

**'N VERGELYKENDE ONDERSOEK NA DIE INVLOED VAN
KOPERSULFAAT OP VIER GESELEKTEERDE VARSWATER-
SLAKSPESIES**

deur

Hesmarie Mulder

B.Sc.

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

Studieleier: **Dr. C.T. Wolmarans**

Hulpleier: **Prof. K.N. de Kock**

Potchefstroom

1995

ABSTRACT

In this study the effect of copper sulphate exposure on some freshwater snails was investigated. Four species were selected for this investigation. Two containing haemoglobin viz. *Biomphalaria glabrata*, *Helisoma duryi*, and the other two, *Lymnaea stagnalis* and *Lymnaea natalensis* containing haemocyanin.

In all the tests the snails were exposed to pre-determined concentrations of copper sulphate in order to ascertain its general toxicity (LD_{50}), accumulation in the haemolymph, the soft tissue and the shell. Furthermore, depuration of copper sulphate was tested and ultrastructural damage to the soft tissue was investigated. Finally, the effect of copper sulphate on egg production as well as hatching was studied.

Although copper sulphate was in general toxic to all the species employed, there were no clear cut differences between the species containing haemoglobin and haemocyanin. However, this study showed that *L. natalensis*, compared to the other species employed, was markedly vulnerable to copper sulphate exposure.

Accumulation of copper was detected in the soft tissue of all the species tested, however, an increase in the copper concentration of the shells was observed in *H. duryi* and *L. natalensis* only. During exposure the copper levels in the haemolymph varied, and therefore it was impossible to draw any conclusions from these results.

The results of this study clearly showed that copper was released by all the species after exposure. In the case of *L. natalensis* the release was less profound, and thus explain

why this species is so sensitive to copper sulphate exposure.

Electron micrographs of all the exposed specimens revealed that large vacuoles were present in the basal part of their surface epithelial cells. Although copper sulphate had no effect on the egg production of *B. glabrata* and *L. natalensis*, it impaired the embryo development as well as hatching of the eggs.

INHOUDSOPGAWE

1.	INLEIDING	1
2.	MATERIAAL EN METODEDES	6
2.1	Proefdiere	6
2.1.1	Aanhouding en teling van proefdiere	6
2.1.2	Eksperimentele voorbereiding van proefdiere	8
2.1.3	Mortaliteitsbepaling by blootgestelde proefdiere	8
2.2	Nablootstellingsbehandeling van proefdiere	9
2.2.1	Die verwydering van blootstellingsmedium vanaf lewende proefdiere	9
2.2.2	Versameling van hemolimfmonsters	9
2.2.3	Skeiding tussen sagtemateriaal en skulpe	10
2.3	Werkwyses en apparaat	11
2.3.1	Wasprosedure van glasware, poli-etileenhouers en teflonverteringsblok	11
2.3.2	Apparaatopstelling vir koperblootstellingseksperimente	12
2.3.3	Blootstellingsparameters	13
2.3.4	Gebruik van die teflonverteringshouer en die voorbereiding van slakhemolimf-, sagtemateriaal- en skulpmonsters vir atoomabsorpsiespektrofotometriese bepalings	15

2.3.5 Kalibrering en gebruik van atoomabsorpsiespektrofotometer	
vir koperanalises	16
2.3.6 Voorbereiding van slakweefsel vir transmissie-elektronmikroskopie	16
3. DIE VASSTELLING VAN LETALE KOPERKONSENTRASIES	
(LD₅₀-WAARDES) TYDENS GESELEKTEERDE	
BLOOTSTELLINGSPERIODES	19
4. 'N ONDERSOEK NA DIE AKKUMULERING VAN KOPER IN DIE	
HEMOLIMF, SAGTEMATERIAAL EN SKULPE	28
5. 'N ONDERSOEK NA DIE VRYSTELLING VAN KOPER	44
6. 'N ONDERSOEK NA DIE HISTOLOGIESE SKADE OP DIE	
OPPERVLAKEPITEEL VAN DIE SLAKVOET MET BEHULP VAN	
TRANSMISSIE-ELEKTRONMIKROSKOPIE	59
7. 'N ONDERSOEK NA DIE INVLOED VAN KOPER OP DIE	
EIERPRODUKSIE EN EMBRIO-ONTWIKKELING VAN TWEE	
GESELEKTEERDE VARSWATERSLAKSPESIES	73
7.1 'n Onderzoek na die invloed van koperblootstelling op die	
eierproduksie van volwasse slakke voor en na blootstelling	74
7.2 'n Onderzoek na embrio-ontwikkeling in eierpakkies en die	

	uitbroeipersentasie tydens koperblootstelling	78
8.	OPSOMMINGS	88
9.	BEDANKINGS	91
10.	LITERATUURVERWYSINGS	92

1. INLEIDING

In 'n snel ontwikkelende land soos Suid-Afrika is water 'n kritiese faktor en het 'n afname in die kwaliteit daarvan verreikende gevolge betreffende menslike gesondheid, industriële en landbou ontwikkeling en die ekologie. As 'n relatief waterarme land is waterbesoedeling tans een van die kernvraagstukke wat aandag geniet. Hoewel 90 % van alle vervaardigde chemikalieë volgens (Wilson & Fraser 1977) negatiewe ekologiese- en gesondheidseffekte het, is dit veral swaarmetale wat groot kommer wek. Hiervan is koper van die meer toksiese en mees algemene metale wat deur nywerhede gestort word (Davenport 1977). Volgens Kelly (1991) word natuurlike waterbronne met 'n konsentrasie van 0,005 dele per miljoen (dpm) koper tans as relatief "onbesoedeld", in terme van hierdie metaal, beskou. Dié waarde is egter kommerwekkend hoog, as die koperkonsentrasie van tussen 0,00038 dpm en 0,00235 dpm wat in riviere in die Amasone bepaal is, as maatstaf geneem word.

In die soeke na oplossings vir die besoedelingsprobleem en na kriteriums vir vroegtydige identifisering van gevaartekens, is goedkoop, praktiese en betroubare bio-evalueringstudies noodsaaklik. Die resultate van toksisiteit- en akkumuleringstudies op akwatiese makro-invertebrate kan met groot vrug gebruik word in die evaluering van besoedelingsprobleme. Volgens Kelly (1991) is dit belangrik dat chemiese, fisiese en biologiese parameters wat tydens toksisiteitstudies gemeet word, gestandaardiseer behoort te word ter wille van herhaling, vergelyking en toepassing.

In 'n literatuurondersoek deur Hellawell (1989) is gevind dat alge en makro-invertebrate

die mees algemene groepe is wat vir die monitering van waterkwaliteit aangewend word. Varswaterslakspesies is by uitnemendheid geskik as proefdiere vir die daarstelling van besoedelingstandaarde en wel om die volgende redes:

- * Dit is wydverspreid, kom deur die jaar voor en is maklik bekombaar.
- * Dit is maklik hanteerbaar en teel gereedelik in aanhouding.
- * Verskeie spesies is reeds beproef as indikatore vir swaarmetaalbesoedeling (Ewing, Ewing & Zimmer 1982; Khangarot & Ray 1988).
- * Dit is 'n belangrike skakel in die voedselketting en talle slakspesies tree op as tussengashere vir verskeie trematoodparasiete wat siektes soos bilharzia by die mens tot gevolg het.

Een van die mees bekende gebruike van kopersulfaat is juis as molluskisied om tussengasheerslakke van veral trematoodparasiete te beheer. Hoewel koperverbindings sedert 1920 aangewend is en Chandler waargeneem het dat dit vir die tussengasheer van *Fasciola hepatica* (lewerbot) letaal is, is min bekend oor hoe dit die diere dood. Dit het egter nie die gebruik van kopersulfaat verhoed nie en word dit steeds in die beheer van *Biomphalaria glabrata* (Say) en ander tussengasheerslakke aangewend.

Uit die literatuur (Cheng 1974) is dit duidelik dat die langtermyn-toediening van kopersulfaat as molluskisied skadelike effekte op die ekologie kan hê en is dit dus raadsaam om die wyse en omvang van koperopname deur tussengasheerslakke uit die wateromgewing en die meganisme waardeur die koperioon mortaliteit tot gevolg het, te ondersoek.

Hoewel nuwe molluskisiede sedertdien ontwikkel is, word die relatief goedkoop kopersulfaat steeds wyd in veral ontwikkelende lande gebruik. Volgens Cheng & Sullivan (1974) is nadele van hierdie verbinding die feit dat dit gereedlik geneutraliseer word deur kompleksering met die sediment en organiese materiaal, oneffektiwiteit daarvan in alkaliese water en die nadelige effek wat dit op nie-teikenorganismes, soos visse, het.

Ten spyte van uitgebreide navorsing op schistosomiase bly dit een van die wêreld se mees omvangryke parasitiese siektes, met 'n geskatte besmetting van 300 miljoen mense (Cheng 1974). Huidige navorsing konsentreer veral op die volgende aspekte:

- * die ontwikkeling van doeltreffende teenmiddels en
- * die verbetering van die metodiek ten opsigte van die toediening van molluskisiede om tussengashere te bestry deur biologiese- en chemiesebeheer.

Ten spyte hiervan is daar steeds 'n groot gebrek aan basiese inligting ten opsigte van die beheer van bilharziatussengashere deur swaarmetaalverbindinge en meer spesifiek kopersulfaat.

Hoewel verskeie studies onderneem is om die effek van kopersulfaat op varswaterslakspesies te ondersoek, is min vergelykende studies gedoen om die effek van dié metaal by verskillende varswaterslakspesies onder dieselfde omstandighede en die spesifieke meganismes waardeur die diere gedood word, na te gaan. Studies het ondermeer die verlies van essensiële elektroliete soos natrium, kalsium en chloor in die

hemolimf van *Bulinus tropicus* (Van Aardt & Coertze 1981), die versteuring van die osmoregulatoriese funksies van *B. glabrata* (Cheng & Sullivan 1977), histopatologiese skade van die oppervlaktepoteel van *B. tropicus* (Wolmarans, Van Aardt & Coetzee 1986), die verlaging van die respirasiekoers van *B. glabrata* (Cheng & Sullivan 1973) en veranderde gedragsreaksies aangetoon. Bogemelde spesies is egter almal hemoglobiendraende slakke, terwyl vergelykings ten opsigte van hierdie effekte met hemosianiendraende slakke, sover bekend, nie getref is nie. Op grond van die feit dat hemosianien 'n respirasiepigment is wat koper bevat, word veronderstel dat slakke met dié proteïen, koper anders sal metaboliseer as die spesies met hemoglobien ('n ysterbevattende respirasiepigment). Hemosianien word slegs by die filums Arthropoda en Mollusca aangetref, elk met 'n unieke koperinhoud (Mal Reddy & Venkateswara Rao 1987).

In hierdie studie is die invloed van kopersulfaat op vier geselekteerde varswaterslakspesies waarvan twee hemosianiendraende slakke is, naamlik *Lymnaea stagnalis* (Linnaeus) en *Lymnaea natalensis* Krauss, ondersoek. Albei hierdie slakspesies is bekende tussengashere vir *Fasciola*-spesies (lewerbot). Die oorblywende twee spesies, naamlik *B. glabrata* en *Helisoma duryi* (Wetherby) is hemoglobiendraende slakke. Eersgenoemde is die tussengasheer vir *Schistosoma mansoni* (ingewandsbilharzia), terwyl laasgenoemde spesie elders in Afrika as biologiese beheeragent teen parasietdraende slakke aangewend word (Frandsen & Madsen 1979).

Aandag is aan die volgende aspekte geskenk:

* Die LD₅₀-waardes is bepaal en die toksisiteit van koper vir die onderskeie spesies

is vergelyk.

- * Die akkumulering van koper in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe is nagegaan.
- * Die mate waarin koper deur die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe vrygestel word, is ondersoek.
- * Die moontlike skade op die oppervlakepiteel van die slakvoet na koperblootstelling is met behulp van transmissie-elektronmikroskopie ondersoek.
- * Die eierproduksie van volwasse slakke van die spesies *B. glabrata* en *L. natalensis*, voor en na blootstelling aan 'n kopermedium, is ondersoek.
- * Embrio-ontwikkeling en die uitbroeipersentasie van bogenoemde twee spesies, is tydens koperblootstelling van die eierpakkies nagegaan.

2. MATERIAAL EN METODES

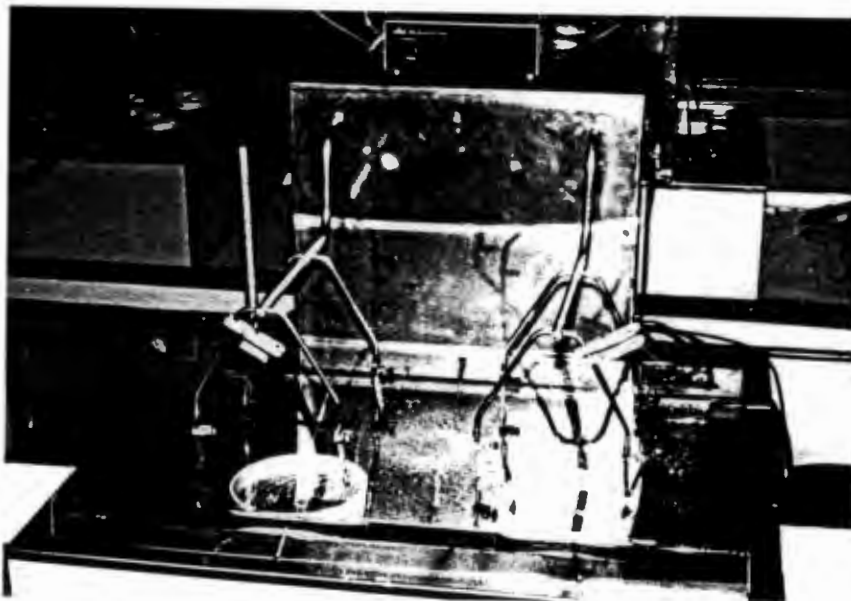
2.1 PROEFDIERE

2.1.1 Aanhouding en teling van proefdiere

Die vier varswaterslakspesies, *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* wat in die studie gebruik is, is in die laboratorium soos beskryf deur De Kock & Van Eeden (1980) aangehou en geteel (Figuur 1). Slakbakke bestaande uit Perspex-ringe met 'n deursnee van 16 cm en 'n diepte van 10 cm, waarvan die bodems met perlongaas met 'n maasgrootte van 375 μm bedek is, is vir die aanhouding van slakke aangewend. Voldoende voedsel in die vorm van "Marpet Staple Food" (Marpet (Pty) Ltd) is daaglik aan die slakke voorsien. Voedselreste en feses op die bodem van akwariums en slakbakke is daaglik met 'n suigpomp opgesuig. Die waterverlies wat as gevolg van verdamping en die skoonmaakproses in elk van die akwariums ontstaan het, is met verouderde boorgatwater uit opgaardromme aangevul. Agt slakbakke is deur middel van aluminiumstafies in elk van die akwariums gehang en is elke tweede dag met identiese skoon slakbakke vervang. Pas uitgebroeide slakke is in Perspex-bakke met 'n deursnee van 9,5 cm en 'n diepte van 5 cm aangehou. Die bodem van dié slakbakke is met perlongaas met 'n maasgrootte van 45 μm bedek. Klein slakkies is aanvanklik met "TetraMin Baby Fish Food" (Tetra Werke, Wes-Duitsland) gevoer. Hierdie voedingsmetode is gebruik totdat die slakkies ongeveer 'n lengte van 5 mm bereik het. Daarna is die slakke na slakbakke, identies aan dié wat vir die volwasse slakke gebruik is, oorgedra en dieselfde voedsel is aan hulle voorsien. Kleiner slakkies is gedurende die

skoonmaakproses versigtig met 'n kwassie van een slakbak na 'n ander oorgeplaas.

Slakke is in verouderde boorgatwater, met 'n konstante watertemperatuur van 25 ± 1 °C, in akwariums aangehou en geteel (Wolmarans & Van Aardt 1986). 'n Gravitasiedrupstelsiem het verouderde boorgatwater vanaf opgaardromme teen 'n tempo van 120 ml/min drupsgewys aan elke slakbak voorsien. Drukluug is voortdurend deur die akwariums geborrel. Drukluug wat aan akwariums voorsien is, het nie net suurstof aan die slakke voorsien nie, maar volgens Frank (1963) bevorder die belugting van die boorgatwater ook die oksidering van skadelike metaboliete. Die slakke is deurentyd aan 'n normale dag-nag-beligtingsiklus onderwerp.



Figuur 1. 'n Akwarium waarin slakke wat vir eksperimentele doeleindes gebruik is, aangehou en geteel is.

2.1.2 Eksperimentele voorbereiding van proefdiere

Slegs volgroeide, aktief rondkruipende slakke is 48 uur voor die aanvang van 'n eksperiment geselekteer en na skoon slakbakke oorgeplaas. In navolging van Mirenda (1986) is geen voedsel tydens dié periode en tydens die daaropvolgende eksperimente aan die proefdiere gegee nie. Volgens Greenaway (1970) is hierdie uithongeringsperiode noodsaaklik aangesien dit daartoe bydra dat die proefdiere fisiologies meer vergelykbaar is en die uitskeiding van feses, waaraan koper moontlik kan bind, grootliks daardeur verhoed word. Slakke is vervolgens met gefiltreerde boorgatwater afgespoel om feses en ander organiese materiaal, soos alge, te verwyder. Die oortollige water teenwoordig op die proefdiere is met handdoekpapier gedreineer en eierpakkies teenwoordig op die skulpoppervlak is verwyder.

2.1.3 Mortaliteitsbepaling by blootgestelde proefdiere

Die volgende drie kriteria is vir die identifisering van dooie slakke tydens mortaliteitsbepaling by proefdiere gebruik. Slakke is as dood geïdentifiseer indien:

- * Daar geen reaksie na 'n naaldprik op die voet van die slak onder 'n stereomikroskoop is nie (Gupta, Khangarot & Durve 1981).
- * Die slak tydens 'n 6 ure waarnemingsperiode geen beweging in skoon boorgatwater hervat het nie (Khangarot & Ray 1988).
- * 'n Duidelike kleurverandering, vanaf 'n normale rooi of bruin na 'n dowwe grys kleur, plaasgevind het (Joubert 1984).

Slakke wat wel as dood geïdentifiseer is, is nie weer in die eksperimenthouer teruggeplaas nie en die aantal lewende slakke is tydens elk van die blootstellingsperiodes genoteer.

2.2 NABLOOTSTELLINGSBEHANDELING VAN PROEFDIERE

2.2.1 Die verwydering van blootstellingsmedium vanaf lewende proefdiere

Nadat die proefdiere aan 'n kopersulfaatmedium blootgestel is, is hulle op handdoekpapier geplaas sodat die blootstellingsmedium vanaf die proefdiere kon dreineer. Hierna is die proefdiere na skoon Pyrex-glasbekers met 10 ml gedistilleerde afspoelwater per slak, oorgedra. Slakke is vir 5 minute in die afspoelwater gelaat. Daar is waargeneem dat die proefdiere na ongeveer twee minute, tydens die afspoelperiode, aktief in die glasbeker begin rondbeweeg het. Hierdie afspoelperiode het grootliks daartoe bygedra dat die blootstellingsmedium in die mantelholte en vanaf ander uitwendige dele van die slakke verwyder is.

2.2.2 Versameling van hemolimfmonsters

Hemolimf van die proefdiere is versamel deur van die Bekius-effek (Lever & Bekius 1965) gebruik te maak. Die spiervoete van die slakke is eers deeglik vooraf met handdoekpapier gedroog. Dit is belangrik dat alle oortollige mukus teenwoordig op die slakvoet met handdoekpapier verwyder word. Mukus kan die versameling van hemolimf aansienlik bemoeilik deurdat dit met die vrygestelde hemolimf meng en die

glaskapillêr waarmee die hemolimf opgesuig word, verstop. Deur die slak onder 'n disseksiemikroskoop met die ventrale oppervlak na bo te hou, is die voetoppervlak duidelik sigbaar gestel. 'n Glaskapillêr (20 μ l) is gebruik om die ventrale voetoppervlak en mantelrand meganies te prik. Die slak reageer op die prik deur vinnig in die skulp terug te trek met die gevolglike vrystelling van hemolimf uit die hemaalporie. Die vrygestelde hemolimf beland via die pneumostoom tussen die skulp en sagtemateriaal van die proefdier. Hierna word dit met 'n glaskapillêr, waarvan die een punt aan 'n rubber suigbuis gekoppel is, opgesuig. Die hoeveelheid hemolimf wat by elk van die proefdier versamel is, het tussen 5 μ l en 20 μ l gewissel. Die vrygestelde hemolimf van 'n bepaalde eksperimentele groep is saam in 'n poli-etileenkuvet versamel en by -20 °C gevries vir koperanalise met 'n atoomabsorpsiespektrofotometer (AAS).

2.2.3 Skeiding tussen sagtemateriaal en skulpe

Skeiding van die sagtemateriaal en skulpe is bewerkstellig deur van die droëhitteproefbuis metode, soos deur Van Aardt & Coertze (1981) beskryf, gebruik te maak. Proefdier is doodgemaak deur hulle vir 15 sekondes in 'n leë proefbuis oor stoom te hou. Hierna is die sagtemateriaal met 'n pinset verwyder. Hierdie metode is nie net vinnig en doeltreffend nie, maar dra ook daartoe by dat die liggaamsvloeistof wat in die skulp agterbly, nog vloeibaar is en dus maklik met gedistilleerde water uitgewas kan word. Skulpe is op handdoekpapier geplaas sodat die grootste hoeveelheid water kon dreineer en oornag by kamertemperatuur gelaat om droog te word. Hierdie drogingsperiode is as voldoende beskou. Die natmassa van die sagtemateriaal en die droëmassa van skulpe is hierna noukeurig met 'n balans bepaal.

2.3 WERKWYSES EN APPARAAT

2.3.1 Wasprosedure van alle glasware, poli-etileenhouers en teflonverteringsblok

Alle glasware en poli-etileenhouers wat tydens die eksperimente gebruik is, is volgens gestandaardiseerde metodes gewas om koperkontaminasie te voorkom. Om alle vetterigheid en onsuiverhede te verwyder, is die apparaat vooraf met 'n nylonborsel en laboratoriumseep gewas. In navolging van Capar (1977) is die glasware en poli-etileenhouers met 10 % salpetersuur afgespoel en drie keer deeglik met kopervrye gedistilleerde water uitgespoel.

Die gedistilleerde water wat in dié studie gebruik is, was van 'n Barnstedt-distillator afkomstig. Alle dele van die apparaat, wat met gedistilleerde water in aanraking kom, is met tin bedek om die moontlikheid van koperkontaminasie te verhoed. Verder is die apparaat voorsien van 'n hoë suiwerheidskamer wat vlugtige onsuiverhede in die distillaat verwyder. Met behulp van AAS-bepalings is vasgestel dat die gedistilleerde water volkome kopervry is. Die glasware is hierna op 'n afdrooigrak gelaat om droog te word. Die poli-etileenhouers is in 'n droogoond by 30 °C gedroog.

Om kruiskontaminasie van die slakmonsters in die verteringskamers van die teflonverteringsblok te verhoed, is 'n gestandaardiseerde wasprosedure noodsaaklik. Elke verteringskamer is met laboratoriumseep gevul en deeglik met 'n nylonproefbuisborsel gewas. Hierdie meganiese aksie het daartoe bygedra dat alle oorblyfsels van die vorige verteringsproses verwyder is. Die seepoplossing is met

gedistilleerde water uitgespoel. Daarna is die verteringskamers met 55 % chemiesuiwer HNO_3 uitgespoel. Die verteringsblok is in 10 % chemiesuiwer HNO_3 geberg. Hierna is dit deeglik voor gebruik met gedistilleerde water uitgespoel en in 'n oond by $30\text{ }^\circ\text{C}$ gedroog.

2.3.2 Apparaatopstelling van koperblootstellingseksperimente

Alle koperblootstellingseksperimente is in 'n akwariumbad, waarin agt eksperimenthouers gelyktydig geplaas kon word, by $25\text{ }^\circ\text{C}$ uitgevoer. Een liter Pyrexglasbekers is as blootstellingshouers gebruik. Al die koperblootstellingsmediums is in gefiltreerde boorgatwater opgemaak deur die byvoeging van 'n deelvolum van 'n 1 000 dpm koperstamoplossing. Die pH van elke koperoplossing is deur die byvoeging van HCl en NaOH by $7 \pm 0,1$ gestandaardiseer. In navolging van Khangarot & Ray (1988) is die blootstellings- en kontrolemediums elke 24 uur vervang.

Gereguleerde druklug is met behulp van poli-etileenpypies aan die blootstellingsmediums in elke glasbeker voorsien. Die voorsiening van druklug het die presipitering van koperoksiedverbindinge verhoed, suurstof aan die proefdiere voorsien en die mukuslaag op die oppervlak van die blootstellingsmediums gebreek. 'n Perspex-skyf wat in kontak met die oppervlak van die kopermedium was, is op elk van die glasbekers geplaas. Hierdie skyf het verhoed dat proefdiere tydens koperblootstelling uit die glasbekers kruip en dat die blootstellingsmedium verdamp. Elke Perspex-skyf is van 'n klein opening voorsien om toe te laat dat druklug die blootstellingsmedium kan bereik.

Geen predasie het tussen die proefdiere voorgekom nie. Normale dag-nagbeligtingsiklusse is gehandhaaf. Watermonsters is tydens elk van die blootstellingsperiodes versamel en met behulp van 'n AAS (Spektra AA 250 Plus) geanaliseer. Dooie slakke is uit glasbekers verwyder.

2.3.3 Blootstellingsparameters

Die blootstellingskonsentrasies wat tydens die eksperimente gebruik is, het tussen 0,05 en 5 dpm¹ koper as kopersulfaat gevarieer (1 dpm $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ het 0,2545 dpm Cu bevat). Hierdie koperblootstellingsdosisse is opgemaak uit 'n 1 000 dpm kopersulfaatstamoplossing. Die stamoplossing is opgemaak deur 3,929 g analities-suiwer $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck) in 1 000 ml boorgatwater op te los. Die pH van die stamoplossing is na 7 aangepas deur die byvoeging van HCl en NaOH.

Alle koperblootstellingskonsentrasies is in gefiltreerde boorgatwater opgemaak. Kopervrye boorgatwater is in die studie gebruik. Die fisiese en chemiese ontledings van verouderde boorgatwater word in Tabel 1 gelys. Hierdie ontledings is met 'n fotometer (Lovibond PC22) bepaal.

dpm is gelyk aan 1 mg per liter water

Tabel 1. Geselekteerde fisiese en chemiese ontledings van verouderde boorgatwater waarin slakke aangehou en geteel is.

Ontledings	Eenheid	Gemiddeld
Alkaliniteit	mg CaCO₃/l	149,2 ± 13,2
Hardheid	mg CaCO₃ (Ca)/l	69,7 ± 12,6
Fosfaat	mg PO₄/l	*
Nitraat	mg NO₃/l	0,77 ± 0,14
Nitriet	mg NO₂/l	0,3 ± 0,095
Geleiding	μS	1102 ± 50
Opgeloste suurstof	% versadiging	70-90
Watertemperatuur	° C	25 ± 1
pH		7,8

* Waarde was onbepaalbaar laag.

2.3.4 Gebruik van die teflonverteringshouer en die voorbereiding van slakhemolimp-, sagtemateriaal- en skulpmonsters vir atoomabsorpsiespektrofotometriese bepalings

Die teflonverteringsblok wat gebruik is om sagtemateriaal- en skulpmonsters vir koperanalises te verteer, beskik oor 92 verteringskamers, elk met 'n deursnee van 9 mm en 'n diepte van 21 mm. As gevolg van druk wat tydens die verteringsproses in elk van die kamers ontwikkel, asook om monsterverlies te voorkom, is styfpassende teflonproppe op elk van die verteringskamers geplaas. Hierdie proppe is met behulp van vlekvrystaalplate (150 x 150 x 10 mm), wat deur middel van 8 mm skroewe aan weerskante van die teflonverteringsblok vasgedraai is, in posisie gehou.

Slegs 'n enkele skulp- of sagtemateriaalmonster is in elke verteringskamer met 0,3 ml van 55 % chemies-suiwer HNO_3 verteer. Die gas wat as gevolg van 'n reaksie tussen die HNO_3 en die skulpe in die verteringskamer ontstaan het, is eers toegelaat om te ontsnap voor die teflonproppies opgesit is. Die teflonverteringsblok is vir 12 ure in 'n oond by 30 °C geplaas sodat die weefsels kon verteer. Na afloop van die verteringsperiode is dit noodsaaklik dat die verteringshouer tot kamertemperatuur afkoel voordat die teflonproppe verwyder word. Hierdie prosedure het die verlies van die verteerde oplossing tydens die verwydering van die teflonproppe grootliks beperk.

By elk van die verteerde slakmonsters is 0,7 ml gedistilleerde water gevoeg, waarna die verteerde oplossing na 'n 2 ml poli-etileenkuvet oorgeplaas is. Na vertering is die koperkonsentrasie in elk van die verteerde monsters met 'n AAS bepaal.

Kontroleverterings is met gedistilleerde water in die teflonverteringsblok uitgevoer om te bepaal of daar nie kontaminasie van koper in die verteringsblok plaasgevind het nie. AAS-bepalings daarvan het getoon dat dié gedistilleerde water kopervry was.

2.3.5 Kalibrering en gebruik van atoomabsorpsiespektrofotometer vir koperanalises

Die AAS-kalibreringsreeks is daargestel deur vier verskillende koperstandaardoplossing (2, 4, 6 en 8 dpm) voor te berei. Die standaardreeks is gebruik om die vlamgedeelte van die apparaat te optimaliseer, terwyl die reglynige kalibrasiekrommes wat uit die reeks verkry is, gebruik is om die absorbansiewaardes van die eksperimenteelverteerde monsters in konsentrasie-eenhede (dpm) af te lees. Vir koperanalises is die AAS by 'n golflengte van 324,7 nm en 'n spleetwydte van 0,5 mm gekalibreer. In navolging van Kinson & Belcher (1961) is lug en asetyleengas vir koperanalises gebruik. Die apparaat is op 3,5 m. amp. stroomsterkte vir die kodelamp ingestel. Koperanalises is met behulp van 'n Spectra AA 250 Plus gedoen. Metings wat met 'n AAS gedoen is, is volgens die voorgeskrewe handleiding van die apparaat onder optimale toestande gedoen. Die verkryging van korrekte lesings is verseker deur na elke 10 analises weer 'n blanko en standaard te meet.

2.3.6 Voorbereiding van slakweefsel vir transmissie-elektronmikroskopie

Na blootstelling aan 'n 0,5 dpm kopermedium is die voetepiteelweefsel vir 'n minimum periode van 6 ure in Todd se fikseermiddel (Todd 1986) gefikseer en soos volg vir transmissie-elektronmikroskopie voorberei:

- * Die prosedure is in 'n roteerapparaat by kamertemperatuur uitgevoer.
- * Nadat die weefsel gefikseer is, is dit drie keer vir 10 minute in 0,5 M natriumkodatbuffer afgespoel.
- * Na-fiksering het in 0,5-1 % osmiumtetra-oksied (opgemaak in gedistilleerde water) vir 1 uur plaasgevind en die weefsels is daarna weer drie keer vir 10 minute in gedistilleerde water afgespoel.
- * Die weefselfragmente is in 2 % uranielasetaat (opgemaak in gedistilleerde water) vir 30 minute gekleur en weer drie keer vir 10 minute in gedistilleerde water afgespoel.
- * Hierna is dit opeenvolgend in 'n asetonreeks van 50 %, 70 %, 90 % en 100 % vir 15 minute elk gedehidreer.
- * Daarna is die aseton vervang met 'n 1:1 mengsel van aseton en hars en is die weefsels daarin gelaat totdat dit ten volle met die oplossing geïmpregneer was.
- * Hierna is die oplossing met 100 % vars opgemaakte hars vervang en weer gelaat sodat die weefselfragmente ten volle met die hars geïmpregneer kan word.
- * Laasgenoemde stap is twee maal herhaal waarna die weefselfragmente in vars 100 % hars in gietvorms ingebed is en vir 8 ure by 70 °C gelaat is om te polimeriseer.
- * Die weefselfragmente is aanvanklik met 'n ligmikroskoop ondersoek om die moontlikheid van histopatologiese tendense te bepaal.
- * Weefselsnitte met 'n dikte van silwer tot goud (90-150 nm) is met 'n ultramikrotroom gesny en op TT-kopperroostertjies met 'n maasgrootte van 200 geplaas. Daarna is die snitte vir 2 minute met waterige uranielasetaat gekleur.
- * Die weefselsnitte is herhaaldelik in gekookte, gedistilleerde water afgespoel en

daarna vir 5 minute met loodsitraat gekleur.

- * Die snitte is gelaat om te droog en was daarna gereed om met die (CM 10 Philips) by 'n versnellingspotensiaalverskil van 80 kV vir histologiese verandering geëvalueer te word.**

3. DIE VASSTELLING VAN LETALE KOPERKONSENTRASIES (LD₅₀-WAARDES) TYDENS GESELEKTEERDE BLOOTSTELLINGSPERIODES

Uit die literatuur is dit duidelik dat die toksisiteit van kopersulfaat vir varswaterslakspesies deur die chemiese en fisiese eienskappe van die water soos turbiditeit, organiese inhoud, temperatuur, pH, hardheid en alkaliniteit beïnvloed word (Webbe 1974).

Gebaseer op LD₅₀-waardes uit die literatuur verkry (Kelly 1991), word kopersulfaat as een van die mees toksiese swaarmetaalverbindinge vir akwatiese organismes beskou. Toksiese effekte by koperkonsentrasies so laag as 0,01 dpm is deur dié outeur vir makro-invertebrate waargeneem. Verskeie studies is in die verlede uitgevoer om die toksiese konsentrasie van koper vir varswaterslakspesies te ondersoek. Honderd persent mortaliteit na 'n blootstellingsperiode van 48 ure aan 'n 1-2 dpm kopersulfaatoplossing is deur Chandler (1920) by sekere varswaterslakspesies waargeneem. Hierteenoor het Paulini (1974) 0,05 dpm koper as die minimum toedieningsdosis, tydens langtermynblootstelling onder veldtoestande, vir die uitwissing van tussengasheerslakke van bilharziaparasiete gereken. Vir die aanwending van kopersulfaat as 'n molluskisied oor 'n blootstellingsperiode van 72-120 ure, word 0,1 dpm deur Paulini (1974) voorgestel. 'n Blootstellingsdosis van 0,125 dpm kopersulfaat het volgens Malek (1974) tot 'n merkbare afname in die slakpopulasie, wat ondersoek is, gelei. Dit is verder deur De Azevedo, Carvao Gomes, Babtista & Gil (1957) en Sullivan & Cheng (1975) gevind

dat so min as 0,07 dpm koper as kopersulfaat, 100 % mortaliteit by varswaterslakspesies binne 72 ure in gedeïoniseerde water tot gevolg gehad het. Volgens Ishak & Mohamed (1975) word 20-30 dpm koper as kopersulfaat vir effektiewe korttermynbeheer aanbeveel.

In vergelykende studies deur Harry & Aldrich (1963) om die toksisiteit van swaarmetale te evalueer, is gevind dat Zn, Cd en Cu die mees toksiese swaarmetale vir *Taphius glabratus* (= *B. glabrata*) is. Blootstelling aan 'n 0,05-0,1 dpm kopermedium het ontspanning van die slakvoet by dié slakke veroorsaak.

Uit bogenoemde literatuur is dit duidelik dat die verkryging van LD₅₀-waardes tydens toksisiteitstoetse, wye toepassingswaarde ten opsigte van die aanwending van kopersulfaat as molluskisied vir die beheer van tussengasheerslakspesies het. Die doel van die huidige studie was om die LD₅₀-waardes van koper by verskillende blootstellingsperiodes in die laboratorium te ondersoek en om die subletale dosisse vir elk van die spesies vir latere eksperimente vas te stel. Verder is gepoog om 'n vergelyking te tref ten opsigte van die kopersensitiwiteit tussen die hemoglobien- en hemosianiendraende slakke.

Materiaal en metodes

Honderd-en-sestig slakke van elk van die vier slakspesies is in 16 groepe van tien slakke elk verdeel. Vier groepe is as kontrolegroepe in kopervrye boorgatwater aangehou. Die oorblywende twaalf groepe is in vier groepe gedeel en onderskeidelik in triplikaat aan

kopersulfaatmediums met vier verskillende koperkonsentrasies, naamlik 0,25 dpm; 0,5 dpm; 1 dpm en 5 dpm koper blootgestel. Aangesien voorloperstudies met *L. natalensis* getoon het dat die koperblootstellingsdosis oor die gekose blootstellingsperiode te hoog was, is dié spesie bykomend aan kopersulfaatmediums met koperkonsentrasies van 0,05 en 0,1 dpm blootgestel.

Die gemiddelde massa van die slakspesies *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* was onderskeidelik $435,5 \pm 60,76$ mg; $343 \pm 125,9$ mg; $678 \pm 104,8$ mg en $195,5 \pm 40,67$ mg. Die kriteria vir oorlewing is, soos in die Materiaal en metodes (Hoofstuk 2) bespreek, tydens dié eksperiment gevolg. Die oorlewingspersentasie is elke 6 ure by elk van die eksperimentele groepe bepaal. Dié prosedure is herhaal tot 0 % oorlewing in elk van die eksperimenthouers bereik is. In navolging van Khangarot & Ray (1988) is dooie slakke terselfdertyd uit die glasbekers verwyder om te verhoed dat bakteriële-afbraakprodukte van die dooie slakke die oorlewing van die ander slakke kon beïnvloed.

Die blootstellings- en kontrolemediums is elke 24 uur vervang om die veranderde koperkonsentrasies as gevolg van die opname deur die organismes, adsorpsie op die organismes en die wande van die blootstellingshouers so ver moontlik uit te skakel. 'n Watermonster van 1 ml is elke 6 ure uit elk van die eksperimenthouers geneem en vir latere koperanalise met 'n AAS gestoor. Die resultate is met behulp van regressie-analise verwerk (ANOVA/Tukey se toets) en die betekenisvolheid van die resultate is by $P \leq 0,05$ bepaal.

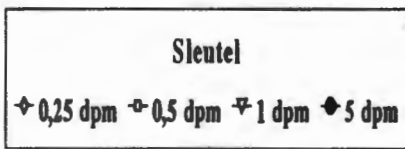
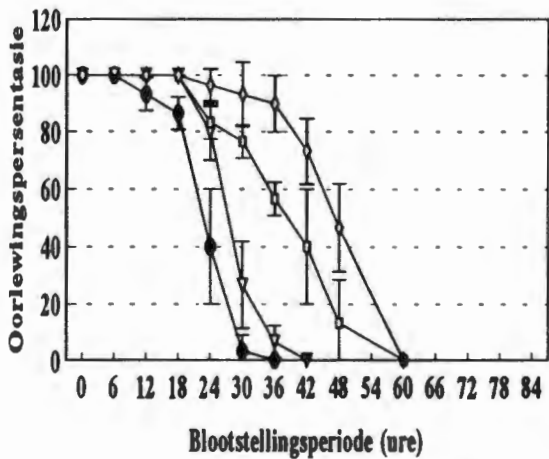
Resultate en bespreking

Volgens Lang, Forward, Miller & Marcy (1980) is gedragsreaksies wat tydens toksisiteitstoetse waargeneem word, 'n betekenisvolle en sensitiewe indikator van stres. In die huidige ondersoek het kontroleslakke normale voortbewegings- en voortplantingsgedrag getoon. Geen mortaliteit het onder die kontroleslakke voorgekom nie en dus kan afgelei word dat die eksperimentele toestande optimaal was. Ooreenstemmende gedrag is ook by die eksperimentele groepe, behalwe dié wat aan 1 en 5 dpm blootgestel is, waargeneem. In 'n soortgelyke ondersoek deur Harry & Aldrich (1963) het die spesie *T. glabratus* normale reaksie getoon by 'n konsentrasie van 0,005 dpm terwyl die ontspanne sindroom by 0,05 dpm en 0,1 dpm voorgekom het.

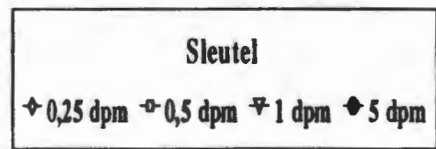
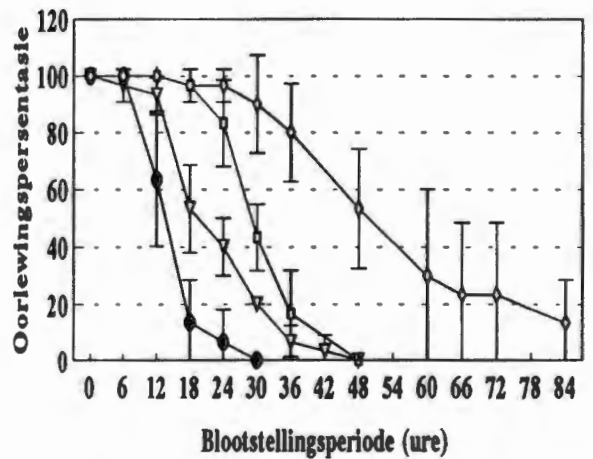
Tydens blootstelling aan die hoër koperkonsentrasie (1 en 5 dpm) het die slakke, voordat die eerste lesing na 6 ure blootstelling geneem is, in die skulp teruggetrek en het 'n groot hoeveelheid mukus op die slakvoet versamel. Soortgelyke bevindings gemaak deur Ishak & Mohamed (1975) het getoon dat sodra die blootstellingsdosis 'n sekere drempelwaarde oorskry, *Biomphalaria alexandrina* in die skulp terugtrek. Hierna het die slakke in die huidige studie bewegingloos op die bodem van die glasbeker gaan lê totdat dit as dood geïdentifiseer is. Tydens blootstelling aan konsentrasies van 1, 5 en 10 dpm het Harry & Aldrich (1963) gevind dat *T. glabratus* in die skulpe terugtrek en op die bodem van die eksperimenthouers gaan lê. In 'n ondersoek deur Gupta *et al.* (1981) en Khangarot & Ray (1987) het soortgelyke gedrag by die slakspesie *Lymnaea luteola* wat aan Zn blootgestel is, voorgekom.

Die oorlewingspersentasies tydens blootstelling aan die verskillende koperkonsentrasies word in Figure 2-5 weergegee. Hieruit is dit duidelik dat die blootstelling aan kopersulfaatmediums wel 'n toksiese effek op die slakke van al vier die slakspesies gehad het. Dit is duidelik uit Figure 2-5 dat daar 'n omgekeerde verband tussen die blootstellingskonsentrasies en die oorlewingspersentasies bestaan. Soortgelyke bevindings is deur Ishak & Mohamed (1975) gemaak wat met *B. alexandrina* gevind het dat die mortaliteitstempo verhoog tydens langer blootstellingsperiodes en toenemende koperkonsentrasies.

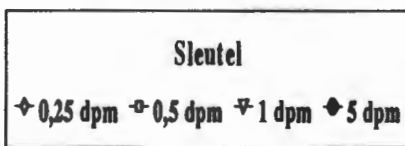
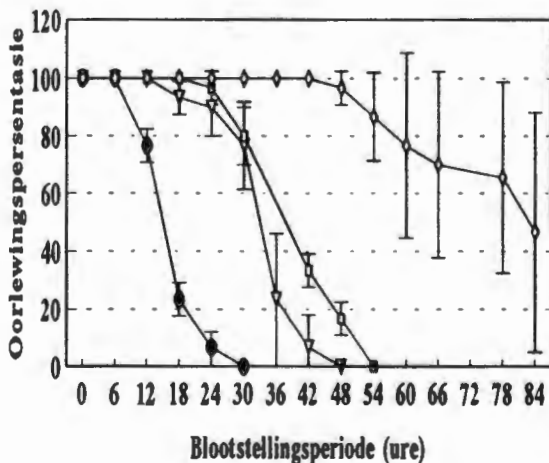
Nul persent oorlewing vir slakke wat aan 'n 1 dpm kopermedium blootgestel is, is vir die spesie *L. natalensis* na 12 ure, vir *B. glabrata* en *H. duryi* na 42 ure en vir *L. stagnalis* na 48 ure blootstelling bereik. Hieruit kan afgelei word dat *L. natalensis* die gevoeligste vir kopersulfaatblootstelling is aangesien 0 % oorlewing na 12 ure blootstelling aan 'n 1 dpm medium bereik is, terwyl 50 % mortaliteit hiertydens nog nie vir die ander drie slakspesies bereik is nie. Resultate in 'n soortgelyke studie deur Davenport (1977) het daarop gedui dat 'n koperkonsentrasie van 0,5 dpm na drie tot vier dae vir die mossel, *Mytilis edalis*, letaal is. Hieruit kan afgelei word dat die tydsduur totdat hierdie blootstellingskonsentrasie 50 % mortaliteit by die spesies tot gevolg het, van spesie tot spesie verskil.



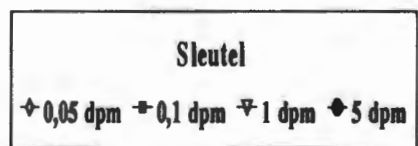
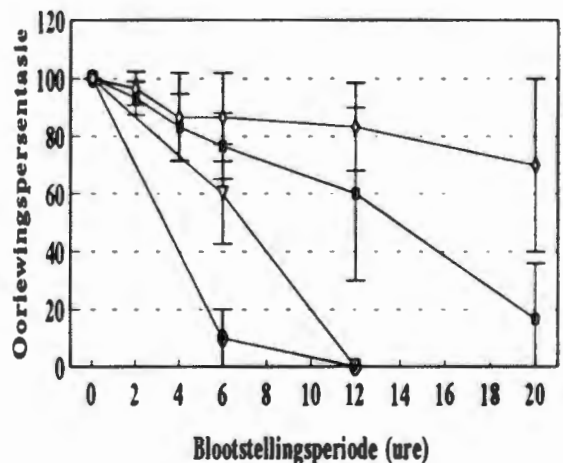
Figuur 2. Vergelyking van die oorlewingspersentasie teenoor die blootstellingsperiode van die varswaterslakspesie *B. glabrata* by vier geselekteerde koperkonsentrasies (n=30).



Figuur 3. Vergelyking van die oorlewingspersentasie teenoor die blootstellingsperiode van die varswaterslakspesie *H. duryi* by vier geselekteerde koperkonsentrasies (n=30).



Figuur 4. Vergelyking van die oorlewingspersentasie teenoor die blootstellingsperiode van die varswaterslakspesie *L. stagnalis* by vier geselekteerde koperkonsentrasies (n=30).



Figuur 5. Vergelyking van die oorlewingspersentasie teenoor die blootstellingsperiode van die varswaterslakspesie *L. natalensis* by vier geselekteerde koperkonsentrasies (n=30).

'n Opsomming van die LD₅₀-waardes van kopersulfaat vir die onderskeie slakspesies word in Tabel 2 weergegee. Uit hierdie resultate is dit duidelik dat daar tydens die 6 ure blootstellingsperiode aan die onderskeie koperkonsentrasies 50 % mortaliteit net by *L. natalensis* waargeneem is. Die LD₅₀-waarde vir hierdie spesie was na 6 ure 2,3 dpm en na 12 ure 1,357 dpm.

In teenstelling hiermee kon die LD₅₀-waardes van die ander drie spesies nie vir 'n blootstellingsperiode korter as 30 ure bereken word nie, aangesien 50 % mortaliteit nie tydens dié blootstellingsperiodes vir die bepaalde blootstellingskonsentrasies bereik is nie. Die LD₅₀-waardes vir *B. glabrata*, *H. duryi* en *L. stagnalis* vir 'n 48 ure blootstellingsperiode is onderskeidelik 0,269 dpm; 0,255 dpm en 0,376 dpm. Hierdie resultate dui daarop dat die LD₅₀-waardes van dié spesies nou ooreengestem het.

Volgens Paulini (1974) is gevind dat die LD₅₀-waarde vir *B. glabrata* na 1 uur blootstelling 17 dpm was. In soortgelyke ondersoeke deur Cheng & Sullivan (1973) is die LD₅₀-waarde van Cu DEG₂ na 'n blootstelling van twee ure vir dieselfde spesie op 3,14 dpm en na 'n 24 uur-periode op 0,0123 dpm bereken.

Hierdie afname van die LD₅₀-waardes, is ook in die huidige studie vir al vier die spesies tydens die langer blootstellingsperiodes bepaal. Soortgelyke resultate is ook deur Mal Reddy & Venkateswara Rao (1987) gevind. In soortgelyke ondersoeke deur hierdie outeurs is gevind dat die LD₅₀-waarde oor 'n blootstellingsperiode van 6 ure, 2 dpm vir die spesie *L. luteola* is, terwyl die LD₅₀-waarde oor 'n blootstellingsperiode van 96 ure vir dieselfde spesie 0,27 dpm is.

Tabel 2. Die LD₅₀-waardes (dpm) van vier geselekteerde varswaterslakspesies by opeenvolgende blootstellingsperiodes (P ≤ 0,05).

Slakspesies	Blootstellingsperiodes (ure)						
	6	12	24	30	36	42	48
<i>B. glabrata</i>	*	*	4,007	1,923	0,574	0,426	0,269
<i>H. duryi</i>	*	*	2,224	0,594	0,446	0,370	0,255
<i>L. stagnalis</i>	*	*	2,825	2,430	0,601	0,534	0,376
<i>L. natalensis</i>	2,3	1,357	◆	◆	◆	◆	◆

* 50 % oorlewing is nie by dié blootstellingsperiode bereik nie.

◆ 0 % oorlewing is voor dié blootstellingsperiode bereik.

Dit is duidelik uit die resultate dat die LD₅₀-waardes van die hemosianiendraende slakke, naamlik *L. stagnalis* en *L. natalensis*, nie by bepaalde blootstellingsperiodes ooreengekom het nie en dat die LD₅₀-waarde vir *L. natalensis* laer is as die waardes vir *L. stagnalis*. Die laer LD₅₀-waardes van *L. natalensis* kan moontlik aan die verskil in liggaamsmassa van die twee spesies toegeskryf word. Die gemiddelde liggaamsmassa van *L. natalensis* was $195,5 \pm 40,67$ mg en die massa van *L. stagnalis* was $678 \pm 104,8$ mg. Volgens Knut Smidt-Nielsen (1987) is daar 'n omgekeerde eweredige verband tussen suurstofverbruik, metaboliese tempo en liggaamsgrootte. 'n Moontlike afleiding wat hieruit gemaak kan word, is dat die metaboliese tempo van die eksemplare van *L. natalensis* wat in hierdie studie gebruik is, hoër as die van *L. stagnalis* is en waarskynlik tot die vinniger opname van koper gelei het. Watling & Watling (1976) het gevind dat konsentrasies van sekere swaarmetale in kleiner individue van die spesie *Choromytilus meridionalis* hoër is as in groter individue. Soortgelyke resultate is ook deur Boyden (1974) gevind, wat aangetoon het dat die hoogste waardes van spoorelementkonsentrasies in skulpvisse in kleiner individue bepaal is.

Uit Tabel 2 is dit duidelik dat die LD₅₀-waardes van die twee hemoglobiendraende slakke vir die blootstellingsperiodes 36, 42 en 48 ure nou ooreengestem het. Uit die resultate is dit duidelik dat koper meer toksies vir *L. natalensis* is en dat die LD₅₀-waardes vir *B. glabrata*, *H. duryi* en *L. stagnalis* oor langer blootstellingsperiodes baie hoër is. Alhoewel die hemosianiendraende slakke koper as deel van die respirasiepigmente in die hemolimf besit en verwag word dat die slakke beter sal oorleef tydens die blootstelling aan koper, word die veronderstelling nie deur die resultate gereflekteer nie.

4. 'N ONDERSOEK NA DIE AKKUMULERING VAN KOPER IN DIE HEMOLIMF, SAGTEMATERIAAL EN SKULPE

Alhoewel die meerderheid studies in die literatuur oor die effek van kopersulfaat as molluskisied ten opsigte van varswaterslakspesies handel, is daar verskeie outeurs wat die akkumulering van swaarmetale deur varswaterslakspesies ondersoek het (Sullivan & Cheng 1976; Wolmarans & Van Aardt 1986; Khangarot & Ray 1987; Mal Reddy & Venkateswara Rao 1987; Wolmarans & Yssel 1988). In die literatuur tans tot ons beskikking, is daar min bekend oor die wyse van koperopname en die detoksifisering daarvan. Min aandag is ook aan vergelykende studies betreffende die akkumulering van kopersulfaat deur hemoglobien- en hemosianiendraende varswaterslakspesies gegee.

Volgens Lopez-Artiguez, Soria & Repetto (1989) is akkumulering van swaarmetale deur varswaterslakspesies van verskeie faktore afhanklik, naamlik die swaarmetaalkonsentrasie in die omgewing, die fisiese en chemiese veranderlikes, asook die grootte, ouderdom, groeikoers en geslag van die slakke.

Sullivan & Cheng (1976) het twee hipoteses voorgestel om die akkumulering en toksiese meganisme van koper by die varswaterslak, *B. glabrata*, te verklaar. Die sogenaamde "teikenorgaanhipotese" bepaal dat koper deur die oppervlakepiteel van die slakvoet in die hemolimf opgeneem word, waarna dit die interne organe van die slak bereik. Daarna akkumuleer die koper in bepaalde teikenorgane totdat 'n toksiese drempelwaarde vir die orgaan of sisteem bereik word en dus die funksie van die orgaan nadelig beïnvloed. Alternatiewelik kan die dood van slakke tydens koperblootstelling

toegeskryf word aan die versteuring van die osmoregulatoriese of respirasiefunksie van die oppervlakepoteel deurdat die koper primêr op die epoteel van die slak inwerk.

As gevolg van die tekort aan vergelykende studies in die literatuur tot ons beskikking, het die huidige ondersoek dit ten doel gehad om 'n vergelykende studie ten opsigte van die akkumulering van kopersulfaat in die hemolimf, sagttemateriaal en skulpe van hemoglobien- en hemosianiendraende varswaterslakke te doen.

Materiaal en metodes

Honderd-en-tagtig slakke van elk van die vier slakspesies is in ses groepe van 30 slakke elk verdeel. Die gemiddelde massa van die slakke wat in die studie gebruik is, was vir *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* onderskeidelik $535,9 \pm 128,5$ mg; $447 \pm 18,6$ mg; $573,8 \pm 69,5$ mg en $198,4 \pm 16,1$ mg.

Een groep van elke spesie is as kontrole in kopervrye boorgatwater aangehou. Die oorblywende vyf eksperimentele groepe is onderskeidelik vir 2, 4, 6, 24 en 48 ure aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatoplossing blootgestel. Die blootstellingstoestand is, soos in die Materiaal en metodes (Hoofstuk 2) bespreek, gehandhaaf. Na elk van bogenoemde blootstellingsperiodes is die slakke van 'n bepaalde eksperimentele groep uit die blootstellingsmedium verwyder en vir 5 minute in gedistilleerde water gelaat om van die eksterne koper ontslae te raak. Oortollige water teenwoordig op die slakke, is met handdoekpapier gedreineer. Hierna is hemolimf by elk van die slakke versamel en in 'n poli-etileenmikrokuvet vir latere koperanalises bewaar. Slakke is met die

droëhittemetode (Van Aardt & Coertze 1981) gedood. Daarna is die sagtemateriaal- en skulpmonsters van elk van die groepe by dié bepaalde blootstellingsperiode versamel en vir latere koperanalises verteer. Die 95 % betekenisvolheid van die resultate is met behulp van Tukey se toets by $P \leq 0,05$ bepaal.

Resultate en bespreking

Hemolimf

Die resultate van die koperkonsentrasies in die hemolimf tydens koperblootstelling word in Tabelle 3-6 weergegee. Volgens die resultate in Tabel 3 is dit duidelik dat daar 'n konstante afname in die hemolimfkoperkonsentrasie van *B. glabrata* tydens die 48 ure blootstellingsperiode was. Hierdie resultate stem ooreen met bevindinge deur Cheng & Sullivan (1977) vir *B. glabrata*. Resultate van 'n soortgelyke ondersoek deur Wolmarans & Van Aardt (1985) dui ook op die afname van die koperkonsentrasie in die hemolimf vir *B. tropicus* tydens koperblootstelling.

Hierdie konstante afname van die hemolimfkoperkonsentrasie van *B. glabrata* in die huidige studie kan moontlik soos volg uit die literatuur verklaar word. Cheng & Sullivan (1977), het op grond van resultate verkry uit elektronmikroskopiese ondersoeke, gevind dat die versteuring van die osmoregulatoriese fisiologie van *B. glabrata* tydens koperblootstelling 'n netto invloei van water tot gevolg het. Verder is deur dié outeurs gesuggereer dat die verlaagde osmolariteit in die hemolimf van blootgestelde slakke moontlik die gevolg van 'n verdunning van die hemolimf met water en die uitloging van

osmotiese aktiewe stowwe uit die hemolimf is.

In teenstelling met die afname van die hemolimfkoperkonsentrasie wat tydens blootstelling by *B. glabrata* gevind is, is dit uit Tabele 4 en 5 duidelik dat daar 'n toename van die koperkonsentrasie by *H. duryi* en *L. stagnalis* ten opsigte van die kontrole was. By hierdie twee spesies was die kontrole waarde laer as enige van die hemolimfkoperkonsentrasies van blootgestelde slakke. Hierdie toename kan moontlik aan die akkumulering van koper in die hemolimf van *H. duryi* en *L. stagnalis* tydens blootstelling toegeskryf word. Uit Tabel 5 is dit duidelik dat die hemolimfkoperkonsentrasie van *L. stagnalis* na 2 ure blootstelling tot 'n hoogste waarde toegeneem het en daarna konstant tydens die 48 ure periode afneem. Uit die resultate kom dit dus voor asof dié afname van die koperkonsentrasie tydens die 48 ure blootstelling op die vrystelling van koper uit die hemolimf dui. 'n Moontlike afleiding is dat dié hemosianiendraende slakspesie, geakkumuleerde koper in die hemolimf reguleer totdat normale koperkonsentrasies bereik word.

Die koperkonsentrasie in die kontrolehemolimf van *L. natalensis* het na 4 ure blootstelling van 10,050 dpm tot 7,407 dpm afgeneem (Tabel 6). 'n Moontlike verklaring hiervoor is die verdunning van die hemolimf van blootgestelde slakke as gevolg van versteuring van die osmolariteit en wat tot die invloed van water lei. Hierna het die hemolimfkoperkonsentrasie na 6 ure blootstelling tot 12,230 dpm toegeneem. Hierdie toename van die koperkonsentrasie kan nie bevredigend in die huidige studie verklaar word nie. Uit dié resultate is dit wel duidelik dat die sensitiwiteit van *L. natalensis* vir koperblootstelling (Hoofstuk 3) waarskynlik aan hierdie toename in die

hemolimfkoperkonsentrasie toegeskryf kan word. Die resultate in die huidige studie verkry, stem ooreen met die bevindings van Wolmarans & Yssel (1988).

Uit die resultate van die huidige studie is dit duidelik dat daar aansienlike verskille in die hemolimfkoperkonsentrasies tydens blootstelling tussen die verskillende spesies bestaan. Geen tendens ten opsigte van die akkumulering van koper in die hemolimf van hemoglobien- en hemosianiendraende slakke is in die studie gevind nie. Uit die resultate is dit egter opvallend dat die koperkonsentrasie in die hemolimf van die hemosianiendraende slakke hoër is as by die hemoglobiendraende spesies. Volgens De Jorge, Cintra, Haeser & Sawaya (1965) is die hoër koperkonsentrasie in die weefsel en hemolimf van hemosianiendraende slakke aan die bloedpigment, wat in hierdie geval koper bevat, toe te skryf.

In soortgelyke studies wat deur George, Pirie, Cheyne & Coombs (1978) met mariene tweekleppiges, *Ostrea edulis*, gedoen is, is gevind dat geen enkele weefsel koper eksklusief vasgelê het nie, terwyl die nier, hemolimf en abduktorspier die minste metale bevat het. Ongeveer 5 % van die koper is in die hemolimf gevind, terwyl die weefsel \pm 10 % meer koper as die hemolimf bevat het.

In teenstelling hiermee het Sperling (1979) gevind dat die totale koperkonsentrasie in al die organe van *Sepia officinalis* hoër is as die koperkonsentrasie in die water was en dat die hoogste konsentrasie in die hemolimf en verteringsklier gevind is. Uit resultate deur Schipp & Hevert (1978) verkry, is die afleiding gemaak dat die hepatopankreas van *S. officinalis* as sentrale stoororgaan vir funksionele en nie-fisiologiese swaarmetaal optree.

Tabel 3. Die gemiddelde koperkonsentrasie (dpm) in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van *B. glabrata*, tydens blootstelling aan 0,1 dpm CuSO₄ vir verskillende blootstellingsperiodes.

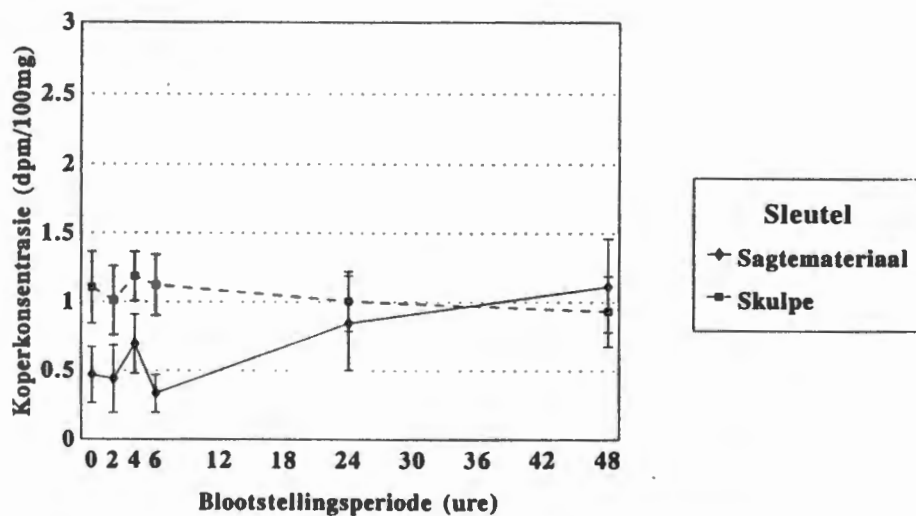
Blootstellings- periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=30)	Skulpe dpm/100mg (n=30)
0	0,404	0,468 ± 0,206	1,106 ± 0,261
2	0,339	0,439 ± 0,247	1,012 ± 0,251
4	0,338	0,695 ± 0,216*	1,187 ± 0,180*
6	0,319	0,331 ± 0,137	1,124 ± 0,221
24	0,174	0,847 ± 0,345*	1,006 ± 0,218
48	0,172	1,113 ± 0,350*	0,934 ± 0,257

* Koperkonsentrasies verskil betekenisvol van kontrolewaardes

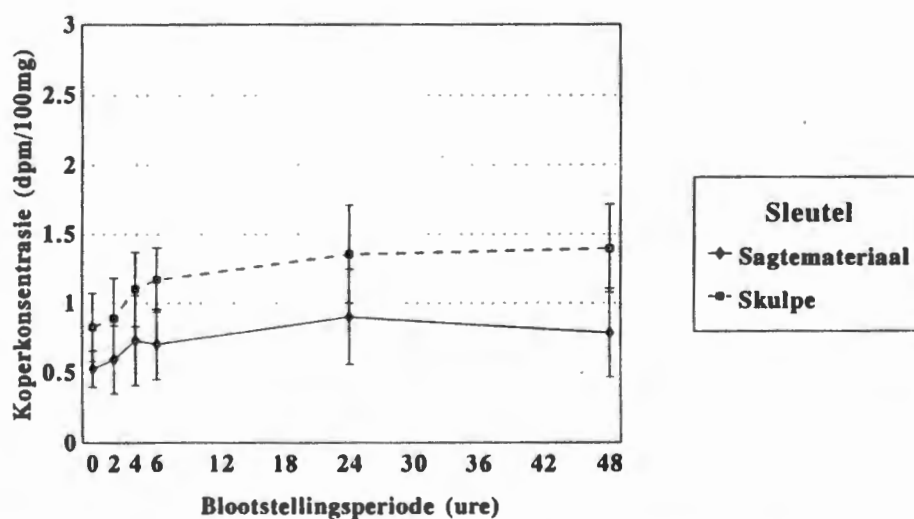
Tabel 4. Die gemiddelde koperkonsentrasie (dpm) in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van *H. duryi*, tydens blootstelling aan 0,1 dpm CuSO₄ vir verskillende blootstellingsperiodes.

Blootstellings- periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=30)	Skulpe dpm/100mg (n=30)
0	0,074	0,527 ± 0,129	0,828 ± 0,244
2	0,174	0,594 ± 0,245	0,892 ± 0,291
4	0,160	0,732 ± 0,323	1,102 ± 0,268*
6	0,216	0,705 ± 0,252	1,169 ± 0,232*
24	0,108	0,902 ± 0,343*	1,355 ± 0,354*
48	0,170	0,787 ± 0,318*	1,395 ± 0,317*

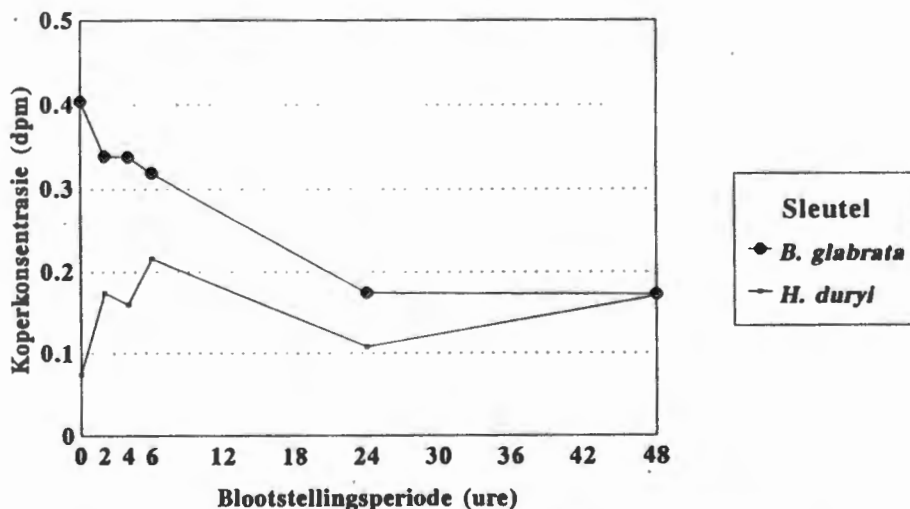
* Koperkonsentrasies verskil betekenisvol van kontrolewaardes



Figuur 6. Die akkumulering van koper in die sagtemateriaal en skulpe van *B. glabrata* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is (n=30).



Figuur 7. Die akkumulering van koper in die sagtemateriaal en skulpe van *H. duryi* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is (n=30).



Figuur 8. Die akkumulering van koper in die hemolimf van *B. glabrata* en *H. duryi* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is.

Tabel 5. Die gemiddelde koperkonsentrasie (dpm) in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van *L. stagnalis*, tydens blootstelling aan 0,1 dpm CuSO₄ vir verskillende blootstellingsperiodes.

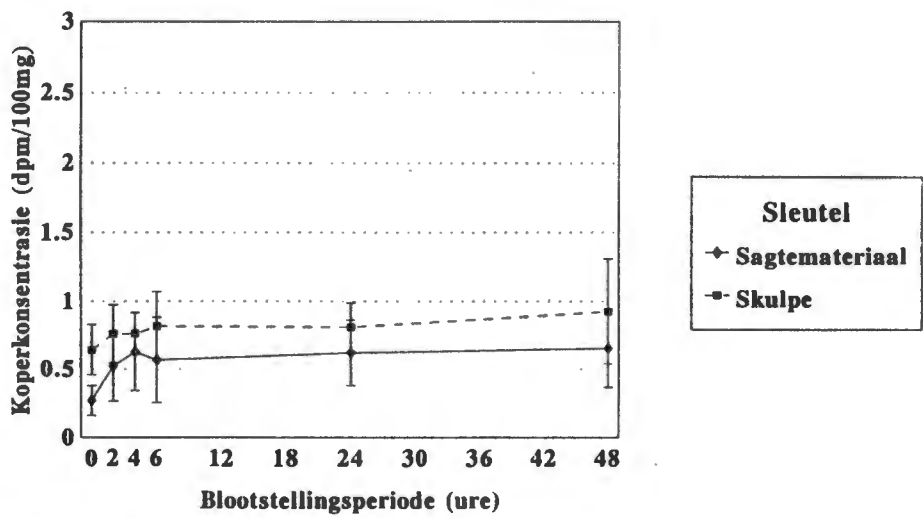
Blootstellings- periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=30)	Skulpe dpm/100mg (n=30)
0	7,564	0,268 ± 0,110	0,643 ± 0,186
2	8,918	0,523 ± 0,257*	0,761 ± 0,214
4	8,624	0,628 ± 0,288*	0,763 ± 0,155
6	8,602	0,569 ± 0,314*	0,817 ± 0,254
24	8,270	0,622 ± 0,243*	0,811 ± 0,180
48	8,083	0,656 ± 0,289*	0,926 ± 0,384*

* Koperkonsentrasies verskil betekenisvol van kontrolewaardes

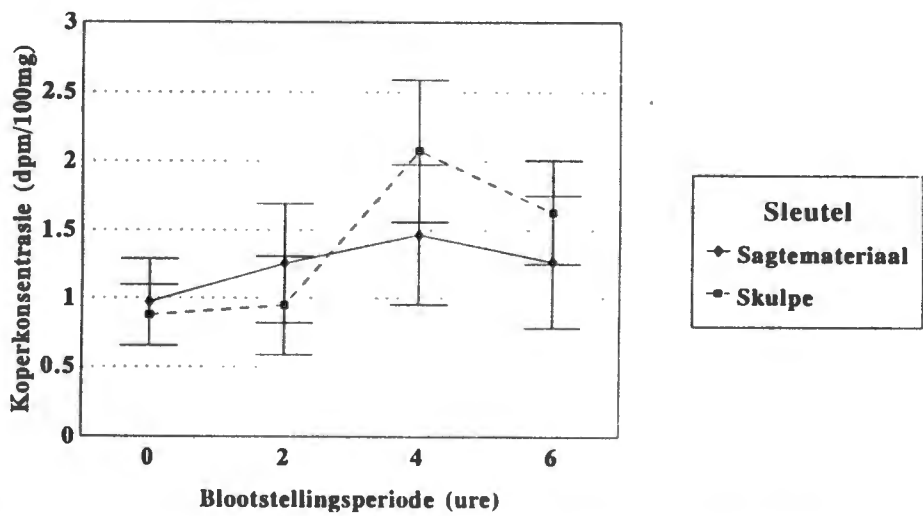
Tabel 6. Die gemiddelde koperkonsentrasie (dpm) in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van *L. natalensis*, tydens blootstelling aan 0,1 dpm CuSO₄ vir verskillende blootstellingsperiodes.

Blootstellings- periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=30)	Skulpe dpm/100mg (n=30)
0	10,050	0,971 ± 0,317	0,876 ± 0,223
2	9,954	1,256 ± 0,437	0,947 ± 0,359
4	7,407	1,464 ± 0,512*	2,074 ± 0,514*
6	12,230	1,267 ± 0,486	1,629 ± 0,377*

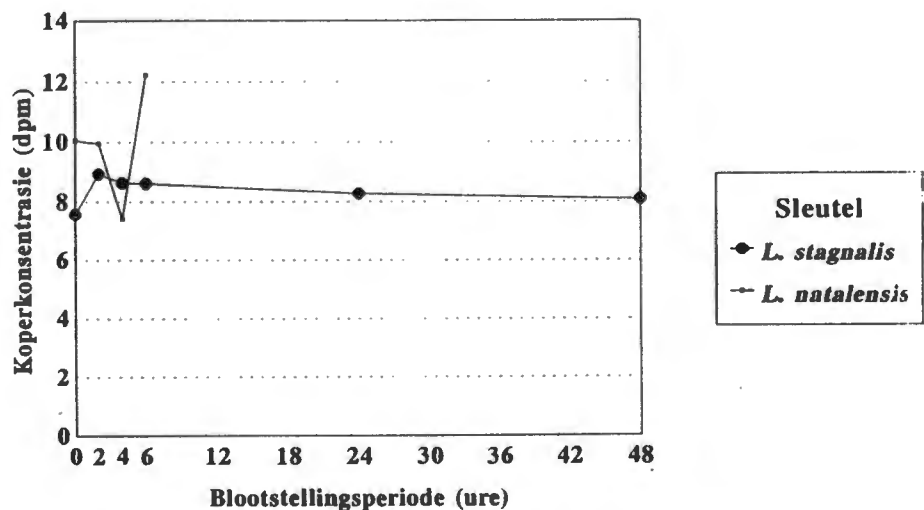
* Koperkonsentrasies verskil betekenisvol van kontrolewaardes



Figuur 9. Die akkumulering van koper in die sagtemateriaal en skulpe van *L. stagnalis* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is (n=30).



Figuur 10. Die akkumulering van koper in die sagtemateriaal en skulpe van *L. natalensis* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is (n=30).



Figuur 11. Die akkumulering van koper in die hemolimf van *L. stagnalis* en *L. natalensis* wat aan 'n 0,1 dpm kopersulfaatmedium blootgestel is.

Skulpe

Volgens Phillips (1980) is dit uit verskeie ondersoeke duidelik dat die eksoskelet van molluske en krustasiërs 'n betekenisvolle hoeveelheid besoedelstowwe opneem en berg. In die geval van spoormetale word dit geadsorbeer op die oppervlak van die skulp of geïntegreer in die skulpstruktuur. Volgens Phillips (1980) besit geadsorbeerde stowwe in die algemeen omkeerbare bindings en word dit vinnig afgegee indien die organisme na 'n onbesoedelde omgewing terugkeer. Spoormetale wat in die skulpstruktuur geïntegreer is, is vas en selde uitruilbaar met die omgewing. In sekere gevalle het dié outeur die moontlikheid van die gebruik van skulpe as indikatorweefsel, as gevolg van die akkumulering van spoormetale, voorgestel.

Uit die resultate wat in Tabele 3 en 5 weergegee word, is dit duidelik dat die koperkonsentrasie van skulpe van blootgestelde slakke van *B. glabrata* en *L. stagnalis*, behalwe na die 4 en 48 ure onderskeidelik, nie betekenisvol van die kontroleskulpe verskil het nie. Dié betekenisvolle verskille in die koperkonsentrasies na 4 en 48 ure blootstelling is moeilik verklaarbaar. Hieruit is dit duidelik dat die skulpe waarskynlik geen rol in koperopname tydens blootstelling by dié twee slakspesies speel nie.

Hierdie resultate stem ooreen met wat deur Wolmarans & Van Aardt (1986) vir *B. tropicus* verkry is. In teenstelling hiermee het Yager & Harry (1966) gevind dat Zn en Cd deur die skulpe van *B. glabrata* opgeneem word en kan die opname aan adsorpsie toegeskryf word.

In soortgelyke ondersoeke wat deur Ireland & Wodan (1977) gedoen is, is gevind dat die skulpe van *Thyas lapillus* en *L. littorea* baie minder koper in vergelyking met die sagtemateriaal van beide spesies geakkumuleer het.

Die koperkonsentrasie van skulpe van blootgestelde slakke vir *H. duryi* en *L. natalensis* het betekenisvol van die kontroles toegeneem (Tabelle 4 en 6). Hierdie betekenisvolle toename in die koperkonsentrasie van skulpe is vir al die blootstellingsperiodes, behalwe 2 ure, by beide dié spesies waargeneem. In teenstelling hiermee het Wolmarans & Yssel (1988) in soortgelyke studies geen betekenisvolle verskil in die koperkonsentrasie van skulpe van die kontrole en blootgestelde slakke van *L. natalensis* gevind nie.

In soortgelyke ondersoeke deur Yager & Harry (1964) is afgelei dat die toename van die koperkonsentrasie aan die adsorpsiekapasiteit van skulpe toegeskryf kan word. Hierdie adsorpsiekapasiteit is volgens dié outeurs 'n funksie van die konsentrasie van die metaalioon in die blootstellingsmedium. Volgens dié outeurs adsorbeer metale op die skulp en sefalopodale massa wat direk in kontak met die blootstellingsmedium is. Hierdie adsorpsie kan volgens Yager & Harry (1964) deur die volgende roetes plaasvind:

- * Deur die epiteelweefsel van die sefalopodale massa en die pulmonêre kompleks;
- * Deur die wand van die spysverteringskanaal nadat die dosisoplossing deur die mond ingeneem is;
- * Deur die skulp of tussen die skulp en mantelepiteelweefsel.

Sagtemateriaal

In teenstelling met die resultate van die hemolimf- en skulpmonsters, is gevind dat daar wel 'n betekenisvolle toename van die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van al die blootgestelde slakke, met die uitsondering van enkele blootstellingsperiodes, was (Tabelle 3-6). Die koperkonsentrasies in die sagtemateriaal van blootgestelde slakke het betekenisvol van die kontroleslakke na 48 ure blootstelling vir *B. glabrata*, *H. duryi* en *L. stagnalis* verskil.

Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van *B. glabrata* het nie betekenisvol na 2 en 6 ure blootstelling van die kontrole verskil nie. Tydens die langer blootstellingsperiodes (24 en 48 ure) is koper wel betekenisvol deur die sagtemateriaal van *B. glabrata* opgeneem. Hierdie resultate stem ooreen met wat deur Cheng & Sullivan (1974) gevind is, naamlik dat die akkumulاسie na 6, 8 en 10 ure baie hoër is as na 30 minute, 2 en 4 ure blootstelling. Sullivan & Cheng (1975) het getoon dat slakke wat aan toksiese vlakke van ⁶⁴Cu blootgestel was, nie koper in die verteringsklier geakkumuleer het nie. Dit is in teenstelling met slakke wat aan sub-letale koperkonsentrasies van 0,06 dpm blootgestel was en wel koper in die verteringsklier geakkumuleer het. Die huidige studie het dit nie ten doel gehad om die bepaalde teikenorgaan waar koper geakkumuleer word te identifiseer nie.

Soortgelyke resultate is by die spesies *H. duryi* en *L. stagnalis* gevind. Die koperkonsentrasie het vir die eerste 6 ure van blootstelling nie betekenisvol van die kontrole by *H. duryi* verskil nie, maar wel tydens die langer blootstellingsperiodes van

24 en 48 ure (Tabel 4).

Wat *L. stagnalis* betref, is gevind dat koper betekenisvol deur die sagtemateriaal opgeneem word aangesien die koperkonsentrasie van al die blootgestelde groepe betekenisvol van die kontrolewaardes verskil het (Tabel 5). In teenstelling hiermee is in 'n ondersoek deur Wolmarans & Van Aardt (1985) gevind dat die koperkonsentrasies in die heel slakke van die spesie *B. tropicus* oor 'n 6 ure blootstellingsperiode aansienlik toegeneem.

Uit bogenoemde resultate word die afleiding gemaak dat koper oor langer blootstellingsperiodes (24 en 48 ure) wel betekenisvol in die sagtemateriaal van *B. glabrata*, *H. duryi* en *L. stagnalis* opgeneem word. Hierdie toename van die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal kan moontlik 'n verklaring vir die toksiese effek van koper op die drie spesies oor langer blootstellingsperiodes bied. In Hoofstuk 3 is aangetoon dat die LD₅₀-waarde na 48 ure blootstelling onderskeidelik 0,269 dpm; 0,255 dpm en 0,376 dpm vir *B. glabrata*, *H. duryi* en *L. stagnalis* is. Alhoewel hierdie LD₅₀-waardes hoër as die 0,1 dpm blootstellingsdosis is wat in die huidige studie aangewend is, kan die betekenisvolle toename van die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal 'n moontlike invloed op die oorlewingspersentasie hê.

Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van *L. natalensis* is slegs oor 'n 6 ure blootstellingsperiode bepaal aangesien *L. natalensis* nie 'n 0,1 dpm blootstellingsdosis oor langer blootstellingsperiodes oorleef het nie. Tydens die 4 ure blootstellingsperiode het die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van *L. natalensis* betekenisvol toegeneem

(Tabel 6). Hierdie toename in die koperkonsentrasie van die sagtemateriaal van *L. natalensis* kan moontlik deur die gevorderde stadium van die doodgaanproses waarin die slakke na 4 ure blootstelling verkeer het, verklaar word. In die geval van *L. natalensis* het die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal tussen die kontrole en die slakke wat vir 2 en 6 ure blootgestel was, nie betekenisvol verskil nie. As gevolg van die toestand van slakke kon elektroliete moontlik uit die sagtemateriaal begin uitloog en 'n toename in die koperkonsentrasie van hemolimf tot gevolg hê. Dit is in teenstelling met Wolmarans & Yssel (1988) se bevinding dat die koper betekenisvol oor die 6 ure periode deur *L. natalensis* in die kopvoetweefsel opgeneem is. Dit is egter belangrik om daarop te let dat die blootstellingsdosis van 1 dpm wat in bogenoemde studie gebruik is, aansienlik hoër is as die 0,1 dpm wat in die huidige studie gebruik is.

5. 'N ONDERSOEK NA DIE VRYSTELLING VAN KOPER

Die omstandigheid dat kopersulfaat toksies vir varswaterslakspesies is, maak dit sinvol om die opname en vrystelling van koper deur dié slakke te ondersoek. Volgens Ryder & Bowen (1977a) word koper waarskynlik deur 'n proses van adsorpsie deur die landslak *Agriolimax reticulatus*, opgeneem. In teenstelling hiermee is deur Zylstra (1972) vasgestel dat kolloïdale ferritien aktief deur *L. stagnalis* opgeneem word wat op 'n proses van absorpsie dui. Cheng & Sullivan (1974) het uit studies wat op *B. glabrata* uitgevoer was, afgelei dat koper deur die rektaalrif en kopvoetepiteelweefsel geadsorbeer word. Dit is egter belangrik om daarop te let dat nie een van hierdie outeurs spesifiek die meganisme van koperopname of kopervrystelling ondersoek het nie. Uit die literatuur is dit duidelik dat die prosesse wat by swaarmetaalopname en -vrystelling betrokke is, nie vir alle swaarmetale dieselfde is nie en ook by die verskillende slakspesies mag verskil.

In hierdie ondersoek is die vrystelling van koper deur die vier geselekteerde slakspesies op die volgende wyses eksperimenteel ondersoek:

- * Die opname en akkumulering van koper in die sagtemateriaal, skulp en hemolimf van die slakke is tydens 'n koperblootstellingsperiode van 6 ure ondersoek;
- * die kopervrystelling uit die sagtemateriaal, skulpe en hemolimf van slakke wat vir 6 ure aan koper blootgestel is en daarna vir 24 ure in kopervrye boorgatwater aangehou is, is ondersoek en
- * die koperkonsentrasie van die aanvanklik kopervrye boorgatwater is tydens die

kopervrystellingsperiode gemonitor.

Materiaal en metodes

Tydens hierdie eksperiment is ondersoek ingestel na die vrystelling van koper deur *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis*. 'n Tekort aan laboratoriumgeteelde slakke van die spesie *L. natalensis* het genoodsaak dat proefdiere in 'n natuurlike dammetjie in die botaniese tuin van die PU vir CHO versamel is. Proefdiere is 48 ure voor die aanvang van die eksperiment uitgehonger. Die gemiddelde massa van die spesies *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* wat vir die ondersoek gebruik is, was onderskeidelik $435,9 \pm 32,9$ mg; $338,8 \pm 7,2$ mg; $516,5 \pm 92,1$ mg en $208,7 \pm 11,5$ mg.

Hemolimf-, sagtemateriaal- en skulpmonsters is voor die aanvang van die eksperiment by 'n kontrolegroep van 15 slakke by elk van die spesies versamel. Koperkonsentrasies van dié monsters is met behulp van 'n AAS bepaal. Daarna is 75 slakke van elk van die bogenoemde spesies in vyf groepe van 15 slakke elk verdeel.

Dié eksperimentele groepe is afsonderlik in eksperimenthouers, gevul met 45 ml van die 0,25 dpm kopermedium, vir 6 ure blootgestel. Na afloop van dié 6 ure blootstellingsperiode is al die slakke uit die kopermediums verwyder en vir 'n 5 minute afspoelperiode in gedistilleerde water gelaat om rond te beweeg. Daarna is hemolimf-, sagtemateriaal- en skulpmonsters van die slakke van een groep soos in Materiaal en metodes (Hoofstuk 2) bespreek, versamel en verteer. Die koperkonsentrasie in elk van

dié monsters is met behulp van 'n AAS geanaliseer.

Die slakke van die oorblywende groepe is na eksperimenthouers gevul met 45 ml gefiltreerde kopervrye boorgatwater oorgedra en op periodes van 2, 4, 18 en 24 ure gemonitor om vas te stel of die proefdiere die opgeneemde koper vrystel.

Watermonsters om die koperkonsentrasies in die onderskeie ekskresiemediums tydens dié periodes te bepaal, is soos volg onttrek:

- * Na 2 ure is 'n 1 ml watermonster uit al vier die vrystellingsmediums, waarin die vier slakgroepe aangehou is, onttrek.**
- * Die slakke wat slegs vir 2 ure toegelaat is om koper vry te stel, is terselfdertyd verwyder en die hemolimf-, sagtemateriaal- en skulpmonsters, soos reeds bespreek, vir koperanalise voorberei.**
- * Na verloop van 4 ure is 'n watermonster (1 ml) uit elk van die oorblywende drie eksperimenthouers onttrek. Terselfdertyd is 'n eksperimentele groep verwyder en is hemolimf-, sagtemateriaal- en skulpmonsters ook, soos reeds bespreek, vir koperanalise voorberei.**
- * Na 18 en 24 ure is dieselfde werkwyse gevolg.**

Altesaam was daar dus vier watermonsters wat by twee ure onttrek is, drie watermonsters wat by vier ure onttrek is, en slegs twee en een wat onderskeidelik by 18 en 24 ure onttrek is.

Standaardafwykings van die gemiddelde koperkonsentrasies wat na elk van die vrystellingsperiodes in die watermonsters bepaal is, is bereken. 'n Standaardafwyking vir die 24 ure vrystellingsperiode kon nie bepaal word nie, aangesien daar slegs een watermonster na hierdie periode onttrek is. Betekenisvolle verskille (95 %) tussen resultate van die kontrole- en eksperimentele groepe is met Tukey se toets bepaal.

Resultate en bespreking

Die koperkonsentrasies in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van die slakspesies *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* word respektiewelik in Tabelle 7-10 weergegee. Uit Tabel 7 is dit duidelik dat die koperkonsentrasies in die hemolimf en sagtemateriaal van *B. glabrata* na die blootstellingsperiode van 6 ure betekenisvol ten opsigte van die kontrole afgeneem het. 'n Soortgelyke afname in die hemolimfkoperkonsentrasie is ook deur Cheng & Sullivan (1977) gevind. Hierdie betekenisvolle afname van die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal kan aan die invloed van water in die selle, as gevolg van die versteuring van die osmolariteit, toegeskryf word.

Wat die blootgestelde eksemplare van die spesie *H. duryi* betref, is dit in Tabel 8 duidelik dat die koperkonsentrasie na die blootstellingsperiode van 6 ure in die hemolimf en betekenisvol in die skulpe ten opsigte van die kontrole toegeneem het. Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal het nie na hierdie periode betekenisvol van die kontrole verskil nie.

Dit is duidelik dat die koperkonsentrasie in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpmonsters van *L. stagnalis* na die 6 ure blootstellingsperiode betekenisvol van die kontrole toegeneem het (Tabel 9). Hieruit kan afgelei word dat koper wel tydens die 6 ure blootstellingsperiode deur *L. stagnalis* opgeneem word.

Wat die hemolimfkoperkonsentrasie betref, is dit uit Tabel 10 duidelik dat dit tydens die 6 ure blootstellingsperiode vir *L. natalensis* toegeneem het. Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal- en skulpmonsters het nie na die 6 ure blootstellingsperiode betekenisvol van die kontrole verskil nie.

Alhoewel daar 'n variasie in die opname van koper by die vier slakspesies was en koper slegs betekenisvol in enkele gevalle in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe opgeneem is, is besluit om die vrystelling van koper deur blootgestelde slakke in die kopervryemediums te ondersoek.

Wat die koperkonsentrasie tydens die vrystelling van koper by *B. glabrata* betref, dui die resultate in Tabel 7 op 'n toename daarvan in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe na 4 ure (Tabel 7). 'n Moontlike verklaring vir dié toename in die hemolimfkoperkonsentrasie is dat koper wat tydens blootstelling op die mukus op die slakvoet versamel het na 4 ure deur die voetepiteel tot in die hemolimf beweeg het. Na die 18 en 24 ure vrystellingsperiode het die hemolimfkoperkonsentrasie van die blootgestelde slakke tot onder die kontrolewaarde afgeneem. Hierdie afname kan moontlik op die vrystelling van koper uit die hemolimf dui.

Die koperkonsentrasies in die sagtemateriaal van blootgestelde slakke van *B. glabrata* het na die 4, 18 en 24 ure vrystellingsperiodes betekenisvol ten opsigte van die kontrole toegeneem. Dit is moontlik toe te skryf aan die beweging van koper vanaf die hemolimf na die sagtemateriaal. Koper mag oor langer periodes as wat in die huidige studie toegelaat is, vrygestel word.

Wat die 24 ure vrystellingsperiode betref, is dit duidelik dat die hemolimfkoperkonsentrasie van *H. duryi* tydens dié periodes ten opsigte van die koperkonsentrasie in hemolimf van blootgestelde slakke na 6 ure afgeneem het. Hierdie afname kan moontlik aan die vrystelling van koper uit die hemolimf toegeskryf word.

Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van *H. duryi* het oor die 24 ure vrystellingsperiode konstant gebly (Tabel 8). Hierdie resultate dui daarop dat die koperkonsentrasie moontlik in die sagtemateriaal 'n ewewig bereik het. Tydens die 24 ure vrystellingsperiode het die koperkonsentrasie van skulpe slegs na die 2 ure periode ten opsigte van die kontrole verskil.

Na 'n aanvanklike toename in die kontrolehemolimfkoperkonsentrasie van *L. stagnalis* vanaf 5,740 dpm na 6,817 dpm koper, tydens die 6 ure blootstellingsperiode, het dit sonder om 'n algemene tendens te vertoon onder dié waarde na die 2, 4, 18 en 24 ure vrystellingsperiodes gefluktueer (Tabel 9). Hierdie fluktuasie is nie in die koperkonsentrasie van die sagtemateriaal en skulpe weerspieël nie.

Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal en skulpe het na 2, 4, 18 en 24 ure

betekenisvol ten opsigte van die kontrolewaarde toegeneem. 'n Moontlike afleiding hieruit is dat koper nie deur die sagtemateriaal en skulpe vrygestel word nie, maar wel in beide akkumuleer.

Wat die resultate van *L. natalensis* betref is dit interessant om daarop te let dat die hemolimfkoperkonsentrasie na 'n 2 ure vrystellingsperiode tot 15,290 dpm toegeneem het (Tabel 10). Daarna het 'n konstante afname van die hemolimfkoperkonsentrasie na 4, 18 en 24 ure vrystelling plaasgevind. Indien die hemolimfkoperkonsentrasie na die 24 ure vrystellingsperiode met die kontrolewaarde vergelyk word, kom dit voor asof die koperkonsentrasie in die hemolimf van *L. natalensis* 'n ewewig ten opsigte van die medium bereik.

Die koperkonsentrasie in die sagtemateriaal van *L. natalensis* het nie betekenisvol tydens die 24 ure vrystellingsperiode van die kontrole verskil nie. Die betekenisvolle toename in die koperkonsentrasie van die skulpe van *L. natalensis* kan moontlik deur die afname van die hemolimfkoperkonsentrasie verklaar word.

Tabel 7. Die gemiddelde koperkonsentrasie van *B. glabrata* in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van kontroleslakke, slakke wat vir 6 ure in kopermediums blootgestel is en slakke wat vir 2, 4, 18 en 24 ure in aanvanklik kopervrye mediums aangehou is.

Blootstellings-periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=15)	Skulpe dpm/100mg (n=15)
Kontrole	0,132	0,716 ± 0,181	1,145 ± 0,391
6 ure blootstelling	0,113	0,522 ± 0,182*	1,471 ± 0,363
2 ure vrystelling	0,118	0,747 ± 0,284	1,387 ± 0,199
4 ure vrystelling	0,159	0,966 ± 0,179*	1,552 ± 0,405*
18 ure vrystelling	0,127	1,201 ± 0,414*	1,551 ± 0,373*
24 ure vrystelling	0,096	1,187 ± 0,579*	1,318 ± 0,552

* Waarde het betekenisvol van die kontrole verskil.

Tabel 8. Die gemiddelde koperkonsentrasie van *H. duryi* in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van kontroleslakke, slakke wat vir 6 ure in kopermediums blootgestel is en slakke wat vir 2, 4, 18 en 24 ure in aanvanklik kopervrye mediums aangehou is.

Blootstellings-periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=15)	Skulpe dpm/100mg (n=15)
Kontrole	0,390	0,714 ± 0,356	0,924 ± 0,257
6 ure blootstelling	0,440	0,767 ± 0,185	1,635 ± 0,279*
2 ure vrystelling	0,413	0,654 ± 0,094	1,532 ± 0,345*
4 ure vrystelling	0,303	0,526 ± 0,129	1,235 ± 0,218
18 ure vrystelling	0,294	0,628 ± 0,214	1,161 ± 0,231
24 ure vrystelling	0,336	0,620 ± 0,244	0,991 ± 0,294

* Waarde het betekenisvol van die kontrole verskil.

Tabel 9. Die gemiddelde koperkonsentrasie van *L. stagnalis* in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van kontroleslakke, slakke wat vir 6 ure in kopermediums blootgestel is en slakke wat vir 2, 4, 18 en 24 ure in aanvanklik kopervrye mediums aangehou is.

Blootstellings-periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=15)	Skulpe dpm/100mg (n=15)
Kontrole	5,740	0,414 ± 0,129	1,250 ± 0,225
6 ure blootstelling	6,817	0,815 ± 0,252*	1,351 ± 0,235*
2 ure vrystelling	5,651	0,729 ± 0,261*	1,499 ± 0,231*
4 ure vrystelling	5,905	0,746 ± 0,163*	1,433 ± 0,308*
18 ure vrystelling	4,321	1,191 ± 0,249*	1,388 ± 0,296*
24 ure vrystelling	5,665	1,190 ± 0,425*	1,374 ± 0,427*

* Waarde het betekenisvol van die kontrole verskil.

Tabel 10. Die gemiddelde koperkonsentrasie van *L. natalensis* in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van kontroleslakke, slakke wat vir 6 ure in kopermediums blootgestel is en slakke wat vir 2, 4, 18 en 24 ure in aanvanklik kopervrye mediums aangehou is.

Blootstellings-periodes (ure)	Koperkonsentrasies (dpm)		
	Hemolimf	Sagtemateriaal dpm/100mg (n=15)	Skulpe dpm/100mg (n=15)
Kontrole	10,192	0,771 ± 0,372	1,025 ± 0,420
6 ure blootstelling	13,432	1,246 ± 0,718	1,781 ± 0,547
2 ure vrystelling	15,290	1,867 ± 0,944	1,981 ± 0,272*
4 ure vrystelling	13,976	1,664 ± 0,734	1,595 ± 0,353*
18 ure vrystelling	12,304	1,160 ± 0,379	1,634 ± 0,316*
24 ure vrystelling	10,648	1,961 ± 1,039	1,500 ± 0,218*

* Waarde het betekenisvol van die kontrole verskil.

Die resultate in Tabel 11 toon dat die koperkonsentrasies in die oorspronklike kopervrye boorgatwater na die vrystellingsperiode van 24 ure vir al vier die slakspesies betekenisvol toegeneem het. Hierdie toename kan moontlik aan die volgende toegeskryf word:

- * die diffusie van die koperioon uit slakweefsel;
- * aktiewe ekskresie deur blootgestelde slakke;
- * vrystelling van die koperioon uit die mantelholte en
- * koperbevattende mukus wat tydens blootstelling op die slakvoet versamel.

Uit die resultate is dit opvallend dat die opgeneemde koper weer deur al die spesies vrygestel word. Verder kan waargeneem word dat die koperkonsentrasies van die vrystellingsmediums waarin *L. natalensis* aangehou is, ten opsigte van die ander drie spesie, relatief laer is. Dit kom dus voor of koper waarskynlik oor die blootstellingsperiode van 6 ure deur *L. natalensis* opgeneem word en in vergelyking met die ander spesies in relatief kleiner hoeveelhede tydens die 24 ure vrystellingsperiode vrygestel word. Volgens Wolmarans & Van Aardt (1985) is die vrystelling van koper in laer konsentrasies deur die blootgestelde slakke waarskynlik 'n aanduiding dat daar nie 'n ewewig tussen koperopname en kopervrystelling bereik word nie.

Dit is verder duidelik dat daar tydens die 24 ure vrystellingsperiode steeds 'n toename in die koperkonsentrasies van die oorspronklik kopervrye boorgatwater waarin die onderskeie groepe aangehou is, voorgekom het. Hierdie toename dui daarop dat ekskresie van koper nie oor dié periode volledig afgehandel is nie.

Watling & Watling (1976) wat die ekskresie van koper deur *Mya arenario* ondersoek het, is bevind dat die eliminering van dié swaarmetaal oor 'n periode van 4-15 dae plaasgevind het. Hierdie outeurs het verder die afleiding gemaak dat daar 'n direkte verband tussen die opname- en ekskresiekoers vir elk van 'n gegewe metaal en vir elk van die geëvalueerde slakspesies bestaan. Hulle het ook vasgestel dat die kontrolekoperkonsentrasie in blootgestelde eksemplare van *Crassaostrea gigas* eers na 116 dae bereik is.

Tabel 11. Die koperkonsentrasies in (dpm) wat deur blootgestelde slakke van die onderskeie slakspesies in die aanvanklik kopervryemediums na 2, 4, 18 en 24 ure vrygestel is.

Slakspesies	Vrystellingsperiodes (ure)				
	0	2	4	18	24
<i>B. glabrata</i>	0,002	0,036 ± 0,011	0,021 ± 0,006	0,072 ± 0,019	0,064
<i>H. duryi</i>	0,002	0,064 ± 0,021	0,035 ± 0,008	0,081 ± 0,016	0,119
<i>L. stagnalis</i>	0,002	0,052 ± 0,027	0,048 ± 0,040	0,109 ± 0,006	0,091
<i>L. natalensis</i>	0,002	0,019 ± 0,003	0,031 ± 0,01	0,047 ± 0,012	0,038

Opsommend kan die afleiding uit die resultate gemaak word dat daar geen opmerlike verskil ten opsigte van die kopervrystelling tussen die geëvalueerde hemoglobien- en hemosianindraende slakke voorgekom het nie.

Wat wel duidelik uit die resultate in Tabel 11 blyk, is dat koperkonsentrasie in al die mediums waarin geselekteerde slakspesies aangehou is, tydens die 24 ure vrystellingsperiode toegeneem het. Soos reeds aangedui, is dit duidelik uit die resultate van Tabel 11 dat die koperkonsentrasies van die vrystellingsmedium waarin *L. natalensis* aangehou is, relatief laer is as die koperkonsentrasie waarin die ander slakke aangehou was. Uit die resultate van die vorige eksperiment waarin die akkumulering van koper deur die slakke ondersoek is (Hoofstuk 4), is gevind dat *L. natalensis* koper uit die blootstellingsmedium opneem en in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe akkumuleer. Hierdie lae koperkonsentrasie wat deur *L. natalensis* in die huidige studie vrygestel word, dui dus daarop dat die geakkumuleerde koper slegs in 'n geringe mate deur die slakke vrygestel word en bied 'n moontlike verklaring vir die sensitiwiteit van *L. natalensis* vir koperblootstelling, soos in Hoofstuk 3 bespreek.

6. 'N ONDERSOEK NA DIE HISTOLOGIESE SKADE OP DIE OPPERVLAKEPITEEL VAN DIE SLAKVOET MET BEHULP VAN TRANSMISSIE-ELEKTRONMIKROSKOPIE

Uit die resultate en besprekings van die vorige eksperimente is die gevolgtrekking gemaak dat koper deur die sagtemateriaal van blootgestelde slakke opgeneem word. Die feit dat die oppervlakepiteel in kontak met die blootstellingsmedium is, maak die afleiding moontlik dat koper 'n toksiese effek op die oppervlakepiteel van slakke uitoefen en daarna in die dieperliggende organe akkumuleer. Outoradiografiese studies deur Ryder & Bowen (1977a) het getoon dat ^{67}Cu op die epiteel van die kopvoetstreek en die rektaalrif akkumuleer. Sullivan, Rodrick & Cheng (1974) het in soortgelyke ondersoeke die akkumulering van ^{64}Cu deur die epiteelweefsel van die rektaalrif van *B. glabrata* aangetoon. 'n Moontlike rede vir die akkumulering van koper deur dié epiteelweefsel is dat die rektaalrif deur water omspoel word en dus met die kopermedium in kontak kom. Verder is die afleiding gemaak dat die permeabiliteit van die oppervlakmembraan by hoë konsentrasies vernietig word. Gevolglik word ^{64}Cu in 'n mindere mate deur die slakke geakkumuleer.

Sullivan & Cheng (1976) het die versteuring van die osmoregulatoriese en respirasiefunksie van blootgestelde slakke aan die toksiese invloed van koper op die epiteelweefsel toegeskryf. In soortgelyke ondersoeke is die versteuring van die osmoregulatoriese en respirasiefunksie ook deur Van Aardt & Coertze (1981) aangetoon. Hierdie outeurs het egter nie aangetoon in watter mate die uitwendige epiteelselle tot die

versteuring van osmoregulering bygedra het nie. Omdat die organisme in varswater leef, word die osmotiese gradiënt tussen die hemolimf en die water deur die opname en retensie van ione gehandhaaf. Ione word dus waarskynlik deur die transportepiteel van die rektaalrif uit die water opgeneem en dring sodoende die rektaalrif binne. Volgens Cheng & Sullivan (1973) is die transportepiteel moontlik die epiteel waar die toksiese effek van gifstowwe op die slak tot uiting kom. 'n Ander moontlikheid is dat koper in die hemolimf van die blootgestelde slakke opgeneem word en daar akkumuleer tot 'n toksiese drempelwaarde vir 'n bepaalde orgaan of sisteem bereik word. In beide gevalle is die opname van koper deur die epiteelweefsel voor-die-handliggend.

In soortgelyke ondersoeke het Cheng & Sullivan (1977) die vergroting van die los, vaskulêre bindweefsel en die epiteelselle by die rektaalrif na koperblootstelling aangetoon. Die leë voorkoms van die los, vaskulêre bindweefsel van die rektaalrif suggereer 'n invloed van water in die weefsel in. Dit dui op die wanfunksionering van die osmoregulatoriese stelsel van die organisme. 'n Sekondêre effek van die invloed van water in die weefsel is die lise van die pigmentselle wat met die sintese van hemoglobien verband hou. Dit weer, behoort te lei tot 'n afname in die hemoglobienvlakke van die hemolimf. Dié outeurs het verder gevind dat die groot pigmentselle in die los bindweefsel wat aan CuSO_4 blootgestel is, beskadig word.

Die rektaalrif van verskeie varswaterslakspesies is met 'n enkellaag epiteelweefsel bedek. Hierdie epiteel sluit selle met mikrovilli, gesilieerde selle en bekere selle in (Sullivan *et al.* 1974). Op grond van die feit dat die epidermis uit 'n laag mikrovilli teenwoordig op die oppervlaktepiteelselle bestaan, asook dat talle vesikels, mitochondrions, Golgi-liggame

en lisosoomagtige organelle in die selle teenwoordig is, kom dit volgens Zylstra (1972) voor asof die integument betrokke is by die opname van partikels en opgeloste stowwe uit die omgewing. Gebaseer op die ultrastruktuur van die oppervlakepiteel van die rektaalrif by *B. glabrata*, postuleer Sullivan *et al.* (1974) dat die selle met mikrovilli by die vervoer van stowwe in en uit die slak betrokke is. Dit is veral die teenwoordigheid van mikrovilli, mitochondrions by apikale seldele, die hegte verbinding tussen oppervlakepiteel en die onderliggende los, vaskulêre bindweefsel en die oorfloed van gesilieerde selle wat op 'n vervoerfunksie by die selle dui.

Volgens Sullivan & Cheng (1975) is die toksiese werking van koper op die rektaalrif moontlik aan die volgende toe te skryf:

- * Koperblootstelling het die sekresie van mukus tot gevolg wat die uitruiling van ione en gase op die epiteeloppervlak verhoed.
- * Koper bind moontlik aan die hidrofiliese streke van die eksterne plasmamembraan deur die membraan se biochemiese en fisiologiese eienskappe te verander.
- * Koper dring die sitoplasma van die epiteelselle binne en ontwrig die normale funksies van die selle.

Na aanleiding van bogenoemde waarskynlikhede is die histopatologiese verandering op ultrastrukturele vlak by die voetepiteel van *B. glabrata*, *H. duryi*, *L. stagnalis* en *L. natalensis* en na kopersulfaatblootstelling met behulp van die transmissie-elektronmikroskoop ondersoek.

Materiaal en metodes

Vir die ondersoek is 15 volwasse slakke van elk van die vier slakspesies geselekteer. Tien slakke van elke spesie is apart aan 'n 0,5 dpm-kopermedium by 25 °C blootgestel. Die oorblywende vyf slakke van elke spesie is in kopervrye boorgatwater as kontrole aangehou. Drukklug is deur elk van die eksperimentglasbekers geborrel. Vyf proefdiere is onderskeidelik na 6 en 18 ure uit die koperblootstellingsmedium verwyder en vir 5 minute toegelaat om in kopervrye boorgatwater rond te beweeg. Hiermee is seker gemaak dat die proefdiere lewend was. 'n Gedeelte van die kopvoetepiteel by beide die kontrole- en proefdiere is vervolgens met behulp van 'n chirurgiese skêrtjie en pinset in Todd se fikseermiddel (Todd 1986) uitgevoer waarna dit ook in Todd se fikseermiddel gefikseer is. Die voetepiteel is geselekteer omdat dit direk met koperblootstellingsmedium in aanraking was. Hierna is die weefsel, soos bespreek in die Materiaal en metodes (Hoofstuk 2) vir elektronmikroskopie voorberei.

Resultate en bespreking

Die resultate van die studie word in Figure 12-15 weergegee. 'n Vergelyking van die voetepiteel van die kontrole en blootgestelde proefdiere toon dat weefselbeskadiging tydens koperblootstelling ingetree het. Uit die elektronmikrograwe van die kontrolesnitte is die talle mikrovilli teenwoordig. Volgens Zylstra (1972) dui die teenwoordigheid van hierdie organelle op 'n opnamefunksie van partikels.

Die skade is veral opvallend in die gebied van die basaallamina waar die bindweefsel

swelling ondergaan het en ook van die basaallamina weggetrek het. Hierdie ruimtes het geen elektrondigtheid vertoon nie en is opvallend groot. In 'n studie met *B. tropicus* het Wolmarans *et al.* (1986) soortgelyke bevindings gemaak en gevind dat beide die kopepiteel en die tentakelepiteit op dieselfde wyse beskadig is.

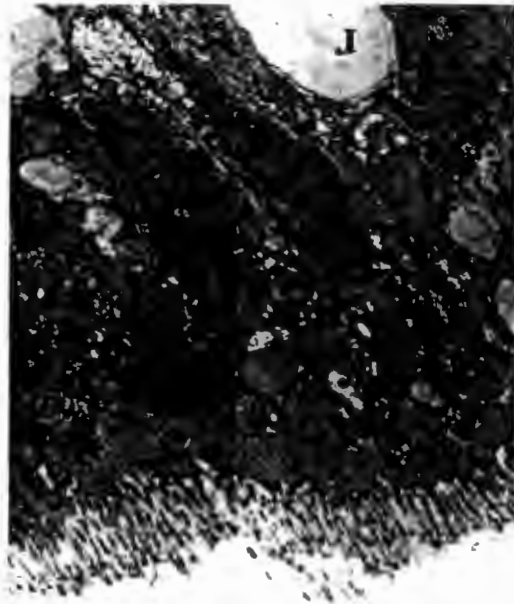
In Figure 12a-15a, wat die kontroleslakke van die vier slakspesies verteenwoordig, kan waargeneem word dat die vaskulêre bindweefsel dig gepak is. In teenstelling hiermee is die leë ruimtes in die bindweefsel van die oppervlakepiteel van die blootgestelde slakke duidelik waarneembaar. In 'n ondersoek deur Sullivan & Cheng (1975) is gevind dat die basaallamina na koperblootstelling nie by die rektaarif teenwoordig was nie. Die los vaskulêre bindweefsel was met groot vloeistofge vulde ruimtes gevul. Cheng & Sullivan (1977) het getoon dat groot ruimtes in die los, vaatryke bindweefsel voorkom en het dit aan die osmotiese influks van water weens 'n moontlike versteuring in die membraanpermeabiliteit van die epiteelselle toegeskryf.

Uit die resultate van die huidige studie is dit verder opvallend dat die weefselkade tot die gebied direk onder die epiteellaag beperk is en dit is in noue ooreenstemming met resultate van Ryder & Bowen (1977a).

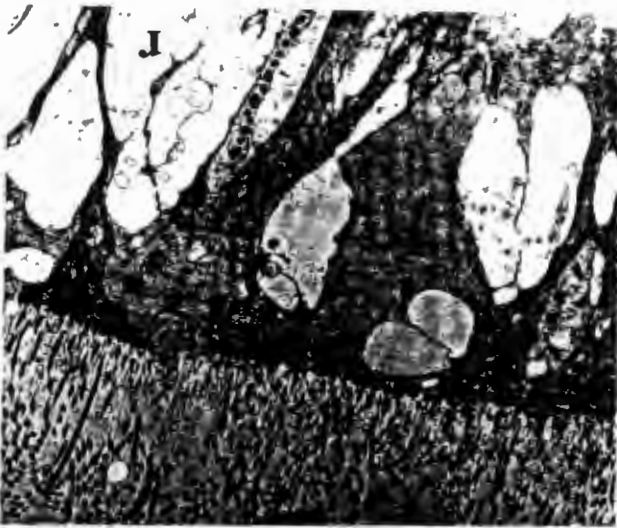
Om op te som, kan afgelei word dat koper waarskynlik op die epiteelselle van alle uitwendige sowel as inwendige weefsel wat met blootstellingsmedium in aanraking kom, adsorbeer en dat soortgelyke histologiese veranderinge op alle eksterne epitele voorkom.

'n Gevolg van hierdie adsorpsie is waarskynlik '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). Hierdie histologiese veranderinge in die epiteelweefsel het moontlik tot die fisiologiese verandering, soos deur Wolmarans *et al.* (1986) beskryf, aanleiding gegee.



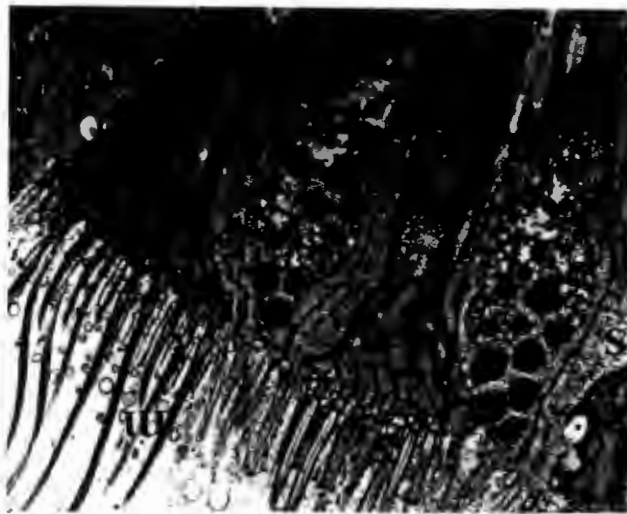
p



c



q

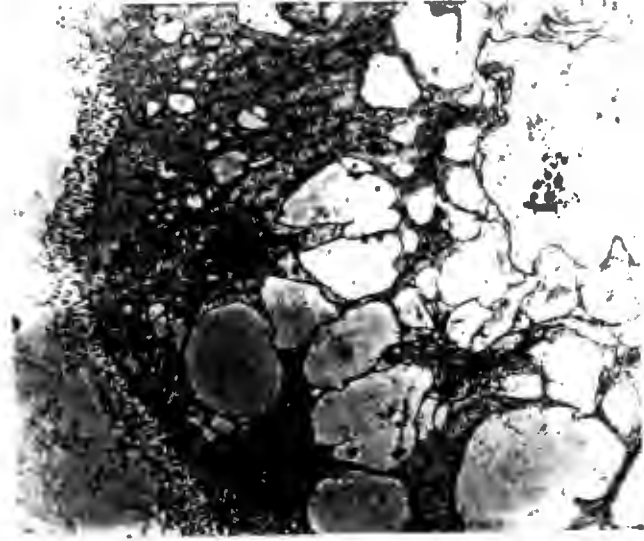


a

a

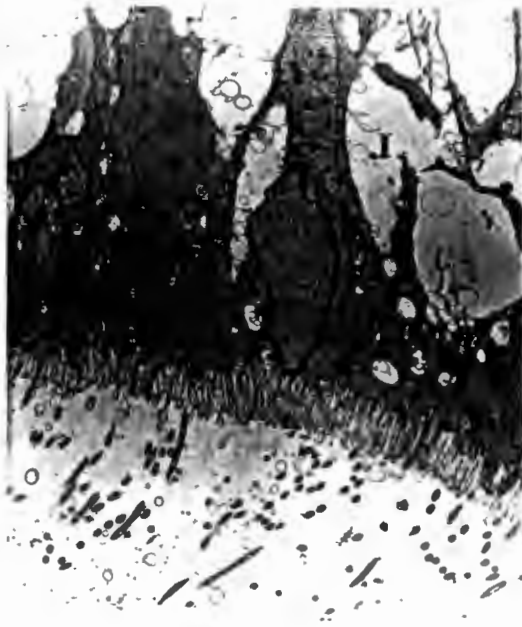


b

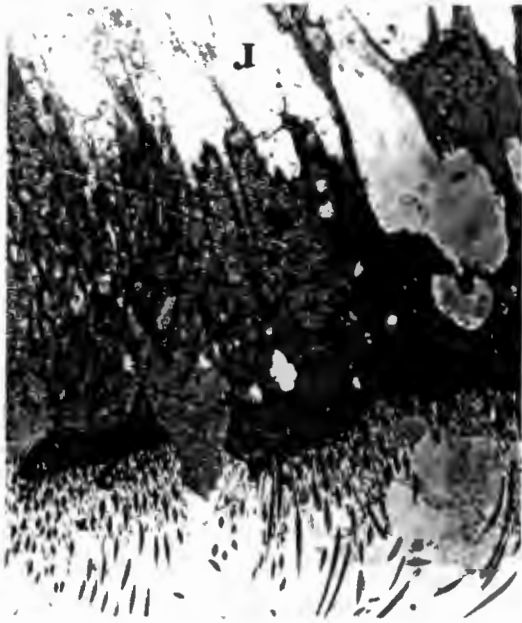


c

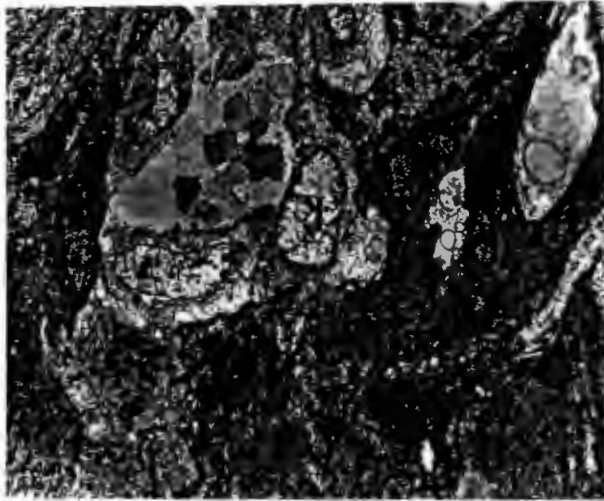




c



q



a

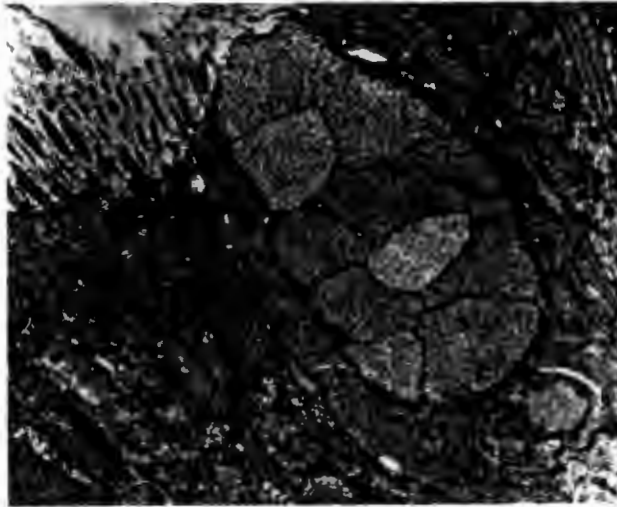
Figuur 15 a.) en b.) Elektronmikrograaf van die kontrole om die mikrovilli (m), Golgi-liggame (g) en sekresieselle (s) van die voetepiteel van *L. natalensis* aan te toon (x 3900).

Figuur 15 c.) Elektronmikrograaf van die voetepiteel van *L. natalensis* om die ruimtes (r) na 6 uur-blootstelling (x 3900) aan te toon.

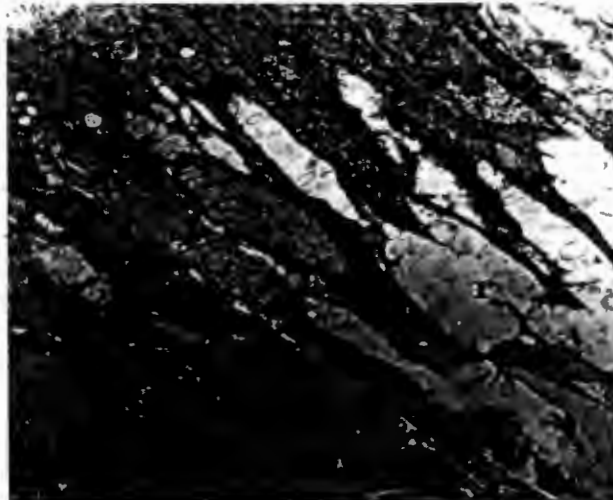
a



b



c



7. 'N ONDERSOEK NA DIE INVLOED VAN KOPERSULFAAT OP DIE EIERPRODUKSIE EN EMBRIO-ONTWIKKELING VAN TWEE GESELEKTEERDE VARSWATERSLAKSPESIES

Huidiglik word koper in 'n variasie van verbindings as 'n suksesvolle molluskisied aangewend. As gevolg van die ekonomiese implikasies hiervan is dit belangrik dat volwasse slakke sowel as die eiers met die toediening daarvan beheer word. Volgens Duncan (1974) is kopersulfaat en ander molluskisiede baie effektief teen die volwasse slakke van die spesie *B. glabrata*, maar nie teen die eiers van die spesie nie. Weinig inligting betreffende die eierproduksie van volwasse slakke asook die ontwikkeling van embrio's in eierpakkies wat aan koper blootgestel is, is bekend.

Deur gebruik te maak van x-straalmikro-analise en histochemiese tegnieke het Ryder & Bowen (1977b) vasgestel dat koper wel deur slakeiers van *A. reticulatus* wat aan kopersulfaatmediums blootgestel is, opgeneem word. Uit dié ondersoek is dit duidelik dat koper in die buitenste perivitalienmembrane van die eiers opgeneem en gekonsentreer word. Geen koper is egter met dié ondersoek in die perivitalienvloeistof opgemerk nie. Die koperkonsentrasies waaraan slakke tydens die studie van Ryder & Bowen (1977b) blootgestel was, was relatief hoog en het gewissel tussen 1 en 100 dpm oor 'n 24 ure periode. Dit was egter nie uit dié studie duidelik of die opgeneemde koper 'n toksiese effek op die embrio's uitoefen nie.

In hierdie studie is gepoog om die invloed wat kopersulfaatblootstelling op die

eierproduksie en embrio-ontwikkeling van *B. glabrata* en *L. natalensis* het, na te gaan. Daarvoor is die eierproduksie van volwasse slakke voor en na blootstelling ondersoek. Die embrio-ontwikkeling en die uitbroeipersentasie in eierpakkies wat aan vier verskillende kopermediums blootgestel is, is ook nagegaan.

7.1 'N ONDERSOEK NA DIE INVLOED VAN KOPERBLOOTSTELLING OP DIE EIERPRODUKSIE VAN VOLWASSE SLAKKE VOOR EN NA BLOOTSTELLING

Materiaal en metodes

Vir die ondersoek is 150 slakke elk van *B. glabrata* en *L. natalensis* in drie groepe van 50 slakke verdeel. Slegs *B. glabrata* en *L. natalensis* met 'n gemiddelde massa van 580 ± 94 mg en 184 ± 14 mg is in die studie gebruik. Die drie slakgroepe is vir 12 dae voor koperblootstelling in slakbakke in boorgatwater by $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ aangehou. Die eierproduksie van elk van dié groepe is daaglik bepaal deur die aantal eierpakkies te tel. Slakke is gedurende die 12 dae periode aanhoudend gevoed sodat daar ten alle tye genoeg kos in die slakbakke beskikbaar was. Daar is egter daarteen gewaak om nie die water in die akwariums te besoedel, deur die toediening van 'n oormaat voedsel wat nie deur die slakke benut word nie. Slakke is daaglik na skoon slakbakke oorgedra.

Na die 12 dae kontroleperiode is twee van die groepe vir 6 ure aan 'n 0,25 dpm kopersulfaatmedium in Pyrex-glasbekers blootgestel. Die derde groep is as kontrole in kopervrye boorgatwater in 'n Pyrex-glasbeker aangehou. Tydens die 6 ure

blootstellingsperiode is die slakke nie gevoer nie. Die slakke is hierna weer vir 10 dae in slakbakke in kopervrye boorgatwater aangehou waartydens die eierproduksie daaglik soos voorheen bepaal is. Genoegsame kos is ook tydens dié periode aan die slakke voorsien.

Resultate en bespreking

Die resultate van die aantal eierpakkies wat deur *B. glabrata* en *L. natalensis* 12 dae voor en 10 dae na blootstelling aan 'n 0,25 dpm kopermedium gelê is, word onderskeidelik in Tabele 12 en 13 weergegee.

Die aantal eierpakkies wat deur *B. glabrata*-slakke van die onderskeie groepe tydens die 12 dae voor blootstelling gelê is, het nou ooreengestem. Soortgelyke resultate is vir dié drie groepe tydens die 10 dae na blootstelling gevind (Tabel 12). Uit die resultate wat vir *B. glabrata* verkry is (Tabel 12), is dit duidelik dat daar wel 'n afname in die aantal eierpakkies van die twee groepe (B en C) wat aan koper blootgestel is, vanaf dag 8 was. Hierdie afname kan egter nie aan die kopersulfaatblootstelling toegeskryf word nie aangesien die aantal eierpakkies deur die kontrole groep (A) gelê ook afneem en die aantal eierpakkies tydens die 12 dae kontrole periode voor blootstelling ook gefluteer het. Hierdie resultate dui daarop dat die blootstelling van die volwasse slakke van die spesie *B. glabrata* waarskynlik geen invloed op die eierproduksie gehad het nie.

Wat die resultate van *L. natalensis* betref is dit uit Tabel 13 duidelik dat die eierproduksie van die drie groepe tydens die 12 dae periode voor blootstelling en 10 dae

na blootstelling nou ooreengestem het.

Uit die resultate van beide die spesies *B. glabrata* en *L. natalensis* is dit duidelik dat die blootstelling van volwasse slakke geen effek op die eierproduksie van dié slakke gehad het nie.

Tabel 12. Die aantal eierpakkies wat deur die kontrole groep (A) en die twee eksperimentele groepe (B en C) van *B. glabrata* gelê is tydens 'n 12 dae periode voor blootstelling en 'n 10 dae periode na blootstelling.

Groepe	Voor blootstelling (dae)						Na blootstelling (dae)				
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10
A	20	40	34	31	55	54	57	64	58	35	40
B	19	30	37	39	55	60	53	61	62	35	23
C	17	28	36	26	43	44	40	60	65	20	31

Tabel 13. Die aantal eierpakkies wat deur die kontrole groep (A) en die twee eksperimentele groepe (B en C) van *L. natalensis* gelê is tydens 'n 12 dae periode voor blootstelling en 'n 10 dae periode na blootstelling.

Groepe	Voor blootstelling (dae)						Na blootstelling (dae)				
	2	4	6	8	10	12	2	4	6	8	10
A	2	8	13	10	5	19	9	16	23	15	8
B	3	3	13	13	3	12	6	8	22	10	6
C	5	6	16	16	6	23	8	10	20	6	8

7.2 'N ONDERSOEK NA DIE EMBRIO-ONTWIKKELING IN EIERPAKKIES EN DIE UITBROEIPERSENTASIE TYDENS KOPERBLOOTSTELLING

Materiaal en metodes

Om die ontwikkeling van die embrio's en die uitbroeipersentasie van *B. glabrata* en *L. natalensis* tydens koperblootstelling te ondersoek, is eendagoue eiers van elk van die twee slakspesies gebruik. Eierpakkies is versamel deur dit versigtig van die kante van maasbakke met 'n spatel te verwyder. Dié eierpakkies is vir 10 dae onderskeidelik aan vier koperkonsentrasies, naamlik 0,25 dpm; 0,5 dpm; 1 dpm en 5 dpm koper blootgestel. Drie eierpakkies is in 40 ml van die onderskeie kopersulfaatmediums in Petri-bakkies blootgestel. Die Petri-bakkies is met parafilm geseël. Drie herhalings van elk van die blootstellingskonsentrasies is vir elk van die slakspesies uitgevoer. As kontrole is drie eierpakkies per Petri-bakkie oor die 10 dae periode vir elk van die spesies in kopervrye boorgatwater aangehou.

Die Petri-bakkies is op 'n platvorm in 'n akwarium by 'n konstante temperatuur van 27 ± 1 °C aan die onderskeie mediums blootgestel. Die aantal ontwikkelende embrio's in elk van die blootgestelde en kontrole-eierpakkies en die aantal uitgebroeide slakkies is met intervalle van 2 dae met behulp van 'n Stereo-mikroskoop getel. Om die ontwikkeling van embrio's in die eierpakkies te ondersoek is daar elke tweede dag 'n mikrograaf van die kontrole- en blootgestelde eierpakkies by 'n vergroting van 22,5 geneem. Die uitbroeipersentasie is ten opsigte van die aanvanklike aantal embrio's bepaal.

Resultate en bespreking

Die resultate van die aantal ontwikkelende embrio's in die eierpakkies en die uitbroeipersentasie van slakkies word in Figure 16 en 17 vir beide die spesies weergegee. Die ontwikkeling van embrio's tydens die 10 dae blootstellingsperiode is ook duidelik in Figure 18 en 19 sigbaar.

Uit die resultate van *B. glabrata* in Figuur 16e is dit duidelik dat die aantal ontwikkelende embrio's in die kontrole tydens die 10 dae periode van 192 tot 43 afneem het. Vanaf dag 1 tot dag 4 was daar 'n skerp afname vanaf 192 tot 153 embrio's. Vanaf dag 4 was beweging van die embrio's in dié eierpakkies sigbaar en hierdie aktiwiteit het toeneem tot en met dag 10.

Op dag 6 het van die slakkies van *B. glabrata* (8,9 %) in die kontrole begin uitgebroei. Hierdie uitbroeipersentasie het na dag 8 tot 57,8 % toeneem waarna geen verdere slakkies op dag 10 uitgebroei het nie. Die ontwikkeling van die embrio's in die kontrole-eierpakkies is duidelik sigbaar in Figuur 18.

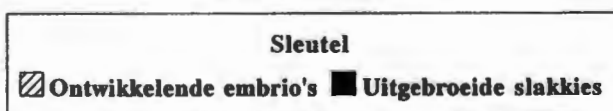
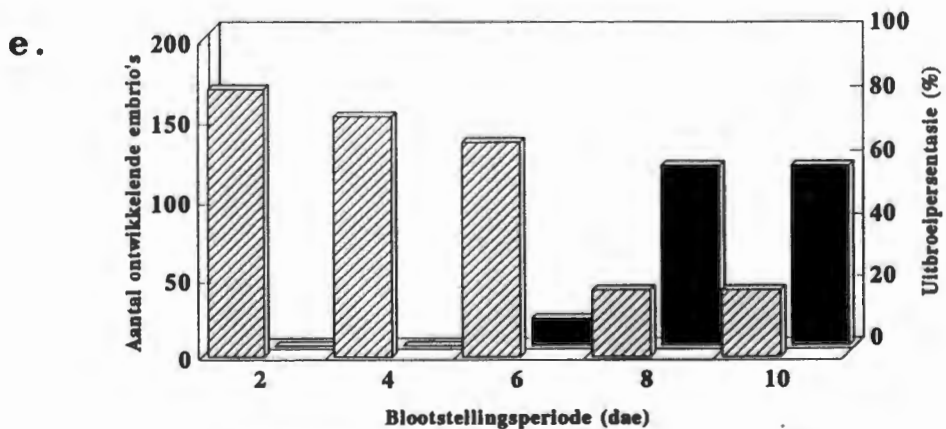
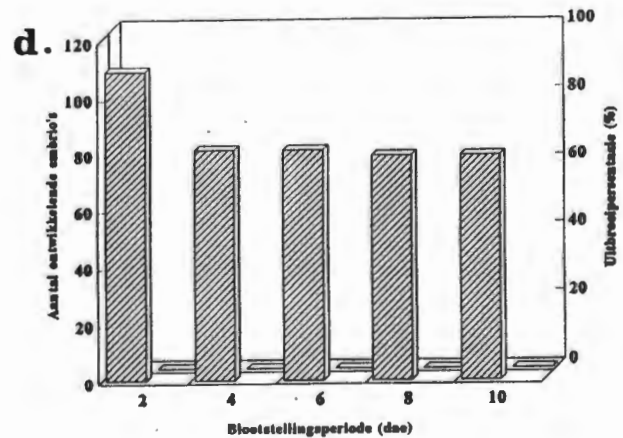
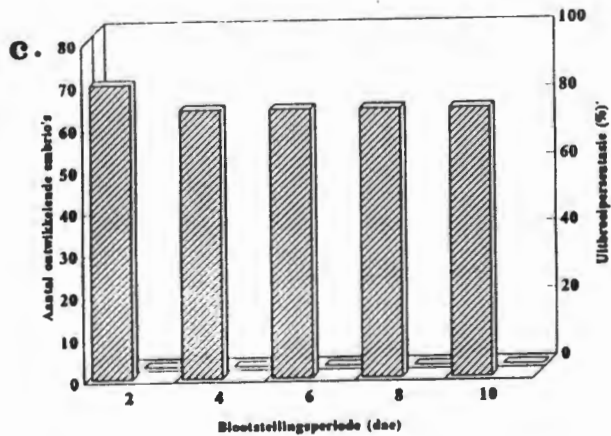
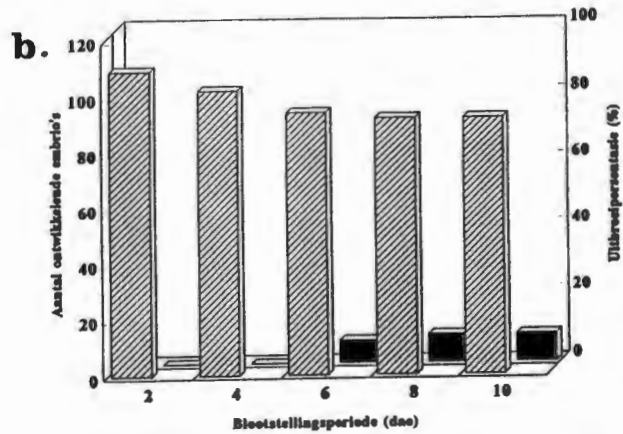
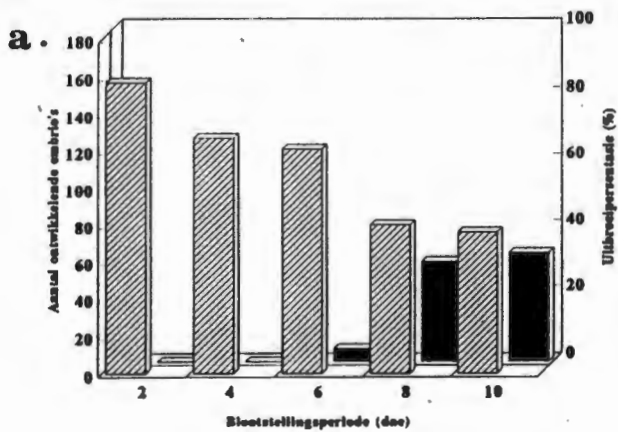
Uit Figuur 16a is dit duidelik dat die aantal ontwikkelende embrio's van *B. glabrata* tydens die eerste vier dae van blootstelling vanaf 157 tot 127 afgeneem het. Soos in die kontrole het die eerste slakkies (3,8 %) op dag 6 uitgebroei. Na dag 8 was die uitbroeipersentasie 29,9 %. Hierdie persentasie het na 10 dae blootstelling tot 32,5 % toeneem. Tydens die 10 dae blootstellingsperiode was daar 'n duidelike afname in die aktiwiteit van hierdie groep in vergelyking met die kontrole.

In Figuur 18 kan gesien word dat die ontwikkelende embrio's van *B. glabrata* wat aan 0,25 dpm blootgestel is, kleiner is as die kontrole groep. Uit dié figuur is dit opvallend dat embrio's naaste aan die blootstellingsmedium die minste ontwikkel het.

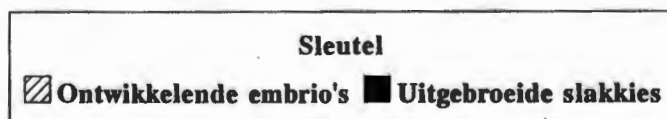
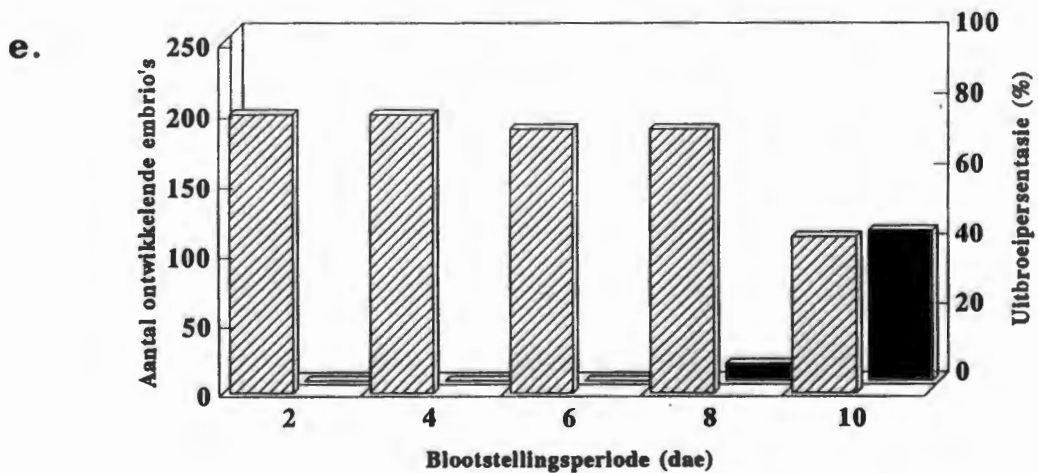
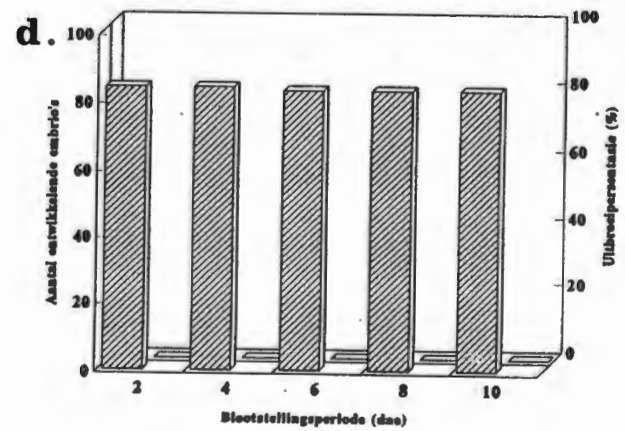
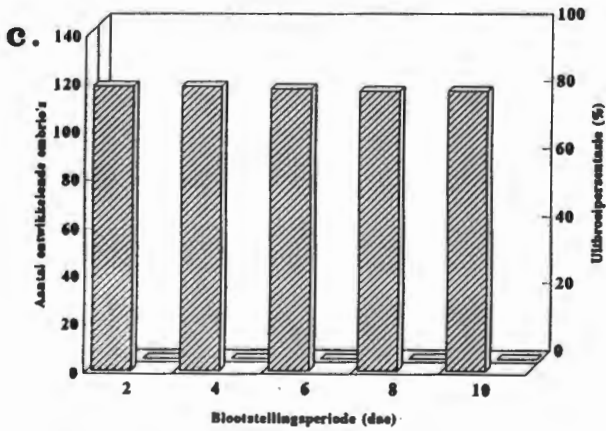
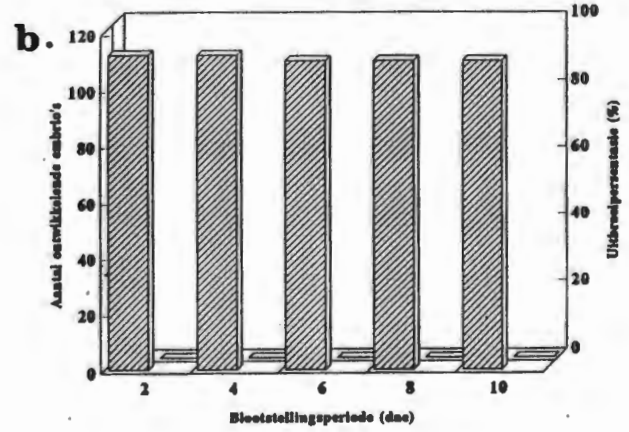
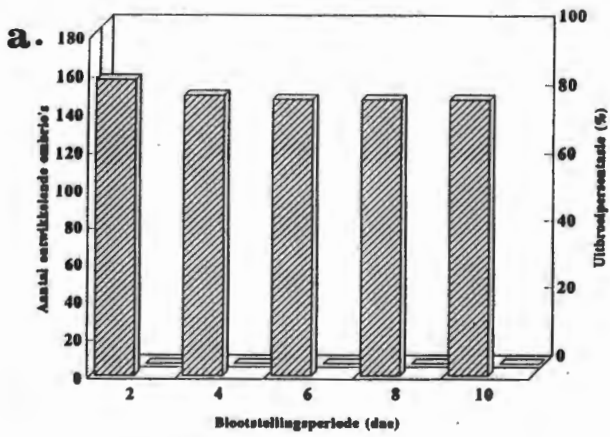
Die ontwikkeling en uitbroeipersentasie van embrio's van *B. glabrata* het verder afgeneem tydens blootstelling aan 'n 0,5 dpm kopermedium (Figuur 16b). Hierdie afname het tydens die eerste 4 dae van blootstelling (vanaf 123 tot 102) plaasgevind. Slakkies het soos by die kontrole en 0,25 dpm blootstelling op dag 6 begin uitbroei (6,5%). Hierdie uitbroeipersentasie het tot op dag 8 tot 8,1 % toegeneem. Geen slakkies het verder tot op dag 10 uitgebroei nie.

Wat die blootstelling van eierpakkies van *B. glabrata* aan 1 en 5 dpm betref kan uit Figuur 16c en d afgelei word, dat die aantal ontwikkelende embrio's drasties tydens die eerste vier dae van blootstelling, onderskeidelik vanaf 76 tot 64 en 114 tot 81, afgeneem het. By bogenoemde twee konsentrasies het die eierpakkies opvallend donkerder geword. Hierdie kleurverandering in die eierpakkies kan moontlik aan koperopname toegeskryf word. Uit Figuur 18 is dit duidelik dat hierdie embrio's nie ontwikkel het nie. Geen slakkies het tydens die 10 dae blootstelling by hierdie twee konsentrasies uitgebroei nie.

Die uitbroeipersentasie van kontrole *B. glabrata*-slakkies en eierpakkies wat aan 0,25 dpm; 0,5 dpm 1 dpm en 5 dpm blootgestel was, is onderskeidelik na 10 dae 57,8 %; 32,5 %; 8,1 %; 0% en 0 %. Hieruit is dit duidelik dat die uitbroeipersentasie na 10 dae blootstelling met die toename van die blootstellingskonsentrasie afgeneem het.



Figuur 16. Ontwikkeling van embrio's in eierpakkies en die uitbroeipersentasie van *B. glabrata*-slakkies wat vir 10 dae aan onderskeidelik a.) 0,25; b.) 0,5; c.) 1 en 5 dpm kopersulfaat blootgestel is, asook 'n kontrole (e).



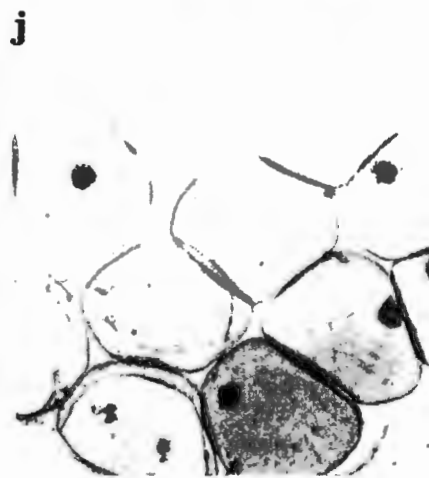
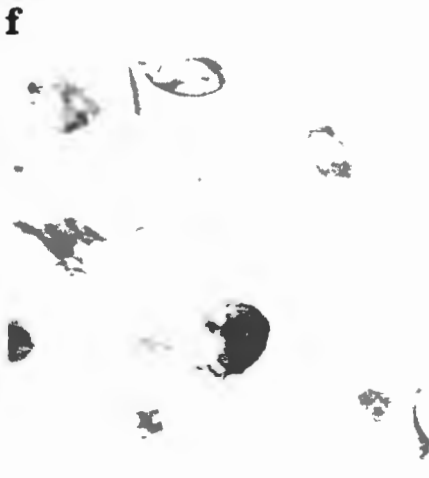
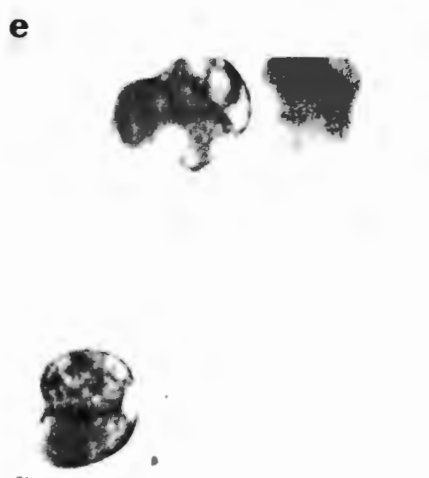
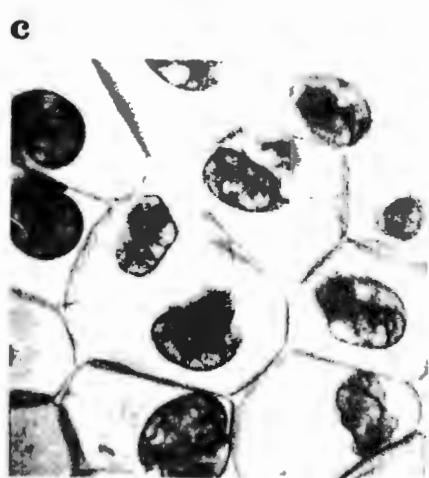
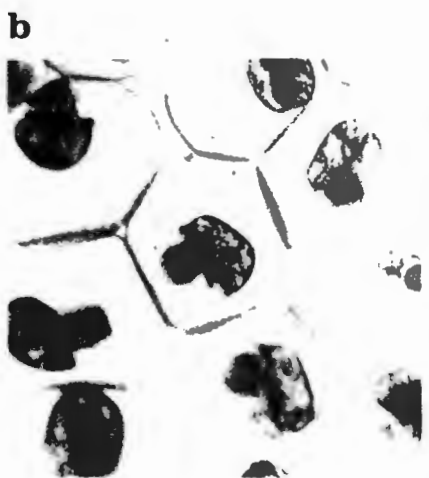
Figuur 17. Ontwikkeling van embrio's in eierpakkies en die uitbroeipersentasie van *L. natalensis* slakkies wat vir 10 dae aan onderskeidelik a.) 0,25; b.) 0,5; c.) 1 en 5 dpm kopersulfaat blootgestel is, asook 'n kontrole (e).

In teenstelling met die resultate van *B. glabrata* waar gevind is dat slakkies na 6 dae uitgebroei het, het die kontrole slakkies van *L. natalensis* eers na 8 dae begin uitbroei. Eierpakkies wat aan die onderskeie kopermediums blootgestel is, het glad nie uitgebroei nie. Uit Figuur 19 is dit duidelik dat die embryo's van *L. natalensis* nie tydens blootstelling ontwikkel het nie.

Figure 16 en 17 word die aantal ontwikkelende embryo's in eierpakkies en die uitbroeipersentasie van onderskeidelik *B. glabrata* en *L. natalensis* weergegee. Uit hierdie figure is dit duidelik dat die aantal ontwikkelende embryo's tydens die eerste 4 dae van blootstelling afgeneem het. Verder is dit uit dié figure duidelik dat die afname in die aantal ontwikkelende embryo's oor hierdie periode nie met die verhoging in die uitbroeipersentasie gepaard gaan nie, aangesien geen slakkies by beide spesies na 4 dae uitgebroei het nie. Die opvallende afname van die aantal ontwikkelende embryo's by *B. glabrata* en *L. natalensis* is moontlik toe te skryf aan die beskadiging daarvan tydens die verwydering uit slakbakke aangesien die eierpakkies afgeplat is en moeiliker was om te verwyder.

Uit resultate van die huidige studie wil dit dus voorkom asof die eierpakkies van *L. natalensis* meer sensitief vir koperblootstelling is as dié van *B. glabrata*. Hierdie bevinding word deur die resultate van toksisiteitstoetse (Hoofstuk 3), wat daarop dui dat volwasse slakke van *L. natalensis* meer sensitief vir koperblootstelling is as *B. glabrata* gesteun. Die afleiding hieruit moontlik is dus dat die volwasse slakke en eiers van *L. natalensis* in vergelyking met die ander drie slakspesies die gevoeligste vir koperblootstelling is.

Figuur 18. 'n Vergelyking van die ontwikkelende embrio's van *B. glabrata* van die kontrole-eierpakkies (a, b, e en h) na 1, 4, 8 en 10 dae in kopervrye boorgatwater. Eierpakkies wat aan 0,25 dpm (c, f en i) en 1 dpm (d, g en j) vir onderskeidelik 4, 8 en 10 dae blootgestel is.

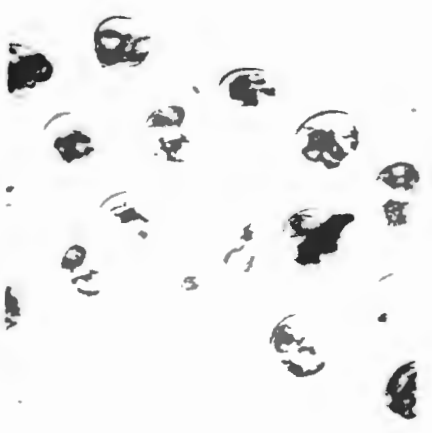


Figuur 19. 'n Vergelyking van die ontwikkelende embrio's van *L. natalensis* van die kontrole-eierpakkies (a, b, e en h) na onderskeidelik 1, 4, 8 en 10 dae in kopervrye boorgatwater. Eierpakkies wat aan 0,25 dpm (c, f en i) en 1 dpm (d, g en j) vir onderskeidelik 4, 8 en 10 dae blootgestel is.

a



b



c



d



e



f



g



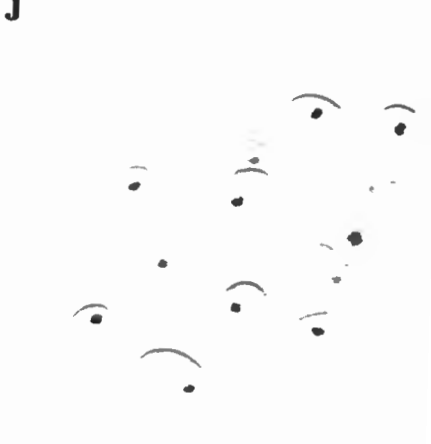
h



i



j



8. OPSOMMINGS

'n Vergelykende ondersoek na die invloed van kopersulfaat op vier geselekteerde varswaterslakspesies, naamlik *B. glabrata*, *H. duryi* (wat hemoglobien as bloedpigment besit) en *L. stagnalis* en *Lymnaea natalensis* (wat hemosianien as bloedpigment besit) is in die huidige studie gedoen.

Resultate van toksisiteit-, koperakkumulering- en kopervrystellingsondersoeke dui daarop dat koperblootstelling wel 'n nadelige invloed op al vier die geselekteerde varswaterslakspesies gehad het. Geen tendens kon tussen hemoglobiendraende en hemosianiendraende slakke gevind word nie.

Tydens die eksperimentele fase is LD₅₀-waardes vir al vier die slakspesies by geselekteerde blootstellingsperiodes nagegaan. Betreffende die sensitiwiteit vir koper tussen die twee hemosianiendraende spesies, kon geen korrelasie getref word nie. Die resultate hiervan het daarop gedui dat *L. natalensis* die grootste sensitiwiteit vir koperblootstelling getoon het.

Die akkumuleringsvermoë van koper in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe is na 2, 4, 6, 24 en 48 ure, van slakke wat aan 0,1 dpm blootgestel is, nagegaan. Daaruit is vasgestel dat koper wel, met uitsondering van enkele blootstellingsperiodes, in die sagtemateriaal van al vier die slakspesies geakkumuleer word. In teenstelling met die resultate van die sagtemateriaal, is daar wel 'n betekenisvolle toename in die koperkonsentrasie van die skulpe van *H. duryi* en *L. natalensis* gevind. Daarenteen is

daar by die skulpe van *B. glabrata* en *L. stagnalis* tydens blootstelling geen betekenisvolle verskil in vergelyking met die kontroles waargeneem nie. Resultate van die hemolimfkoperkonsentrasies dui daarop dat dit vir *B. glabrata* tydens die 48 ure blootstellingsperiode konstant afgeneem het. In teenstelling hiermee het die hemolimfkoperkonsentrasies vir *H. duryi* en *L. stagnalis* tydens dieselfde periode ten opsigte van die kontrole toegeneem. Die hemolimfkoperkonsentrasie van *L. natalensis*, het tydens die 6 ure blootstelling gefluktueer.

Bogenoemde resultate dui duidelik daarop dat daar geen tendens in die akkumuleringsvermoë in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van hemoglobien- en hemosianiendraende slakke waarneembaar was nie.

In 'n ondersoek om die vrystelling van opgeneemde koper na te gaan, is gevind dat die koperkonsentrasie van die aanvanklik kopervrye mediums waarin blootgestelde slakke vir 24 ure aangehou is, toegeneem het. Hierdie toename dui op die vrystelling van koper deur die slakke. Geen tendens tussen die vrystelling van koper deur slakke in die mediums en die afname van koper in die hemolimf, sagtemateriaal en skulpe van blootgestelde slakke is gevind nie.

Histologiese verandering in die epiteelweefsel is met behulp van transmissie-elektronmikroskopie ondersoek. Dit is gevind dat histologiese skade in die oppervlaktepiteel na blootstelling aan 'n 0,5 dpm kopersulfaatoplossing voorgekom het. Hierdie skade is as groot vloeistof gevulde ruimtes onder die basaalmembraan in die epiteel van al vier die spesies waargeneem.

Verder is die effek van koper op die eierproduksie van volwasse slakke voor en na blootstelling ondersoek. Die aantal eierpakkies wat deur die kontrole en blootgestelde slakke van die spesie *B. glabrata* en *L. natalensis* gelê is, het egter nie noemenswaardig verskil het nie.

'n Eksperiment om die embrio-ontwikkeling tydens blootstelling in eierpakkies te ondersoek, het getoon dat dit wel 'n effek op die embrio-ontwikkeling van *B. glabrata* en *L. natalensis* het. Hierdie effek was egter baie duideliker sigbaar ten opsigte van die eierpakkies van *L. natalensis* waar geen slakkies tydens koperblootstelling uitgebroei het nie. In teenstelling hiermee het *B. glabrata*-slakkies wat aan 0,25 dpm en 0,5 dpm blootgestel is na 6 dae uitgebroei.

In die geheel gesien kom dit voor asof *L. natalensis* die gevoeligste vir koperblootstelling is. Hierdie afleiding word ondersteun deur die bevindinge dat:

- * *L. natalensis* die laagste LD₅₀-waarde het.
- * Hierdie spesie waarskynlik nie oor dieselfde vermoë beskik om opgeneemde koper weer in dieselfde mate vry te stel nie.
- * Die gevoeligheid van volwasse slakke vir koper ook deur embrio-ontwikkeling weerspieël word.

9. BEDANKINGS

My opregte waardering teenoor die volgende persone en instansies:

- * Dr. C.T. Wolmarans (studieleier) vir sy leiding tydens die studie,**
- * Prof. K.N. de Kock (hulpstudieleier) vir advies en taalversorging,**
- * Wilna Pretorius en Dr. L.R. Tiedt van die Laboratorium vir Elektronmikroskopie vir die gebruik van die TEM,**
- * Riana Kriel vir hulp met die versorging van die verhandeling,**
- * Casper Geldenhuys vir die neem en ontwikkel van foto's,**
- * Personeel en studente van die Departement Dierkunde,**
- * SNO en PU vir CHO vir finansiële steun,**
- * Familie en vriende.**

10. LITERATUURVERWYSINGS

BOYDEN, C.R. 1974. Trace element content and body size in molluscs. *Nature*, 251: 311-314.

*CAPAR, S.G. 1977. Atomic absorption spectrophotometric determination of Pb, Cd, Zn and Cu in clams and oysters. *Collaborative Study Journal of the AOAC*, 60(6): 54-66.

*CHANDLER, A.C. 1920. Control of liver fluke diseases by destruction of the intermediate host. *Journal of Agricultural Research*, 20: 193-208.

CHENG, T.C. 1974. *Molluscicides in Schistosomiasis Control*. New York en Londen: Academic Press, Inc. 266 p.

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: Pulmonate). *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*. New York en Londen: 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.
- *DAVENPORT, J. 1977. A study of the effects of Cu applied continuously and discontinuously to specimens of *Mytilus edulis* L exposed to study and fluctuating salinity levels. *Journal of the Marine Biological Assotiation of the United Kingdom*, 12: 63-74.
- *DE AZEVEDO, J.F., CARVAO GOMES, F.A., BAPTISTA, A.M. & GIL, F.B. 1957. Studies on the molluscicide action of copper sulphate using ⁶⁴ Cu. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 8: 457-464.
- *DE JORGE, F.B., CINTRA, A.B., HAESER, 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. & 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: 1-9.
- DUNCAN, J. 1974. A review of the development and application of molluscicides in Schistosomiasis control. (In Cheng, T.C., red. *Molluscicides in Schistosomiasis Control*. New York en Londen: Academic Press, Inc. p. 9-24.)

EWING, M.S., EWING, S.A. & ZIMMER, M.A. 1982. Sublethal copper stress and susceptibility of channel catfish to experimental infections with *Ichthyophthirius multifiliis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 28(6): 674-681.

*FRANSEN, F. & MADSEN, H. 1979. A review of *Helisoma duryi* in biological control. *Acta Tropica*, 36: 67-84.

*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. Detoxification 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.

GUPTA, P.K., KHANGAROT, B.S. & DURVE, V.S. 1981. The temperature dependence of the acute toxicity of copper to a freshwater pond snail, *Viviparus bengalensis* L. *Hydrobiologia*, 83: 461-464.

***HARRY, H.W. & ALDRICH, D.V. 1963. The distress syndrome in *Taphius glabratus* (Say) as a reaction to toxic concentrations of inorganic ions. *Malacologia*, 1(2): 283-289.**

HELLAWELL, J.M. 1989. Biological indicators of freshwater pollution and environmental management. Londen en New York: Elsevier Applied Science. 507 p.

***IRELAND, M.P. & WOOTTON, R.J. 1977. Distribution of Pb, Zn, Cu and Mn 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.

JOUBERT, P.H. 1984. Die oorlewing van ses ekonomies belangrike varswaterslakspesies by uiterste temperature. Potchefstroom. p. 24-25 (Proefskrif (D.Sc.)- PU vir CHO.)

KELLY, M. 1991. Mining and the freshwater environment. Londen en New York: Elsevier Applied Science. 231 p.

KHANGAROT, B.S. & RAY, P.K. 1987. Zinc sensitivity of a freshwater snail, *Lymnaea luteola* L., in relation to seasonal variations in temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1): 45-49.

KHANGAROT, B.S. & RAY, P.K. 1988. Sensitivity of freshwater Pulmonate snails, *Lymnaea luteola* L., to heavy metals. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2): 208-213.

***KINSON, K. & BELCHER, C.B. 1961. Determination of minor amounts of copper in iron and steel by atomic absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 31: 180-183.**

LANG, W.H., FORWARD, R.B., MILLER, D.C. & MARCY, M. 1980. Acute toxicity and sublethal behavioral effects of copper on Barnacle Nauplii (*Balanus improvisus*). *Marine Biology*, 58: 139-145.

***LEVER, J. & BEKIUS, R. 1965. On the presence of an external hemal pore in *Lymnaea stagnalis* (L.). *Experientia*, 21: 1-4.**

LOPEZ-ARTIGUEZ, M., SORIA, M.L. & REPETTO, M. 1989. Heavy metals in bivalve molluscs in the Huelva estuary. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42(4): 634-642.

MALEK, E.A. 1974. A note on the use of copper compounds as molluscicides. (*In* Cheng, T.C., *red.* Molluscicides in Schistosomiasis Control. New York en Londen: Academic Press, Inc. p. 171-175.)

MAL REDDY, N. & VENKATESWARA RAO, P. 1987. Copper toxicity to the freshwater snail, *Lymnaea luteola*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 39(1): 50-55.

MIRENDA, R.J. 1986. Acute toxicity and accumulation of zinc in the crayfish, *Orconectes virilis* (Hagen). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 37(3): 387-394.

PAULINI, E. 1974. Copper molluscicides: Research and goals. (*In* Cheng, T.C., *red.* Molluscicides in Schistosomiasis Control. New York en Londen: Academic Press, Inc. p. 155-170.)

PHILLIPS, D.J.H. 1980. Quantitative aquatic biological indicators. Londen: Applied Science Publishers, Ltd. 488 p.

RYDER, T.A. & BOWEN, I.D. 1977a. The slug foot as a site of uptake of copper molluscicide. *Journal of Invertebrate Pathology*, 30: 381-386.

RYDER, T.A. & BOWEN, I.D. 1977b. The use of x-ray microanalysis to demonstrate the uptake of the molluscicide copper sulphate by slug eggs. *Histochemistry*, 52: 55-60.

***SCHIPP, R. & HEVERT, F. 1978. Distribution of Cu and Fe in some central organs of *Sepia officinalis* (Cephalopoda). A comparative study by flameless atomic absorption and electron microscopy. *Marine Biology*, 47: 391-399.**

SCHMIDT-NIELSEN, K. 1987. Animal physiology: Adaptation and environment. Cambridge: Cambridge University Press. 619 p.

***SPERLING, K. 1979. Determination of heavy metals in sea water and in marine organisms by flameless AAS. *Fresenius Zeitschrift fur Analytische Chemie*, 299: 103-107.**

SULLIVAN, J.T. & CHENG, T.C. 1975. Heavy metal toxicity of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata). *Annals of the New York academy of Science*, 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.

***TODD, W.J. 1986. Effects of specimen preparation on the apparent ultrastructure of microorganisms. (In Aldrich, H.C. & Todd, W.J., eds. Ultrastructure techniques for microorganisms. New York: Plenum Press. 87 p.**

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.

***WATLING, H.R. & WATLING, R.J. 1976. Trace metals in *Choromytilus meridionalis*. *Marine Pollution Bulletin*, 7(5): 91-94.**

WEBBE, G. 1974. Molluscicides in the control of Schistosomiasis. (In Cheng, T.C., red. Molluscicides in Schistosomiasis Control. New York en Londen: Academic Press, Inc. p. 41-50.)

***WILSON, J.G. & FRASER, E.C. 1977. Handbook of Teratology: General principals and etiology. New York: Plenum Press. vol 1.**

WOLMARANS, C.T. & VAN AARDT, W.J. 1985. Experimental evidence that copper is taken up by the freshwater snail *Bulinus tropicus* through a process of adsorption. *South African Journal of Zoology*, 20(4): 258-260.

WOLMARANS, C.T. & VAN AARDT, W.J. 1986. Uptake of copper by the haemolymph, shell and soft tissue of the snail *Bulinus tropicus*. *South African Journal of Science*, 82: 383-384.

WOLMARANS, C.T., VAN AARDT, W.J. & COETZEE, J. 1986. Histopathological effects of copper on selected epithelial tissues of snails. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 36(4): 906-911.

WOLMARANS, C.T. & YSSEL, E. 1988. Uptake and distribution of copper sulphate and its effect on the respiration rate of the hemocyanin-producing freshwater snail *Lymnaea natalensis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 41(2): 214-221.

*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.

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.