obstruksies van die kas se binnehoeke wat hy daar ondervind het. As B.glabrata tydens hierdie toestande anaerobies respireer, sal dit 'n moontlike verklaring vir die waargenome resultate van beide gradiënt- en keusekas wees. Wijsman et al. (1985) het bevind dat L.stagnalis alreeds na een uur in anoksia, anaerobies begin respireer. Dit word bewys deur die toename van D-laktaat in die weefsel en ook in die hemolimf van L.stagnalis na 24 uur in anoksia (Wijsman et al., 1985). Wolmarans (in druk) het bevind dat B.glabrata 'n hoër konsentrasie van veral melksuur en suksiensuur (eindprodukte van anaerobe respirasie) in sy ekskresieprodukte vertoon sodra die slak in water met baie laer suurstofkonsentrasies geplaas word. Hiervolgens is dit moontlik dat sodra B.glabrata nie meer toegelaat word om

sy mantelholtegas te hernu nie, hy anaerobies begin respi-
reer. As dit so is sal die slak onder die toestand van
anaerobe respirasie geen voorkeur vir 'n spesifieke suurstof=
konsentrasie in die water besit nie.

Die intensiteit van heem-heeminteraksies in die hemoglobien=
molekule word aangedui deur die maksimum helling van die Hill-
grafiek (Perutz, 1978). Sodra een heemeenheid in die hemoglo=
bienmolekule met suurstof verbind, vind daar 'n toename in die
intensiteit van die interaksies tussen die ander heemeenhede
van die hemoglobien plaas. Die interaksie het dan 'n toename
in die suurstofaffiniteit van die oorblywende heemeenhede tot
gevolg (Perutz, 1978). Daar bestaan egter nie 'n verband tus=
sen die suurstofaffiniteit van 'n hemoglobienmolekule en 'n hoë
heem-heeminteraksie van so 'n molekule nie. 'n Bewys hiervoor
is dat die eritrokruorien van L.terrestis (Fushitani et al.,
1986) 'n maksimum n-waarde van 7,9 en 'n P_{50} van 3,6 mmHg besit.
Die eritrokruorien van B.glabrata (Nascimento et al., 1982)
daarenteen besit 'n n-waarde van 1,7 met dieselfde suurstofaf=
finititeit as L.terrestis, naamlik 3,6 mmHg. By die onderhawige
ondersoek is 'n n-waarde van 1,46 en 'n P_{50} -waarde van 5,92 mmHg
verkry by dieselfde temperatuur en pH van die buffer. In ver=
gelyking met die eritrokruorien van L.terrestis toon die res=
pirasiepigment by B.glabrata aan dat heem-heeminteraksies van
sy 96 heemgroepe (Figueiredo et al., 1973) slegs by 'n baie klein
getal (drie tot vier) heemgroepe gelyktydig werkzaam is. Vir
L.terrestis is bevind dat minstens vyf tot twaalf heemgroepe
gelyktydig werkzaam is. Dit verklaar die hoë n-waarde van
tot 7,9 by hierdie wurm (Fushitani et al., 1986). Onder 'die

invloed van dalende temperatuur het die n-waarde van die eritrokuorien van B.glabrata ook baie min afgeneem. In teenstelling hiermee is bevind dat die n-waarde van eritrokuorien veral deur pH waardes bokant 7,7, verhoog. Die effek wat pH-veranderinge op die n-waarde het, is in ooreenstemming met Nascimento et al. (1982) vir B.glabrata en Fushistani et al. (1986) vir L.terrestis. Die P_{50} -waarde van die eritrokuorien van B.glabrata word veral verhoog deur temperature bokant 15°C . 'n Lae suurstofaffiniteit by hoë temperature is noodsaaklik omdat die hoë temperature op lewende organismes 'n verhoogde metabolisme veroorsaak. Meer suurstof word dus deur die lewende weefsel benodig (Schmidt-Nielsen, 1983). Die teenoorgestelde, egter, vind by lae temperature plaas en dit word ook so deur die resultate uitgewys (Figuur 30).

'n Toenemende hoeveelheid koolstofdiksied in die hemolimf het tot gevolg dat die pH van die hemolimf daal en die SEK na regs verskuif word. Die verskynsel het tot gevolg dat by 'n hoër koolstofdiksiedkonsentrasie in die hemolimf meer suurstof afgegee word. Die verskynsel staan bekend as die Bohr-effek (Schmidt-Nielsen, 1983). Met 'n verlaging van die pH van eritrokuorien van B.glabrata is bevind dat die P_{50} -waardes verhoog en 'n Bohr-effek met 'n waarde van $-0,25$ verkry word. Volgens Nascimento et al. (1982) word die Bohr-effek beïnvloed deur die molariteit van die fosfaatbuffer waarin die eritrokuorienmonster van B.glabrata opgelos is. Volgens hierdie outeurs word 'n maksimum Bohr-effek van $-0,25$ verkry by 'n molariteit van $0,1\text{ M}$ natriumfosfaat terwyl by $0,25\text{ M}$ natriumfosfaat die Bohr-effek heeltemal afwesig was. Aangesien ligande soos NaCl chemies kan koppel aan die intramolekulêre soutbrûe (Perutz,

1978), sal die soute waaruit buffers opgemaak is, ook hieraan bind (Antonini & Brunori, 1971). Dit sal verklaar waarom Figueiredo et al. (1973) geen Bohr-effek gevind het vir die eritrokruorien van B.glabrata nie, aangesien hulle met 'n hoë bufferkonsentrasie van 0,25 M gewerk het.

Nadat die eritrokruorien chemies deur Sephadex-G75, gesuiwer is, is bevind dat veral die P_{50} -waardes afgeneem het met 'n maksimum afname van 70,7%, terwyl die n -waardes 'n maksimum afname vertoon het van 6,9%. Fushitani et al. (1986) het bevind dat die verwydering van katione, soos byvoorbeeld lithium, natrium en magnesium maar nie die chloried-ione nie, die suurstofbinding van L.terrestis se hemoglobien beïnvloed. Die suurstofaffiniteit word verhoog en in 'n mindere mate die n -waarde of kooperatiewiteit in die hemoglobienmolekule. Met die onderhawige ondersoek na die gesuiwerde eritrokruorienmonster van B.glabrata met Sephadex-G75, is katione uit die monster verwyder. As die P_{50} -waardes en die n -waardes van die chemies gesuiwerde eritrokruorien en die nie-chemies gesuiwerde eritrokruorien teenoor die afnemende temperatuur uitgestip word, word dieselfde effek verkry. Hieruit is dit duidelik dat suivering deur Sephadex-G75 die suurstofbindingseienskappe van die eritrokruorienmolekule positief beïnvloed het. Dit het beteken dat die monsters gesuiwer is van katione wat as allosteriese modifiseerders kan optree (Perutz, 1978).

As die spektra van eritrokruorien met koolstofmonoksied daaraan verbind, vergelyk word met die binding van menshemoglobien met koolstofmonoksied (Van Assendelft, 1977), is dit duidelik dat die tipiese spektra van HbCO glad nie verkry is nie. Dit kan

waarskynlik verklaar word daaruit dat 'n volledige binding tussen eritrokruorien en koolstofmonoksied nie plaasgevind het nie. Die deurborreling van die koolstofmonoksied deur die buffer was lank genoeg om die buffer en ook die monster met koolstofmonoksied te versadig. Volgens Perutz (1978) is koolstofmonoksied se bindingsaffiniteit met hemoglobien 150 keer groter as die van suurstof. Die gevolgtrekking kan dus gemaak word dat die eritrokruorienmolekule se heembinding met koolstofmonoksied nie so 'n groot affiniteit vertoon soos vertebrathemoglobien nie.

5. OPSOMMING

1. Die suurstofverbruik ($\dot{V}O_2$) van Biomphalaria glabrata kan bereken word uit die volgende allometriese verantskap:
 $\dot{V}O_2 = 0,04 Mb^{0,849}$ waar $\dot{V}O_2$ die suurstofverbruik is en Mb die liggaamsmassa in kilogram is.
2. Die juiste bepaling van die suurstofopnametempo ($\dot{V}O_2$) was onsuksesvol as die eksemplare van B.glabrata in lug gehou is.
3. Die $\dot{V}O_2$ van volwasse B.glabrata (droë massa 19,4 tot 25,1 mg) by 25°C was 38,3 μ l. kg. uur met 'n standaardafwyking van 0,80.
4. 'n Duidelike verband tussen die slak se droë massa en die skulpbreedte is gevind met 'n passing van 97,3% en 'n regressielyn se helling van 0,416 ($y = 0,416x + 5,8$).
5. Geen suurstofvoorkeur vir 'n bepaalde partiële suurstof is deur die slakke in 'n suurstofgradiënt met 'n PO_2 van 5 tot 132 mmHg getoon nie.
6. Geen voorkeur tussen hoë en lae partiële suurstof is deur die slakke in 'n suurstofkeusekas van 'n PO_2 van 5 of 132 mmHg getoon nie.
7. Twaalf buffers is getoets om meteritrokruorienvorming te beperk. Slegs buffer nommer 11 (0,05 M TRIS, 0,1 M $MgCl_2$, 1 mM PMSF en 0,5 mM dithioeritritol) was suksesvol in die

bekamping van meteritrokruorien.

8. Die gebruik van buffer nommer elf tesame met die uitswaai van hemosiete by 50 G het meteritrokruorienvorming verder beperk.
9. Dialise in 'n oplossing wat buffer nommer elf bevat, was onsuksesvol om meteritrokruorienvorming te onderdruk.
10. Verkoelde inkubasie (4°C) van 'n eritrokruorienmonster in buffer nommer 11 vir 24 uur het meteritrokruorienvorming, matig onderdruk.
11. In teenstelling met Figueiredo et al. (1973) is 'n Bohr-effek deur die eritrokruorien van B.glabrata vertoon. Die effek is -0,25 tussen 'n pH van 7,10 en 7,86.
12. Die hoogste maksimum n-waarde van 1,46 is by 'n pH van 7,86 en 25°C vir eritrokruorien verkry.
13. Die P₅₀-waardes was 5,39 mmHg (pH 7,51) by 25°C, 2,23 mmHg by 15°C (pH 7,57) en 1,16 mmHg by 7°C (pH 7,68) in 'n eritrokruorienmonster wat nie deur Sephadex-G75 gesuiwer was nie.
14. Krommes wat gemaak is van die P₅₀-waardes uitgestip teenoor temperatuur wys 'n steiler helling by temperature bo 15°C as by laer temperature.

15. As die n-maksimum waardes van slakeritrokrurorien teenoor die temperatuurwaardes uitgestip word is 'n liniêre verband gevind.
16. By hoë pH-waardes word die n-maksimum waarde van B.glabrata eritrokrurorien kleiner wat op verminderde heem-heeminteraksie dui.
17. Die Sephadex-G75 gesuiwerde eritrokrurorienmolekule se P_{50} -waardes was 1,73 mmHg by 25°C (pH 7,40), 0,49 mmHg by 15°C (pH 7,59) en 0,32 mmHg by 7°C (pH 7,76). In vergelyking met opsomming dertien het Sephadex-G75 gesuiwerde eritrokrurorien 'n baie hoër suurstofaffiniteit.
18. Temperatuur- en pH-effekte beïnvloed P_{50} - en n-waardes op dieselfde manier vir beide gesuiwerde en ongesuiwerde eritrokrurorien.
19. Die koueligbrontegniek waardeur koolstofmonoksied met suurstof in die monster verplaas is, is suksesvol toegepas.
20. Die gebruik van die dunlaagreaksiesel van Dolman en Gill (1978) vir die bepaling van suurstofdissosiasiekrommes van slakeritrokruroriene was geslaag nadat meteritrokrurorienvorming onderdruk is.

6. BEDANKINGS

My opregte dank aan die volgende persone:

Prof. W.J. van Aardt onder wie se bekwame leiding ek hierdie projek kon onderneem, vir sy raad en bystand.

Dr. K.N. de Kock vir sy hulp en hooggewaardeerde advies.

Mev. Mara Reyneke en Mej. H van Wyk vir die netjiese tikwerk en besondere bydrae met die versorging van die verhandeling.

Mnr. J.C. Combrink vir die professionele taalversorging van die verhandeling.

My ouers vir hulle volgehoue morele ondersteuning en ondersteuning. Met opregte dank en erkenning dra ek hierdie werk aan hulle op.

7. LITERATUURLYS

- ALBERTS, L.E. 1966. Some aspects of the respiratory physiology of three South-African freshwater pulmonate snails, Bulinus (Physopsis) africanus (Krauss), Bulinus (Bulinus) tropicus (Krauss) and Lymnaea natalensis (Krauss). South-African Journal of Science, 62 : 215 - 223.
- ALTMAN, P.L. & DITTMER, D.S. 1968. Biology Data Book. Washington, D.C.: Federation of American Societies for Experimental Biology. 633 p.
- ANTONINI, E. & BRUNORI, M. 1971. Hemoglobin and Myoglobin in their reaction with Ligands. Amsterdam. North Holland.
- BERG, K.A.J. & OCKELMAN, K.W. 1959. The respiration of freshwater snails. Journal of experimental Biology, 36: 690 - 708.
- BONAVENTURA, J. & BONAVENTURA, C. 1981. Preparation of high molecular weight invertebrate hemoglobins. Methods in Enzymology, 76 : 43 - 54.
- COERTZE, D.J. 1976. Invloed van CuSO_4 op ioon en waterbalans van B. tropicus. Potchefstroom. 245 p. (Proefskrif M.Sc. - PU vir CHO).
- COMBRINCK, C. 1968. 'n Vergelykende studie van die invloed van enkele ekologiese faktore op die varswaterslakspesies Lymnaea natalensis (Krauss) en Bulinus (Bulinus) Tropicus (Krauss) (Mollusca : Basommatophora) met spesiale klem op die substratum. Potchefstroom. 240p. (Proefskrif M.Sc. - PU vir CHO.)

- DAVIS, B.J. & RIGGS, A.F. 1986. Effects of sodium chloride and carbon dioxide on oxygen binding by Artemia hemoglobin. Journal of Comparative Physiology and Biochemistry, 156: 355 - 361.
- DE KOCK, K.N. & VAN EEDEN, J.A. 1980. Lifetable studies on freshwater snails: Culture system and method. Wetenskaplike bydraes vir die PU vir CHO. Reeks B. Natuurwetenskappe nr. 105.
- DEPLEDGE, M.H. 1985. Respiration and lung function in the mouse, Mus Musculus (with a note on mass exponents and respiration variables). Respiration physiology 60: 83 - 94.
- DOLMAN, D. & GILL, S.J. 1978. Membrane covered thin-layer optical cell for gas-reaction studies of hemoglobin. Analytical Biochemistry. 87: 127 - 134.
- DUNN, A. & ARDITTI, J. 1969. Experimental Animal Physiology. New York. Holt, Rinehart & Winston Inc.
- FIGUEIREDO, E.A., GOMEZ, M.V., HENEINE, I.F., SANTOS, I.O. & HARDGREAves, F.B. 1973. Isolation and physico-chemical properties of the hemoglobin of Biomphalaria glabrata (Mollusca, Planorbidae). Comparative Biochemical Physiology. 44B: 481 - 491.
- FREY, B.J. 1974. Aspekte van die respirasiefisiologie van die varswaterslak Bulinus (Physopsis) globosus (Morelet). Potchefstroom. 133 p. (Proefskrif (M.Sc.)-PU vir CHO).

FUSHITANI, K., IMAI, K. & RIGGS, A.F. 1986. Oxygen properties of hemoglobin from the earthworm, Lubricus terrestris. The Journal of Biological Chemistry. 261: 8414 - 8423.

GAMBLE, J.C. 1971. The responses of the marine Amphipods Corophium arenarium and C.volutator to gradients and to choices of different oxygen concentrations. Journal of experimental Biology. 54: 275 - 290.

GARLICK, R.L., BONAVENTURA, J., MARTIN, J.P. & POWERS, D.A. 1979. Functional studies on the single component hemoglobin from an amazon knife fish, Sternopygus macrurus. Comparative Biochemical Physiology. 62A: 201 - 205.

GHIRETTI, F. 1966. Respiration. (In Wilbur, K.M. & Yonge, C.M. red. Physiology of Mollusca. Volume II. New York Academic Press.)

GILSON, W.E. 1963. Differential respirometer of simplified and improved design. Science, 141: 531 - 532.

* HEMMINGSEN, A.M. 1950. The relation of standard (basal) energy metabolism to total fresh weight of living organisms. Rep. Steno Mem. Hosp. (Kopenhagen) 4: 1 - 58.

* HEMMINGSEN, A.M. 1960. Energy metabolism as related to body size and respiratory surfaces, and its evolution. Rep. Steno Mem. Hosp. (Kopenhagen) 9: 1 - 110.

- HÖGLUND, L.B. 1951. A new method for studying the reactions of fishes in stable gradients of chemical and other agents. Oikos, 3: 247 - 267.
- IMAI, K. 1981. Measurements of accurate oxygen equilibrium curves by an automatic oxygenation apparatus. Methods in Enzymology, 76: 438 - 449.
- INNES, A.J., MARSDEN, I.D. & WONG, P.P.S. 1984. Bimodal respiration of intertidal Pulmonates. Comparative Biochemical Physiology, 77A: 441 - 445.
- JONES, J.D. 1961. Aspects of respiration in Planorbis corneus L. and Lymnaea stagnalis L. (Gastropoda, Pulmonata). Comparative Biochemical Physiology, 4: 1 - 29.
- JONES, J.D. 1964. Respiratory gas exchange in the aquatic Pulmonate, Biomphalaria sudanica. Comparative Biochemical Physiology, 12: 297 - 310.
- JONES, J.R.E. 1952. The reaction of fish to water of low oxygen concentration. Journal of experimental Biology. 29: 403 - 415.
- LEVER, J. & BEKIUS, R. 1965. On the presence of an external hemal pore in Lymnaea stagnalis L. Experimentia 21: 1 - 4.

- MAHONEY, J.D., ROSS, S.C. & GILL, S.J. 1977. A thin layer optical cell for spectroscopic studies of oxygen binding to hemoglobin. Analytic Biochemistry. 78: 535 - 542.
- NASCIMENTO, C.S., DANIEL, J.P. & HENNEINE, I.F. 1982. The hemoglobin of the snail Biomphalaria glabrata. The absence of sulfhydryl groups (SH), presence of disulfide bonds (SS) and their relation to ligand properties. Comparative Biochemical Physiology. 73B: 251 - 256.
- NOBLE, R.W., KWIATKOWSKI, L.D., DE YOUNG, A., DAVIS, B.J., HAEDRICH, R.L., TAM, L. & RIGGS, A.F. 1986. Functional properties of hemoglobins from deepsea fish: correlations with depth distribution and presence of a swimbladder. Biochimica et Biophysica Acta. 870: 552 - 563.
- RAHN, H. 1966. Gas transport from the external environment to the cell. (In De Reuck, A.V.S. & Porter, R. red. Development of the lung. CIBA. London. 3 - 23 p.)
- READ, K.R. & TERWILLIGER, R.C. 1973. Molluscan mioglobins. Exp. in physiol and Biochem. 6: 153 - 170.
- ROSSI-FANELLI, A. & ANTONINI, E. 1958. Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human myoglobin. Archs Biochem Biophys. 77: 478 - 492.
- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1983. Animal physiology: Adaptation and environment. Cambridge University Press. Cambridge. 560 pp.

- SCHMIDT-NIELSEN, K. 1984. Scaling: Why is animal size so important? Cambridge University Press. Cambridge. 215 pp.
- SICK, H. & GERSONDE, K. 1969. Method for continuous registration of O₂-binding curves of Hemoproteins by means of a diffusion chamber. Analytical Biochemistry, 32: 362 - 376.
- TERWILLIGER, R.C., TERWILLIGER, N.B., BONAVENTURA, C. & BONAVENTURA, J. 1977. Oxygen binding domains of Heliosoma trivolvis hemoglobin. Biochemica et Biophysica Acta. 494: 416 - 425.
- TOMITA, S., INOKI, Y., SANTA, M., YOSHIDA, H. & YASUMITSU, Y. 1968. A simple spectrophotometric method for determination of met-hemoglobin in dilute solutions. The Journal of Nara medical association. 19: 1 - 6.
- UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H. & STAUFFER, J.F. 1972. Manometric and biochemical techniques. Burgess Publishing Company. Minneapolis Minnesota. 386 pp.
- VAN AARDT, W.J. & FREY, B.J. 1979. Oxygen consumption and responses of the freshwater snail Bulinus (Physopsis) globosus to gradients of different oxygen tensions. South African Journal of Zoology. 14 : 202 - 207.
- VAN ASSENDELFT, O.W. 1970. Spectrophotometry of haemoglobin derivatives. Charles C Thomas, Publisher. The Netherlands.
- VAN HOVEN, W. 1973. Aspekte van die ekologie en respiratoriese fisiologie van die akwatiese oligochaeta. Potchefstroom. 189 p. (Proefskrif (D.Sc.) - PU vir CHO).

- VAN SOMEREN, V.D. 1946. The habitats and tolerance ranges of Lymnaea (Radix) caillandi, the intermediate host of liver fluke in East Africa. Journal of Animal Ecology. 15: 170 - 197.
- VINOGRADOV, S.N. 1985. The structure of invertebrate extracellular hemoglobins (erythrocrucorins and chlorocrucorins). Comparative Biochemical Physiology. 82B: 1 - 15.
- WIESER, W. 1984. A distinction must be made between the ontogeny and the phylogeny of metabolism in order to understand the mass exponent of energy metabolism. Respiration Physiology. 55: 1 - 9.
- WIJSMAN, T.C.M., VAN DER LUGT, H.C. & HOOGLAND, H.P. 1985. Anaerobic metabolism in the freshwater snail Lymnaea stagnalis. Haemolymph as reservoir of D- lactate and succinate. Comparative Biochemical Physiology. 81B: 889 - 895.
- WOLMARANS, C.T. 1987. Respiration calcium and end products of carbohydrate metabolism. Comp. Biochem. Physiol.
In druk.

* Literatuur nie self geraadpleeg nie.