

DIE OPNAME EN VERSPREIDING VAN KOPERSULFAAT  
BY DIE VARSWATERSLAK *BULINUS (BULINUS)*  
*TROPICUS*.

*deur*

CORNELIUS TOBIAS WOLMARANS M.Sc.

*Slaknavorsingseenheid van die SAMNR*

*Departement Dierkunde*

*Potchefstroomse Universiteit vir CHO*

*Potchefstroom.*

Proefskrif voorgelê ter voldoening aan  
die vereistes vir die graad DOCTOR SCIENTIAE  
aan die Potchefstroomse Universiteit vir CHO

*Promotor:* Prof. W.J. van Aardt D.Sc.  
(V.U., A'dam.)

Potchefstroom

1984

*Aan Hanneke, De Wet en Deidré*

## ABSTRACT

### THE UPTAKE AND DISTRIBUTION OF COPPER SULPHATE BY THE FRESHWATER SNAIL *BULINUS (BULINUS) TROPICUS*

The copper concentration found in the haemolymph, shell and the whole snail was determined by atomic absorption spectrophotometry. These concentration values were designated as the background copper concentration. No copper was found in the snail haemolymph or the shell after a six hour exposure of snails to 1 ppm  $\text{CuSO}_4$ . This exposure to  $\text{CuSO}_4$  was done at a pH of 7,2 and 8,4.

Because of differences in the solubility of copper-sulphate at different pH levels the amount of copper available in aquarium water at pH 4, 7,2 and 8,4 was determined by atomic absorption spectrophotometry. Snails were exposed for six hours to 1 ppm  $\text{CuSO}_4$ . It was found that copper accumulated in the snails within the first 20 minutes. After this period no further accumulation occurred.

Snails which have accumulated copper do not release the copper into the water. For this experiment the water was analysed for copper for a period of 24 hours. This test was done using an atomic absorption spectrophotometer and radio-active copper.

Snails were also exposed to increasing concentrations of  $\text{CuSO}_4$  and at the same time the decrease

of copper from the water was monitored.

The relationship between copper uptake by the snail and its increasing metabolic rate showed that the rate of copper uptake does not increase with increasing metabolic activity.

An experiment to measure the adsorption of copper by dead snail tissue was performed. It was found that no adsorption of copper took place on this tissue. Adsorption of copper on Perspex and Pyrex glass containers was demonstrated in a series of experiments.

Transmission electron microscopy showed histological changes in the subepithelial tissues. Large vacuoles appeared just below the basement membrane. These changes were found in tissues of both the head and the tentacles of the snail.

The results obtained from the various experiments indicate that copper is adsorbed on the exposed body wall of the snail. It is suggested that chemisorption and not physisorption could be the underlying mechanism of adsorption of copper on the snail's outer epithelium.

## INHOUD

1.	INLEIDING	1
2.	MATERIAAL EN METODEDES	4
2.1	Herkoms, Versorging en teling van die proefdiere	4
2.2	Vorbereiding van die proefdiere vir eksperimente	7
2.3	Apparaat vir koperblootstellings= eksperimente	8
2.4	Slakverteringshouer	9
2.5	Blootstellingsparameters en werkwyses	12
2.6	Nablootstellingsbehandeling van proefdiere	13
2.6.1	Verwydering van blootstellings= medium vanaf lewende slakke	13
2.6.2	Verwydering van blootstellings= medium vanaf geïsoleerde slak= skulpe	14

2.7	Massabepalings	15
2.7.1	Liggaamsmassabepaling van 'n lewende slak	15
2.7.2	Massabepaling van slakskulpe	16
2.8	Vorbereiding van hemolimf-, totale slak- en skulpmonsters vir atoomabsorpsiespektrofotometer bepaling	16
2.8.1	Versameling van hemolimfmonsters	16
2.8.2	Vorbereiding van totale slakke en slakskulpe	18
2.9	Waswerkwyses	19
2.9.1	Teflonverteringshouer	19
2.9.2	Poli-etileen- en glashouers	22
2.10	Vorbereiding van koperstandaarde en kalibrering van die atoomabsorpsiespektrofotometer (AAS)	23
2.11	Eksperimentele opstelling vir $^{64}\text{CuSO}_4$ -opname deur die slakke	26
2.12	Vorbereiding van slakweefsel vir transmissie-elektronmikroskopie	28

### 3. EKSPERIMENTE

- 3.1 n Bepaling van die hoeveelheid koper wat natuurlik in totale slak- en slakhemolimfmonsters teenwoordig is 31
- 3.2 n Bepaling van die koperkonsentrasie in totale slakke en hemolimf na n blootstellingsperiode van ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by n pH van 8,4 34
- 3.3 n Bepaling van die koperkonsentrasie in totale slakke en hemolimf na n blootstellingsperiode van ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by n pH van 7,2
- 3.4 n Bepaling van die konsentrasie koper nadat 1,5640 g  $\text{CuSO}_4$  ( dpm koper as kopersulfaat) in blootstellings= mediums waarvan die pH onderskei= delik 7,2, 8,4 en 2,8 is, opgelos is 43
- 3.5 n Bepaling van die hoeveelheid koper wat natuurlik in slakskulpe teen= woordig is 47
- 3.6 n Bepaling van die koperkonsentrasie op slakskulpe nadat slakke vir twee, vier en ses ure aan 1dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 7,2 en 8,4 blootgestel is 48

3.7	<p> n Ondersoek na die moontlike  akkumulering van koper in die  slakweefsel oor n periode van  ses ure by pH 8,4 en 7,2 </p>	54
3.8	<p> Die verlies van koper uit die  blootstellingsmedium en die toe=  name van koper in skoon akwarium=  water tydens blootstelling </p>	63
3.9	<p> n Ondersoek na die afname van koper  uit n 1 dpm <math>\text{CuSO}_4</math>-blootstellings=  medium by pH 8,4 en 7,2 oor n  periode van een uur </p>	79
3.10	<p> n Ondersoek na die koperkonsentra=  sie in totale slakke wat vir ses  ure aan 1, 2, 3 en 4 dpm <math>\text{CuSO}_4</math> by  pH 8,4 blootgestel is </p>	85
3.11	<p> Die afname in die koperkonsentrasie  van n 2, 3 en 4 dpm <math>\text{CuSO}_4</math>-bloot=  stellingsmedium tydens n drie ure  blootstellingsperiode </p>	91
3.12	<p> n Ondersoek na die opname en vry=  stelling van <math>^{64}\text{Cu}</math> in die vorm van  kopersulfaat oor n periode van  2,5 ure by pH 8,4 </p>	95

3.13	n Eksperiment om die opname van koper by slakgroepe wat aan verskillende temperature blootgestel is, na te gaan	104
3.14	n Ondersoek na die moontlike adsorpsie van koper op die oppervlakke van die eksperimentele kamers	112
3.15	n Ondersoek om na te gaan of koper deur dooie slakweefsel geadsorbeer word	120
3.16	n Transmissie-elektronmikroskopiese ondersoek om die effek van $\text{CuSO}_4$ op die oppervlaktepoteel na te gaan	123
4.	ALGEMENE BESPREKING	128
5.	OPSOMMING	132
6.	DANKBETUIGINGS	135
7.	LITERATUURVERWYSINGS	136

## 1. INLEIDING

Die blootstelling van varswaterslakke aan kopersulfaat het verskeie nadelige effekte by die slakke tot gevolg. Van Aardt & Coertze (1981) het onder andere waargeneem dat daar 'n afname in die natrium-, chloried- en kalsiumkonsentrasie van die slakhemo-limf voorkom wanneer die slak *Bulinus (Bulinus) tropicus* aan 1 dpm koper as kopersulfaat blootgestel word. Ander effekte soos die terugtrekking van die slak se sagte materiaal in die skulp en verhoogde sekresie van mukus op die voetepiteel is deur Cheng & Sullivan (1974) waargeneem. Verskeie histopatologiese effekte is ook by die oppervlakepiteelweefsel van die rektaalfrif van *Biomphalaria glabrata* na koperblootstelling waargeneem (Sullivan & Cheng, 1975).

Na aanleiding van hierdie waarnemings het die vraag van hoe die swaarmetaal deur die slak opgeneem word en waar die toksiese invloed van die koper in die slak uitgeoefen word, ontstaan. Verskeie teorieë bestaan reeds in hierdie verband. Cheng & Sullivan (1974) het onder andere aangetoon dat daar 'n akkumulering van koper op die rektaalfrif van *B. glabrata* tydens blootstelling voorkom. Dit is egter nie duidelik of die koper in dié geval aktief opgeneem word en of dit deur 'n proses van adsorpsie op die rektaalfrif akkumuleer nie. Zylstra (1972) het die selektiewe opname van partikels deur *Lymnaea stagnalis* op die kopepiteel aangetoon. Eksperimente

deur Zylstra (1972) uitgevoer, dui daarop dat kolloïdale ferritien maar nie kolloïdale silwer deur die slak opgeneem word nie. Hierdie verskynsel word volgens die outeur aan sekere eienskappe van die partikel toegeskryf. Dit kom egter voor asof hierdie ferritien wel aktief deur die slak opgeneem word. Eksperimente wat deur Ryder & Bowen (1977) met die terrestriese slak *Agriolimax reticulatus* uitgevoer is, het aangetoon dat slegs die uitwendige epiteelweefsel wat met koper in aanraking gekom het positief vir koper getoets het. 'n Gevolgtrekking wat uit Ryder & Bowen (1977) se navorsing gemaak kon word, is dat koper waarskynlik deur 'n proses van adsorpsie deur die slak opgeneem word.

Dit is dus uit die inligting wat tot dusver verkry is duidelik dat dit nog nie moontlik is om te verklaar hoe koper opgeneem word en waar die toksiese effek van koper by die varswaterslakke begin nie.

In hierdie studie van 16 eksperimente is gepoog om meer duidelikheid oor hierdie probleem te verkry. Die eksperimente wat uitgevoer is, het dit onder andere ten doel gehad om na te gaan of (i) die koper deur die hemolimf opgeneem en versprei word, (ii) of die koper deur die sagte materiaal van die slak opgeneem word en weer vrygestel word, (iii) of die skulp 'n rol speel in die opname van koper by die slak, (iv) of daar 'n verband bestaan tussen slakmetabolisme en koperopname, (v) of koper deur dooie slakweefsel opgeneem word en (vi) watter

histopatologiese effekte koper op geselekteerde epiteelweefsels tot gevolg het. Daar is in die studie onder andere ook van die bepaling van koper met die atoomabsorpsiespektrofotometer in slakhemo= limf en verteerde slakweefsels gebruik gemaak. Hierdie tegniek wat sover bekend nog nie voorheen in soortgelyke studies aangewend is nie, het 'n groot sukses geblyk te wees.

## 2. MATERIAAL EN METODEDES

### 2.1 Herkoms, versorging en teling van die proefdiere

Vir sommige van die eksperimente is volgroeide slakke in natuurlike habitats versamel. Vir ander eksperimente is die slakke in die laboratorium geteel. Die proefdiere gebruik in eksperimente 1-3 was afkomstig vanuit 'n dammetjie geleë op die terrein van die Potchefstroomse Landboukollege (ruitverwysing  $26^{\circ} 44'$  S.B.,  $27^{\circ} 04'$  O.L.) terwyl die slakke gebruik in eksperimente 5 en 6 afkomstig is vanuit 'n dammetjie geleë op die plaas Wilgeboom 456 (ruitverwysing  $26^{\circ} 46'$  S.B.,  $27^{\circ} 05'$  O.L.), ongeveer 4 km suid van die Potchefstroomse dorpsgebied.

Eksperimente 7-11 is uitgevoer met slakke versamel in 'n dammetjie op die plaas Naauwpoort 385 (ruitverwysing  $26^{\circ} 04'$  S.B.,  $27^{\circ} 05'$  O.L.) ongeveer 4 km noord van Potchefstroom.

Eksperimente 12, 13 en 16 is uitgevoer met slakke wat in die akwarium geteel is van parentaalslakke wat ook versamel is op Naauwpoort 385.

Vir die voor-eksperimentele versorging van die veldslakke is hulle so gou doenlik na versameling in habitatwater na die laboratorium gebring waar hulle in slakakwariums geplaas is. Hierdie akwariums was dieselfde soos beskryf deur De Kock & Van Eeden

(1980).

Die watertemperatuur was konstant gehou op 25° (+ 1°C) terwyl 'n normale dag-nagsiklus met kunsmatige beligting gehandhaaf is. 'n Diafragma pomp is gebruik om voortdurend lug deur die akwariums te borel. Hierdie lug het nie net suurstof aan die slakke voorsien nie, maar volgens Frank (1963) bevorder die belugting van die water ook die oksidering van skadelike metaboliete.

Water afkomstig vanuit 'n boorgat geleë in die botaniese tuin van die PU vir CHO is as akwariumwater gebruik. Cheng & Sullivan (1977) het, in teenstelling hiermee, gedefoniseerde water gebruik wat verder met ander elemente verryk was. Die geleidingsvermoë van die water is slegs met die byvoeging van gedistilleerde water gereguleer om ooreen te stem met die geleidingsvermoë van die habitatwater waaruit die slakke afkomstig was. Hierdie geleiding het gewissel tussen 450 en 550  $\mu$ S terwyl die pH van die water gewissel het tussen 7,9 en 8,2 eenhede.

Die slakbakke wat gebruik is, het ooreengestem met dié soos gebruik deur De Kock (1973), Hamilton-Attwell (1973) en Coertze (1973). Elke slakbak bestaan uit 'n Perspex-ring met 'n deursnee van 16 cm en 'n diepte van 10 cm. Die bodem van die Perspex-ring is met perlongaas met 'n maasgrootte van 375 mikrometer en 'n deurlaatoppervlak van 43% bedek. Hierdie bakke is deur middel van aluminiumstafies in die slakakwariums gesuspendeer. 'n Gravitasiedrup afkomstig van

n aluminiumpypie is vir elke slakbak voorsien. Die slakke is daagliks na identiese skoon bakke ooregeplaas waarna hulle van voedsel voorsien is.

Die slakvoedsel vir die volgroeiende slakke het in dié geval ooreengestem met die voedsel soos gebruik deur Wolmarans (1979) met die uitsondering dat die "Tetramin Staple Food" in 'n verhouding van 1:1 met "Tetramin Conditioning Food" (Tetra Werke, Wes Duitsland) gemeng is.

Die voedsel en slakbakke wat vir die teling van slakke gebruik is, het op enkele uitsonderings na ooreengestem met die teelapparaat en voedsel aangewend by veldslakke. In eersgenoemde geval is die pasuitgeborede slakke aangehou in Perspex-bakke met 'n deursnee van 9,5 cm en 'n diepte van 5 cm. Die bodem van hierdie bakke was bedek met perlongaas met 'n maasgrootte van 45 mikrometer en 'n deurlaatoppervlak van 28%. Die klein slakkies is aanvanklik met "Tetramin Baby Fish Food" (Tetra Werke, Wes Duitsland) gevoed. Hierdie voedsel is toegedien totdat die slakke ongeveer 'n lengte van 5 mm bereik het. Hierna is die slakke na dieselfde bakke soos gebruik in die geval van veldslakke oorgedra en daarna van dieselfde voedsel soos gebruik vir volgroeiende slakke voorsien.

Die rede vir die oorskakeling van veldslakke na laboratoriumgeteelde slakke was as gevolg van periodieke tekorte aan veldslakke wat ondervind is by

die bepaalde habitats. Hierdie afname in die beskikbaarheid van veldslakke het voorgekom as gevolg van opeenvolgende swak reënseisoene wat tot die periodieke opdroging van die slakhabitats gelei het. Omdat Van Aardt & Coertze (1981) geen betekenisvolle verskille waargeneem het in die ion- en waterbalans van veldslakke en laboratoriumgeteelde slakke wat aan ooreenstemmende dosisse  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie, kon die veld- en laboratoriumslakke in hierdie eksperimente fisiologies met mekaar vergelyk word. Dit is egter belangrik dat die slakke nie met parasiete geïnfecteer moet wees wat tot fisiologiese verskille in die slakke aanleiding mag gee nie (Van Aardt & Coertze, 1981). Geen noemenswaardige parasietafskiedings is by *Bulinus (B.) tropicus*-veldeksemplare wat in dié studie gebruik is, waargeneem nie.

## 2.2 Voorbereiding van die proefdiere vir eksperimente

Aktief rondkruipende volgroeide slakke is 12 ure voor aanvang van 'n eksperiment geselekteer en oorgeplaas in 'n skoon bak. Tydens hierdie 12-ure periode is geen voedsel aan die slakke gegee nie. Hierdie uithongeringsperiode is nodig omdat dit in 'n mate daartoe bydra dat die proefdiere fisiologies meer vergelykbaar is. Minder defekasie en gevolglik ook minder besoedeling kom ook in die eksperimentele houers tydens 'n eksperiment voor (Greenaway, 1970). Na die 12-ure uithongeringsperiode is die slakke vinnig met gedistilleerde water (Yager & Harry,

1964) afgespoel om alle feses en ander onsuierhede te verwyder. Hierna is die proefdiere met handdoekpapier gedroog waarna die eierpakkies wat op die buiteoppervlak van sommige slakskulpe teenwoordig was, verwyder is. Die proefdiere was nou volledig voorberei vir die eksperimente.

### 2.3 Apparaat vir koperblootstellingseksperimente

Al die eksperimente is in 'n Perspex-waterbad voorsien van 'n Lauda-ultratermostaat met 'n sirkulasiepomp, uitgevoer. Die waterbad was 60 x 45 x 30 cm groot en kon 24 eksperimentele kamers huisves. Die eksperimentele kamers (fig. 1) kon in twee groepe van 12 op die eksperimentele kamerplatvorms ingeskuif word sodat hulle in pare langs mekaar gerangskik is. Die hoogte van die platvorms in die waterbad was sodanig dat die eksperimentele kamers ongeveer 1 cm bokant die wateroppervlak uitgesteek het nadat die waterbad maksimaal met water gevul was. Elke eksperimentele kamer was voorsien van druklug deur middel van dun poli-etileentoevoerpijpies (fig. 1). Die eksperimentele kamers (fig. 2a) was gemaak van deursigtige Perspex en het 'n deursnee van 5 cm en 'n hoogte van 10 cm gehad. Elke kamer was daarbenewens aan die een kant van 'n Perspex-bodem voorsien. In elke eksperimentele kamer is 'n proefdierkompartement ingebou bestaande uit 'n sentrale as waaraan twee ronde geperforeerde Perspex-skywe aangebring was (fig. 2b). Een van die skywe was permanent aan die een punt van die sentrale as

bevestig terwyl die ander skyf. vertikaal op die as kon beweeg. Hierdie skyf kon egter op 'n vereiste hoogte, afhangende van die hoeveelheid blootstellersvloeistof in die kamer, met behulp van 'n skroef aan die sentrale as vasgeskroef word. Die hele proefdierkompartement kon noupassend in die eksperimentele kamer inskuif. Die proefdiere wat tydens die blootstellingseksperimente tussen die twee Perspex-skywe geplaas is, kon dus nie uit die blootstellersmedium kruip nie. Elke kamer was verder voorsien van 'n Perspex-deksel (fig. 2c) met 'n openingtjie en lugtoevoerpypjie. Die doel van die openingtjie was enersyds vir monsterneming en andersyds om die ingevoerde lug weer te laat ontsnap.

#### 2.4 Slakverteringshouer

Hierdie houer, wat gebruik is om die slakke vir koeperebepalings vir die atoomabsorpsiespektrofotometer voor te berei, het bestaan uit 'n teflonblok van 150 mm x 150 mm x 24 mm. Eenhonderd verteringskamers met 'n deursnee van 9 mm en 'n diepte van 21 mm is in rye van 10 in die teflonblok geboor. Elke kamer kon dig afgesluit word met 'n styfpassende teflonpropjie. Tydens die verteringsprosesse is twee vlekvrystaal plate van 150 mm x 150 mm x 10 mm aan weerskante van die teflonblok deur middel van 8 mm skroewe aan die teflonblok en aanmekaar vasgeheg. Die rede hiervoor was om die teflonproppies wat as gevolg van die hoë druk wat tydens vertering in die verteringskamers ontstaan, in posisie te hou. Dit het verseker dat

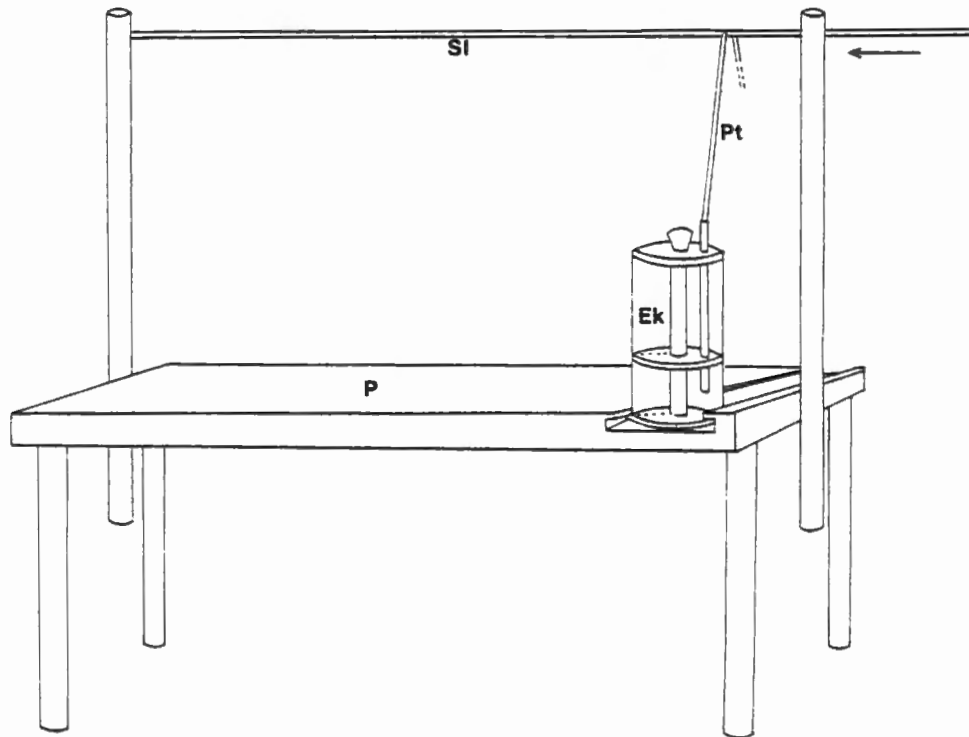
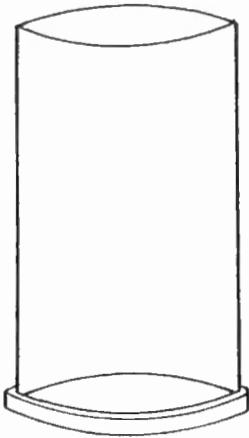
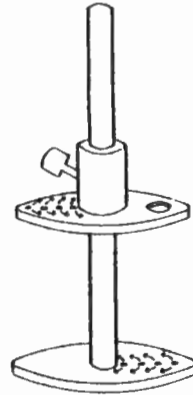


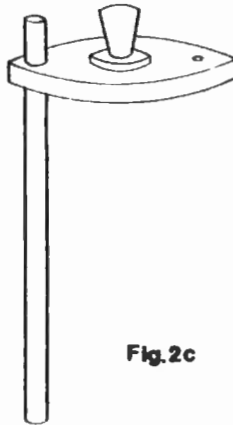
FIG. 1 n Diagrammatiese voorstelling van eksperimentele kamers (Ek) (waarvan slegs een kamer geteken is), platform (P) en polietilentoevoerpijpies (Pt) vanaf n sentrale lutoevoernyn.



**Fig. 2a**



**Fig. 2b**



**Fig. 2c**

**FIG. 2** n Diagrammatiese voorstelling van (a) n eksperimentele kamer, (b) die proef=dierkompartement en (c) die Perspex-deksel met lugtoevoerpyp.

daar geen monsterverliese tydens vertering plaasgevind het nie. Verteringshouers gemaak van dieselfde materiaal is gebruik deur Schipp & Hevert (1980). Die voordele wat teflon as materiaal vir so 'n houer inhou, is toe te skryf aan die chemiese inertheid daarvan sowel as aan die suur- en temperatuurbestande eienskappe wat hierdie materiaal vertoon. Hierdie eienskappe het daartoe bygedra dat daar geen koper op die wande van die verteringskamers geadsorbeer het nie en al die koper vir bepaling, sover vasgestel kon word, herwin is.

## 2.5 Blootstellingsparameters en -werkwyse

Al die eksperimente is uitgevoer by 'n temperatuur van  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Volgens De Kock (1973) is hierdie temperatuur optimaal vir groei van *Bulinus (B.) tropicus*. Die blootstellingsperiode met kopersulfaat het gewissel tussen een en ses ure.

Drukklug is tydens alle eksperimente aan die proefdiere voorsien wat onder andere ook die presipitering van die onopgeloste  $\text{CuO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$ -verbinding verhoed. Die blootstellingsdosis het gevarieer tussen 1 en 4 dpm\* $\text{CuSO}_4$  (1 dpm  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  het 0,3981 dpm Cu bevat). Hierdie blootstellingsdosis was opgemaak uit 'n stamoplossing van  $1000 \text{ cm}^3$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  wat verkry is deur 1,5640 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  van Merck (analities suiwer) af te weeg en op te los in 'n  $1000 \text{ cm}^3$  boorgatwater. Die pH van die water was aangepas na 7,2 en 8,4 deur die byvoeging van HCl (analities suiwer) van Merck en KOH verkry

\*Een deel per miljoen is gelyk aan  $1 \text{ mg Kg}^{-1}$  water.

van BDH. n "Orion Research" model 701 pH-meter is vir pH-metinge gebruik.

Slakke is in groepe van 10 verdeel wat afsonderlik in eksperimentele houers aan  $3 \text{ cm}^3$  blootstellingsmedium per slak blootgestel is.

Hierdie volume was klein in vergelyking met die blootstellingsvolume gebruik deur Cheng & Sullivan (1973) en Yager & Harry (1964). Laasgenoemde ondersoekers het  $10 \text{ cm}^3$  blootstellingsmedium per slak toegelaat terwyl van Aardt & Coertze (1981) ook  $3 \text{ cm}^3$  per slak gebruik het. In Yager & Harry (1964) se eksperimente het die blootstellingsperiode egter gewissel tussen ses en 72 ure terwyl daar ook nie melding gemaak word of druklug tydens die eksperimente voorsien is nie.

Die blootstellingseksperimente is telkens met 30 proefdiere per eksperiment gedoen en in sommige gevalle na bestudering van die resultate herhaal. Wat die kontrole-eksperiment betref, het die werkswyses ooreengestem met dié van die blootstellings-eksperimente behalwe dat die proefdiere in kopervrye akwariumwater geplaas is.

## 2.6 Nablootstellingsbehandeling van proefdiere

### 2.6.1 Verwydering van blootstellingsmedium vanaf lewende slakke

Nadat die slakke aan kopersulfaat blootgestel was, is hulle eers op handdoekpapier geplaas sodat die grootste hoeveelheid blootstellingsmedium vanaf die proefdiere kon dreineer (Chowdary, Rão & Narayanan, 1979; Raheem, El-Gindy & Al-Hassan, 1979). Hierna is die slakke oorgeplaas in skoon Pyrex-glasbekers met voldoende gedistilleerde water om  $10 \text{ cm}^3$  afspoelwater per slak beskikbaar te stel. In vergelyking hiermee het Cheng & Sullivan (1974) gedeïoniseerde water as afspoelmedium gebruik. Die afspoelperiode van vyf minute is drie maal herhaal. Hierdie metode het verhoed dat daar nog blootstellingsmedium in die mantelholte en op ander uitwendige dele van die slak teenwoordig was. Dit is waargeneem dat die proefdiere reeds na ongeveer twee minute tydens die eerste afspoelperiode in die gedistilleerde water begin rondbeweeg het. Hierdie aktiewe bewegings sou verder daartoe kon bydra dat prakties alle kopersulfaat uit die mantelholte verwyder kon word.

#### 2.6.2 Verwydering van blootstellingsmedium vanaf geïsoleerde slakskulpe

Alvorens slakskulpe afgespoel kon word, moes hulle eers van die sagte materiaal van die slakke geskei word. Hierdie skeiding is bewerkstellig deur die proefbuismetode soos beskryf deur Van Aardt & Coertze (1981) toe te pas. Vir dié metode is 'n slak in 'n leë proefbuis geplaas en vir 45 sekondes in kokende water geplaas. Hierdie metode wat vinnig en doeltreffend was, het daartoe bygedra dat liggaams =

vloeistof wat in die skulp agterbly nadat die sagte materiaal met 'n pinset verwyder is, nog vloeibaar was en dus maklik uitgewas kon word.

In teenstelling met hierdie metode het Cheng & Sullivan (1977) die skulp deur middel van disseksie van die sagte materiaal geskei. Die skulpe is vervolgens, nadat die sagte materiaal verwyder is, in 'n skoon glasbeker met 10 cm<sup>3</sup> gedistilleerde water per slakskulp geplaas. In hierdie geval is die beker met skulpe op 'n magnetiese roerder geplaas waar die skulpe vir vyf minute lank matig geskommel is. Hierdie werkwys is ook drie maal herhaal waarna die skulpe uit die water verwyder is en op handdoekpapier geplaas is sodat die grootste hoeveelheid afspoelwater kon dreineer. Daarna is dit vir 10 minute in 'n oond van 60°C gehou vir volledige droging.

## 2.7 Massabepalings

### 2.7.1 Liggaamsmassabepaling van 'n lewende slak

Slakmassa word gedefinieer as die som van die skulp= massa en die massa van die sagte materiaal. Hierdie slakmassabepalings is gedoen nadat alle oortollige eksterne blootstellingsmedium wat nie op een of ander wyse aan die slak gebind is nie, verwyder is. Dit is gedoen deur lewende slakke vir een minuut lank met skulpopeninge op handdoekpapier 20 cm vanaf 'n 60 watt gloeilamp te plaas. Die lamphitte het daartoe

bygedra dat die slakke uitwendig vinnig droog geword het terwyl die handdoekpapier die dreinerings van water tussen die skulp en die sagte materiaal bespoedig het. Die slakmassa is direk hierna met 'n Mettler-balans tot 'n noukeurigheid van 1 mg bepaal.

### 2.7.2 Massabepaling van slakskulpe

Die slakskulpe is, nadat die meeste afspoelwater op handdoekpapier gedreineer is, vir 12 ure in 'n oond by 60°C geplaas. Dit is gedoen omdat nie al die water uit die skulp gedreineer het nie. Hierdie drogingstemperatuur en -periode is voldoende gevind om die skulp volledig te droog. Die massa van die skulpe is hierna met 'n Mettler-balans ook tot 'n noukeurigheid van 1 mg bepaal.

## 2.8 Voorbereiding van hemoïmf-, totale slak- en skulpmonsters vir atoomabsorpsiespektrofotometriese bepalings

### 2.8.1 Versameling van hemoïmfmonsters

Bloedmonsters vir koperbepalings is verkry deur toepassing van die Bekius-effek (Lever & Bekius, 1965). Die werkwyse om 'n bloedmonster te verkry het ooreengekom met die metode toegepas deur Coertze & Van Aardt (1978) en Van Aardt & Frey (1981) wat hemoïmf by *B. (B.) tropicus* en *B. (P.) globosus* versamel het. Die slak is vooraf eers deeglik met hand-

doekpapier droog gemaak. Dit is veral belangrik om daarop te let dat alle oortollige mukus wat op die slakvoet teenwoordig is, verwyder moet word omdat dit geneig is om met die vrygestelde hemo=limf te meng terwyl dit ook die opsuig van bloed aansienlik bemoeilik deurdan dit die opsuigkapillêr verstop. Die slak is hierna omgekeer sodat die voetoppervlak blootgestel is en onder n disseksie= mikroskoop in dié posisie gehou. n Twintig  $\mu\text{dm}^3$  glaskapillêr waarvan die punt aan n rubber suigbuisie gekoppel is, word dan gebruik om die ventrale voetoppervlak en mantelrand meganies te prik. Die slak reageer op die aanraking deur vinnig in die skulp terug te trek met die gevolglike vrystelling van hemolimf vanuit die hemaalporie (Lever & Bekius, 1965). Hierdie hemolimf beland via die pneumostoom op die terugtrekkende ventrale voetoppervlak. Hemo=limf wat op dié wyse versamel word, is met behulp van die suigbuisie tot in die glaskapillêr opgesuig. Hoeveelhede van  $8 \mu\text{dm}^3$  tot  $27 \mu\text{dm}^3$  is op hierdie wyse by verskillende groottes slakke versamel. Die versamelde hemolimf se soortlike massa is telkens bepaal waarna elke versameling afsonderlik na poli-etileenproef= buise oorgedra is. By elke hemolimfmonster is  $20 \mu\text{dm}^3$  gedistilleerde water gevoeg om die viskositeit van die hemolimf te verlaag. Dit was noodsaaklik omdat onverdunde hemolimf die verstopping van die monsterdeponeerder van die atoomabsorpsiespektrofotometer veroorsaak het. Hierdie hemolimfmonsters was hierna gereed vir koperbepalings in die elektrotermiese grafietoond van die atoomabsorpsiespektrofotometer.

tometer.

## 2.8.2 Voorbereiding van totale slakke en slak=skulpe

Die slakke is nadat hulle geweeg is, oorgeplaas na die teflonverteringshouer met dien verstande dat daar net een slak in elke verteringskamer teenwoordig was. Dit het ooreengestem met Cheng & Sullivan (1974) en Benson, Brock, Gabica & Loomis (1976)se metode wat ook ongedroogde weefselmonsters direk aan chemiese vertering onderwerp het. In teenstelling hiermee het Watling & Watling (1976) eers die slakmonsters vir 48 ure by 105°C gedroog en daarna verteer. In elke verteringsruimte is 0,2 cm<sup>3</sup> 55% chemies suiwer HNO<sub>3</sub> gevoeg. Die gas wat ontwikkel as gevolg van die reaksie tussen die HNO<sub>3</sub> en slakskulp is toegelaat om te ontsnap voor die ruimte met die teflonproppies en metaalplate verseël is. Hierdie volume HNO<sub>3</sub> was relatief klein in vergelyking met die 3 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> wat Cheng & Sullivan (1974) per monster, wat uit 3 kopdele bestaan het, gebruik het. Vir hierdie studie was 0,2 cm<sup>3</sup> HNO<sub>3</sub> voldoende omdat die relatiewe groot druk en temperatuur wat in die klein volume van die verteringskamer (1,4 cc) tydens verhitting voorgekom het, meegehelp het om die slakmonsters volledig te verteer. Hierdie vertering is uitgevoer by 'n temperatuur van 70°C vir ses ure. Na die verteringsperiode was dit essensieel dat die verteringshouer toegelaat is om na kamertemperatuur af te koel voordat die teflonproppies verwyder kon word. By elke

verteerde slak is dan 1 cm<sup>3</sup> skoon gedistilleerde water gevoeg (Benson et al., 1976). Die byvoeging van gedistilleerde water het enersyds die volume vir analise vergroot en andersyds die viskositeit van die verteerde oplossing verminder om sodoende die opsuiging van die monster in die atoomabsorpsiespektrofotometer te vergemaklik. 'n Groter analisevolume was in hierdie geval noodsaaklik omdat die vlamge-deelte van die apparaat 'n baie groter volume van die monster per bepaling benodig in vergelyking met die elektrotermiese grafietoond. Daarbenewens het die groter volume monster ook verskeie bepalings in die-selwe monster moontlik gemaak wat tot verhoogde noukeurigheid gelei het. Die vertering van die skulpe het ooreengestem met die verteringsprosedure van totale slakke. Na vertering is 1 cm<sup>3</sup> gedistil-leerde water by die verteerde oplossing gevoeg waar-na die koperinhoud van die skulpe met die vlam van die apparaat bepaal is.

## 2.9 Waswerkwyses

### 2.9.1 Teflonverteringshouer

Om kruiskontaminasie van die slakmonsters en verte-ringskamers te verhoed, is gestandaardiseerde waspro-sedures essensieel. Die teflonverteringshouer is voor elke verteringsprosedure deeglik skoongemaak deur die verteringsruimtes herhaaldelik met 55% chemies-suiwer HNO<sub>3</sub> te spoel. Hierna is elke ruimte gevul met 'n mengsel van gedistilleerde water en

Extran-laboratoriumseep. Met behulp van 'n proefbuisborsel is hierdie ruimtes deeglik met die seepoplossing gewas. Hierdie meganiese aksie het daartoe bygedra dat alle residue van die vorige verteringsproses verwyder kon word. Die seepmengsel is hierna met gedistilleerde water uitgespoel waarna die ruimtes weer deeglik met  $\text{HNO}_3$  gewas is. Die gebruik van  $\text{HNO}_3$  het verseker dat alle koper wat nog in die kamers teenwoordig was, verwyder kon word. Die verteringshouer is hierna in 10% chemies-suiwer  $\text{HNO}_3$  geberg terwyl dit net voor gebruik deeglik met gedistilleerde water uitgespoel is.

Die gedistilleerde water wat in alle gevalle vir die studie gebruik is, was afkomstig van 'n Barnstedt-distilleerder. Alle dele van die apparaat wat met die gedistilleerde water in aanraking kom, is met tin bedek om die moontlikheid van metaalkontaminasie van die water te verhoed. Verder was die apparaat voorsien van 'n hoë suiwerheidskamer wat ontwerp is om vlugtige onsuiverhede van die distillaat te verwyder. Atoomabsorpsiespektrofotometriese bepalinge om die koperinhoud van die gedistilleerde water na te gaan, het getoon dat die water volkome vry is van koper.

Om die effektiwiteit van die wasprosedure soos toegepas op die verteringshouer na te gaan, is die volgende eksperiment uitgevoer. 10 Slakke is vir ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel. Die slakke is hierna uit die blootstellingsmedium verwyder, drie

maal vir vyf minute lank in gedistilleerde water afgespoel en oorgeplaas in die kamers van die verteeringshouer. Salpetersuur is by elke slak gevoeg waarna die kamers met die teflonproppies en metaalplate verseël is. Vertering het hierna soos reeds bespreek, plaasgevind. Vervolgens is die verteringshouer toegelaat om af te koel waarna die teflonproppies en metaalplate verwyder is. Die verteerde oplossing is hierna by 'n temperatuur van 80°C ingedamp.

Die ingedampte verteerde produkte is weer met  $\text{HNO}_3$  in oplossing gebring en daarna met behulp van 'n pipet oorgeplaas na skoon 5 cm<sup>3</sup> poli-etileenproefbruis. Hierna is die reeds bespreekte wasprosedure op die verteeringshouer toegepas. Die verteeringshouer is deeglik drooggemaak en met gedistilleerde water gevul. Hierdie water is vir 'n kort periode met 'n kwartsglasstafie geroer waarna die water onttrek is en ook na skoon 5 cm<sup>3</sup> poli-etileenproefbruis oorgeplaas is. Die koperkonsentrasies van beide die verteerde slakmonsters sowel as die gedistilleerde watermonsters is hierna bepaal.

Die resultate het getoon dat die koperkonsentrasies van die gedistilleerde watermonsters ooreengestem het met die gedistilleerde watermonster wat as kontrole gedien het. In teenstelling hiermee was die koperkonsentrasies in die verteerde slakmonsters so hoog dat dit buite die meetbare gebied van die atoomabsorpsiespektrofotometer geval het. Op grond

van hierdie bevindings is aanvaar dat die wasprosedure effektief genoeg was om herhaaldelike gebruik van die verteringshouer moontlik te maak.

### 2.9.2 Poli-etileen- en glashouers

Alle poli-etileenhouers en glasware wat in die voorbereiding van die koperstandaarde sowel as in die eksperimente gebruik is, is op 'n gestandaardiseerde wyse skoongemaak.

Die glasware is vooraf eers deeglik met Extran-laboratoriumseep gewas om alle vetterigheid te verwyder. Hierna is die glasware afgespoel met 'n mengsel bestaande uit 50 cm<sup>3</sup> hidrofluorsuur, 50 cm<sup>3</sup> van 'n 55% chemies-suiwer HNO-oplossing, 100 cm<sup>3</sup> Extran-laboratoriumseep en 800 cm<sup>3</sup> gedistilleerde water. Die glasware is hierna weer twee keer met gedistilleerde water afgespoel en daarna by 70°C in 'n oond gedroog.

Die poli-etileenhouers is hoofsaaklik gebruik om die koperstandaardoplossings in te berg en is gebruik om die atoomabsorpsiespektrofotometer te kalibreer. Die Kartell-poli-etileenhouers was chemies van 'n hoë kwaliteit en het min metaalonsuiwerhede bevat. Om die houers skoon te maak is hulle eers met 'n nylonborsel en Extran-laboratoriumseep gewas om alle fisiese kontaminasie en vetterigheid te verwyder. Hierna is die houers met kraanwater, gevolg deur gedistilleerde water afgespoel. Elke

houer is vervolgens vir n periode van 48 ure met 5% Extran-seep gevul en daarna met gedistilleerde water afgespoel. Hierna is die houers vir 24 ure gevul met n oplossing bestaande uit 2 dele gedistilleerde water, twee dele 10%  $\text{HNO}_3$  en een deel 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Hierdie oplossing is verwyder waarna die houers weer met gedistilleerde water gespoel is. Al die houers is voorts met 1% HCl-oplossing gevul en so gelaat tot dat dit vir eksperimente benodig was.

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

Die kalibrasiereeks is daargestel deur vyf verskillende koperkonsentrasieoplossings op te maak. Hier konsentrasies het vir kalibrering van die vlamgedeelte van die apparaat gewissel van 0,1 dpm tot 0,5 dpm. Vir kalibrering van die elektrotermiese grafietoond het die reeks bestaan uit koperkonsentrasies wat gewissel het van 0,02 tot 0,1 dpm. Hierdie twee reekse standaard is verkry uit n stamoplossing van 1 000 dpm koper as kopersulfaat, afkomstig van n Titrisol-oplossing (Merck). Elke reeks is met  $\text{HNO}_3$  aangesuur om n konsentrasie van 10% suur in die poli-etileenhouers te verkry. Die byvoeging van  $\text{HNO}_3$  by die oplossing het daartoe bygedra dat die rakleef tyd van die standaard aansienlik verleng is sodat geskikte kalibrasiekrommes met die standaard oor n relatief lang periode verkry kon word. Die standaardreeks is gebruik om die apparaat te opti=

maliseer terwyl die kalibrasiekrommes verkry uit hierdie reeks, gebruik is om die absorpsiewaardes van die eksperimentele monsters in konsentrasie-eenhede (dpm) af te lees.

Die golflengte vir die bepaling van koper was 324,7 nm, terwyl die spleetwydte 0,5 nm was. Vir die bepaling van koper is van asetyleengas en lug gebruik gemaak (Kinson & Belcher, 1964 en Platte & Marcy, 1965.) Die apparaat is op n 3,5 m.ampere stroomsterkte vir die kodelamp ingestel.

Vir gebruik van die elektrotermiese oond, wat wye aanvaarding as roetinemetode in laboratoriums geniet (Zatka, 1978), is geskikte periodes en temperature vir die drogings-, verassings- en atomiseringsfases soos volg vasgestel.

Vir hierdie program is n  $5 \mu\text{dm}^3$  hemolimfmonster vir een minuut by  $100^\circ\text{C}$  gedroog, daarna vir 30 sekondes by  $250^\circ\text{C}$  veras en toe vir drie sekondes by  $2500^\circ\text{C}$  geatomiseer. Geen sigbare monsterverliese is met hierdie program waargeneem nie. Dit is belangrik om toe te sien dat die monsterdeponering binne-in die grafiëtbuisie sodanig plaasvind dat geen monsterverliese voorkom alvorens die temperatuurprogram in werking is nie. Volgens Zatka (1978) kan een grafiëtbuisie vir tussen 20 en 50 herhalings tot n atomiseringstemperatuur van  $2700^\circ\text{C}$  verhit word voordat n afname in die sensitiwiteit van die bepalings voorkom. In hierdie studie is die aan-

tal monsters wat met 'n enkele grafietbuis bepaal is tot 15 beperk. Dit het verseker dat die grafietbuis waarmee die bepalinge gedoen is altyd van 'n goeie gehalte was.

Nadat die apparaat vir die elektrotermiese oond optimaal ingestel was, is 'n kalibrasiekromme opgestel. Dit is gedoen deur 'n reeks van ses bekende hemolimf-volumes te neem en onderskeidelik 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 en 1,0 dpm Cu by te voeg. Deur die gemete absorpsiewaardes grafies teenoor die bekende konsentrasies uit te sit, is 'n reguit lyn verkry. Hierdie reguit lyn het 'n direkte eweredigheid tussen konsentrasie en absorpsie tot en met 'n konsentrasie van 1 dpm Cu verteenwoordig. Dit is gevind dat indien hemolimf of enige ander monster met hoër as 1 dpm koperkonsentrasies gemeng is dit nie meer direk eweredig met die absorpsiewaardes is nie (Welz, 1976). Hieruit is dit duidelik dat wanneer die grafietoond gebruik word monsterverdunning sodanig moet plaasvind dat die omskakeling van absorpsiewaardes na konsentrasiewaardes op die deel van die korreksiekromme geskied wat nog 'n direkte eweredigheid tussen konsentrasie en absorpsie verteenwoordig. Hierdie voorwaarde is ook van toepassing op elementbepalinge met die vlamgedeelte. Dit was verder noodsaaklik om telkens wanneer bepalinge gedoen word 'n nuwe korreksiekromme op te stel omdat 'n eenmalige optimalisering van die apparaat daagliks deur 'n verskeidenheid van faktore beïnvloed kon word.

## 2.11 Eksperimentele opstelling vir $^{64}\text{CuSO}_4$ -opname deur die slakke

Die bepaling van  $^{64}\text{Cu}$  is uitgevoer met 'n gammaspektrometer (Outogammaspektrometer, model 5000, Packard Instrument Co.) gekoppel aan die elektronika van 'n vloeistofsintillasiespektrometer (Tri-Carb, model 3003, Packard Instrument Co.). Uit 'n energiespektrum van  $^{64}\text{Cu}$  is vasgestel dat by 'n versterkingstand van 55% die gammapië afkomstig van annihilasiestraaling van  $^{64}\text{Cu}$  tussen 400 en 670 KeV lê. Hierdie pië van die spektrum is verkry deur 'n geskikte hoeveelheid radioaktiwiteit van  $^{64}\text{Cu}$  by  $1\text{ cm}^3$  gedistilleerde water te voeg en dit in 'n plastiekproefbuis in die putkristal van die gammaspektrometer te tel (fig. 3). Die eksperimentele opstelling en prosedures vir die blootstelling van die proefdiere aan  $^{64}\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  het, op enkele uitsonderings na, ooreengestem met die blootstellingsprosedures vir atoomabsorpsiespektrofotometrie. Radioaktiewe kopersulfaat met 'n massa van 1,5640 gram en 'n aktiwiteit van 3,7 GBq is van die Atoomenergiekorporasie van Suid-Afrika verkry. Hierdie isotoop met 'n halfleeftyd van 12,9 ure het verskil van die  $^{67}\text{Cu}$  wat deur Cheng & Sullivan (1974) vir slakke gebruik is deurdat die halfleeftyd van  $^{67}\text{Cu}$  61,88 ure was en dus meer geskik was vir langtermyneksperimente. In hierdie studie is  $^{67}\text{Cu}$  nie gebruik nie, eerstens omdat dit aansielik duurder was om te vervaardig en tweedens omdat slegs korttermyneksperimente uitgevoer is. Die radioaktiewe kopersulfaat is in  $1\text{ dm}^3$  akwarium=

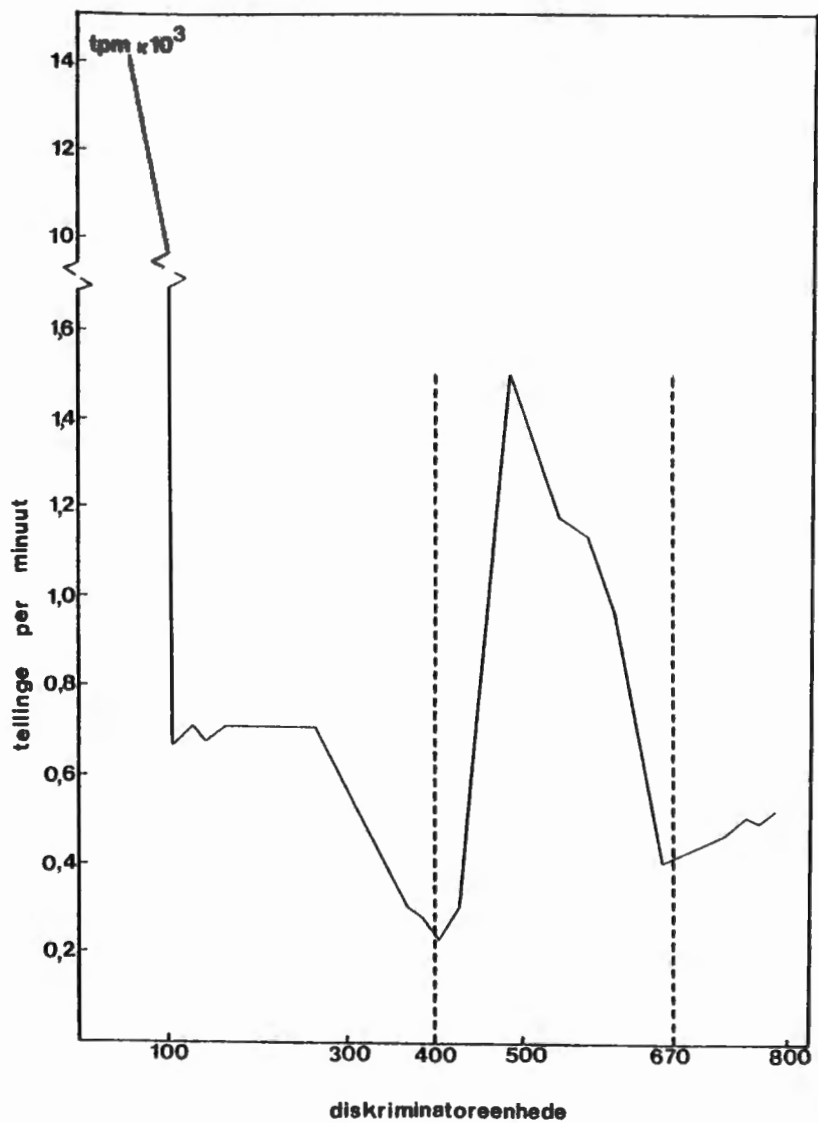


FIG. 3 Die energiespektrum van  $^{64}\text{Cu}$  (KeV).

water met 'n pH van 8,4 opgelos. Uit hierdie 1 000 dpm stamoplossing is 'n 2 dpm-blootstellingsoplossing opgemaak. Die blootstellingsoplossing het met aanvang van die eksperiment 'n soortlike aktiwiteit van 2 358 tpm per  $\text{cm}^3$  gehad. Die proefdiere is vir die doeleindes van hierdie eksperimente in groepe van 10 sowel as individueel aan  $^{64}\text{Cu}$  blootgestel. Die slakke is tydens blootstelling op spesifieke tydsintervalle uit die blootstellingsmedium verwyder en in gedistilleerde water afgespoel. Hierna is die proefdiere afsonderlik in 1  $\text{cm}^3$  skoon gedistilleerde water in 'n plastiekproefbuis geplaas en vir een minuut getel. Die slakke is daarna dadelik weer in die oorspronklike blootstellingsmedium teruggeplaas om weer later getel te word. Een  $\text{cm}^3$  van die blootstellingsmedium is op spesifieke tydsintervalle verwyder en in die gammaspektrometer getel om 'n moontlike afname in aktiwiteit tydens die blootstellingsperiode in die medium aan te toon. Hierdie bepaling is ook nadat die slakke uit die blootstellingsmedium verwyder is en in ongemerkte water oorgeplaas is, herhaal om na te gaan of daar 'n verlies van radioaktiwiteit vanuit die slakke na die water plaasvind. Vervalkorreksies vir die  $^{64}\text{Cu}$  is waar nodig aangebring.

## 2.12 Voorbereiding van slakweefsel vir transmissie-elektronmikroskopie

Vir hierdie ondersoek is die slakke aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel en daarna soos volg vir transmissie-

elektronmikroskopie voorberei. Die proefdiere is na die blootstellingsperiode vir vyf minute oorgeplaas in akwariumwater om toe te laat dat hulle begin rondbeweeg en om te verseker dat al die proefdiere lewend is. Hierna is die slakskulpe met behulp van 'n skêrtjie en pinsette verwyder waarna die tentakels en gedeeltes van die uitwendige kop-epiteel van elke slak verwyder is. Soortgelyke orgaan- en weefselfragmente is ook van kontroleslakke verwyder wat nie aan kopersulfaat blootgestel was nie. Hierdie tipe orgaan- en weefselfragmente is geselekteer omdat die tentakels, in teenstelling met die voetepiteel, tydens blootstelling altyd met die blootstellingsmedium in aanraking kom. Die dorsale kopepiteel is gekies omdat bewyse bestaan dat ferritien deur hierdie epiteel opgeneem word (Zylstra, 1972).

Die verwydering van hierdie weefsels is gedoen in  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  Piperazine-NN'-bis-2-etaan-sulfoonsuur (PIPES) wat as buffer gedien het en wat met NaOH na 'n pH van 7,4 aangepas is (Salema & Brandão, 1973). Hierna is die weefsel met 'n mengsel van 2% glutaaraldehyd in  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  (PIPES) by 'n pH van 7,4 vir vier ure by  $0^\circ\text{C}$  gefikseer. Hierdie fikseermiddel het verskil van dié gebruik deur Cheng & Sullivan (1974) wat Zenker se fikseermiddel gebruik het. Vir Lymnaea stagnalis het De Jong-Brink (1976) en Roubos (1976) 'n mengsel van 0,8% glutaaraldehyd en 1%  $\text{OsO}_4$  met veronal-asetaat as buffer gebruik. Die weefsel is vervolgens drie maal vir vyf minute

elk in PIPES gewas en daarna vir drie ure oorgeplaas in 'n mengsel van 1%  $\text{OsO}_4$  en  $0,05 \text{ mol dm}^{-3}$  buffer by 'n pH van 7,4. Die weefselfragmente is hierna gedroog deur dit telkens vir 30 minute lank opeenvolgend in asetoonkonsentrasies van 30%, 50%, 70%, 90% en 100% te plaas. Uitdroging in 100% asetoon is drie keer herhaal waarna die weefsel weer 30 minute in 'n mengsel van 30% Spurr-hars (Spurr, 1969) en asetoon geplaas is. Hierna is die weefsel vir 30 minute in 'n mengsel van 60% Spurr-hars en asetoon gehou waarna 100% Spurr-hars twee maal vir 12 ure lank by die weefselfragmente gevoeg is. Die weefsel is vervolgens in 100% Spurr-hars in 'n gietblokkie geplaas en by 'n temperatuur van  $80^\circ\text{C}$  vir 12 ure lank gelaat om te polimeriseer.

'n Reichert model Om  $U_3$  ultramikrotoom met 'n diamantmes is gebruik om weefsel snitte met 'n dikte van silwer tot goud (60-80 nm) te maak. Hierdie snitte is op HT-kopperroostertjies met 'n maas van 200 geplaas waarna die snitte vir 25 minute met 4% waterige uranielasetaat gekleur is. Elke snit is hierna herhaaldelik met gedistilleerde water wat gekook is, afgespoel en daarna vir vyf minute oorgeplaas in loodsitraat (Reynolds, 1963). Die gedistilleerde water word gekook om die maksimum hoeveelheid  $\text{CO}_2$  te verwyder omdat dit lei tot die vorming van loodkarbonaatkristalle wat duidelik op die snitte sigbaar is. Na kontrastering met loodsitraat word die snitte weer herhaaldelik gespoel met  $0,02 \text{ mol dm}^{-3}$  NaOH wat ook met gekookte gedistilleerde water

opgemaak is. Die snitte is hierna ook met gekookte gedistilleerde water afgespoel en gelaat om te droog. 'n Phillips model EM 301 HRG transmissie-elektronmikroskoop, aangewend by 60 kV, is gebruik om die snitte vir histologiese veranderings te ondersoek. Elektronmikrograwe is van die snitte gemaak.

### 3. EKSPERIMENTE

#### 3.1 'n Bepaling van die hoeveelheid koper wat natuurlik in totale slak- en slakhemolimfmonsters teenwoordig is.

Die doel van hierdie ondersoek was om te bepaal hoe groot die koperkonsentrasies is wat natuurlik in "totale slakke" (slakskulp en sagte materiaal) en hemolimfmonsters afsonderlik voorkom.

Vir hierdie bepaling is twee groepe van 25 proefdiere geneem en vir die genoemde periode uitgehonger waarna die slakke gedroog is. Die massa is vervolgens noukeurig bepaal waarna 'n bekende hoeveelheid hemolinf van elke proefdier onttrek is. Die soortlike massa van die hemolinf is vasgestel deur die massa van vyf hemolimfmonsters waarvan die volumes bekend is, te bepaal en te bereken wat die massa van  $1 \text{ cm}^3$  hemolinf is. Hierdie waarde is vasgestel op 1,04 g en is gebruik vir die berekening van die massas van die hemolimfmonsters wat in die eksperimente vir koperbepalings onttrek is. Die versamelde hemolimfmonsters is oorgeplaas in skoon  $1 \text{ cm}^3$  poli-etileen=

proefbuis waarna  $20 \mu\text{dm}^3$  gedistilleerde water by elke hemolimfmonster gevoeg is. Die hemolimfmonsters was hierna gereed vir koperbepalings.

Die totale slakke is, nadat hemolimfmonsters geneem is, geweeg en daarna in die teflonverteringsblok verteer. Hierna is by elke verteerde slakmonster  $1 \text{ cm}^3$  gedistilleerde water gevoeg waarna die verteerde oplossings oorgeplaas is in skoon  $5 \text{ cm}^3$  poli-etileenproefbuis. Die koperkonsentrasies is hierna bepaal. Die resultate van beide bepalinge wat in duplikaat uitgevoer is, word in tabel 1 getoon.

#### Bespreking van die resultate

Soos gesien in tabel 1 is die koperkonsentrasie wat natuurlik in die slakke voorkom baie hoër in totale slakke as in slakhemolimf. 'n Replikaateksperiment is uitgevoer om die betroubaarheid van die analise-metode na te gaan. Hierdie koperkonsentrasie wat in die hemolimf gevind is, was heelwat minder in vergelyking met die koper in die hemolimf van die landslak *Strophocheilus oblongus musculus*. In dié geval was die koperwaarde ongeveer 79 dpm wat toegeskryf moet word aan die hemosianienbloedpigment wat ryk aan koper is (De Jorge, Ulhôa Cintra, Haeser & Sawaya, 1965). Soortgelyke bevindinge is gemaak deur Bryan, Potts & Forster (1977) by die mariene slak *Haliothis tuberculata*, wat ook hemosianien besit.

Die relatief lae koperkonsentrasie in die hemolimf

TABEL 1. 'n Vergelyking van die gemiddelde koperkonsentrasies in dpm natuurlik teenwoordig in slakhemolimf (100 mg) en totale slakke (100 mg). Elke bepaling is met 25 slakke uitgevoer.

Bepalings in duplikaat	Koperkonsentrasie per 100 mg hemo= limf	Gemiddelde totale slakmassa in mg	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak
1	$7,88 \times 10^{-5}$	131,51	$4,34 \times 10^{-3}$	$3,34 \times 10^{-3}$
2	$8,02 \times 10^{-5}$	120,92	$5,80 \times 10^{-3}$	$4,92 \times 10^{-3}$
Gemiddeld vir 50 slakke	$7,95 \times 10^{-5}$	126,21	$5,07 \times 10^{-3}$	$4,13 \times 10^{-3}$
SA	$3,92 \times 10^{-5}$		$1,38 \times 10^{-3}$	$1,54 \times 10^{-3}$

wat by *B. (B.) tropicus* gevind is, kan toegeskryf word aan die feit dat hierdie slak hemoglobien as bloedpigment het wat nie koper nie, maar wel yster bevat.

Die aansienlik groter koperkonsentrasies wat in totale slakke gevind is, kan moontlik toegeskryf word aan 'n bepaalde orgaan of ensiem wat ryk aan koper is. Met verwysing na die koperkonsentrasie in totale slakke is daar nie onderskeid gemaak tussen die slakskulp en die sagte materiaal van die slak nie. Dit is dus moontlik dat die slakskulp 'n bydrae kan lewer tot die groter koperkonsentrasie wat in die totale slakke gevind is. Om hierdie moontlikheid op te klaar, sou dit wenslik wees om 'n eksperiment uit te voer waarin die koperkonsentrasie in die skulp sowel as in die sagte materiaal afsonderlik bepaal kan word. 'n Sodanige eksperiment is later in hierdie ondersoek uitgevoer. (Kyk bladsy 47).

### 3.2 'n Bepaling van die koperkonsentrasie in totale slakke en hemolimf na 'n blootstellingsperiode van ses ure aan 1 dpm $\text{CuSO}_4$ by 'n pH van 8,4

Die doel van hierdie eksperiment was om na te gaan of daar 'n toename in die koperkonsentrasie van hemolimf en totale slakke voorkom wanneer die slakke aan 'n eksterne dosis van 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel word. Hierdie blootstellingsdosis is by 'n pH van 8,4 toegedien omdat dit in noue ooreenstemming was met die

pH van die natuurlike waters in die Potchefstroom-distrik.

Die eksperiment, wat in duplikaat uitgevoer is, het soos volg verloop. Vyf-en-twintig slakke is geneem en uitgehonger. Hierna is die proefdiere in drie groepe verdeel waarvan twee groepe elk 10 slakke en die oorblywende groep vyf slakke bevat het. Die drie groepe is vervolgens aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  vir ses ure blootgestel. Die dosisvolume is konstant op  $3 \text{ cm}^3$  per slak gehandhaaf terwyl die blootstellingstemperatuur  $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  was. In hierdie eksperimente is die koperkonsentrasies wat in eksperiment 3.1 verkry is as kontrole gebruik. Na die blootstellingsperiode is die slakke, soos reeds beskryf vir koper, vir die atoomabsorpsiespektrofotometer voorberei. Die resultate word in tabel 2 weergegee.

#### Bespreking van die resultate

Uit die resultate aangetoon in tabel 2 is dit duidelik dat daar 'n afname in die koperkonsentrasies van die hemolimf van die koperblootgestelde slakke voorkom in vergelyking met die bepaling in tabel 1 waar die slakke nie aan koper blootgestel was nie. Hierdie slakke het as kontrole gedien.

In teenstelling hiermee toon die koperkonsentrasies in die totale blootgestelde slakke 'n aansienlike toename in vergelyking met die kontroleslakke. 'n T-toets volgens rekenaarprogram BMDP1V is gebruik om

TABEL 2. n Vergelyking van die gemiddelde koperkonsentrasies in dpm gevind by slak= hemolimf en totale slakke na blootstelling aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  vir ses ure by pH 8,4. Elke bepaling is met 25 slakke uitgevoer.

Bepalings in duplikaat	Koperkonsentrasie per 100 mg hemo= limf	Gemiddelde totale slakmassa (mg)	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak
1	$4,17 \times 10^{-5}$	157,35	$13,39 \times 10^{-3}$	$9,67 \times 10^{-3}$
2	$4,19 \times 10^{-5}$	129,25	$11,97 \times 10^{-3}$	$9,68 \times 10^{-3}$
Gemiddeld vir 50 slakke	$4,18 \times 10^{-5}$	143,30	$12,68 \times 10^{-3}$	$9,675 \times 10^{-3}$
SA	$1,90 \times 10^{-5}$		$2,153 \times 10^{-3}$	$3,38 \times 10^{-3}$

die betekenisvolheid van hierdie verskille na te gaan.\*

Indien die hemolimfkoperkonsentrasies van die twee eksperimente vergelyk word, word die nul-hipotese, wat stel dat daar nie 'n verskil in die koperkonsentrasies van die twee eksperimente is nie, verwerp. Dit word gedoen omdat die P-waarde wat uit die T-toets bereken word kleiner as 0,05 is. Met 'n P-waarde groter as 0,05, sou die nul-hipotese nie verwerp kon word nie en sou daar dus nie op grond van 'n 5% peil van betekenis, wel 'n betekenisvolle verskil in die lesings gevind kon word nie.

Wat die resultate aangaande die koperkonsentrasies in die totale slakke betref, is ook op grond van 'n 5% peil van betekenis 'n betekenisvolle verskil tussen die resultate van die twee eksperimente gevind. Uit 'n fisiologiese oogpunt beskou, kom dit voor asof die blootstelling aan  $\text{CuSO}_4$  daartoe aanleiding gee dat die koper wat natuurlik in slakhemolimf voorkom, afneem. Die verwydering of migrasie van koper uit die hemolimf kan moontlik bydra

\*Die program is ontwikkel deur "Health Science Computing Facility (HSCF), University of California, Los Angeles (UCLA)".

HSCF word geborg deur "NIH Special Research Resources Grant RR-3".

tot die verhoogde koperkonsentrasie wat na koperblootstelling in die totale slakke gevind is. Die toename in koperkonsentrasie in die totale slak, blootgestel aan kopersulfaat, kan ook toegeskryf word aan direkte opname uit die kopersulfaatoplossing.

Outoradiografiese studies het getoon dat die kopstreek van die slak *Biomphalaria glabrata* die meeste  $^{67}\text{Cu}$  opgeneem het terwyl die middelste deel en die totale slak eweveel opgeneem het. Dit is gevind dat die  $^{67}\text{Cu}$  hoofsaaklik op die epiteelweefsel van die kopvoetstreek en die epiteelweefsel van die rektaalrif akkumuleer. Koperakkumulasie is verder gevind in die mukuslaag wat die kopvoetstreek bedek en wat gesekreter word op reaksie van die proefdier in teenwoordigheid van toksiese stowwe (Cheng & Sullivan, 1974). Vir *B. tropicus* moet in gedagte gehou word dat die hoeveelheid koper wat die skulp bydra tot die totale koperkonsentrasie in die totale slak nie in aanmerking geneem is nie.

### 3.3    n Bepaling van die koperkonsentrasie in totale slakke en hemolimf na n blootstellingsperiode van ses ure aan 1 dpm $\text{CuSO}_4$ by n pH van 7,2.

Die uitvoering van hierdie eksperiment het ooreengestem met die werkwyse van eksperiment 3.2 behalwe dat die pH van die blootstellingsmedium in dié geval na 7,2 aangepas is. Die rede vir die metinge by n laer pH is omdat daar, teoreties gesproke, meer

$\text{CuSO}_4$  in oplossing is wat dus meer  $\text{Cu}^{2+}$ -ione vir opname beskikbaar stel. Blootstellingsmediums met baie laer pH-waardes is nie oorweeg nie omdat dit nadelig vir die normale metaboliese aktiwiteite van die slak is. Die aanpassing van die pH van die blootstellingsmedium na 7,2 is in skoon akwariumwater gedoen. Coertze (1976) het gevind dat die byvoeging van  $\text{CuSO}_4$  die pH van die reeds aangepaste akwariumwater met 0,2 pH-eenhede laat daal het. Hierdie geringe pH-verandering het nie 'n merkbare invloed op die effektiwiteit van die  $\text{CuSO}_4$  ten opsigte van die slakke nie en daar is derhalwe nie weer daarvoor gekompenseer nie. Die resultate van die eksperiment word in tabel 3 weergegee.

#### Bespreking van die resultate

Uit die resultate van hierdie eksperiment is dit duidelik dat daar geen werklike verskil is tussen die koperkonsentrasie van die eksperiment wat by 'n pH van 8,4 gedoen is nie. Dit beteken dus dat die verhoogde koperkonsentrasie by pH 7,2 nie deur verhoogde akkumulاسie van hierdie swaarmetaal deur die proefdier se weerspieël word nie. Statistiese vergelyking tussen hierdie eksperiment en eksperiment 3.2 dui aan dat daar op grond van 'n 5% peil van betekenis geen betekenisvolle verskil tussen die koperkonsentrasies van die ooreenstemmende weefsels voorkom nie.

Wat die lae konsentrasie koper in die hemolimf van

TABEL 3. n Vergelyking van die gemiddelde koperkonsentrasies in dpm gevind by slakhemolimf en totale slakke na blootstelling aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  vir ses ure by pH 7,2. Elke beplaining is met 25 slakke uitgevoer.

Aantal herhalings	Koperkonsentrasie per 100 mg hemo= limf	Gemiddelde totale slakmassa (mg)	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak
1ste Bepaling	$3,38 \times 10^{-5}$	150,69	$12,54 \times 10^{-3}$	$8,77 \times 10^{-3}$
2de Bepaling	$4,54 \times 10^{-5}$	143,48	$13,57 \times 10^{-3}$	$9,82 \times 10^{-3}$
Gem.	$3,96 \times 10^{-5}$	147,08	$13,05 \times 10^{-3}$	$9,29 \times 10^{-3}$
S.A.	$1,95 \times 10^{-5}$		$1,21 \times 10^{-3}$	$2,36 \times 10^{-3}$

hierdie slakke in vergelyking met die kontroleslakke betref, kom dit voor asof die hemolimf nie as voersistees vir koper in die slak optree nie.

Volgens Sullivan, Rodrick & Cheng (1974) kan koper by *B. glabrata* langs 'n parasellulêre weg beweeg. Koper kom in 'n nie-toksiese gecheleerde vorm in die hemolimf by *B. glabrata* voor indien hoë konsentrasies daarna in die hemoseel ingespuut word (Sullivan & Cheng, 1976). As koper in 'n gecheleerde vorm by *B. tropicus* sou voorkom, kan dit steeds met atoomabsorpsie-analises aangetoon word.

'n Meer aanvaarbare moontlikheid vir die afname in die hemolimfkoperkonsentrasie van blootgestelde slakke is dat die hemolimf as gevolg van 'n netto influks van water en 'n daarmee gepaardgaande netto uitfluks van die elektroliete verdun raak. Hierdie gedagte word ondersteun deurdat Cheng & Sullivan (1977) met 'n blootstellingsdosis van 0,06 dpm by *B. glabrata* gevind het dat daar 'n aansienlike afname in die osmolaliteit van die hemolimf voorkom. Dit kan volgens hierdie outeurs moontlik aan die verdunning van die bloed as gevolg van die invloed van water en die uitlek van osmotiese aktiewe elektroliete uit die hemolimf toegeskryf word. Van Aardt & Coertze (1981) het ook 'n progressiewe afname in die osmolaliteit van die hemolimf van *B. (B.) tropicus* gevind nadat die slak aan toenemende koperkonsentrasies blootgestel is.

Die moontlikheid dat koper een van die elektroliete

is wat ook uit die hemolimf uit beweeg, is nie ondersoek nie. Dit mag egter wees dat daar nie 'n verlies van koper in die hemolimf voorkom nie maar dat die koperkonsentrasie in die hemolimf net verdun raak as gevolg van die netto influks van water.

Dit is deur George, Pirie, Cheyne & Coombs (1978) by die oester *Ostrea edulis* gevind dat, alhoewel die hemolimf ongeveer die helfte van die weefselmassa verteenwoordig het, dit slegs sowat 5% van die totale koper- en sinkkonsentrasies bevat. Dit is met hemolimfanalises gevind dat die amebosiete vir ongeveer 70% van die koper wat in die hemolimf gevind is, verantwoordelik is. Die weefselkoperkonsentrasie was, in vergelyking met die hemolimf sonder amebosiete, 10 maal meer. Die outeurs het gevind dat die koperkonsentrasies van geïsoleerde amebosiete 13 000 dpm is wat baie hoër is as die konsentrasie in die weefsel. Volgens hierdie outeurs verlaat individuele amebosiete die hemolimf en beweeg in die omringende weefsels in. Uit bogenoemde inligting kan die afleiding gemaak word dat die amebosiete kan bydra tot die verhoogde koperkonsentrasie in die oester se weefsels. Omdat die koperkonsentrasie in die hemolimf van *B. (B.) tropicus* na blootstelling nie toeneem nie, kan tot die gevolgtrekking gekom word dat derglike amebosiete, soos by die oester, nie voorkom nie.

Wat die vervoerwyse betref, het Sullivan, Rodrick & Cheng (1974) gevind dat die ultrastruktuur van die

rektaalrif van *B. glabrata* kenmerkend van transportweefsel is. Die teenwoordigheid van mikrovilli en mitochondrions by apikale seldele en die hegte verbinding tussen oppervlakepiteel en die onderliggende bindweefsel dui op 'n vervoerfunksie. Of vervoer slegs deur hierdie epiteelweefsel en nie deur die totale oppervlakepiteel plaasvind nie, is nog 'n ope vraag. Ryder & Bowen (1977) wat die opname van koper by die terrestriële slak *Agriolimax reticulatus* nagegaan het se bevindings wys daarop dat 'n groot hoeveelheid koper in die oppervlakepiteelselle van slakke waargeneem is. In teenstelling hiermee is min koper in die onderliggende weefsel gevind. In studies waar slegs die voetepiteel met koper in aanraking was, het net hierdie epiteel positief vir koper getoets (Ryder & Bowen, 1977). Hierdie bevinding ondersteun die gedagte dat koper nie maklik deur die hemolimf vervoer word nie.

Omdat die koperkonsentrasie in die totale slakke teenwoordig van beide die eksperimente 3.2 en 3.3 geen verskille getoon het nie, is besluit om 'n analise van die koperkonsentrasie in die blootstellingsmediums by pH 7,2, 8,4 en 2,8 (Meyling, 1966) te maak.

3.4 'n Bepaling van die konsentrasie koper nadat 1,5640 g  $\text{CuSO}_4$  (1 dpm koper as kopersulfaat) in blootstellingsmediums waarvan die pH onderskeidelik 7,2, 8,4 en 2,8 is, opgelos is.

Soos blyk uit die resultate van eksperimente 3.2 en 3.3 is die koperkonsentrasies in die slakke dieselfde

by pH 7,2 en 8,4. Met hierdie eksperiment was die doel om na te gaan of daar 'n verskil is in die koperkonsentrasie van die akwariumwater by pH 7,2 en 8,4.

Die volgende eksperimentele werkwyses is gebruik.

#### *Werkwyse A*

'n Hoeveelheid akwariumwater is geneem en in  $3 \times 1 \text{ dm}^3$  deelvolumes verdeel. Twee van die deelvolumes se pH is onderskeidelik na 8,4 en 7,2 aangepas waarna 'n 1 000 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossing in elke deelvolumegemaak is. In die derde  $1 \text{ dm}^3$  deelvolumegemaak is ook 'n 1 000 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossing waarna die akwariumwater aangesuur is tot 'n pH van 2,8 waarby alle sigbare  $\text{CuSO}_4$  opgelos was. Al hierdie oplossings is hierna vir 48 ure gelaat sodat alle onopgeloste verbindinge kon uitsak. Hierna is 'n "1 dpm"  $\text{CuSO}_4$ -oplossing uit elke  $1 \text{ dm}^3$  deelvolumegemaak deur  $1 \text{ cm}^3$  van die helder dryfvlloeistof te neem en dit oor te plaas in  $1 \text{ dm}^3$  akwariumwater. Die pH van hierdie akwariumwatervolumes het ooreengestem met die pH van die drie deelvolumes. Die koperkonsentrasies is hierna 10 keer in al drie "1 dpm"-oplossings bepaal. Die resultate word in tabel 4 weergegee.

#### *Werkwyse B*

Die pH van twee  $1 \text{ dm}^3$  akwariumwaterhoeveelhede is

onderskeidelik na 7,2 en 8,4 pH-eenhede aangepas. Duisend dele per miljoen  $\text{CuSO}_4$ -oplossings is in elke 1  $\text{dm}^3$  hoeveelheid opgemaak waarna n 1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossing dadelik van elke 1 000 dpm-oplossing gemaak is. Die 1 dpm-oplossings is vir 48 ure gelaat sodat die onopgeloste verbindings kon uitsak. Die koperkonsentrasie is hierna weer 10 keer in die dryfvlloeistof bepaal. Die resultate word in tabel 4 weergegee.

#### *Werkwyse C*

Hierdie werkwyse is net soos in die geval van werkwyse B herhaal behalwe dat die onopgeloste verbindings in die 1 dpm-oplossings nie toegelaat is om uit te sak voordat 1  $\text{cm}^3$  monsters vir koperbepalings geneem is nie. Die resultate van hierdie bepaling word ook in tabel 4 weergegee.

#### Bespreking van resultate

Uit die resultate in tabel 4 is dit duidelik dat die koperkonsentrasie wat atoomabsorpsiespektrofotometries bepaal is, by al die werkwyse by pH 7,2 hoër is as by pH 8,4.

As die 1  $\text{cm}^3$  monsters volledig oplos, sou daar teoreties 0,3981 dpm koper in die oplossing wees. Hieruit is dit duidelik dat by werkwyse C, by pH 8,4, net 78% van die teoreties bepaalde konsentrasie in oplossing is. Hierteenoor was dit by pH

TABEL 4. Die gemiddelde koperkonsentrasie in dpm gevind in 1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossings by pH 7,2, 8,4 en 2,8 van werkwyses A, B en C. (Kyk teks).

Werkwyse	Koperkonsentrasie S.A. by pH 7,2	Koperkonsentrasie S.A. by pH 8,4	Koperkonsentrasie S.A. by pH 2,8
A	0,089 0,003	0,084 0,005	0,083 0,006
B	0,255 0,008	0,17 0,00	-
C	0,330 0,012	0,312 0,006	-

7,2 82%. In die geval van pH 2,8 is al die koper in oplossing omdat die waarde van die teoreties bekende konsentrasies dieselfde as die gemete waarde is.

Uit die eksperimente 3.2, 3.3 en 3.4 waar die koper konsentrasie in totale en in die blootstellingsmediums by verskillende pH-waardes nagegaan is, kan die volgende gevolgtrekking gemaak word. By die gebruikte pH-waardes is geen verskille in die koperkonsentrasies van die totale slakke waargeneem nie. Hierdie resultate moet toegeskryf word aan die fisies-chemiese aard van die kopersulfaat in akwariumwater by relatief hoë pH-waardes. Dieselfde pH-waardes van die blootstellingsmedium is in die opvolgende eksperiment gebruik. Een van die redes hiervoor was dat Van Aardt & Coertze (1981) met die blootstelling van *B. (B.) tropicus* aan  $\text{CuSO}_4$  wat by 'n relatiewe hoë pH-waarde van 8,5 onoplosbaar vertoon het, duidelike fisiologiese effekte verkry het. Die rede waarom 'n laer pH van 7,2 vir die eksperimente gebruik is, was enersyds om as "kontrole" te dien vir die hoër pH en andersyds omdat die pH van slakhabitats in ander gebiede in die buurt van 7,2 is.

3.5 'n Bepaling van die hoeveelheid koper wat natuurlik in slakskulpe teenwoordig is.

Die doel was om na te gaan hoe groot die natuurlike koperkonsentrasie in slakskulpe is en dit dan te

vergelyk met die koperkonsentrasies in skulpe van slakke wat by pH 7,2 en 8,4 aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is. Vir hierdie bepaling is 30 slakke geneem en 12 ure lank uitgehonger. Hierna is die sagte materiaal volgens die reeds bespreekte werkwyse van die skulpe verwyder waarna die skulpe vir vyf minute in  $300 \text{ cm}^3$  gedistilleerde water geplaas is. Tydens hierdie wasperiode wat drie maal herhaal is, is die slakskulpe voortdurend stadig met behulp van 'n magnetiese roerder geskommel. Dit het verseker dat alle hemolimf wat in die skulpe agtergebly het nadat die sagte materiaal verwyder is ook uitgewas word.

Die skulpe is na die wasproses op handdoekpapier geplaas en by  $60^\circ\text{C}$  in 'n oond gedroog totdat dit 'n konstante massa bereik het. Hierdie periode het ongeveer vyf ure geduur. Die konstante skulpmassa is genoteer waarna die skulpe verteer is. Na verteerling is die verteerde oplossing met  $1 \text{ cm}^3$  gedistilleerde water verdun om sodoende die volume waarmee koperbepalings met die AAS gedoen is, te vergroot. Die resultate word in tabel 5 aangedui.

3.6 'n Bepaling van die koperkonsentrasie op slakskulpe nadat slakke vir twee, vier en ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 7,2 en 8,4 blootgestel is.

Die doel van hierdie ondersoek was om na te gaan of daar enige opname van koper in slakskulpe plaasvind wanneer lewende slakke aan  $\text{CuSO}_4$  blootgestel word.

TABEL 5. Die gemiddelde natuurlike koperkonsentrasie (dpm) in 30 slakskulpe met 'n gemiddelde massa van 19,52 mg.

Koperkonsentrasie per 19,52 mg skulp	Koperkonsentrasie per 100 mg skulp	S.A.
$1,65 \times 10^{-2}$	$9,29 \times 10^{-2}$	$3,64 \times 10^{-2}$

Hierdie eksperiment wat in tweevoud uitgevoer is, het soos volg verloop.

Sestig slakke is geneem en soos gebruiklik voor die eksperiment uitgehonger. Hierna is die slakke in ses groepe van 10 elk verdeel waarna die uitwendige skulpoppervlak deeglik met handdoekpapier afgevee is. Die doel hiervan was om alle sigbare organiese materiaal sowel as eierpakkies van die skulpe te verwyder. Dit het verseker dat die koper wat in die skulpe gemeet word nie toegeskryf kan word aan ander materiaal op die skulp nie. Elke groep van 10 slakke is vervolgens in 'n eksperimentele kamer met  $30 \text{ cm}^3$  van 'n  $1 \text{ dpm CuSO}_4$  blootstellingsmedium geplaas. Elke twee ure vir ses ure lank is die slakke vanuit twee eksperimentele kamers verwyder en soos in eksperiment 3.5 beskryf, gespoel en voorberei vir koperanalise. Die resultate van die bepalinge word in tabel 6 weergegee.

Uit die resultate in tabel 6 is dit duidelik dat daar by beide pH-waardes nie 'n toename in die koperkonsentrasies van die skulpe oor 'n periode van ses ure voorkom nie. Statistiese T-toetse op 'n 5% peil van betekenis het getoon dat daar geen betekenisvolle verskille voorkom tussen die koperwaardes in die skulpe wat by pH 8,4 vir die bepaalde periodes aan koper blootgestel was nie. Dieselfde is ook by pH 7,2 bevind. Met statistiese T-toetse kon daarbenewens aangetoon word dat die koper, wat as spoorelement in slakkskulpe teenwoordig is ook nie betekenisvol verskil van die koperwaardes na bloot-

TABEL 6. Die gemiddelde koperkonsentrasie (dpm) gevind in slakskulpe wat vir bepaalde periodes aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 en 7,2 blootgestel is. Vir elke blootstellingsperiode is 40 skulpe gebruik.

Blootstellingsperiodes in uur	Gemiddelde skulp= massa in mg	Gemiddelde koper= konsentrasie per gemiddelde skulp= massa	Gemiddelde koper= konsentrasie per 100 mg skulp= massa	S.A.
pH 8,4				
2	54,19	$1,84 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-2}$	$1,65 \times 10^{-2}$
4	53,09	$1,68 \times 10^{-2}$	$4,23 \times 10^{-2}$	$2,18 \times 10^{-2}$
6	52,24	$2,02 \times 10^{-2}$	$4,66 \times 10^{-2}$	$2,60 \times 10^{-2}$
pH 7,2				
2	49,50	$2,37 \times 10^{-2}$	$5,09 \times 10^{-2}$	$2,04 \times 10^{-2}$
4	55,29	$2,49 \times 10^{-2}$	$4,69 \times 10^{-2}$	$1,57 \times 10^{-2}$
6	49,84	$2,01 \times 10^{-2}$	$4,35 \times 10^{-2}$	$2,11 \times 10^{-2}$

stelling by beide pH-waardes nie.

Verder is dit uit die resultate duidelik dat daar nie 'n verband bestaan tussen die verskillende skulpmassas en die koperkonsentrasies in die skulpe na blootstelling aan kopersulfaat nie. Yager & Harry (1966) het soortgelyke resultate met Zn en Cd by *Taphius glabratus* verkry. Die omstandigheid dat die "koperverbindings" in suspensie in die water by pH 7,2 en 8,4 se konsentrasies weinig van mekaar verskil, verklaar tot 'n groot mate die resultate gevind by die twee pH-waardes in tabel 6.

Ireland & Wootton (1977) het by *Thais lapillus* en *Littorina littorea*, twee mariene slakke, gevind dat die natuurlike koperkonsentrasie in die verteringsklier en gonades heelwat hoër was as die konsentrasie wat op die skulpe gevind is. Wat die opname van Zn en Cd by *T. glabratus* betref, het Yager & Harry (1966) gevind dat die slaklewer na 24 ure blootstelling heelwat meer van die swaarmetale opgeneem het as of die skulp of die protoplasmiese liggaam. Dit het egter geblyk dat die skulpe meer Zn as Cd opgeneem het. Volgens hierdie outeurs sou die opname van swaarmetale deur die skulp waarskynlik deur adsorpsie plaasvind en nie deur absorpsie nie.

Eksperimente wat oor 'n aantal maande deur Amiard & Amiard-Triquet (1979) uitgevoer is, het getoon dat die skulp van *Lymnaea palustris* <sup>60</sup>Co langer vashou

as die sagte materiaal. Ook het hulle gevind dat daar 'n toename in  $^{60}\text{Co}$  in die skulpe plaasvind terwyl 'n afname van die metaal in die sagte materiaal voorkom. Hieruit het hulle afgelei dat  $^{60}\text{Co}$  wat onder andere deur die mantelrand afgeskei word deur die skulp opgeneem word. Ook het hulle vasgestel dat kobalt op die skulp geadsorbeer word. Omdat koper in hierdie studie selfs nie uit die water opgeneem word nie is dit te betwyfel of geëkskreteerde koper, indien dit by *B. (B.) tropicus* voorkom, wel deur die skulp opgeneem sal word. Dit is verder deur Yager & Harry (1964) waargeneem dat die graad van adsorpsie van Zn deur die skulpe 'n funksie van pH sowel as die konsentrasie van die metaal-ioon in die blootstellingsmedium is. Hierdie bevindinge word nie deur die resultate van eksperiment 3.6 wat pH betref, ondersteun nie. Swinehart & Smith (1979) het in 'n studie op die Fe- en Mn-konsentrasies teenwoordig op mariene- en varswaterslakskulpe waargeneem dat Fe en Mn onderskeidelik konsentrasies van tot 2 600 en 560 dpm op die skulp van die varswaterslak *Anodonta californiensis* bereik het. Daar is egter nie nagegaan of die elemente op 'n bepaalde deel van die skulp konsentreer nie. Allen (1960) en Tavarsin (1964) is van mening dat Mn biologies en bakteriologies op die skulp konsentreer. Volgens Tavarsin (1964) vind 'n uitruilreaksie tussen  $\text{Mn}^{2+}$  en die  $\text{CaCO}_3$ -verbinding van die skulp plaas en dat mikro-organismes die oksidasie van  $\text{Mn}^{2+}$  na mangaanoksiedes op die slakskulp kataliseer.

Uit hierdie bespreking is dit duidelik dat die opname van swaarmetale soos Zn, Fe, Cd en Cu by slak=skulpe onderling aansienlik verskil en deur verskeie faktore beïnvloed word. Hierdie eksperimente met *B. (B.) tropicus* bewys onteenseglik dat koper nie op die skulpoppervlak adsorbeer nie. Die moontlikheid dat koper gedurende langtermynstudies deur die skulp via die mantelrand opgeneem kan word, is skraal.

### 3.7 n Onderzoek na die moontlike akkumulering van koper in die slakweefsel oor n periode van ses ure by pH 8,4 en 7,2.

Die moontlike akkumulering van koper in die hemolimf van *B. glabrata* nadat die swaarmetaal deur die epiteeloppervlak beweeg het, word deur Sullivan & Cheng (1975) as n hipotese gestel vir die toksiese uitwerking van koper op slakke. Volgens hierdie outeurs sou die swaarmetaal in die hemolimf tot n sekere drempelwaarde ophoop waarna dit dan n bepaalde orgaan nadelig beïnvloed. Dit is in hierdie studie aangetoon dat daar n afname in die hemolimfkoperkonsentrasies na blootstelling voorkom en nie n akkumulering soos die hipotese veronderstel nie.

Die eksperimentele werkwýse was soos volg. Tagtig slakke is soos gebruiklik 12 ure lank voor aanvang van die eksperiment uitgehonger. Hierna is die slakke in agt groepe van 10 elk verdeel waarna ses van die agt groepe onderskeidelik vir een,

twee, drie, vier, vyf en ses ure, aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by 'n pH van 8,4 blootgestel is. Die oorblywende twee groepe is vir die volle duur van die eksperiment in kopervrye akwariumwater as kontrole aangehou. Hierdie hele werkwyse is met 60 ander slakke, ses groepe van 10 elk, by 'n pH van 7,2 herhaal. Elke slakgroep is nadat dit vir die voorgeskrewe tyd aan koper blootgestel was uit die blootstellingsmedium verwyder en vir koperbepalings deur die atoomabsorpsiespektrofotometer voorberei. Die resultate word in tabelle 7 en 8 en figure 4,5 en 6 uiteengesit.

#### Bespreking van die resultate

Soos gesien in tabel 7 en 8 en figure 4 en 5 is daar na een uur van blootstelling 'n duidelike en betekenisvolle toename in die koperkonsentrasie van die totale slakke. Uit die resultate is dit duidelik dat die koperkonsentrasie in die slakke nie verder toeneem met toenemende blootstellingsperiodes nie maar onderling tussen blootstellingsperiodes wissel. Hierdie verskille is egter nie statisties betekenisvol nie. Dit is moeilik om te verklaar waar die koper in die slak voorkom. Drie moontlike plekke nl. die oppervlaktepoteel, binne-in slakweefsel of in bepaalde teikenorgane word voorgestel. Outoradiografiese studies met *Biomphalaria glabrata* het getoon dat  $^{64}\text{Cu}$  in die ovotestis van hierdie proefdier akkumuleer terwyl dieselfde radio-isotoop in die albumienklier van *B. pfeifferi* akkumuleer (De

TABEL 7. Die gemiddelde koperkonsentrasie in dpm in totale slakke wat vir nul, een, twee, drie, vier, vyf en ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 blootgestel is.

Blootstellings= periodes in ure	Gemiddelde totale slakmassa in mg	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak	S.A.
0	81,6	$5,47 \times 10^{-3}$	$6,85 \times 10^{-3}$	$2,37 \times 10^{-3}$
1	89,05	$8,66 \times 10^{-3}$	$8,85 \times 10^{-3}$	$2,29 \times 10^{-3}$
2	85,76	$8,64 \times 10^{-3}$	$10,59 \times 10^{-3}$	$3,24 \times 10^{-3}$
3	84,88	$9,00 \times 10^{-3}$	$10,36 \times 10^{-3}$	$2,53 \times 10^{-3}$
4	77,27	$8,72 \times 10^{-3}$	$11,50 \times 10^{-3}$	$2,77 \times 10^{-3}$
5	89,15	$10,33 \times 10^{-3}$	$11,95 \times 10^{-3}$	$2,92 \times 10^{-3}$
6	88,74	$9,33 \times 10^{-3}$	$11,53 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$

TABEL 8. Die gemiddelde koperkonsentrasie in dpm in totale slakke wat vir nul, een, twee, drie, vier, vyf en ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 7,2 blootgestel is.

Blootstellings= periodes in ure	Gemiddelde totale slakmassa in mg	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak	S.A.
0	81,6	$5,47 \times 10^{-3}$	$6,85 \times 10^{-3}$	$2,37 \times 10^{-3}$
1	78,53	$8,58 \times 10^{-3}$	$11,73 \times 10^{-3}$	$4,11 \times 10^{-3}$
2	72,59	$9,96 \times 10^{-3}$	$14,59 \times 10^{-3}$	$4,45 \times 10^{-3}$
3	82,96	$9,25 \times 10^{-3}$	$12,12 \times 10^{-3}$	$4,44 \times 10^{-3}$
4	101,19	$8,73 \times 10^{-3}$	$9,93 \times 10^{-3}$	$4,41 \times 10^{-3}$
5	80,00	$8,56 \times 10^{-3}$	$11,51 \times 10^{-3}$	$3,66 \times 10^{-3}$
6	71,98	$9,79 \times 10^{-3}$	$14,00 \times 10^{-3}$	$3,34 \times 10^{-3}$

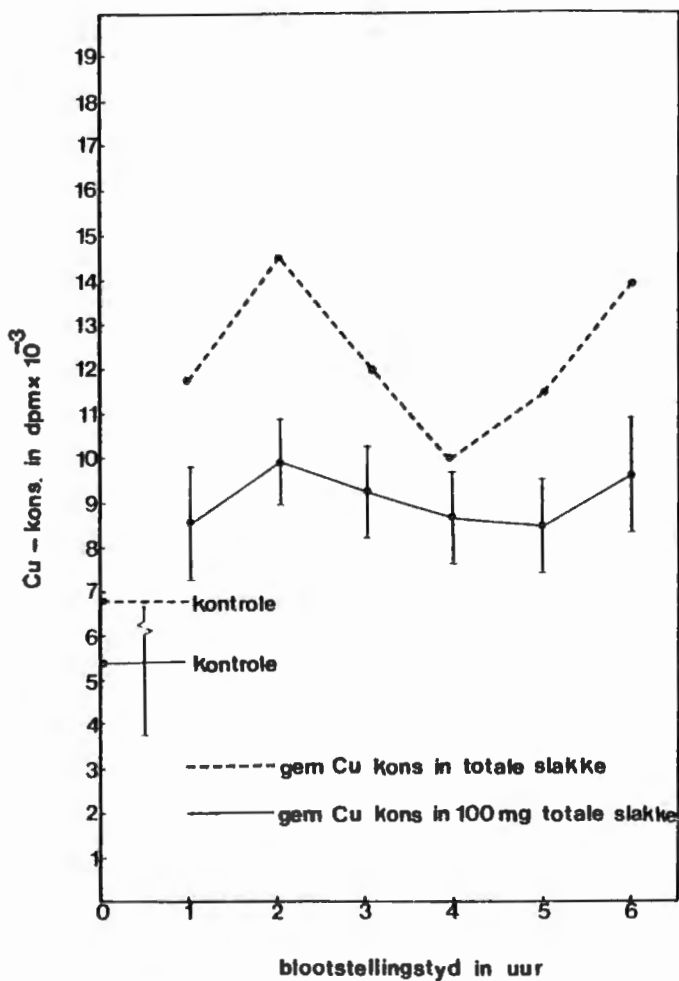


FIG. 5 n Grafiese voorstelling om die verband tussen koperkonsentrasie (dpm) in slakke wat vir toenemende periodes by pH 7,2 aan kopersulfaat bloot= gestel is aan te toon. Elke punt stel die gemiddelde koperkonsentrasie in 10 slakke voor.

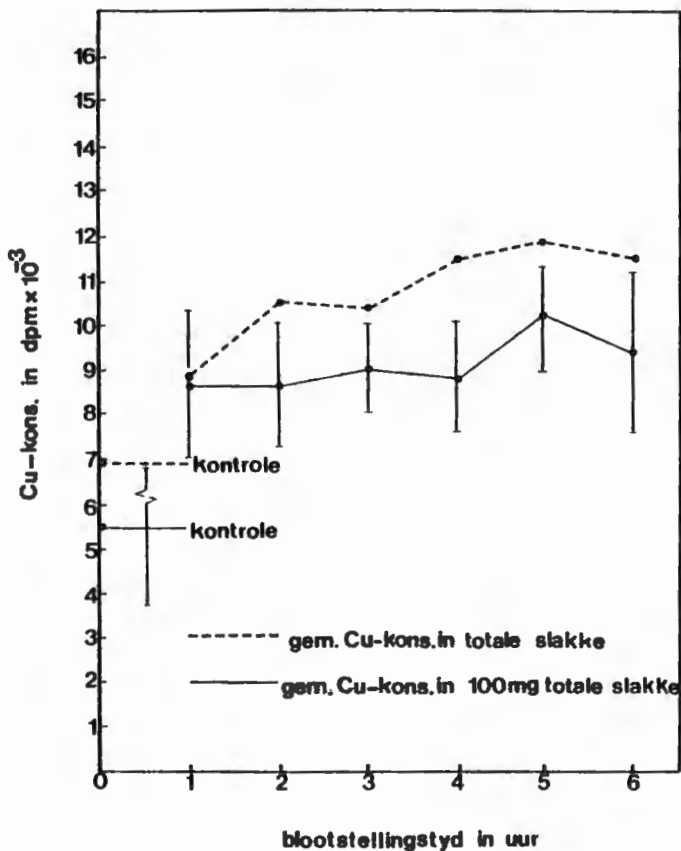


FIG. 4 n Grafiese voorstelling om die verband, tussen koperkonsentrasie (dpm) in slakke wat vir toenemende periodes by pH 8,4 aan kopersulfaat blootgestel is aan te toon. Elke punt stel die gemiddelde koperkonsentrasie in 10 slakke voor.

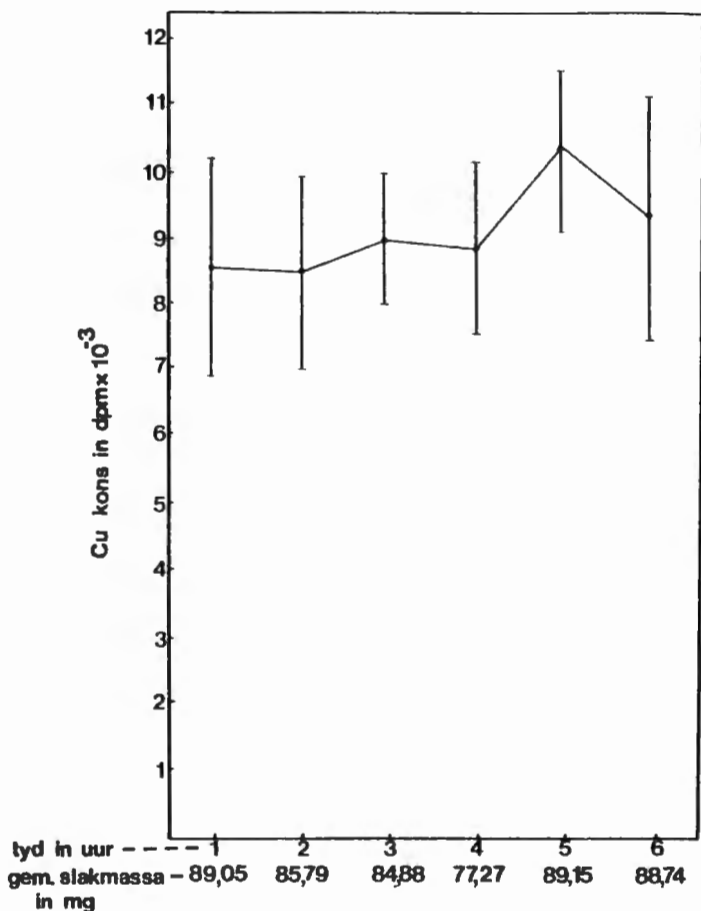


FIG. 6 n Grafiese voorstelling om die verband tussen die gemiddelde massa van totale slakke en die koperkonsentrasie (dpm) in totale slakke wat by pH 8,4 blootgestel is aan te toon.

Azevedo, Gomes, Babbista & Gil, 1957). Na 'n een uur periode van blootstelling is dit hoogs onwaarskynlik dat koper, via 'n parasellulêre roete 'n bepaalde orgaan kon bereik, veral omdat koper nie in die hemolimf verskyn nie. Sullivan & Cheng (1975) het gevind dat  $^{64}\text{Cu}$  in die verteringsklier van *B. glabrata* akkumuleer. Die koperblootstellingsperiode was egter in dié geval 72 ure en die koper kon dus via 'n parasellulêre roete die verteringsklier bereik het. Hulle het egter geensins hemolimf vir koper getoets nie. Die teenwoordigheid van koper in die verteringsklier is ook deur Yager & Harry (1964) wat *Taphius glabratus* vir 72 ure aan  $^{64}\text{Cu}$  blootgestel het, gevind. Sullivan, Rodrick & Cheng (1974) het gevind dat  $^{67}\text{Cu}$  ook op die uitwendige epiteelweefsel van die rektaalrif van *B. glabrata* akkumuleer.

Ryder & Bowen (1977) het met skandeerelektronmikroskopiese studies gevind dat die epiteelweefsel van ander slakdele wat ook met koper in aanraking kom hierdie swaarmetaal opgeneem het. Volgens Sullivan & Cheng (1976) is die akkumulاسie van koper op die epiteelweefsel een moontlike rede vir die toksisiteit van die swaarmetaal. Soos gesien in figure 4 en 5 bereik die koperkonsentrasie in die slakke na een uur 'n plato en is daar in vergelyking met die eerste uur nie meer so 'n groot toename in die koperkonsentrasie van die totale slakke nie. Moontlike verklarings hiervoor is dat alle koperbindingslokaliteite op die epiteelweefsel na 'n uur alreeds

deur adsorpsie met koper versadig is. Hierdie resultate sou ook veroorsaak kon word deur 'n ekskresieproses nadat 'n ewewigstoestand van koper bereik is. Eksperimente wat later in die ondersoek uitgevoer is, het gewys dat ekskresie van watter aard ookal nie hierdie resultate sal verklaar nie.

'n Ander moontlike verklaring vir die gebrek aan koperakkumulاسie oor 'n periode van ses ure is die terugtrekking van slakke in hulle skulpe. Indien dit plaasvind word baie minder uitwendige epiteel aan koper blootgestel sodat 'n "oënskynlike" ewewigstoestand bereik word wat die opname van koper verhoed.

Soos gesien in figuur 4 en 5 vertoon die resultate van die koperkonsentrasie per 100 mg slakweefsel nie dieselfde tendens as die totale slakmassakromme nie. 'n Moontlike rede hiervoor is omdat daar nie 'n verband bestaan tussen koperakkumulاسie en slakmassa nie (tabel 7). Slakke met 'n gemiddelde massa van 77,27 mg wat in tabel 7 vir vier ure blootgestel is, het byvoorbeeld 'n koperkonsentrasie van  $8,72 \times 10^{-3}$  dpm vir die totale slakmassa vertoon. Hierteenoor was die gemiddelde massa van slakke wat vir twee ure blootgestel was 85,76 mg met 'n koperkonsentrasie van  $8,64 \times 10^{-3}$  dpm. Word hierdie resultate na die konsentrasie per 100 mg slak bereken, kom dit voor asof die kleiner slakke meer koper per 100 mg slakweefsel vertoon as die groot slakke. In figuur 6 word hierdie verskynsel grafies geïllustreer. Yager & Harry (1964) het in studies met

*T. glabratus* ook gevind dat daar geen verband tussen die massa van die intakte slakke en die konsentrasies van swaarmetale soos Zn, Cd en Cu is nie.

3.8 Die verlies van koper uit die blootstellingsmedium en die toename van koper in skoon akwariumwater tydens blootstelling.

Die doel van hierdie ondersoek was om na te gaan hoe vinnig koper deur die slakke uit die blootstellingsmedium opgeneem word. Aanvullend hierby is gekyk na die afgee van koper deur die slakke oor 'n periode van 24 ure. Hierdie ondersoek is gedoen deur slakke wat aan koper blootgestel is in skoon akwariumwater te plaas en dan die water te analiseer vir enige toename in die koperkonsentrasie. Die koperkonsentrasie is na 24 ure ook in dieselfde blootgestelde proefdiere ondersoek.

Die eksperimentele werkwyse was soos volg. Sestig slakke is in ses groepe van 10 elk verdeel en soos gebruiklik voor aanvang van die eksperiment uitgehonger. Hierna is drie groepe slakke aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 blootgestel terwyl die oorblywende drie groepe aan dieselfde dosis by pH 7,2 blootgestel is. Die koperkonsentrasie is in beide pH-oplossings voor aanvang van die eksperiment bepaal. Hierna is die onderskeie slakgroepe afsonderlik in ses eksperimentele houers aan 3  $\text{cm}^3$  blootstellingsmedium per slak blootgestel. Tydens die ses ure blootstellingsperiode is 1  $\text{cm}^3$  van die blootstellingsmedium

medium uurliks uit al die eksperimentele kamers verwyder waarna die koperkonsentrasie in die monsters bepaal is. Nadat die koperkonsentrasie vasgestel is, is weer presies  $1 \text{ cm}^3$  van dieselfde konsentrasie in die houer teruggeplaas. Die proefdier is na die ses ure blootstellingsperiode uit die blootstellingsmedium verwyder en op handdoekpapier geplaas om sodoende te verseker dat alle oortollige blootstellingsmedium verwyder word. Hierna is die slakke vinnig in gedistilleerde water afgespoel en weer op handdoekpapier geplaas. Die slakke is vervolgens in kopervrye akwariumwater met pH-waardes van 7,2 en 8,4 geplaas en vir 24 ure gemonitor vir moontlike kopervrystelling.

Tydens die 24 ure periode is  $1 \text{ cm}^3$  watermonsters een, twee, drie, vier, vyf, ses, 18 en 24 ure na aanvang van die eksperiment uit die eksperimentele houers verwyder waarna die koperkonsentrasies in die monsters bepaal is. Die verwyderde volumes is weer soos voorheen vervang met konsentrasies wat met die gemete konsentrasies ooreengekom het. Na die 24 ure periode is 15 slakke uit elke pH-groep geneem en soos reeds beskryf vir koperbepalings voorberei. Die resultate van die bepalinge word in tabelle 9 tot 14 en figure 7 tot 10 uiteengesit.

#### Bespreking van die resultate

Soos gesien uit die resultate is daar geen verskil

TABEL 9. Die uurlikse afname in die koperkonsentrasie in (dpm) van die blootstellingsmedium by pH 8,4 tydens n ses ure blootstellingsperiode.

Blootstellings= periode in ure	Koperkonsentrasie in dpm in die drie eksperimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00
1	0,07	0,07	0,06	0,066	0,005
2	0,07	0,075	0,08	0,076	0,002
3	0,07	0,075	0,075	0,073	0,002
4	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00
5	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00
6	0,065	0,075	0,07	0,07	0,002

TABEL 10. Die toename in die koperkonsentrasie van skoon akwariumwater nadat blootgestelde slakke vir 24 ure daarin aangehou was.

Periode van Cu-vrystelling uit die slakke in ure	Koperkonsentrasie in dpm in die drie eksperimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,00	0,005	0,01	0,05	0,005
2	0,02	0,02	0,03	0,023	0,005
3	0,03	0,03	0,04	0,033	0,005
4	0,02	0,03	0,045	0,031	0,012
5	0,02	0,04	0,06	0,04	0,02
6	0,01	0,03	0,05	0,03	0,02
18	0,02	0,035	0,07	0,041	0,025
24	0,01	0,025	0,07	0,035	0,031

TABEL 11. Die koperkonsentrasie (dpm) in slakke wat vir ses ure by pH 8,4 aan koper blootgestel is en daarna 24 ure toegelaat is om die opgeneemde koper vry te stel.

Nr	Slakmassa	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak
1	96,94	$8,01 \times 10^{-3}$	$8,26 \times 10^{-3}$
2	83,37	$6,25 \times 10^{-3}$	$7,49 \times 10^{-3}$
3	81,14	$7,59 \times 10^{-3}$	$9,36 \times 10^{-3}$
4	82,15	$6,50 \times 10^{-3}$	$7,91 \times 10^{-3}$
5	78,73	$8,85 \times 10^{-3}$	$11,24 \times 10^{-3}$
6	139,79	$6,24 \times 10^{-3}$	$4,46 \times 10^{-3}$
7	81,79	$6,97 \times 10^{-3}$	$8,52 \times 10^{-3}$
8	135,28	$8,22 \times 10^{-3}$	$6,07 \times 10^{-3}$
9	59,25	$7,27 \times 10^{-3}$	$12,27 \times 10^{-3}$
10	84,44	$7,16 \times 10^{-3}$	$8,48 \times 10^{-3}$
11	59,70	$9,49 \times 10^{-3}$	$15,89 \times 10^{-3}$
12	114,04	$8,12 \times 10^{-3}$	$7,12 \times 10^{-3}$
13	109,99	$6,50 \times 10^{-3}$	$6,19 \times 10^{-3}$
14	48,12	$8,06 \times 10^{-3}$	$16,75 \times 10^{-3}$
15	104,48	$7,20 \times 10^{-3}$	$6,89 \times 10^{-3}$
$\bar{x}$	90,28	$7,48 \times 10^{-3}$	$9,12 \times 10^{-3}$
SA		$0,968 \times 10^{-3}$	$3,51 \times 10^{-3}$

TABEL 12. Die uurlikse afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium by pH 7,2 tydens n ses ure blootstellingsperiode.

Blootstellings= periode in ure	Koperkonsentrasie in dpm in die drie ekspe= rimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00
1	0,10	0,08	0,09	0,09	0,010
2	0,09	0,08	0,09	0,086	0,005
3	0,09	0,07	0,09	0,083	0,011
4	0,09	0,08	0,08	0,083	0,005
5	0,09	0,08	0,08	0,083	0,005
6	0,09	0,08	0,08	0,083	0,005

TABEL 13. Die toename in die koperkonsentrasie van skoon akwariwmwater nadat blootgestelde slakke 24 ure daarin aangehou was.

Periode van koper= vrystelling uit slakke in ure	Koperkonsentrasie in dpm in die drie eksperimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1	0,01	0,02	0,00	0,01	0,005
2	0,01	0,02	0,00	0,01	0,01
3	0,01	0,03	0,00	0,013	0,015
4	0,02	0,03	0,01	0,02	0,009
5	0,02	0,03	0,03	0,026	0,005
6	0,02	0,03	0,03	0,026	0,005
18	0,02	0,05	0,03	0,033	0,015
24	0,05	0,06	0,03	0,046	0,015

TABEL 14. Die koperkonsentrasie (dpm) in slakke wat vir ses ure by pH 7,2 aan koper blootgestel is en daarna 24 ure toegelaat is om die opgeneemde koper vry te stel.

Nr	Slakmassa (mg)	Koperkonsentrasie per totale slak	Koperkonsentrasie per 100 mg totale slak
1	97,74	$8,16 \times 10^{-3}$	$8,34 \times 10^{-3}$
2	108,74	$7,51 \times 10^{-3}$	$6,90 \times 10^{-3}$
3	87,48	$7,64 \times 10^{-3}$	$7,32 \times 10^{-3}$
4	104,40	$6,50 \times 10^{-3}$	$6,22 \times 10^{-3}$
5	84,11	$7,50 \times 10^{-3}$	$8,91 \times 10^{-3}$
6	100,41	$7,68 \times 10^{-3}$	$7,64 \times 10^{-3}$
7	93,08	$7,09 \times 10^{-3}$	$7,61 \times 10^{-3}$
8	98,04	$8,40 \times 10^{-3}$	$8,56 \times 10^{-3}$
9	109,91	$7,44 \times 10^{-3}$	$6,76 \times 10^{-3}$
10	77,31	$6,57 \times 10^{-3}$	$8,50 \times 10^{-3}$
11	89,25	$8,13 \times 10^{-3}$	$9,11 \times 10^{-3}$
12	112,67	$6,07 \times 10^{-3}$	$5,38 \times 10^{-3}$
13	137,05	$8,59 \times 10^{-3}$	$6,26 \times 10^{-3}$
14	93,15	$6,09 \times 10^{-3}$	$6,54 \times 10^{-3}$
15	91,84	$6,03 \times 10^{-3}$	$6,57 \times 10^{-3}$
$\bar{x}$	99,01	$7,29 \times 10^{-3}$	$7,36 \times 10^{-3}$
S.A.		0,864	1,11

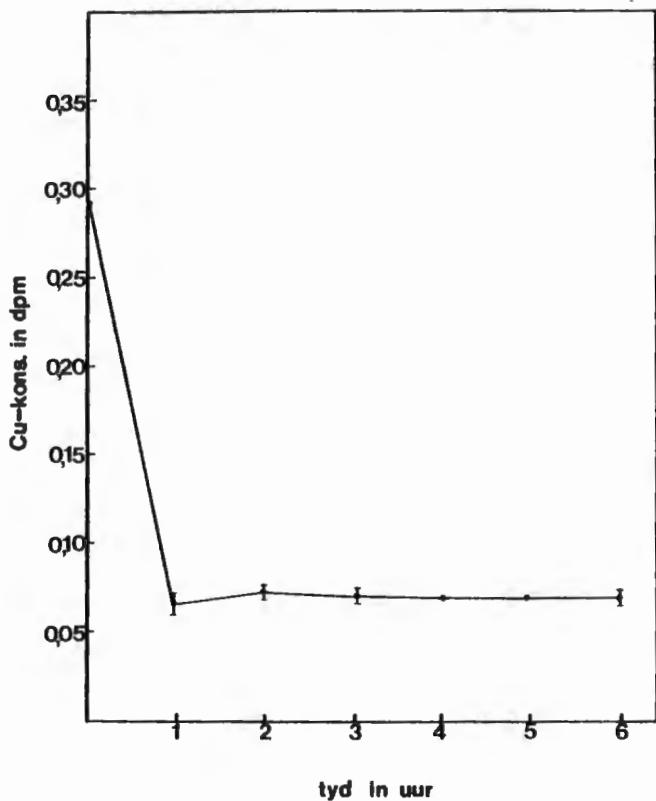


FIG. 7 n Grafiese voorstelling om die uurlikse afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium by pH 8,4 tydens n ses ure blootstellingsperiode aan te toon.

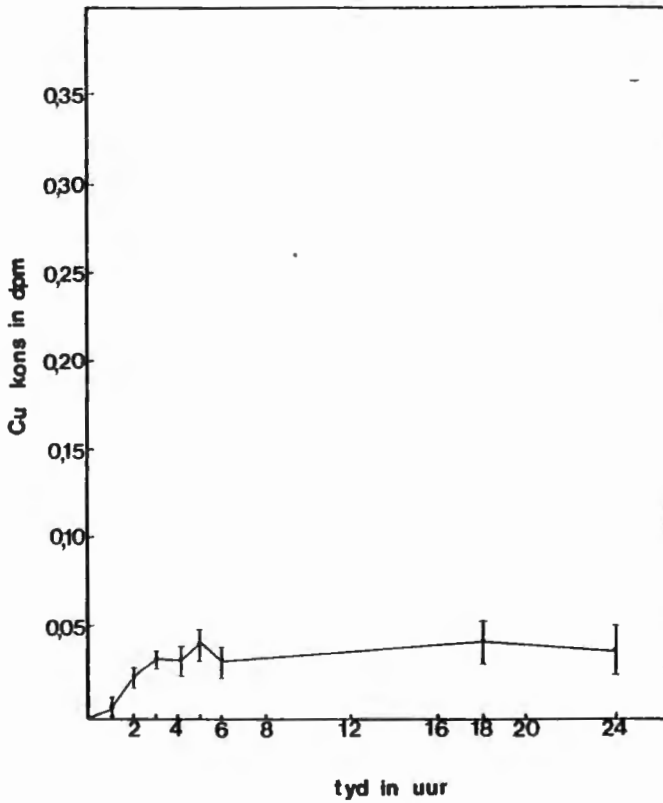


FIG. 8 n Grafiese voorstelling om die toename in die koperkonsentrasie van skoon akwariumwater aan te toon nadat slakke wat by ph 8,4 blootgestel was vir 24 ure daarin aangehou was.

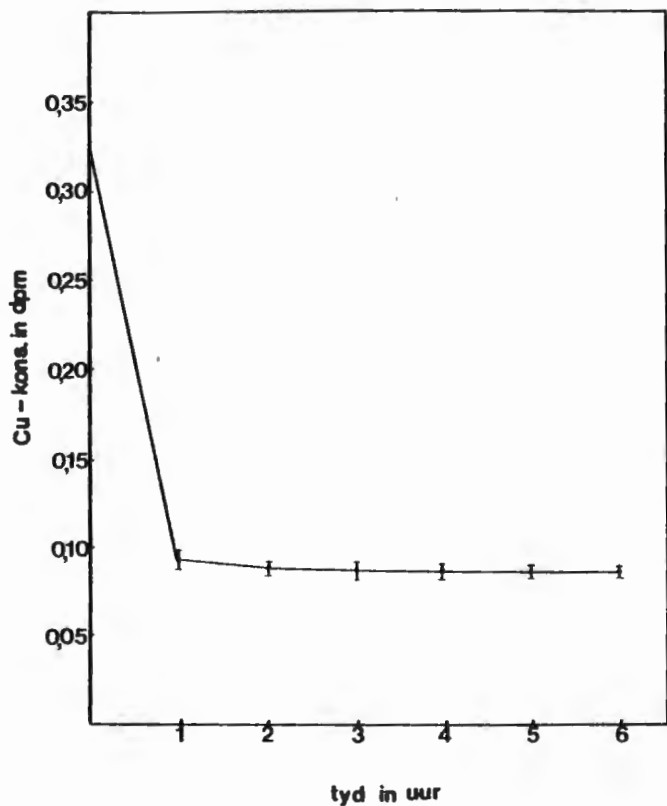


FIG. 9 n Grafiese voorstelling om die uurlikse afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium by pH 7,2 tydens n ses ure blootstellingsperiode aan te toon.

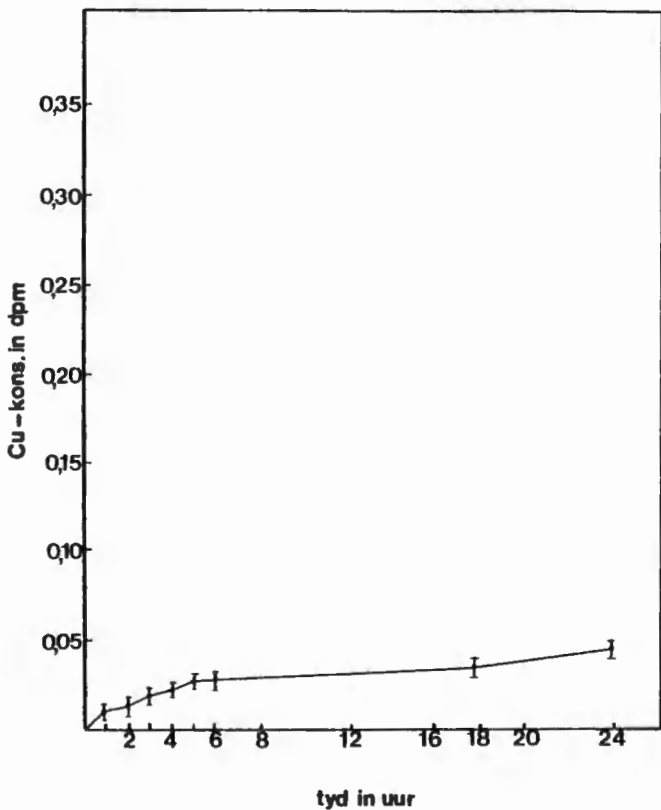


FIG. 10 n Grafiese voorstelling om die toename in die koperkonsentrasie van skoon akwariumwater aan te toon nadat slakke wat by pH 7,2 blootgestel was vir 24 ure daarin aangehou was.

tussen die gegewens wat by pH 8,4 en pH 7,2 verkry is nie. In figure 7 en 9 wat onderskeidelik die resultate by pH 8,4 en 7,2 toon, kan gesien word dat daar tydens die eerste uur van blootstelling 'n vinnige afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium plaasvind. In die geval van pH 8,4 neem die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium af na ongeveer 22% van die oorspronklike waarde terwyl dit in die geval van pH 7,2 na 25% van die oorspronklike waarde afneem. Hierdie vinnige afname in die koperkonsentrasie in die medium word goed weerspieël deur die toename in die koperkonsentrasie by slakke na een uur blootstelling. (Kyk eksperiment 3.7.)

In tabel 9 word aangedui dat die koperkonsentrasie wat aanvanklik 0,31 dpm in die blootstellingsmedium was binne een uur daal na 'n gemiddelde waarde van 0,066 in die eksperimentele kamers. Dit beteken dat die rekenkundige verskil van 0,244 dpm klaarblyklik deur die 10 slakke opgeneem word. Uit eksperimente 3.1 en 3.2 is egter gesien dat die agtergrondkonsentrasie toeneem van gemiddeld  $5,07 \times 10^{-3}$  dpm na gemiddeld  $12,68 \times 10^{-3}$  dpm na koperblootstelling. Hierdie toename in die koperkonsentrasies van die totale slakke beteken dat elke slak gemiddeld  $7,6 \times 10^{-3}$  dpm koper opgeneem het. Die totale hoeveelheid koper wat deur die 10 slakke in een eksperimentele kamer opgeneem is, is  $7,61 \times 10^{-2}$ . Hieruit blyk dit dat al die koper wat uit die blootstellingsmedium tydens blootstel-

ling verdwyn, naamlik 0,244 dpm, nie deur die slakke opgeneem word nie. Dit kan bereken word dat slegs 18% deur die 10 slakke opgeneem word. As soortgelyke berekenings met die waardes gevind by pH 7,2 gemaak word, word 'n ooreenstemmende tendens gevind. Die moontlikheid dat die koper wat nie deur die slakke opgeneem word nie dalk op die bodem van die eksperimentele kamers presipiteer, is onwaarskynlik omdat daar voortdurend lug deur die blootstellingsmediums geborrel is wat die koperbindings in suspensie behoort te hou.

'n Meer waarskynlike rede is dat groot hoeveelhede koper glad nie vir die slakke toeganklik is nie maar op die wand van die eksperimentele kamers adsorbeer. 'n Belangrike gevolgtrekking is dat baie laer koperkonsentrasies as die 0,3981 dpm koper (dit is gelyk aan 1 dpm kopersulfaat) met slakke in aanraking kom. Dit beteken dat die toksiese invloed wat die koper op die slakke uitoefen met baie laer koperkonsentrasies as wat aanvanklik vermoed is, teweeggebring word.

'n Ander resultaat in figure 7 en 9 is dat die koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium na een uur blootstelling nie verder afneem nie. 'n Moontlike verklaring hiervoor is dat die bindingsplekke van koper op die wand van die eksperimentele kamers reeds beset mag wees. Die afplating van die koperkonsentrasie na een uur kan ook veroorsaak word deurdat die slakke koperopname staak as gevolg van die feit dat die proefdiere in die skulpe terug-

trek en onafktief raak.

Die resultate in tabelle 10 en 13 en figure 8 en 10 dui daarop dat baie min koper deur die slakke in die kopervrye akwariumwater vrygestel word. Dit sluit die moontlikheid dat 'n ewewigstoestand tussen opgeneemde koper en vrygestelde koper kon plaasvind, heeltemal uit. Die koper wat wel in die water vrykom, is waarskynlik meer 'n fisies-chemiese ontkoppe-ling van koper as 'n metaboliese proses. Dit kan verder moontlik toegeskryf word aan die vrystelling van mukus wat koper bevat. Dit is deur Cheng & Sullivan (1974) gevind dat koper voorkom in die dik mukuslaag wat, uit respons met kontak met giftige stowwe, deur die varswaterslak *B. glabrata* gesekre-ter word. Dit is verder deur hierdie outeurs by dieselfde slakspesie gevind dat koper, via 'n proses van fagositose in die sitoplasma van leukosiete geleë tussen die geïsoleerde epiteel van die intestinum-wand, opgeneem word. Hierdie opname van vreemde partikels deur die proses van fagositose is deur Tripp (1961) by *B. glabrata* gevind, terwyl soort-gelyke bevindings deur Arcadi (1968) gemaak is. Volgens Cheng & Sullivan (1974) gee die feit dat koper wel in fagositiese selle teenwoordig was nie uitsluitel of die koper in 'n proses van opname deur die slak of verwydering uit die slak was nie. Wat wel uit hierdie ondersoek met redelike sekerheid aanvaar kan word, is dat die rol wat fagositose in die opname van koper speel baie klein behoort te wees omdat die tempo van opname tydens die eerste

uur redelik vinnig plaasvind en daarna tot stilstand kom. Die gegewens dui eerder op 'n adsorpsieproses van koper.

Yager & Harry (1966) het by *B. glabrata* gevind dat die slakke na 48 ure nog 62% van opgeneemde Cd teruggehou het. Volgens die resultate van Wier & Walter (1976) behoort 20% van die opgeneemde Cd na 48 ure nog in die slak *Physa gyrina* teenwoordig te wees as die afname in Cd oor die eerste 24 ure onveranderd vir die volgende 24 ure voortduur. Uit die literatuur en hierdie ondersoek is dit duidelik dat die prosesse wat by swaarmetaalopname betrokke is, nie vir alle swaarmetale dieselfde is nie en ook by verskillende slakspesies kan verskil. Volgens Wier & Walter (1976) word die tempo van Cd-ekskresie by *Physa gyrina* ook deur die blootstellings tyd en die massa van die slakke beïnvloed. Volgens Yager & Harry (1966) is ekskresie van opgeneemde koper deur die intestinum by *T. glabratus* moontlik.

In tabelle 11 en 14 word uit die resultate gesien dat die gemiddelde koperkonsentrasie na 24 ure in die slakke baie nou ooreenstem met die gemiddelde koperkonsentrasie per totale slakke na ses ure blootstelling.

Opsommenderwys kan gesê word dat die vinnige verlies van koper uit die blootstellingsmedium tydens die eerste uur van blootstelling asook die vinnige toename van die koperkonsentrasie in die slakke hoof-

saaklik op 'n adsorpsiewyse van opname dui. Hierdie afleiding word gesteun deur die feit dat die vrystelling van koper deur die slakke baie stadig plaasvind en daarom is dit onrealisties om te beweer dat die opname of vrystelling van koper aan die slakke se metabolisme gekoppel kan word.

3.9 'n Onderzoek na die afname van koper uit 'n 1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -blootstellingsmedium by pH 8,4 en 7,2 oor 'n periode van een uur.

Uit die resultate en bespreking van die vorige eksperiment het dit duidelik geblyk dat die meetbare koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium reeds na een uur 'n konstante waarde bereik het. Omdat die snelheid waarmee koper deur die slak opgeneem word grootliks die meganisme van opname bepaal, was dit nodig om die koers daarvan binne die eerste uur te bepaal.

Die eksperimentele werkwyse wat weer eens in pH 7,2 en 8,4 aangepaste akwariumwater plaasgevind het, is die volgende. Sestig slakke is geselekteer en in ses groepe van 10 elk verdeel waarna hulle vir 12 ure lank, voor aanvang van die eksperiment, uitgehonger is. Hierna is drie van die groepe afsonderlik in drie eksperimentele kamers by pH 8,4 aan  $3 \text{ cm}^3$ , 1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -blootstellingsmedium per slak blootgestel. Die werkwyse is met die oorblywende drie groepe slakke herhaal behalwe dat hulle by pH 7,2 blootgestel is. Die aanvanklike koperkonsentrasies is

in al ses die eksperimentele kamers bepaal voordat die slakke daarin geplaas is. Hierna is  $1 \text{ cm}^3$  blootstellingsmediummonsters elke 10 minute uit elk van die eksperimentele kamers onttrek en vir koper geanaliseer. Hierdie werkwyse is vir een uur lank herhaal. Die geneemde monsters is in hierdie geval nie met ooreenstemmende koperkonsentrasies vervang nie. Die resultate van hierdie bepaling word in tabelle 15 en 16 en in figure 11 en 12 weergegee.

### Bespreking van die resultate

Soos gesien in die resultate bereik die koperkonsentrasie in die water na ongeveer 40 minute 'n konstante waarde. Dit is veral tydens die eerste 10 minute van blootstelling wat daar 'n vinnige afname van koper in die blootstellingsmedium voorkom. Hierdie vinnige daling word tesame met vorige bevindings toegeskryf aan die feit dat koperverbindinge op die blootgestelde slakdele adsorbeer. Dit is waargeneem dat die proefdiere tydens die kort periode van hantering in die skulpe teruggetrek is maar dat hulle kort daarna in die medium begin rondbeweeg waarna die sagte materiaal weer eens in 'n half tot 'n volle teruggetrekte toestand verkeer. Dit is waarskynlik dat die grootste deel van koperadsorpsie tydens die aktiewe fase plaasvind. Die bydrae wat die Perspex-wande van die eksperimentele kamers in die vinnige koperafname maak, moet nie buite rekening gelaat word nie. Hierdie bydrae sal later eksperimenteel ondersoek word. Dit is verder

TABEL 15. Die afname in die koperkonsentrasie (dpm) van die blootstellingsmedium by pH 8,4 tydens  $n$  een uur blootstellingsperiode uit  $n$  totaal van 30 slakke.

Blootstellings= periode in minute	Koperkonsentrasie in dpm in die drie ekspe= rimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,31	0,31	0,31	0,31	0,00
10	0,11	0,15	0,11	0,123	0,023
20	0,08	0,13	0,08	0,096	0,028
30	0,08	0,10	0,075	0,085	0,013
40	0,07	0,09	0,07	0,076	0,011
50	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00
60	0,07	0,07	0,07	0,07	0,00

TABEL 16. Die afname in die koperkonsentrasie (dpm) van die blootstellingsmedium by pH 7,2 tydens n een uur blootstellingsperiode uit n totaal van 30 slakke.

Blootstellings= periode in minute	Koperkonsentrasie in dpm in die drie eksperimentele kamers				
	1	2	3	$\bar{x}$	S.A.
0	0,33	0,33	0,33	0,33	0,00
10	0,14	0,19	0,14	0,156	0,028
20	0,12	0,14	0,15	0,125	0,015
30	0,12	0,14	0,11	0,123	0,015
40	0,10	0,10	0,09	0,096	0,005
50	0,10	0,10	0,09	0,096	0,005
60	0,10	0,09	0,09	0,093	0,005

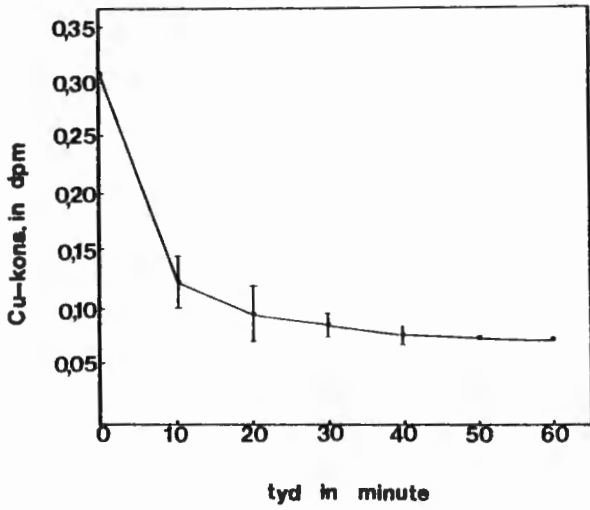


FIG. 11 Die afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium by pH 8,4 waartydens 30 slakke vir een uur blootgestel is.

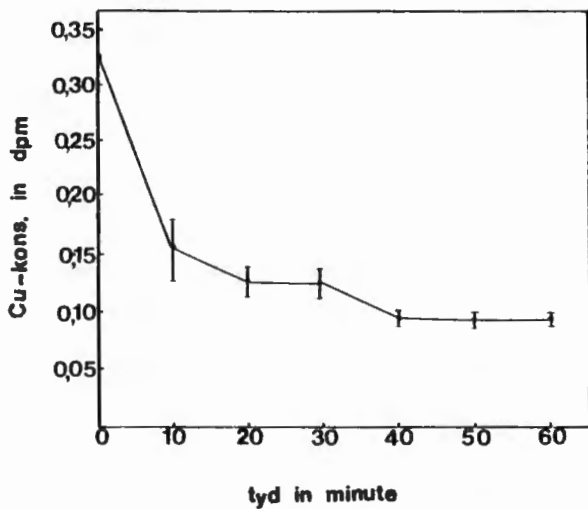


FIG.12 Die afname in die koperkonsentrasie van die blootstellingsmedium by pH 7,2 waartydens 30 slakke vir een uur blootgestel is.

in figure 11 en 12 duidelik dat die koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium na 10 minute stadiger afneem waarna dit konstant word.

Die vermydingsgedrag van die slakke wanneer hulle met koper in aanraking kom, soos byvoorbeeld die oormatige produksie van mukus en die feit dat die slakke in die skulp terugtrek, dui daarop dat die slakke hierdie swaarmetaal toksies vind. Sullivan & Cheng (1976) het gevind dat die toksiese invloed van koper moontlik toe te skryf is aan 'n inwerking op die epiteelweefsel van die slakintegument. Dit is egter uit hierdie resultate nog nie duidelik of opname slegs deur 'n proses van adsorpsie plaasvind en of absorpsie ook 'n bydrae lewer nie.

Interessante resultate verkry deur Zylstra (1972) dui daarop dat die epidermis van *L. stagnalis* betrokke is by die selektiewe ingestie van kolloïdale ferritien maar nie kolloïdale silwer nie. Hierdie selektiwiteit is volgens hom moontlik toe te skryf aan die eienskappe van die partikel, byvoorbeeld sy lading, sy grootte en of die partikel 'n proteïen is of nie. Volgens Zylstra (1972) kom dit voor asof die toksisiteit van 'n verbinding moontlik ook aan hierdie faktore toegeskryf kan word.

3.10 'n Ondersoek na die koperkonsentrasie in totale slakke wat vir ses ure aan 1, 2, 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 blootgestel is.

Uit vorige eksperimente is waargeneem dat die koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium net tot 'n sekere konstante vlak daal waarna koper nie verder deur die proefdiere opgeneem word nie. Omdat die konsentrasie moontlik te laag daal vir die slak om nog koper op te neem, of dat die slak met koper- versadig mag raak, was dit wenslik om die slakke aan hoër dosisse  $\text{CuSO}_4$  bloot te stel.

Die eksperimentele werkwysse was soos volg. Tagtig slakke is voor aanvang van die eksperiment geselekteer, in agt groepe van 10 elk verdeel en soos gewoonlik uitgehonger. Die agt groepe is hierna aan 1, 2, 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel op so 'n wyse dat twee groepe van 10 slakke telkens afsonderlik aan een bepaalde dosis blootgestel is. Die blootstellingsvolume is konstant op  $3 \text{ cm}^3$  per slak gehandhaaf. Die slakke is na blootstelling vir koperbepalings met die atoomabsorpsiespektrofotometer voorberei. Die resultate word in tabel 17 en figuur 13 getoon.

#### Bespreking van die resultate

Soos gesien in die resultate weergegee in tabel 17 en figuur 13 kom dit voor asof die koperkonsentrasie per totale slakmassa van slakke wat aan 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie verskil nie. In teenstelling hiermee is daar 'n aansienlike verskil tussen die koperkonsentrasie van slakke wat onderskeidelik aan 1 en 2 dpm blootgestel is en die koperkonsentrasies van slakke wat aan 3 en 4 dpm koper blootgestel

TABEL 17. Die gemiddelde koperkonsentrasie in totale slakke wat aan 1, 2, 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  vir ses ure blootgestel is. Twintig slakke is vir elke konsentrasie gebruik.

Koperkonsentrasie in dpm	Gemiddelde totale slakmassa in mg	Koperkonsentrasie per totale slak= massa in dpm	S.A.
1	88,74	$9,33 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$
2	78,11	$10,18 \times 10^{-3}$	$2,96 \times 10^{-3}$
3	81,77	$19,92 \times 10^{-3}$	$6,17 \times 10^{-3}$
4	73,34	$19,92 \times 10^{-3}$	$7,25 \times 10^{-3}$

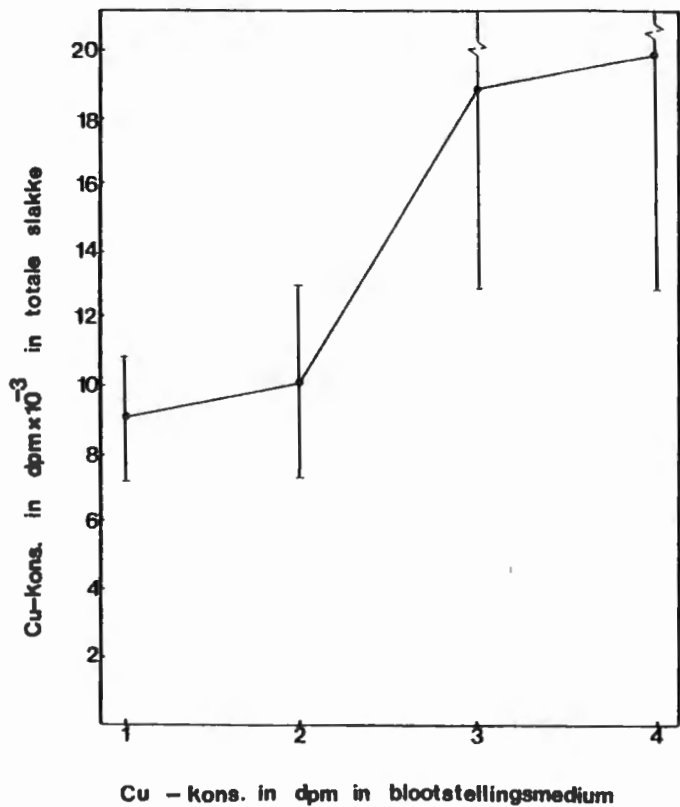


FIG. 13 n Grafiese voorstelling van die koperkonsentrasie in totale slakke wat aan 1, 2, 3 en 4 dpm koper= sulfaat blootgestel is.

is. Die koperkonsentrasies van slakke wat aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is, verskil ook van slakke wat aan 2 dpm blootgestel is. Om hierdie verskille, of gebrek aan betekenisvolle verskille, statisties te ondersteun, is rekenaarprogram BMDP IV, waar IV die kode is vir die betrokke program, gebruik.

In 'n vergelyking van die koperkonsentrasies in slakke wat onderskeidelik aan 2 en 3 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel word, is die P-waardes van die statistiese T-toetse soos volg. In die geval van 'n vergelyking tussen die koperwaardes vir die totale slakmassa verkry, is die P-waarde 0,0000 wat daarop dui dat hierdie koperkonsentrasies betekenisvol van mekaar verskil. Hierdie verskille word herhaal in 'n vergelyking van die koperkonsentrasies in slakke wat onderskeidelik aan 2 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is. Die P-waardes wat verkry is, in 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies in slakke by 1 dpm en 3 dpm, asook wat aan 1 dpm en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is, het betekenisvolle verskille getoon. In 'n vergelyking tussen die koperkonsentrasies van slakke wat aan 1 en 2 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is, dui die P-waarde daarop dat daar ook 'n betekenisvolle verskil voorkom. Vergelykings tussen die koperkonsentrasies van slakke wat onderskeidelik aan 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is, het in die geval waar totale slakke met mekaar vergelyk is 'n P-waarde van 0,7160 opgelewer. Dit dui daarop dat daar geen betekenisvolle verskil gevind is in die koperkonsentrasie wat teenwoordig is in slakke wat onderskeidelik aan 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie.

Uit die resultate is dit duidelik dat daar nie 'n direkte eweredigheid tussen die konsentrasie in die slakke en water voorkom nie. Volgens Van Aardt & Coertze (1981) bestaan daar 'n verband tussen die kopersulfaatkonsentrasie en die persentasie mortaliteit by *Bulinus (B.) tropicus*. Waarom die koperkonsentrasies in slakke wat aan 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie hoër is as die konsentrasies by slakke wat aan 3 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie, is moontlik toe te skryf aan die feit dat die slakke wat aan 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is dieper in die skulpe teruggetrek was. Ishak & Mohamed (1975) het by *B. alexandrina* gevind dat die mate van terugtrekking van die slak in die skulp direk eweredig is met die konsentrasie van die  $\text{CuSO}_4$ . 'n Ander moontlike verklaring vir die gebrek aan 'n betekenisvolle verskil in die koperkonsentrasies by slakke wat aan 3 en 4 dpm blootgestel is, is dat die slakke wat aan 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is meer mukus, waarop koper geadsorbeer is, in die water vrystel. In hierdie geval sou die slakke wat aan 3 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is meer koperbelaaide mukus besit het wat saam met die totale slakke gemeet is. Cheng & Sullivan (1974) het, soos reeds voorheen vermeld, 'n verhoogde sekresie van mukus by *B. glabrata* aangetoon.

Walter & Wier (1976) het gevind dat daar 'n direkte verband bestaan tussen die kadmiumkonsentrasie in die blootstellingsmedium en die tempo van kadmiumopname deur die varswaterslak *P. gyrina*. In die geval moet egter onthou word dat die manier van op-

name kan verskil van  $\text{CuSO}_4$  en dat die toksiese werking van Cd nie noodwendig dieselfde is nie. Volgens Kägi & Vallee (1961) onderbreek Cd die slak se sellulêre metabolisme deur aan die sulfhidriël-groepe van ensieme te bind, en so posisies op die ensiem beset, wat die normale funksionering van die selle belemmer. In die geval van koper kom dit egter voor asof die swaarmetaal sy toksiese invloed op die epiteelselmembrane uitoefen wat dan lei tot 'n verlies van noodsaaklike elektroliete (Van Aardt & Coertze, 1981).

### 3.11 Die afname in die koperkonsentrasie van 'n 2, 3 en 4 dpm $\text{CuSO}_4$ -blootstellingsmedium tydens 'n drie ure blootstellingsperiode.

Hierdie eksperiment is enersyds uitgevoer om na te gaan of daar wel koper is, wat hetsy aan mukus gebind is of op ander wyse deur die slakke vrygestel word, in die water vrykom. Dit sou ook moontlik 'n aanduiding gee of die afname van koper in die blootstellingsmedium vinniger stabiliseer. Dit kan gebeur deur die omstandigheid dat die slak òf gouer in sy skulp terugtrek òf as gevolg van die moontlikheid dat die koperbindingsareas op die slak of die Perspex-eksperimentele kamer vinniger met koper beset raak.

Die eksperimentele werkwyse van dié eksperiment het nou ooreengestem met die vorige eksperiment behalwe dat daar in dié geval net 30 slakke gebruik is wat in drie groepe van 10 elk verdeel is. Hierdie drie

groepe slakke is afsonderlik aan 2, 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel. Die blootstellingsperiode is op grond van vorige resultate wat toon dat stabilisering van die afname in die koperkonsentrasie in die blootstellingsmedium reeds na een uur plaasvind, bepaal. Tydens die drie ure blootstellingsperiode is 1  $\text{cm}^3$  watermonsters elke 15 minute uit al die eksperimentele kamers verwyder en vir koper geanaliseer. Ooreenstemmende koperkonsentrasies is ook nie in hierdie eksperiment opgemaak en in die eksperimentele kamers teruggeplaas nie. Die resultate van die eksperiment word in tabel 18 en figuur 14 uitgebeeld.

### Bespreking van die resultate

Soos gesien in die resultate van hierdie eksperiment is daar in al die gevalle tydens die eerste 60 minute van blootstelling weer eens 'n vinnige afname in die koperkonsentrasies van die blootstellingsmediums. Op grond van hierdie resultate kom dit voor of die opname van koper, ongeag die konsentrasie van die swaarmetaal, deur middel van adsorpsie plaasvind en dat die slak klaarblyklik nie oor 'n meganisme beskik om die adsorpsie van hoër, meer nadelige koperkonsentrasies te verhoed nie. Dit is verder duidelik dat daar in al drie die blootstellingsmediums, na 'n afname weer 'n toename in die koperkonsentrasies voorkom. Hierdie toename is heel waarskynlik toe te skryf aan die sekresie van koperbelaaide mukus wat oormatig by hoër koperkonsentrasies gesekreter word.

TABEL 18. Die afname in die koperkonsentrasie van n 2, 3 en 4 dpm  $\text{CuSO}_4$ -blootstellingsmedium tydens n drie ure blootstellingsperiode

Monsternemingstyd in minute	Koperkonsentrasie van blootstellingsmediums in dpm		
	2	3	4
0	0,65	0,98	1,32
15	0,43	0,79	0,92
30	0,36	0,465	0,79
45	0,33	0,42	0,67
60	0,31	0,365	0,57
120	0,31	0,30	0,42
180	0,42	0,255	0,49
240	0,39	0,31	0,82
300	0,35	0,44	0,87
360	0,33	0,485	0,83

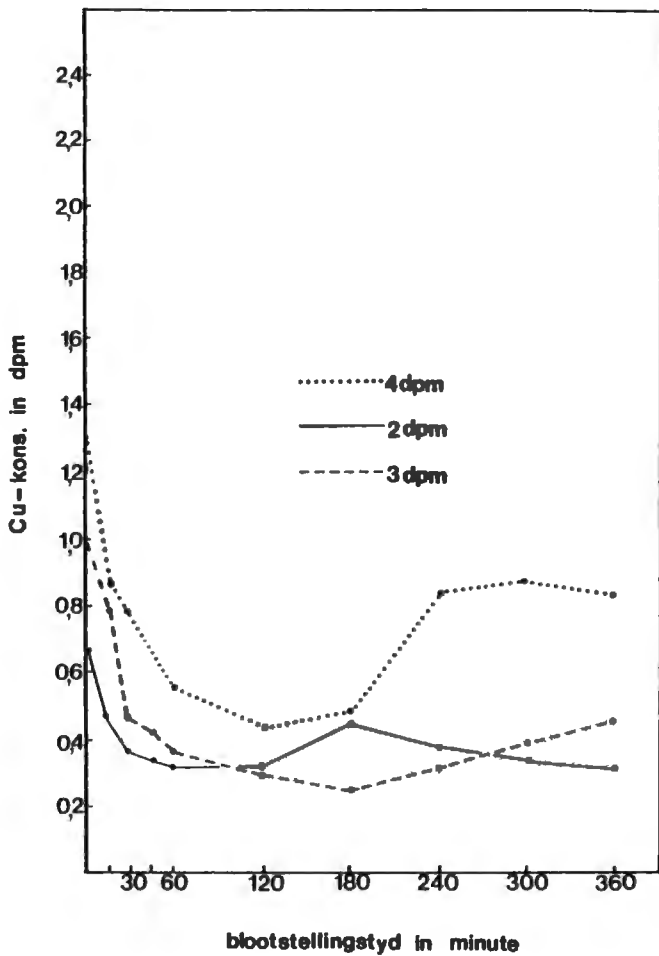


FIG. 14 n Grafiese voorstelling om die afname van koper uit n 2, 3 en 4 dpm blootstellingsmedium oor n periode van drie ure aan te toon.

### 3.12 n Onderzoek na die opname en vrystelling van $^{64}\text{Cu}$ in die vorm van kopersulfaat oor n periode van 2,5 ure by pH 8,4.

Die rede vir die uitvoering van hierdie eksperiment was om deur die toepassing van ander tegnieke die resultate wat met die atoomabsorpsiespektrofotometer verkry is, te onderskryf. Omdat die gebruik van radio-isotope n baie noukeurige tegniek is om die verlies van koper uit die water tydens opname en die verskyning daarvan in die water tydens vrystelling na te gaan, sou dit n baie duidelike beeld kon gee van hierdie uitruilprosesse by lewende slakke. Wat die gebruik van hierdie isotoop verder baie geskik maak, is dat met hierdie tegniek slegs die gemerkte koper gemeet word. Hierdie voordeel is ook van waarde in die meting van vrygestelde koper omdat slegs die gemerkte opgeneemde koper na vrystelling weer gemeet word.

Wat die eksperimentele werkwyse betref, is van twee groepe slakke gebruik gemaak. Een groep het bestaan uit 20 slakke waarvan die massa bepaal is en wat elk in  $3\text{ cm}^3$  radioaktiewe mediums van 2 dpm kopersulfaat in sintillasieflessies blootgestel is. n Tweede groep van twintig slakke is vervolgens in twee groepe van 10 elk verdeel en soos gewoonlik in twee eksperimentele kamers aan  $3\text{ cm}^3$  radioaktiewe medium per slak blootgestel. Die rede waarom hierdie slakke as twee hoofgroepe van 20 afsonderlik behandel is, is omdat die 20 slakke wat elk afsonderlik in tel-

flessies blootgestel is, herhaaldelik getel is sodat toename van  $^{64}\text{Cu}$  oor n periode van 150 minute in elkeen afsonderlik nagegaan kon word. Die soortlike aktiwiteit waaraan al die slakke blootgestel is, het ooreengestem terwyl die konsentrasies van die koper in die blootstellingsmedium in al die gevalle 2 dpm was. Hierdie konsentrasie het voldoende radioaktiwiteit gegee sodat ongeveer 3 000 tpm verkry is.

Die twintig slakke wat individueel blootgestel is, is op 30 minute tydsintervalle uit die blootstellingsmedium verwyder en vinnig in gedistilleerde water afgespoel. Daarna is elke slak afsonderlik in 1 cm<sup>3</sup> gedistilleerde water in n plastiekproefbuis vir een minuut lank in die gammaspektrofotometer getel. Die slakke is na elke telperiode uit die proefbuise verwyder, vinnig met handdoekpapier afgedroog en weer in die radioaktiewe medium teruggeplaas.

Wat die afname van  $^{64}\text{Cu}$  in die radioaktiewe medium betref, is die tweede groep van 20 slakke wat in twee groepe van 10 elk verdeel is, gebruik. In hierdie geval is 1 cm<sup>3</sup> radioaktiewe watermonster elke 20 minute uit elk van die drie eksperimentele kamers onttrek, weer afsonderlik in plastiekproefbuise geplaas en vir een minuut getel. Die radioaktiewe monsters is na elke telling weer in die oorspronklike eksperimentele kamers teruggeplaas. Hierdie werkwyse is vir n periode van 180 minute herhaal. Die proefdiere is na die periode uit die radioaktiewe

medium verwyder en deeglik met gedistilleerde water afgespoel. Tydens die afspoelperiode is die slakke toegelaat om rond te beweeg sodat die radioaktiewe medium in die mantelholte ook kon vrykom. Dit het in 'n redelike mate verseker dat die gemerkte koper wat wel tydens die vrystellingsperiode gemonitor word alleenlik as gevolg van vrystelling uit die slak die water bereik. Die slakke is na die afspoelperiode in 3 cm<sup>3</sup> skoon pH-aangepaste akwariumwater per slak in ander eksperimentele houers oorgeplaas. Tydens dié periode wat 18 ure geduur het, is 1 cm<sup>3</sup> watermonsters op bepaalde tydsintervalle (kyk tabel 19) uit die eksperimentele kamers onttrek, vir een minuut lank getel en daarna weer in die eksperimentele kamers teruggeplaas. Die resultate van die eksperiment word in tabel 19 en figure 15, 16 en 17 weergegee.

### Bespreking van die resultate

Wat die verwerking van die resultate betref, is korreksies vir die fisiese halfleeftyd van <sup>64</sup>Cu met die verkrygte data gedoen. Wat die resultate in tabel 19 en figuur 15 betref, is daar 'n groot ooreenkoms tussen die opname van koper met hierdie tegniek en die tegniek vir die bepaling van koper deur middel van atoomabsorpsiespektrofotometrie. In hierdie geval is daar weer eens 'n baie vinnige toename van radioaktiewe koper in die totale slakke tydens die eerste 30 minute van blootstelling. Hierna kom dit voor asof die toename begin stabiliseer met die ge-

TABEL 19. Die gemiddelde toename van koper as  $^{64}\text{Cu}$  in twintig slakke oor 'n periode van 150 minute.

Radioaktiewe blootstelling	Radioaktiwiteit in tpm	S.A.
t0 Agtergrond	85	
t1 na 30 minute	836	211,73
t2 na 60 minute	946	193,06
t3 na 90 minute	1078	216
t4 na 120 minute	1276	289
t5 na 150 minute	1285	241,5

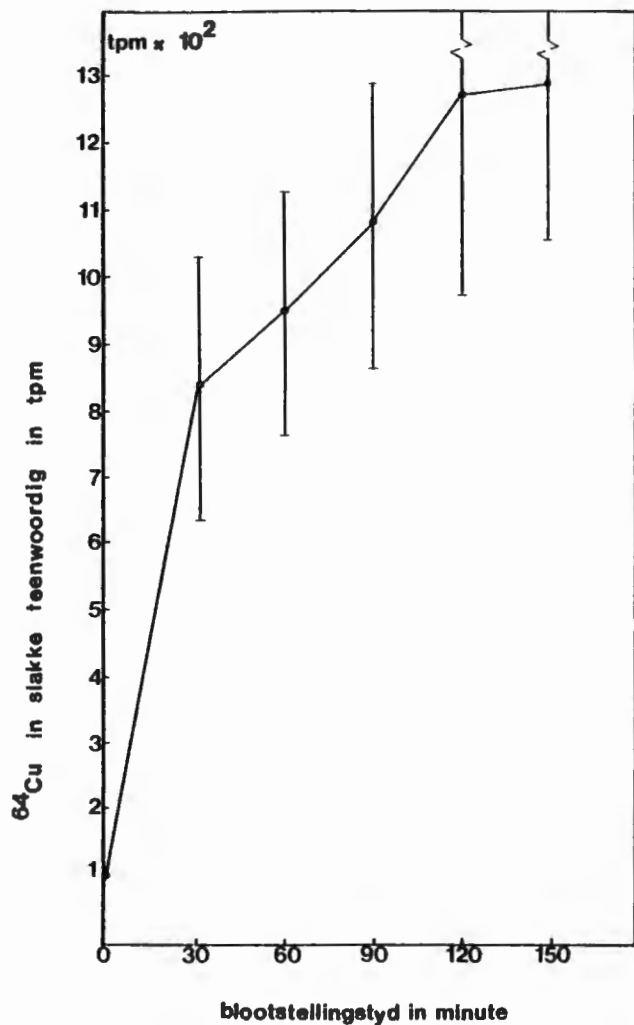


FIG. 15 n Grafiese voorstelling om die gemiddelde toename van  $^{64}\text{Cu}$  in 20 slakke wat vir 150 minute aan  $^{64}\text{Cu}$  blootgestel is aan te toon.

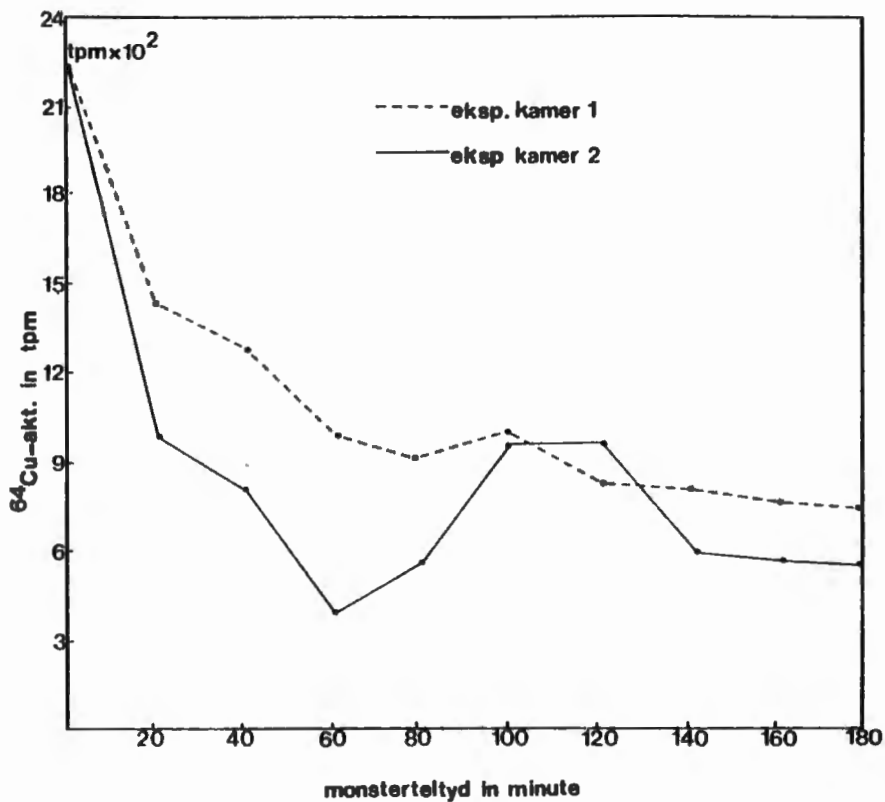


FIG. 16 n Grafiese voorstelling om die afname van  $^{64}\text{Cu}$  in die radioaktiewe medium oor n periode van 180 minute aan te toon. Elke eksperimentele kamer het 10 slakke bevat.

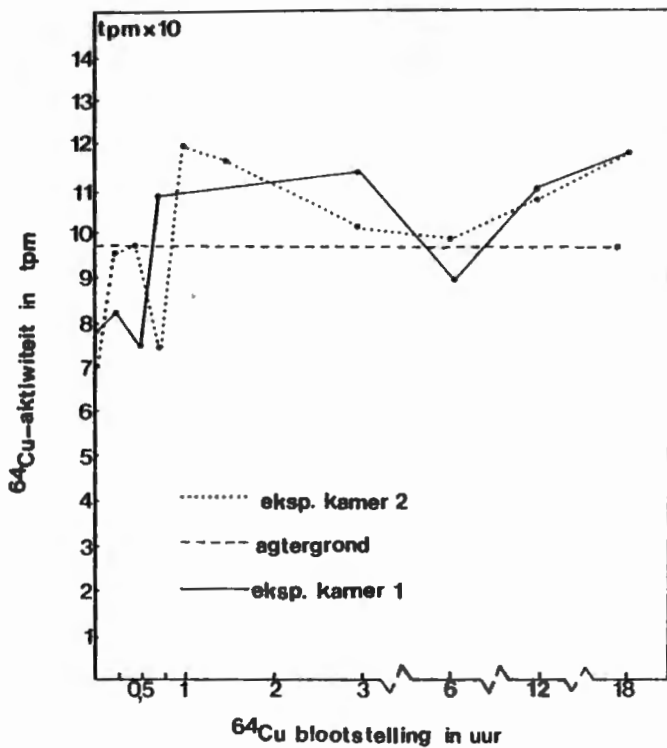


FIG. 17 n Grafiese voorstelling om die toename van  $^{64}\text{Cu}$  in skoon akwariumwater afkomstig vanuit radioaktief blootgestelde slakke oor n periode van 18 ure aan te toon.

volg dat minder koper oor die volgende 90 minute deur die slakke opgeneem word. Verder kom dit voor asof daar na 120 minute van blootstelling 'n definitiewe plato in die opname van  $^{64}\text{Cu}$  bereik is. In vergelyking met die resultate van dieselfde eksperimente verkry met die atoomabsorpsiespektrofotometer is bevind dat die meeste koper na 30 minute blootstelling aan die slakke vassit. Dieselfde redes vir die aanvanklike vinnige opname, gevolg deur 'n plato, is in eksperiment 3.7 verduidelik. Uit figuur 16 is daar 'n goeie ooreenkoms met die data van eksperiment 3.11 waar die proefdiere ook aan 2 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is. Dit is duidelik dat daar, veral tydens die eerste 20 minute van blootstelling, 'n baie vinnige afname van die radioaktiewe koper in die blootstellingsmedium plaasvind. Volgens Spronk, Tilders & van Hoek (1973) word die grootste hoeveelheid  $\text{Cu}^{2+}$  tydens die eerste 15 minute van blootstelling opgeneem. Daarna is die meeste slakke in 'n teruggetrekte toestand terwyl mukus in oormaat afgeskei word. Hierdie verhoogde sekresie van mukus is, soos reeds vermeld, ook deur Sullivan & Cheng (1975) waargeneem. Uit die resultate uitgebeeld in figuur 16 is dit moontlik dat mukus wat  $^{64}\text{Cu}$  bevat deur die slakke in die akwariumwater vrygestel word en daarna saam met die watermonster getel is. Dit verklaar moontlik die verhoogde toename in radioaktiwiteit van 80-120 minute. Hierdie verhoging in die koper het by slakke wat in eksperiment 3.11 blootgestel is aan dieselfde koperkonsentrasie na 180 minute voor gekom. Die adsorpsie van koper op die mukus

en feses van slakke is deur Yager & Harry (1964) aangetoon.

Figuur 17 dui daarop dat die hoeveelhede gemerkte koper wat tydens 'n 18 ure periode deur die slak vrygestel is nie veel verskil van die agtergrondmetings van die gammaspektrofotometer nie. Hierdie resultate korreleer goed met dié van die eksperimente waar slegs kopervrystelling nagegaan is. Dit onderskryf die opvatting wat herhaaldelik hier gestel is dat koper eerder deur adsorpsie as absorpsie opgeneem word.

Outoradiografiese studies wat deur De Azevedo, Carvalho Gomes, Bragança Gil, Babbista & Mendes de Magalhães, (1958) by vier soorte Basommatophora uitgevoer is, het getoon dat  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{32}\text{P}$  en  $^{131}\text{I}$  na 18 ure blootstelling deur die spysverteringskanaal geabsorbeer word. Die blootstellingsdosisse het egter in die geval van koper gewissel tussen 1 300 dpm en 5 000 dpm  $\text{CuSO}_4$  wat uiters ekstreem is as in gedagte gehou word dat 1 dpm koper reeds letaal is. Omdat hierdie hoë koperdosisse die proefdiere oombliklik met indomping daarin sou gedood het, is dit hoogs onwaarskynlik dat aktiewe koperabsorpsie deur die intestinum kon plaasvind. Die koper wat in die geval autoradiografies in die slak aangetoon is, het heelwaarskynlik as gevolg van beskadiging en vernietiging van membrane en selle deur die slakweefsel gediffundeer. Dit is dus heeltemal onrealisties om die metabolisme van koper in slakke by sulke hoë dosisse na te gaan. Die feit dat die koper in hierdie studie die eerste

30 minute byna maksimaal opgeneem word en dat ne=gerbaar klein hoeveelhede koper oor 'n periode van 18 ure vrygestel word, maak dit hoogs onwaarskynlik dat die wyse van opname een van adsorpsie kan wees.

3.13 'n Eksperiment om die opname van koper by slakgroepe wat aan verskillende temperature blootgestel is, na te gaan.

In hierdie eksperiment is slakke by verskillende temperature aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel. Tydens blootstelling aan  $\text{CuSO}_4$  is die slakke onderwerp aan temperature wat tussen 5-20°C gewissel het. Op dié wyse kon die opname van koper by verskillende temperature (metaboliese tempo's) nagegaan word. Indien daar in hierdie eksperiment 'n direkte verband tussen koperopname en toenemende temperature sou voorkom, kon dit 'n verband tussen slakmetabolisme en koperopname aantoon. Verder sou dit 'n goeie aanduiding gee van die rol wat metabolisme speel in die opname van koper. Blyk dit egter dat daar nie 'n verband tussen koperopname en toenemende temperatuur bestaan nie word die gevolgtrekking wat uit ander eksperimente verkry word dat die koper eerder deur 'n proses van adsorpsie opgeneem word nogeens bevestig.

Die eksperimentele werkwyse was soos volg. Honderd slakke is in vyf groepe van 20 elk verdeel en onderskeidelik vir 24 ure in akwariumwater by temperature van 5, 10, 15, 20 en 25°C geaklimeer. Tydens die laaste 12 ure van die akklimeringsperiode

is die slakke in skoon bakke oorgeplaas. Gedurende hierdie periode is geen voedsel aan die proefdiere voorsien nie. Na die 24 ure akklimeringsperiode is die slakgroepe in die eksperimentele kamers vir ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 blootgestel. Die blootstellingstemperatuur van elke slakgroep het ooreengestem met die akklimeringstemperatuur waaraan elke slakgroep oorspronklik onderwerp was. Die koperkonsentrasies in die slakke is na blootstelling met die atoomabsorpsiespektrofotometer bepaal.

Terselfdertyd is ook 'n eksperiment uitgevoer om 'n aanduiding van die metabolisme van die slakke te kry deur te kyk na die lokomotoriese aktiwiteite van die slakke wat by hierdie temperature blootgestel is. Hiervoor is 25 slakke in vyf groepe van vyf elk verdeel. Die slakke van elke groep is vervolgens versigtig met 'n kwassie met vinnigdrogende verf sodanig gemerk dat elke slak van 'n groep 'n ander kleur op die apeks van die skulp vertoon het. Op dié wyse kon die afstand van beweging van elke slak afsonderlik bepaal word. Die slakgroepe is hierna afsonderlik in slakbakke geplaas waarvan die bodem van die bak in  $4 \text{ cm}^2$  dele gemerk is. Hierdie verdeling het daartoe bygedra dat die afstand wat elke slak afgelê het, bepaal kon word. Die slakke is aanvanklik in die middel van die gaasbodem geplaas en daarna toegelaat om rond te beweeg. Sodra 'n slak die periferie van die bodem bereik het

en geneig het om teen die vertikale kante van die bak op te kruip, is hy weer na sy oorspronklike posisie in die middel van die bak teruggeplaas en toegelaat om weer te begin beweeg. Die beweegafstande van elke slak is na die eksperiment bymekaargetel waarna die gemiddelde afstand wat al vyf slakke van 'n groep by elke temperatuur afgeleë het, bereken is. Die duur van die eksperiment was 30 minute. Die resultate van beide eksperimente word in tabelle 20 en 21 en figuur 18 en 19 weergegee.

### Bespreking van die resultate

Soos gesien in tabel 20 en figuur 18 het die temperatuur geen invloed uitgeoefen op die opname van koper nie. Daar is egter 'n direkte verband tussen temperatuur en slakbeweging wat dus slakmetabolisme weerspieël (tabel 21 en figuur 19). As die twee eksperimente se resultate nader beskou word, kan afgelei word dat verhoogde metabolisme nie aanleiding gee tot verhoogde koperopname nie. Dit beteken dat aktiewe absorpsie van koper nie plaasvind nie.

Tripp (1961) het egter die fagositiese opname van partikels by *B. glabrata* aangedui. Of hierdie proses, wat met die metabolisme van die slak verband hou, ook 'n rol by koperopname speel, is onbekend. Zylstra (1972) het die opname van ferritienpartikels deur die dorsale kopepidermis sowel as deur die binneste mantelepiteel by *L. stagnalis* aangetoon. Selle van

TABEL 20. Die gemiddelde koperkonsentrasie in dpm in totale slakke by verskillende blootstellingstemperature.

Blootstellings= temperatuur in °C	Gemiddelde totale slakmassa in mg	koperkonsentra= sie per totale slak	S.A.
5	17,42	$9,02 \times 10^{-3}$	$1,28 \times 10^{-3}$
10	187,01	$8,92 \times 10^{-3}$	$1,47 \times 10^{-3}$
15	156,72	$8,40 \times 10^{-3}$	$0,853 \times 10^{-3}$
20	163,19	$8,74 \times 10^{-3}$	$1,75 \times 10^{-3}$
25	88,74	$9,33 \times 10^{-3}$	$4,43 \times 10^{-3}$

TABEL 21. Die gemiddelde beweegafstand van slakke by verskillende blootstellingstemperature.

Temperatuur in °C	Gemiddelde totale slakmassa in mg	Beweegafstand in cm
5	197,56	2,54
10	212,74	29,32
15	196	37,38
20	220,76	49,6
25	219,72	46,33

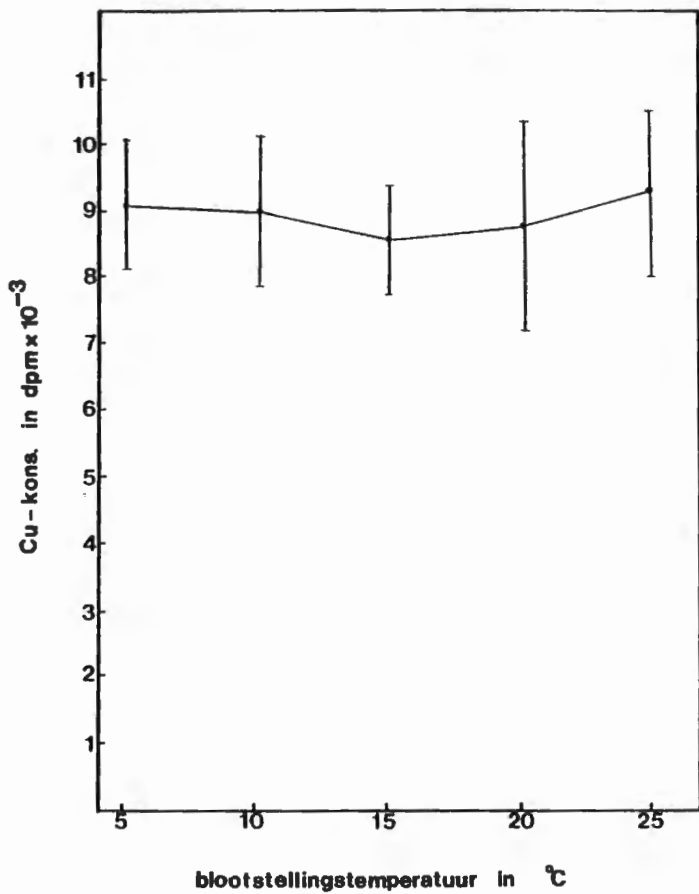


FIG. 18 n Grafiese voorstelling om die verband tussen die koperkonsentrasie teenoor die temperatuur by totale slakke aan te toon.

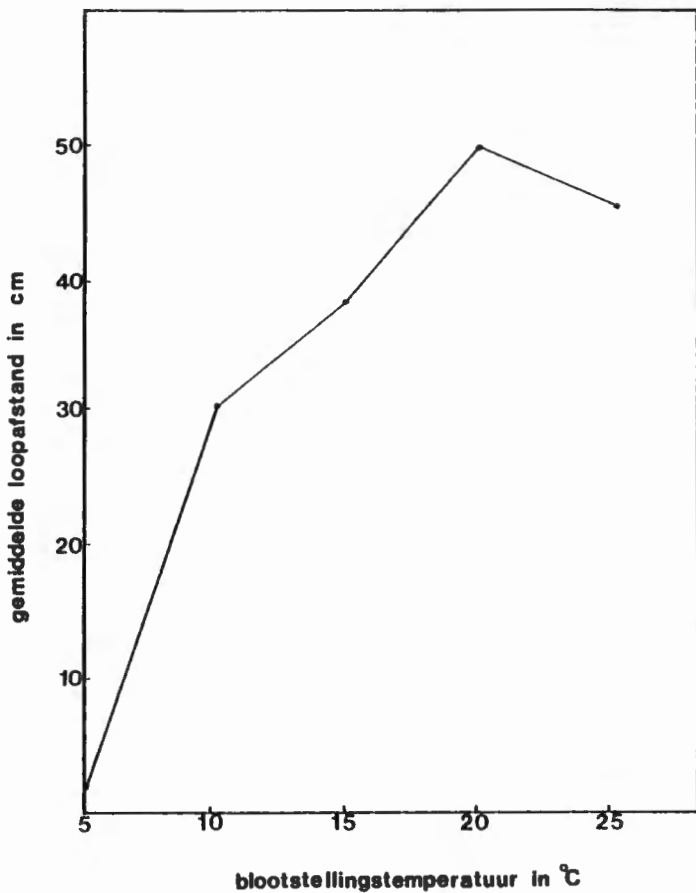


FIG. 19 n Grafiese voorstelling om die gemid=  
delde loopafstand wat slakke, bloot=  
gestel aan verskillende temperature,  
in 30 minute beweeg het.

die buitenste mantelepiteel het egter nie hierdie funksie vervul nie. Laasgenoemde outeur het met *L. stagnalis* gevind dat die opname van ferritien binne twee minute plaasvind terwyl kolloïdale silwer glad nie opgeneem word nie. Hierdie selektiwiteit is volgens hom moontlik toe te skryf aan die eienskappe van die partikel ten opsigte van die lading, die grootte en die vraag of die partikel n proteïen is of nie. In hierdie geval was kolloïdale silwer n nie-proteïen en ook groter as kolloïdale ferritien. Die koperkonsentrasie van die temperatuureksperiment wat by *B. tropicus* gevind is, het goed vergelyk met die konsentrasies in die slakke wat in eksperimente 3.7 vir ses ure blootgestel is.

Om die resultate en gevolgtrekkings wat tot dusver verkry is, saam te vat, kan gesê word dat die wyse van koperopname deur *B. (B.) tropicus* hoofsaaklik n adsorpsieproses is. Dit word deur die volgende ondersteun:

- (i) die vinnige toename van koper in die slakke na blootstelling,
- (ii) die gebrek aan vrystelling van opgeneemde koper oor n periode van 18 ure en
- (iii) die gebrek aan n verband tussen slakmetabolisme en die hoeveelheid koper wat deur die slakke opgeneem word.

Wat die afname van koper uit die blootstellingsmedium betref, ontstaan die vraag of hierdie vinnige afname net aan die adsorpsie van koper op die slakke toege-

skryf kan word of ook aan adsorpsie van die swaar= metaal op die wande van die eksperimentele kamers. Indien beide prosesse plaasvind, sou die adsorpsie op die wande ook n bydrae lewer tot verlies van koper uit die blootstellingsmedium. Die adsorpsie= gedrag van koper op grond en organiese materiaal is ook deur Cheng & Sullivan (1974) uitgewys, terwyl akkumulاسie van swaarmetale op bodemsedimente deur Laube, Ramoorthy & Kushner (1979) aangetoon is. Yager & Harry (1964) het die adsorpsie van swaar= metaalione op die bekere waarin die slakke bloot= gestel is as n moontlikheid beskou. Daar word eg= ter nie melding gemaak van die materiaal waaruit die bekere bestaan het nie. Dit sou dus wenslik wees om na te gaan wat die bydrae van die Perspex= kamers in die opname of adsorpsie van koper sou wees.

### 3.14 n Ondersoek na die moontlike adsorpsie van koper op die oppervlakke van die eksperi= mentele kamers.

Na aanleiding van vorige eksperimente waar daar n vinnige afname van koper in die blootstellingsmedium tydens die eerste 60 minute voorkom asook dat koper adsorberingseienskappe op n verskeidenheid van . biologiese en nie-biologiese materiale vertoon (Yager & Harry, 1964, Laude et al. 1979), is die moontlikheid van koperadsorpsie op die wande van eksperimentele kamers ondersoek. Hierdie eksperiment is by pH 8,4, 7,2 en 4 in Perspex- en Pyrex-

bekers uitgevoer.

Die eksperimentele werkwysie het soos volg verloop. n Hoeveelheid akwariumwater is geneem en in drie volumes van  $1 \text{ dm}^3$  elk verdeel. Die pH-waardes van hierdie volumes is onderskeidelik na 8,4, 7,2 en 4 pH-eenhede aangepas. Hierna is 1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossing in elke  $1 \text{ dm}^3$  volume opgemaak. Ses Pyrex-glasbekers is hierna geneem waarvan daar telkens twee bekers, met  $30 \text{ cm}^3$  1 dpm  $\text{CuSO}_4$ -oplossing, wat by n bepaalde pH opgelos is, gevul is. Hierdie werkwysie is met ses Perspex-bekers herhaal. Die gevulde houers is hierna in n waterbad by  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  geplaas. Drukklug is tydens die drie ure periode deur die oplossings geborrel. Dit het verhoed dat die onopgeloste koperverbindings, hoofsaaklik  $\text{CuO} \times \text{H}_2\text{O}$  en  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  wat by hoë pH-waardes gevorm word, tydens monsterring uitsak (Meyling, 1966). Monsters van  $1 \text{ cm}^3$  is by tyd nul en na 15, 30, 45, 60, 120 en 180 minute uit al die houers onttrek waarna die koperkonsentrasies met die atoomabsorpsiespektrofotometer bepaal is. Die resultate word in figure 20, 21 en 22 weergegee.

### Bespreking van die resultate

Uit die resultate is dit duidelik dat daar n afname in die meetbare koperkonsentrasie by n pH 8,4 en 7,2 in beide tipes houers voorkom, terwyl die koperkonsentrasie by pH 4 konstant bly. Hierdie afname in die koperkonsentrasie by pH 8,4 en 7,2,

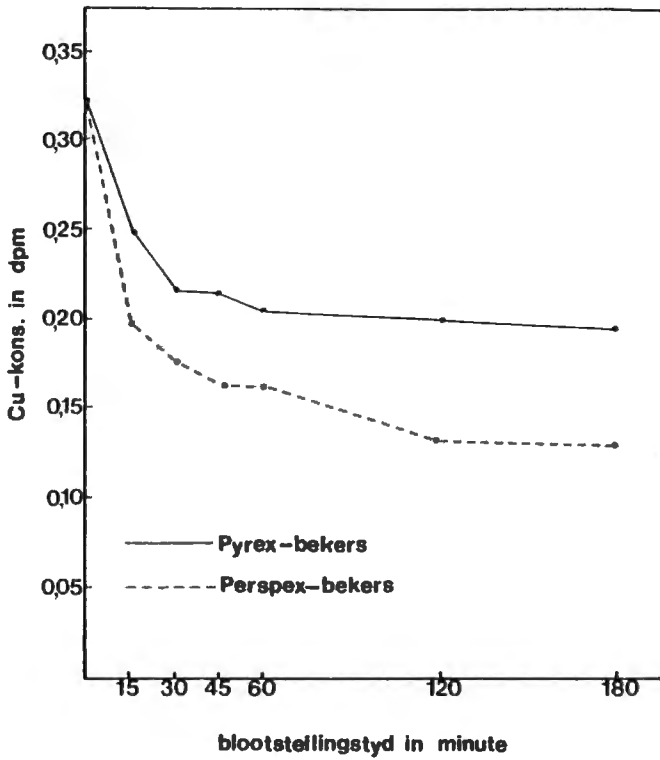


FIG. 20 n Grafiese voorstelling van die afname in die koperkonsentrasie van n 1 dpm kopersulfaatooplossing by pH 7,2 in Perspex - en Pyrex-bekers

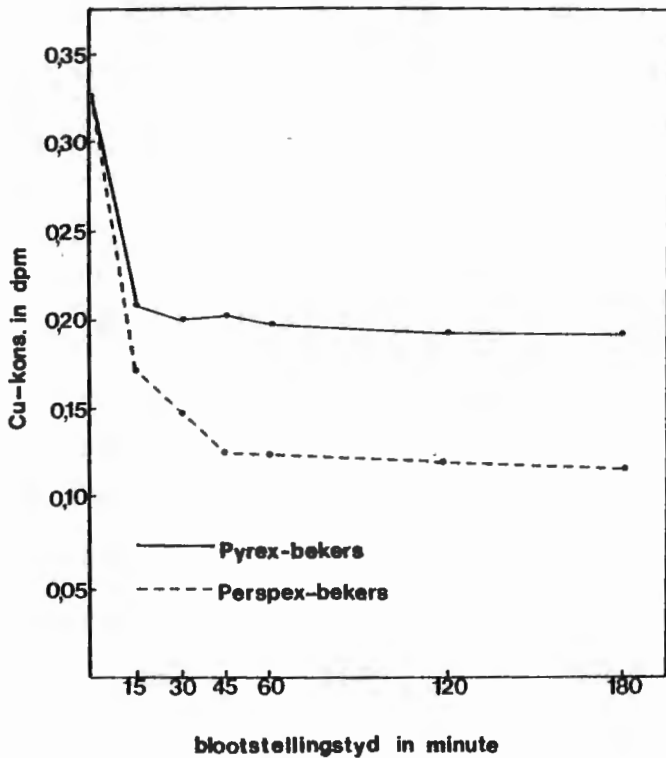


FIG. 21 n Grafiese voorstelling van die afname in koperkonsentrasie van n 1 dpm kopersulfaatoplossing by pH 8,4 in Perspex - en Pyrex-bekers

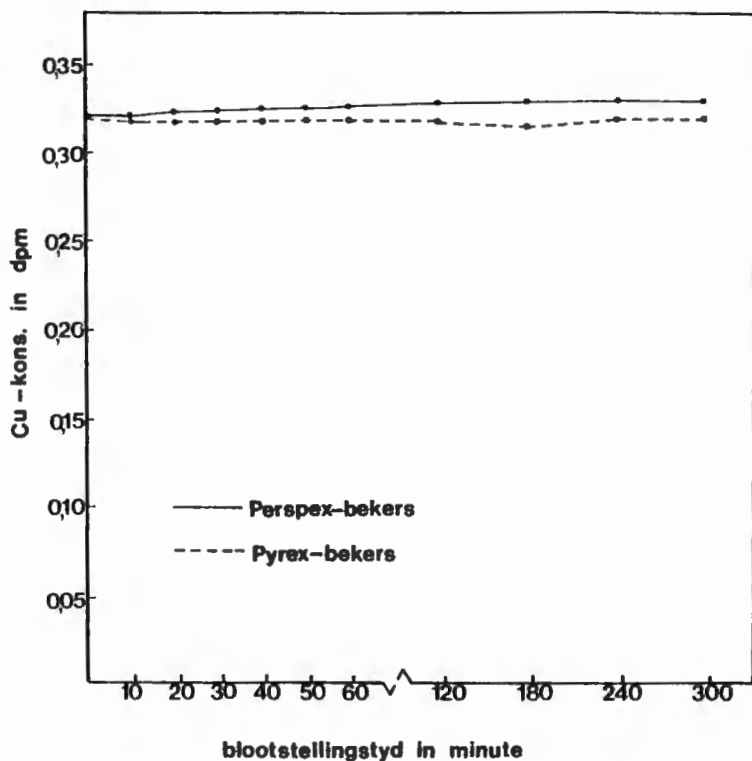


FIG. 22 Die koperkonsentrasie in n 1 dpm koper-sulfaatooplossing opgemaak in akwarium-water met n pH van 4 oor n periode van ses uur in Perspex - en Pyrex-bekers

veral tydens die eerste 15 minute van die eksperiment, verloop vinnig. Tydens die daaropvolgende 45 minute is daar 'n stadiger afname in die koperkonsentrasie wat daarna neig om 'n plato te vorm. Dit is verder uit figure 20 en 21 duidelik dat die afname in die koperkonsentrasie by die Pyrex-glasbekers minder was in vergelyking met die Perspex-bekers. Hierdie afname in die koperkonsentrasie in die oplossings is heel waarskynlik toe te skryf aan die adsorpsie van koperbindings op die eksperimentele houerooppervlakke. Volgens Meyling (1966) word die graad van hidrolise van die verbinding deur die pH van die water beïnvloed. Verder het hy gevind dat die presipitasie van kopersulfaat feitlik volledig in alkaliese water plaasvind. In die geval van pH 7,2 en 8,4 is die vorming van presipitate ook waargeneem. Hierdie uitpresipitering van koperbindings kon egter nie tot die afname in die koperkonsentrasies in die oplossings aanleiding gee het nie omdat die gevormde presipitate deur die borreling van lug in suspensie gehou word.

Volgens Meyling (1966) staan die akkumulاسie van die opgeloste stof op die oppervlak van soliede materiaal as adsorpsie bekend. Dit vind plaas as die opgeloste stof die oppervlakspanning tussen die soliede oppervlak en die oplosmiddel verlaag. Hiervolgens blyk dit dat oppervlakspanning in die geval van die Pyrex-houers hoër is as by die Perspex-eksperimentele kamers.

In die geval van pH 4 (fig. 22) het geen sigbare presipitate in die oplossing gevorm nie en was al die koper in die  $\text{Cu}^{2+}$ -vorm teenwoordig. Omdat die koperkonsentrasie in dié geval by beide tipe houers konstant bly, is dit waarskynlik die  $\text{CuO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -verbindings wat by pH 8,4 en 7,2 die adsorpsie-eienskappe besit en vir die afname in die koperkonsentrasie verantwoordelik is.

Hierdie bevindinge kan in samehang met die afname in die koperkonsentrasies tydens die slakblootstellingseksperimente bespreek word. Die afname in die koperkonsentrasie tydens die eerste 10 minute waartydens slakke aan koper blootgestel is, kan dus nie slegs aan die invloed van die slakke toegeskryf word nie. Dit is uit tabel 16 van eksperiment 3.9 duidelik dat die koperkonsentrasie van 0,33 dpm tot gemiddeld 0,156 dpm tydens die eerste 10 minute van blootstelling by pH 7,2 daal. Na 30 minute is die konsentrasie 0,123 dpm. In die eksperiment waar geen slakke teenwoordig was nie, is die koperkonsentrasie na 30 minute by dieselfde pH 0,17 dpm. In die geval waar die akwariumwater na pH 8,4 aangepas is, was die waardes na 30 minute blootstelling met slakke 0,085 dpm terwyl dit op dieselfde tyd sonder slakke 0,145 dpm was. Dit is dus duidelik dat die proefdiere wel 'n deurslaggewende rol speel in die afname van die koper in die blootstellingsmedium.

Dit is egter verder nog nie duidelik of koper in

al sy verbindings soos wat dit in water met hoë pH-waardes voorkom, ewe veel op die slak en die Perspex-bekers adsorbeer en ewe toksies vir die slak is nie.

Dat een van hierdie koperverbindings wel 'n groter invloed op die proefdiere kan hê, is baie waarskynlik. Cheng & Sullivan (1973) het gevind dat  $\text{Cu}(\text{DEG})_2$  koper(II)-bis-N,N-dihidroksie-etielgliserien 'n merkbare afname in die respirasiekoers van *B. glabrata* tot gevolg het, terwyl Cu EDTA koper (II)-etileendiamien-N,N,N',N'-tetra-asynsuur geen opmerklike verskil in die respirasietempo teenoor die kontroleslakke getoon het nie. Verder is gevind dat  $\text{Cu}(\text{DEG})_2$  'n 50% mortaliteit tot gevolg gehad het met 'n dosis van 3,14 dpm tydens 'n twee ure blootstellersperiode. Met Cu EDTA het geen mortaliteite voorgekom selfs met 'n blootstellingsdosis van 100 dpm tydens 'n twee ure blootstellingsperiode nie.

Daar word egter nie in hulle studie melding gemaak of beide verbindings deur die slakke opgeneem word nie. Volgens die outeurs gaan die toksiese effek van alle koperverbindings hand aan hand met die stereochemiese blootgesteldheid van koper in die verbinding. Of die posisie van koper in die verbinding ook 'n invloed uitoefen op die adsorpsie-eienskappe van so 'n verbinding kan tans niks oor gesê word nie. Indien dit wel plaasvind sou dit tot gevolg hê dat, as koper by 'n stereochemiese verbinding blootgestel is, dit makliker aan die slak sal adsorbeer.

Dit is waarskynlik die rede waarom Cu EDTA tydens die toetsing glad nie letaal was nie. Dit is egter nie fisies moontlik om  $\text{CuO} \times \text{H}_2\text{O}$  en  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  by die getoetste pH-waardes te skei nie. Daarom kan nie uit die resultate van hierdie studie gesê word welke verbinding meer adsorbeer of letaal vir die slakke is nie. Omdat die koper by pH 4 nie op die wande van die eksperimentele kamers geadsorbeer het nie, ontstaan die vraag of koper as  $\text{Cu}^{2+}$  wel op slakke sal adsorbeer en of dit via 'n ander weg deur die slakke opgeneem sal word. Dit kan egter nie ondersoek word nie omdat 'n pH van 4 fisiologies nie vir slakke geskik is nie.

### 3.15 'n Ondersoek om na te gaan of koper deur dooie slakweefsel geadsorbeer word.

Die doel van hierdie ondersoek was om te bepaal of koper deur die kopvoetgedeelte van slakke wat met droë hitte doodgemaak is, geadsorbeer word. Die eksperimentele werkwyse was soos volg. Vyftien slakke is geselekteer en deeglik met handdoekpapier afgedroog. Hierna is die slakke in twee groepe verdeel waarvan een groep van vyf slakke as kontrole gedien het. Die oorblywende groep slakke is aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 8,4 blootgestel. Vir hierdie eksperiment is die slakke voor blootstelling met droë hitte ( $52^\circ\text{C}$ ) gedood (kyk Materiaal en Metodes) waarna die sagte materiaal uit die skulpe verwyder is. Die kopvoetgedeeltes is van die sagte materiaal afgeknip, op handdoekpapier "gedroog" en

120

daarna geweeg. Hierna is die weefsels vir vyftien minute aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  blootgestel. Die kontrole=monsters is dieselfde behandel behalwe dat hulle nie aan  $\text{CuSO}_4$  blootgestel is nie. Die koperkonsentrasies in al die monsters is met die AAS bepaal. Die resultate word in tabel 22 weergegee.

### Bespreking van die resultate

Uit die resultate van tabel 22 kom dit voor asof daar 'n toename in die koperkonsentrasie van blootgestelde slakweefsel is. Daar moet egter op gelet word dat die gemiddelde weefselmassa van die blootgestelde slakke heelwat hoër as die massa van die kontrole=slakke was.

Uit die standaardafwykings is dit duidelik dat daar nie 'n betekenisvolle toename in die koperkonsentrasie van blootgestelde slakke voorkom nie. Dit is dus onwaarskynlik dat koper slegs deur 'n fisiese adsorpsieproses op die dooie slakweefsel vassit. Omdat vorige eksperimente egter sonder uitsondering wel op adsorpsie as manier van opname dui, is dit moontlik dat koper eerder deur 'n chemiese adsorpsieproses opgeneem word. In dié eksperiment is dit waarskynlik die droë hitte van  $52^\circ\text{C}$  wat die chemiese verbindings soos proteïene kan denatureer sodat die bindingsposisie vir koper nie meer bestaan nie.

der  $^{64}\text{Cu}$  deur die slakke opgeneem word. Die akkumulering van  $^{64}\text{Cu}$  op die epiteelweefsel van die rektaalrif van *B. glabrata* is deur Sullivan, Rodrick & Cheng (1974) aangetoon. Dit is so, omdat die rektaalrif deur water omspoel word en dus met die koperblootstellingsmedium in kontak is. Cheng & Sullivan (1974) het ook  $^{67}\text{Cu}$  op die kop- en voetepiteel van *B. glabrata* na blootstelling aan hierdie radio-isotoop gevind.

Op grond van al hierdie bevindings is besluit om deur middel van 'n transmissie-elektronmikroskopiese ondersoek na te gaan of die oppervlakepiteelweefsel van die slak nadelig deur die blootstellingsdosis beïnvloed word. Dit was in hierdie geval belangrik om die proefdiere in 'n lewende toestand te dissekteer omdat die droë hitte doodmaaktegniek (Van Aardt & Coertze, 1981) tot moontlike histologiese veranderinge in die proefdiere aanleiding kon gee. Die werkwyse van hoe die eksperiment uitgevoer is, word volledig onder Materiaal en Metodes bespreek. Die resultate word in figure 23 en 24 weergegee.

#### Bespreking van die resultate

As die elektronmikrograwe van die kontrole en eksperiment van beide die tentakel en kopepiteel vergelyk word, kan gesien word dat weefselbeskadiging ingetree het. Dit is veral opvallend in die gebied van die basaallamina waar die bindweefsel swelling ondergaan het, of weggetrek het van die

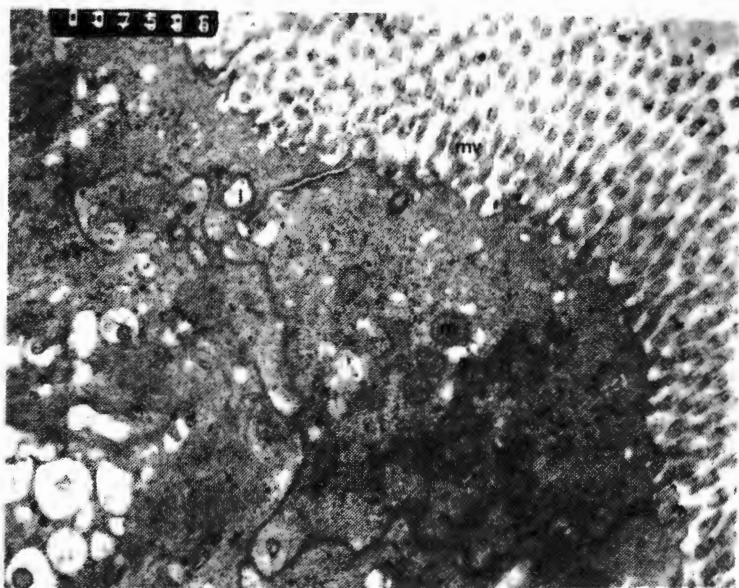


Fig. 23a.

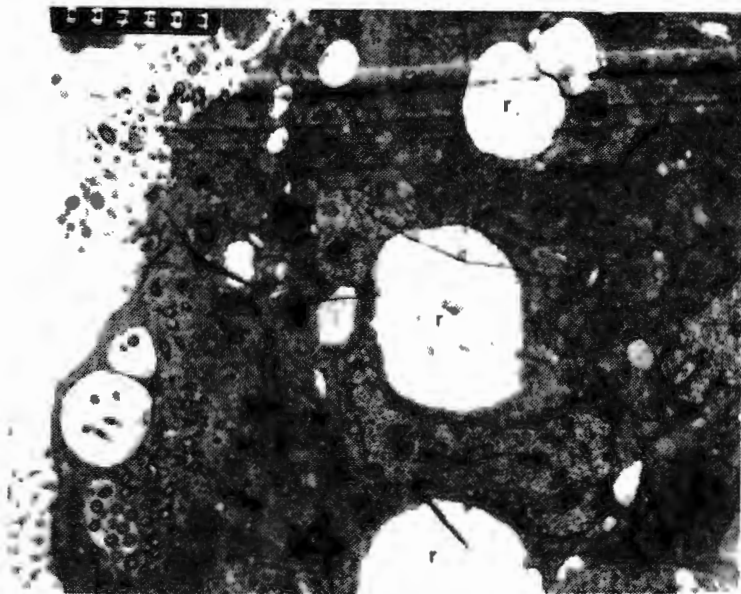


Fig. 23b.

Fig. 23a. n Elektronmikrograaf van die kontrole-koepiteel om die mikrovilli(mv), mitochondrions(m), Golgi-apparaat(g) en lisosoomagtige organelle(l) aan te toon. X 13000

Fig. 23b. n Elektronmikrograaf van die eksperiment-koepiteel om die ruimtes(r) aan te toon. X 7500

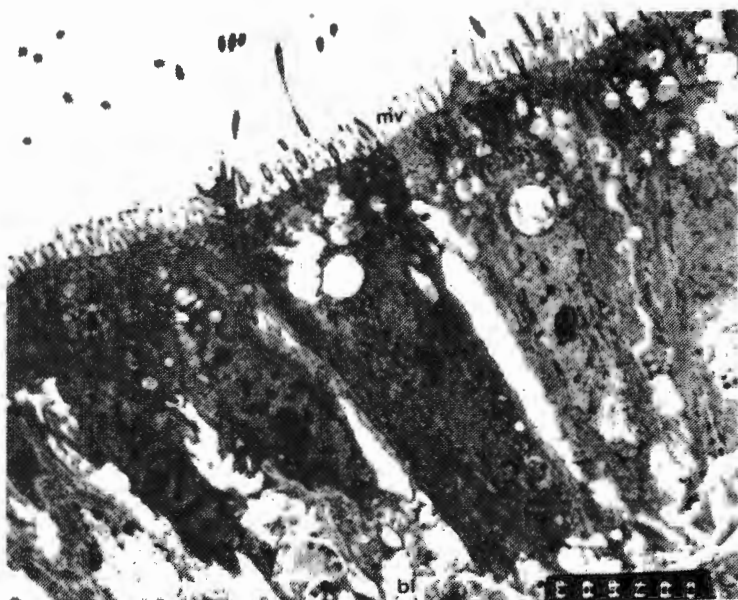


Fig. 24a.

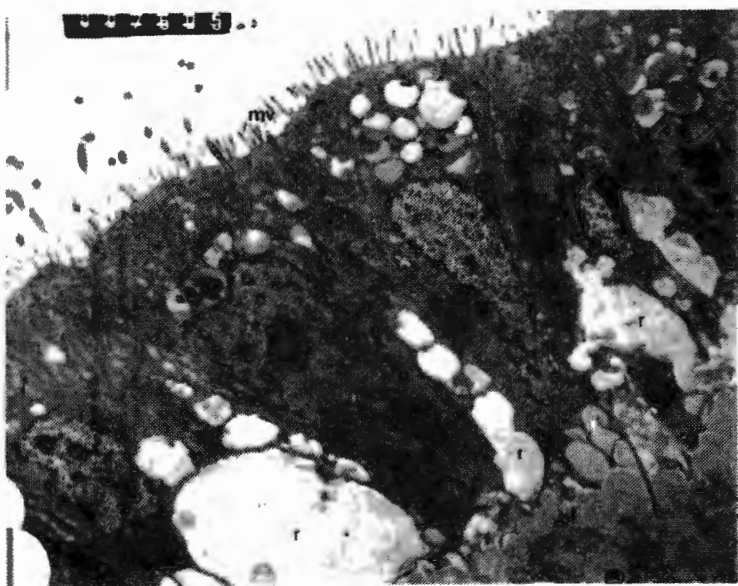


Fig. 24b.

- Fig. 24a. n Elektronmikrograaf van die kontrole-tentakel-epiteel om die mikrovilli(mv) en basaallamina(bl) aan te toon. X 4300
- Fig. 24b. n Elektronmikrograaf van die eksperiment-tentakel-epiteel om die mikrovilli(mv), ruimtes(r) en basaallamina(bl) aan te toon. X 4300

basaallamina. Hierdie groot ruimtes, wat geen elektrondigheid vertoon nie, is opvallend groot, die maksimale grootte vir die tentakelepiteel was 10,46  $\mu\text{m}$  terwyl dit in die kopepiteel, tussen die basaallamina en onderliggende bindweefsel, 4,5  $\mu\text{m}$  in deursnee was.

Volgens Sullivan & Cheng (1975) word versteuring van weefsel by die rektaalrif toegeskryf aan beskadiging van pigment selle wat in die los bindweefsel teenwoordig is. Dit is veral opvallend dat die weefsel van beide die kopepiteel sowel as die epiteelweefsel van die tentakel op dieselfde wyse beskadig word. Soos gesien kan word in die kontrole van die kopepiteel (fig.23a) is daar talle mikrovilli, mitochondrions, Golgi-liggame en lisosoomagtige organelle in die selle teenwoordig. Volgens Zylstra (1972) dui die teenwoordigheid van hierdie organelle op 'n opnamefunksie van partikels. Of die epiteel selle van die tentakel ook 'n opnamefunksie besit of nie, is nie duidelik nie. Uit die resultate van vorige eksperimente kom dit voor asof hierdie weefselbeskadiging nie noodwendig 'n gevolg is van partikels of opgeloste stowwe wat opgeneem is nie maar ook kan voorkom na die adsorpsie van toksiese stowwe soos koper op die epidermis. Hieruit word afgelei dat alle epiteelweefsel wat met die blootstellersmedium in aanraking kom, beskadig word. So het Cheng & Sullivan (1977) aangetoon dat daar 'n swelling van die los vaatryke bindweefsel en epiteel selle van die rektaalrif is as gevolg van die osmotiese influks van water nadat die membraanpermeabiliteit

van die epiteelselle deur koper versteur is. Hieruit volg dat die toksiese invloed van koper gesetel is in die aanvanklike beskadiging van epiteelselle. Dit is verder deur Sullivan & Cheng (1975) gevind dat die basaallamina by die rektaalrif na blootstelling aan koper nie meer teenwoordig was nie, terwyl die los vaskulêre bindweefsel leeg voorgekom het met groot ruimtes in die matriks. Dit is veral hierdie ruimtes wat baie prominent in figure 23b en 24b van die elektronmikrograwe teenwoordig is. Soos blyk uit die kontroles (figure 23a en 24a) is die streke dig met bindweefsel. Dit is interessant dat by die eksperimentele weefsel van die tentakel geen beskadiging van die mikrovilli voorkom nie. Sullivan & Cheng (1975) het by die rektaalrif gevind dat mitochondriondegenerasie in die matriks plaasvind met wyer ruimtes tussen die binne- en buitemembraan van die mitochondrion. Wat verder opvallend is, is die verskynsel dat die weefselbeskadiging soos aangedui in figure 23b en 24b hoofsaaklik beperk is tot die gebied direk onder die epiteellaag. Dit is in ooreenstemming met die resultate van Ryder & Bowen (1977) wat met skandeerelektronmikroskopie gevind het dat groot hoeveelhede koper op die epiteelselle van *Agrilolimax reticulatus* teenwoordig was, maar min koper in die onderliggende weefsel voorgekom het. Studies deur De Azevedo et al. (1958) dui egter daarop dat  $^{64}\text{Cu}$  deur die intestinum "geabsorbeer" word waarna die isotoop na verskillende organe diffundeer. Hierdie outeurs het egter ekstreme hoeveelhede kopersulfaat vir hulle

eksperimente gebruik (1 300 - 5 000 dpm) wat die slakke kon dood voordat dit werklik biologies na die genoemde organe vervoer is. Ryder & Bowen (1977) het met die transmissie-elektronmikroskoop aangetoon dat koper deur die zonula adherens en desmosome van aangrensende epiteelselle beweeg en op hierdie wyse die slak via 'n parasellulêre roete binnedring.

Om op te som kan gesê word dat koper op die epiteelselle van alle uitwendige sowel as inwendige weefsel wat met die blootstellingsmedium in aanraking kom, adsorbeer. 'n Gevolg van hierdie adsorpsie is 'n verandering in die membraanpermeabiliteit van die selle wat lei tot 'n toename in wateropname in die slakweefsel (Sullivan & Cheng, 1975) en 'n uitbeweging van elektroliete soos Na, Ca en Cl uit die slak uit (Van Aardt & Coertze, 1981).

#### 4. ALGEMENE BESPREKING

Die patofisiologiese effekte van koper (as kopersulfaat) op slakke is op verskeie maniere vasgestel. Die mees algemene effek van letale dosisse (1 dpm kopersulfaat) is dat die slakke n verlamde voorkoms vertoon. Hierdie verskynsel vind binne n paar sekondes plaas nadat die diere in die koperoplossing geplaas is en dit duur so lank as wat die eksperiment aanhou (ses ure). Sodra hierdie blootgestelde slakke in kopervrye water geplaas word, is die herstel uit die verlammingstoestand opvallend vinnig. Binne een minuut word die normale bewegingspatrone vertoon. By hoër dosisse kopersulfaat trek die liggaam van die slak in die skulp terug.

Volgens van Aardt & Coertze (1981) wat die elektrolietveranderinge in *B. tropicus* nagegaan het, is dit duidelik dat natrium-, kalsium- en chloorione in groot hoeveelhede uit die liggaam van die slak beweeg. Hulle postuleer dat die deurlatenheid van die slakshuid verhoog en die elektrolietverlies kan veroorsaak. Verder het hulle, net soos Cheng & Sullivan (1974) gevind dat die osmotiese waarde van die hemolimf drasties daal.

Die afname in hartpuls asook suurstofverbruik is deur Cheng & Sullivan (1974) by veral Cu DEG (koper (II)-bis-N,N-dihidroksie-etiëlglycerien gevind, terwyl Cu-EDTA(koper(II)-etiëldiamin-N,N,N<sup>1</sup>,N<sup>1</sup>-tetra-asynsuur as knypverbinding geen effek op die

fisiologie het nie.

Histologiese veranderinge van die huidepiteel is deur hierdie ondersoek en dié van Sullivan & Cheng (1975) gevind. Die veranderinge word hoofsaaklik gemanifesteer deur die ontstaan van groot vloeistofruimtes net onder die huidepiteel.

Presipitasie van protoplasmiese proteïene en die volledige vermenging van die protoplasma van die huidepiteel is deur De Azevedo et al. (1958) in autoradiografiese studies vasgestel. In hierdie eksperiment is tot 5 000 dpm kopersulfaat gebruik. Binding van koper aan proteïene is by die oester *Crassostrea cucullata* deur Silva & Qasim (1979) gevind. Ensiematiese inhibisie van suksinoksidase deur koper is vasgestel deur Kirdani & Evans. (1954), terwyl Yager & Harry (1966) gevind het dat koper die sulfhidrielkettings van ensieme nadelig kan beïnvloed.

Uit bestaande inligting is dit duidelik dat koper op allerhande wyses die slak kan benadeel. Die vraag hoe koper die slak binnedring om al hierdie histoenfisiopatologiese veranderinge teweeg te bring, is nog nie duidelik beantwoord nie.

Uit hierdie reeks eksperimente kom dit voor asof koper op alle blootgestelde epiteelweefsel adsorbeer. Hierdie gevolgtrekkings word deur die werk van Ryder & Bowen (1977) ondersteun. Die resultaat van

een eksperiment dui daarop dat adsorpsie by *B. (B.) tropicus* nie plaasvind as die slak gedood word by 52°C en dan aan kopersulfaat blootgestel word nie. Dit kan beteken dat adsorpsie van 'n bepaalde aard hier 'n rol speel. Hier word voorgestel dat adsorpsie van koper chemisorpsie kan wees waar daar 'n elektroniese interaksie (elektronoordrag of elektron=deling) tussen die adsorbaat en die adsorbent is (Scholten & Kruyer, 1970).

Ander navorsers (Cheng & Sullivan, 1974) wat met koper as molluskisied gewerk het, beweer dat akkumulاسie van koper op die rektaalrif en kopvoet, plaasvind. Hierdie outeurs, wat sekerlik die meeste navorsing op koper as molluskisied gedoen het, kan nie sê of adsorpsie of absorpsie van koper deur die slakhuid plaasvind nie. Hulle term "akkumulاسie" kan, tesame met hulle outoradiograwe, volgens my siening, daarop dui dat absorpsie wel plaasvind. Dit is jammer dat hierdie outeurs nêrens in hulle eksperimente vermeld by watter pH die ondersoek uitgevoer is nie.

In hierdie studie was dit baie belangrik dat die pH van die kopersulfaatoplossing bekend is voordat enige slakke daarin geplaas is.

Verder het Cheng & Sullivan (1974) nie melding gemaak of koper weer deur die slak vrygestel word nie. Enige vrystelling van koper in kopervrye water sou hulle siening dat koper geabsorbeer word deur 'n

aktiewe opnameproses baie goed ondersteun. Dit is egter moontlik dat die koperioon (Cheng, 1975) wel deur 'n proses van absorpsie opgeneem kan word terwyl koperverbindings soos  $\text{CuO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{Cu}(\text{OH})_2$  op die slak kan adsorbeer. Hierdie afleiding word gesteun deur eksperimente in hierdie studie wat getoon het dat daar nie adsorpsie van koperione by pH 4 op Pyrex-glashouers of Perspex-houers voorgekom het nie. Adsorpsie het egter wel by pH 8,4 op hierdie materiale plaasgevind. By pH 8,4 was koper hoofsaaklik as  $\text{CuO} \cdot x\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{Cu}(\text{OH})_2$ -verbindings in die oplossing teenwoordig.

## 5. OPSOMMING

1. Die agtergrond koperkonsentrasies in slakhemolinf, totale slak en slakskulpe is vasgestel.
2. Koperkonsentrasies in die slakhemolinf en slakskulpe nadat slakke vir ses ure aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 7,2 en 8,4 blootgestel is, het getoon dat die hemolinf of die skulpe geen rol speel in die opname of verspreiding van koper nie.
3. Weens verskille in die oplosbaarheid van koper-sulfaat is die beskikbare hoeveelheid koper in akwariumwater met pH-waardes van 4,0, 7,2 en 8,4 vasgestel.
4. Eksperimente om die akkumulatiewe opname van koper tydens blootstelling aan 1 dpm  $\text{CuSO}_4$  by pH 7,2 en 8,4 vir 'n maksimum periode van ses ure na te gaan, het getoon dat koper binne een uur opgeneem word en dat akkumulاسie nie verder plaasvind nie.
5. Wat die vrystelling van koper uit die slakke na blootstelling betref, is gevind dat geen koper vrygestel word oor 'n periode van 24 ure nie. Hierdie resultaat is deur middel van radioaktiewe koper en met behulp van die atoomabsorpsiespektrofotometer gevind.

6. Eksperimente wat by pH 7,2 en 8,4 oor ses ure en een uur uitgevoer is om die afname van koper in die blootstellingsmedium tydens blootstelling na te gaan, dui daarop dat koper binne 20 minute reeds 'n konstante konsentrasie in die blootstellingsmedium bereik.
7. Dit koperkonsentrasies in slakgroepe wat afsonderlik aan toenemende dosisse blootgestel is, is nagegaan. Die afname van koper uit die blootstellingsmedium is ook nagegaan.
8. 'n Eksperiment om 'n verband tussen koperopname en metabolisme aan te toon, het aan die lig gebring dat 'n toenemende metabolismekoers geen invloed op die opname van koper het nie. Hierdie bevinding tesame met vorige resultate dui daarop dat hierdie swaarmetaal waarskynlik deur adsorpsie opgeneem word.
9. Die verlies van koper uit die water, die opname van koper deur die slak en die vrystelling van koper uit die slak is met radioaktiewe koper ( $^{64}\text{Cu}$ ) en atoomabsorpsiespektrofotometrie gemeet. Die resultate was in alle gevalle dieselfde.
10. 'n Eksperiment om na te gaan of koper deur dooie slakweefsel geadsorbeer word is uitgevoer. Die resultate wat verkry is, dui daarop dat chemisorpsie van koper waarskynlik

plaasvind en nie fisisorpsie nie.

11. Transmissie-elektronmikroskopiese ondersoek om die histopatologiese effekte op oppervlak-epiteelweefsel aan te toon, het aan die lig gebring dat beide die tentakel- en kopepiteel dieselfde histologiese veranderinge ondergaan het.

## 6. DANKBETUIGINGS

Hiermee spreek ek my dank en waardering teenoor die die volgende persone uit.

Prof. W.J. van Aardt, onder wie se leiding ek hierdie projek kon onderneem, vir sy onbaatsugtige hulp en advies wat tot my beskikking was.

Prof. J.A. van Eeden vir sy belangstelling in hierdie projek.

Mev. E.S. Hibbert, Instituut vir Biostatistiek (Potch) van die SAMNR vir die statistiese verwerking van sekere resultate.

--  
Prof. J. Coetzee, hoof van die afdeling Elektronmikroskopie van die Universiteit van Pretoria vir sy hulp en advies met die voorbereiding en hantering van monsters vir transmissie-elektronmikroskopiese studies.

Mev. H. Haasbroek vir die netjiese tikwerk.

Dr. K.N. de Kock vir die proeflees van die manuskrip.

Die PU vir CHO, SAMNR en RAK vir finansiële steun en beskikbaarstelling van apparaat.

## 7. LITERATUURVERWYSINGS

- \*ALLEN, J.D. 1960. Manganese deposition on the shells of living molluscs. *Nature*. 185:336-337.
- AMIARD, J.-C. & AMIARD-TRIQUET, C. 1979. Distribution of Cobalt 60 in a mollusc, a crustacean and a freshwater teleost: variations as a function of the source of pollution and during elimination. *Environmental Pollution*. 20(3):199-213.
- \*ARCARDI, J.A. 1968. Tissue response to the injection of charcoal into the pulmonate gastropod *Lehmania poirieri*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 11:59-62.
- BENSON, W.W., BROCK, D.W., GABICA, J.G. & LOOMIS, M. 1976. Swan mortality due to certain heavy metals in the Mission Lake Area Idaho. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 15(2):171-174.
- BRYAN, G.W., POTTS, G.W. & FORSTER, G.R. 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.) *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. 57:379-390.

- CHENG, T.C. & SULLIVAN, J.T. 1973. A comparative study of the effects of two copper compounds on the respiration and survival of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca : Pulmonata). *Comparative and General Pharmacology*. 4:315-320.
- CHENG, T.C. & SULLIVAN, J.T. 1974. Mode of entry, action, and toxicity of copper molluscicides In Cheng, T.C., (red.) Molluscicides in Schistosomiasis Control. London, Academic Press, Inc. p.89-153.
- CHENG, T.C. & SULLIVAN, J.T. 1977. Alterations in the osmoregulation of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata* due to copper. *Journal of Invertebrate Pathology*. 29:101-104.
- CHOWDARY, V.D., RÃO, P.V. & NARAYANAN, R. 1979. Effects of copper sulphate and sodium pentachlorophenate on adenine and adenosine phosphates in *Lymnaea luteola* (Mollusca : Gastropoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 23(4/5):615-619.
- COERTZE, D.J. 1973. Natrium- en waterbalans in die varswaterslak *Bulinus (Bulinus) tropicus*. Potchefstroom. 123p. (Verhandeling (M.Sc.)-PU vir CHO.)

- COERTZE, D.J. 1976. Die invloed van kopersulfaat op die loon- en waterbalans van *Bulinus (Bulinus) tropicus* (Krauss). Potchefstroom. 245p. (Proefskrif (D.Sc.) - PU vir CHO.)
- COERTZE, D.J. & VAN AARDT, W.J. 1978. 'n Vinnige en betroubare metode om  $^{22}\text{Na}$ -uitfluks in varswaterslakke te bepaal. Wetenskaplike Bydraes van die PU vir CHO. Reeks B: Natuurwetenskappe nr. 97. 10p.
- DE AZEVEDO, J.F., CARVÃO GOMES, F.A., BRAGANCA GIL, F.M., BAPTISTA, A.M. & MENDES DE MAGALHÃES, E. 1958. Application of radio isotopes to the study of the metabolism of freshwater snails (Gastropoda-Pulmonata). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 7(1):84-89.
- \*DE AZEVEDO, J.F., GOMES, F.C., BAPTISTA, A.M. & GIL, F.B. 1957. Studies on the molluscicide action of copper sulphate using  $^{64}\text{Cu}$ . *Zeitschrift Für Tropenmedizin und Parasitologie*. 8:457-464.
- DE JONG BRINK, M., DE WIT, A., KRAAL, G. & BOER, H.H. 1976. A light and electron microscope study on oogenesis in the freshwater pulmonate snail *Biomphalaria glabrata*. *Cell and Tissue Research*. 171:195-219.

- DE JORGE, F.B., ULHÔA CINTRA, A.B. & HAESER (S.J.) P.E. & SAWAYA, P. 1965. Biochemical studies on the snail *Strophocheilus oblongus musculus* (Becquaert). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 44:35-42.
- DE KOCK, K.N. 1973. Die bevolkingsdinamika van vyf medies en veeartsenykundig belangrike varswaterslakspesies onder toestande van beheerde temperatuur. Potchefstroom. 388p. (Proefskrif (D. Sc.)- PU vir CHO.)
- DE KOCK, K.N. & VAN EEDEN, J.A. 1980. Life-table studies on freshwater snails: Culture system and method. Wetenskaplike Bydraes van die PU vir CHO. Reeks B: Natuurwetenskappe, nr. 105. 17p.
- FRANK, G.H. 1963. Some factors affecting the fecundity of *Biomphalaria pfeifferi* (Krauss) in glass aquaria. *Bulletin of the World Health Organization*. 29:531-537.
- GEORGE, S.G., PIRIE, B.J.S., CHEYNE, A.R., COOMBS, T.L. & GRANT, P.J. 1978. Detoxication of metals by marine bivalves: An ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Marine Biology*. 45:147-156.

- GREENAWAY, P. 1970. Sodium regulation in the freshwater mollusc *Limnaea stagnalis* (L.) (Gastropoda : Pulmonata). *Journal of Experimental Biology*. 53:147-163.
- HAMILTON-ATTWELL, V.L. 1973. Elektroforetiese skeidings van die proteïene in die perivitellienovog van die Basommatophora (Mollusca) as taksonomiese hulpmiddel. Potchefstroom. 286p. (Proefskrif (D.Sc.)-PU vir CH0.)
- IRELAND, M.P. & WOOTTON, R.J. 1977. Distribution of lead, zinc, copper and manganese in the marine gastropods *Thais lapillus* and *Littorina littorea* around the coast of Wales. *Environmental Pollution*. 12(1):27-41.
- ISHAK, M.M. & MOHAMED, A.M. 1975. Effect of sublethal doses of copper sulphate and Bayluscide on survival and oxygen consumption of the snail *Biomphalaria alexandrina*. *Hydrobiologia* 47(3):499-512.
- \*KÄGI, J.H.R. & VALLEE, B.L. 1961. Metallothionein: a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *Journal of Biological Chemistry*. 236:2435-2445.

- KINSON, K. & BELCHER, C.B. 1961. The determination of minor amounts of copper in iron and steel by atomic absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*. 31:180-183.
- \*KIRDANI, R. & EVANS, G.T. 1954. Studies on the molluscicidal action. II. The inhibition of snail succinoxidase by some potent molluscicides. NAMRU.-3 Cairo, Res. Report. NM.  
(Hierdie verwysing is nie in die oorspronklike gesien nie en kon nie opgespoor word nie.)
- LAUBE, V., RAMAMOORTHY, S., KUSHNER, D.J. 1979. Mobilization and accumulation of sediment bound heavy metals by algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 21(6):763-776.
- LEVER, J. & BEKIUS, R. 1965. On the presence of an external hemal pore in *Lymnaea stagnalis* (L.) *Experientia*. 21:1-4.
- MEYLING, A.H. 1966. Notes on some limiting factors in the use of molluscicides. *South African Journal of Science*. 62(7):224-228.
- PLATTE, J.A. & MARCY, V.M. 1965. Atomic absorption spectrophotometry as a tool for the water chemist. *Atomic Absorption Newsletter*. 4:289-292.

- RAHEEM, K.A., EL-GINDY, H. & AL-HASSAN, M.J. 1979. Susceptibility of different body-sized *Bulinus truncatus* to molluscicidal action at two different temperatures. *Hydrobiologia*. 65(2): 129-133.
- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*. 17:208-212
- ROUBOS, E.W. 1976. Regulation of neurosecretion in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* (L.) Amsterdam. 136p. (Proefskrif - Vrije Universiteit te Amsterdam).
- RYDER, J.A. & BOWEN, I.D. 1977. The slug foot as a site of uptake of copper molluscicide. *Journal of Invertebrate Pathology*. 30:381-386.
- SALEMA, R. & BRANDÃO, I. 1973. The use of pipes buffer in the fixation of plant cells for electron microscopy. *Journal of Submicroscopical Cytology*. 5:79-96.
- SCHIPP, R. & HEVERT, F. 1978. Distribution of copper and iron in some central organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). A comparative study by flameless atomic absorption and electron microscopy. *Marine Biology*. 47:391-399

- SCHOLTEN, J.J.F. & KRUYER, S. 1970. Some recent applications of the calculation of the entropy of the adsorbed phase according to De Boer. In Linsen, B.G., *red.* Physical and chemical aspects of adsorbents and catalysts. Londen, Academic Press. p147-169.
- SILVA, C.D'. & QASIM, S.Z. 1979. Bioaccumulation and elimination of copper in the rock oyster *Crassostrea cucullata*. *Marine Biology*. 52(4):343-346.
- \*SPRONK, N., TILDERS, F. & VAN HOEK, R.J. 1973. Copper in *Lymnaea stagnalis*. III. Uptake from fresh water and the role of the shell. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 45A:257-272.
- SPURR, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research*. 26:31-43.
- SULLIVAN, J.G. & CHENG T.C. 1975. Heavy metal toxicity to *Biomphalaria glabrata* (Mollusca : Pulmonata). *Annals of the New York Academy of Sciences*. 266:437-444.
- SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C. 1976. Comparative mortality studies on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca : Pulmonata) exposed to copper internally and externally. *Journal of Invertebrate Pathology*. 28:255-257.

- SULLIVAN, J.T., RODRICK, G.E., CHENG, T.C. 1974. A transmission and scanning electron microscopical study of the rectal ridge of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca : Pulmonata). *Cell and Tissue Research*. 154:29-38.
- SWINEHART, H.J. & SMITH, K.W. 1979. Iron and manganese deposition in the periostraca of several bivalve molluscs. *Biological Bulletin*. 156:369-381.
- \*TAVARSIN, G.A. 1964. The mechanism of manganese deposition of mollusk shells. *Doklady Akademii Nauk. S.S.S.R.* 154:944-945.
- TRIPP, M.R. 1961. The fate of foreign materials experimentally introduced into the snail *Australorbis glabratus*. *Journal of Parasitology*. 47:745-751.
- VAN AARDT, W.J. & COERTZE, D.J. 1981. Influence of copper sulphate on the water and electrolyte balance of the freshwater snail *Bulinus (Bulinus) tropicus*. *South African Journal of Science*. 16 (4):193-199.
- VAN AARDT, W.J. & FREY, B.J. 1981. Oxygen-binding characteristics of the haemolymph of the freshwater snail *Bulinus (Physopsis) globosus*. *South African Journal of Science*. 16(1):1-4.

- WATLING, R.H., & WATLING, J. 1976. Trace metals in *Choromytilus meridionalis* Marine Pollution Bulletin. 7(5):91-94.
- WELZ, B. 1976. Atomic absorption spectroscopy. New York, Verlag Chemie. 267p.
- WIER, C.F. & WALTER, W.M. 1976. Toxicity of cadmium in the freshwater snail *Physa gyrina* Say. *Journal of Environmental Quality*. 54(4): 359-362.
- WOLMARANS, C.T. 1979. Assimilering van *Chlorella* spp. deur twee varswaterslakspesies. Potchefstroom. 94p. (Verhandeling (M.Sc.) - PU vir CHO.)
- YAGER, C.M. & HARRY, H.W. 1964. The uptake of radio active zinc, cadmium and copper by the freshwater snail, *Taphius glabratus*. *Malacologia*. 1(3):339-353.
- YAGER, C.M. & HARRY, H.W. 1966. Uptake of heavy metal ions by *Taphius glabratus* a snail host of *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*. 19:174-183.
- ZATKA, V.J. 1978. Tantalum treated graphite atomizer tubes for atomic absorption spectrometry. *Analytical Chemistry*. 50(3):538-541.

ZYLSTRA, V. 1972. Uptake of particulate matter by the epidermis of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *Netherlands Journal of Zoology*. 22(3):299-306.

\*Literatuur nie in die oorspronklike gesien nie.