

Sellulêre biomerkerresponse as maatstaf van gevoeligheid van klipmossels (*Mollusca*) vir kadmiumbesoedeling

Cellular biomarker responses of limpets (Mollusca) as measure of sensitivity to cadmium contamination

A.J. REINECKE, W. SCHOEMAN EN

S.A. REINECKE

Departement Plant- en Dierkunde,

Universiteit van Stellenbosch,

Privaatsak X1, Matieland, 7602,

Suid-Afrika

ajr@sun.ac.za



Koot Reinecke

Werner Schoeman

Sophié Reinecke

AJ (KOOT) REINECKE is sedert 1992 professor in die Departement Plant- en Dierkunde aan die Universiteit van Stellenbosch waar hy ook verskeie jare as voorsitter gedien het en ook as dekaan van die Fakulteit Natuurwetenskappe waargeneem het. Hy het aan die Roodepoortse Hoërskool gematrikuleer. Hy het sy doktorsgraad aan die destydse Potchefstroomse Universiteit vir CHO behaal waar hy vanaf 1969 dosent was en ook vanaf 1986 tot 1991 professor en hoof van die Department Dierkunde. Hy het ook reeds as president van die Dierkundige Vereniging van Suidelike Afrika, die Gesamentlike Raad van Natuurwetenskaplike Verenigings en die Internasionale Grondierkundige Vereniging gedien. Hy dien ook op die redaksierade van verskeie vaktydskrifte en is tans lid van die Onderwysadvieskomitee van die Suid-Afrikaanse Raad van Natuurwetenskaplike Professions waar hy ook reeds vir 'n termyn as vise-president opgetree het. Hy het uitgebreide studieperiodes in die VSA, Duitsland en Nederland deurgebring waar hy navorsing gedoen het oor die invloed van chemiese besoedelstowwe op diere. Hy is outeur en mede-outeur van sowat 200 navorsingpublikasies waarvan die meerderheid in internasionale, ge-akrediteerde vaktydskrifte verskyn het. Hy is in 2007 met die Havengaprys vir die biologiese wetenskappe van die SA Akademie vir Wetenskap en Kuns bekroon. Hy het in 2008 op uitnodiging opgetree as lid van 'n evaluasiekommissie van navorsingsprogramme van die Nederlandse Wetenskaplike Organisasie in Den Haag. Hy het reeds studieleiding aan sowat veertig M- en D- studente gegee en is tans betrokke by vier PhD studies. Sy navorsing word gefinansier deur die Nasionale Navorsingstigting en die Universiteit van Stellenbosch.

AJ (KOOT) REINECKE has since 1992 held a professorship in the Department of Botany and Zoology at Stellenbosch University where he also served as chairman for several years and also acted as dean of the science faculty. He matriculated at Roodepoort High School and obtained his doctorate at the then Potchefstroom University for CHE where he became a lecturer in 1969 and later professor and head of the department from 1986 to 1991. He has also served as president of the Zoological Society of Southern Africa, the Joint Council of Scientific Societies and the International Soil Zoology Society. He serves on the editorial boards of several international and one national science journal and is currently a member of the Educational Advisory Committee of the South African Council for Scientific Professions where he also served a term as vice-president. He spent extended sabbaticals in the USA, Germany and The Netherlands researching the effects of chemical contaminants on animals. He is author or co-author of some 200 research papers, most of them published in international accredited scientific journals. He was awarded the prestigious Haviga Prize for the biological sciences by the SA Academy of Science and Arts in 2007. In 2008 he was invited to serve as a member of a program evaluation commission for the Netherlands research organization (NWO) in The Hague. He has supervised some forty M- and D-students and is currently involved with supervision of four doctoral studies. His research is financed by the National Research Foundation and the University of Stellenbosch.

WERNER SCHOEMAN is in 1981 in Pretoria gebore en het sy hoërskoolloopbaan onderskeidelik by Hoërskool Patriot op Witbank en Centurion Hoër voltooï. Hy het sy voorgraadse studies en honneursgraad in Dierkunde aan die destydse Universiteit van Port Elizabeth (tans die Nelson Mandela Metropolitaanse Universiteit) behaal. Daarna skryf hy in en behaal in 2006 die MSc graad in dierkunde aan die Universiteit van Stellenbosch met 'n tesis wat handel het oor die mariene ekotoksikologie. Hy het 'n besondere belangstelling in die mariene ekologie en die bewaring van mariene hulpbronne asook die ontwikkeling van mariene akwakultuur in Suid-Afrika. Gevolglik sluit hy na afloop van sy nagraadse studies aan by die maatskappy West Coast Abalone in St Helena Baai as Mariene Bioloog en Bestuurder van die onderneming se broeifasiliteite. Hy is ten nouste gemoeid met die ontwikkeling van die perlemoenbedryf in Suid-Afrika.

WERNER SCHOEMAN was born in 1981 in Pretoria and completed his high school education at High School Patriot in Witbank and Centurion High School respectively. He completed his undergraduate studies and his honours degree in Zoology at the former University of Port Elizabeth (currently the Nelson Mandela Metropolitan University). After enrolling at Stellenbosch University he obtained his masters degree in 1996 in Zoology with a thesis on marine ecotoxicology. He has a keen interest in marine ecology and conservation of marine resources as well as the development of marine aquaculture in South Africa. Consequently, after completion of his postgraduate studies, he joined the company West Coast Abalone in St Helena Bay as Marine Biologist and Manager of the hatchery. He is intimately involved with the development of the abalone industry in South Africa.

SOPHIÉ REINECKE is tans Uitvoerende Hoof in die Departement Plant- en Dierkunde aan die Universiteit van Stellenbosch waar sy sedert 1992 werksaam is en tans mede-professor is. Sy behaal haar honneursgraad in dierkunde, M.Sc. en doktorsgrade in Dierkunde (1987) aan die Randse Afrikaanse Universiteit nadat sy haar voorgraadse studies en eerste honneursgraad in Plantkunde aan die destydse Potchefstroomse Universiteit vir CHO behaal het. Vir haar meestersgraad het sy die S2A3 en Junior Kaptein Scott medaljes ontvang. Gedurende haar jare as senior lektor aan die PU vir CHO verwerf sy die universiteitstoekening vir voortreflike onderrig. Sy was verskeie jare raadslid en sekretaris van die Dierkundige Vereniging van Suidelike Afrika. Haar navorsingsbelangstelling is in die ekotoksikologie en behels die invloed van chemiese besoedelstowwe op diere, met besondere klem op die biochemiese, molekuleêre en sellulêre biomarkerresponse by ongewerweldes. Sy het reeds as studieleier van 19 MSc- en 7 PhD-studente opgetree en lei tans vier doktorsgraadstudente in ekotoksikologie. Sy is outeur en mede-outeur van sowat 80 publikasies in ge-akkrediteerde vaktydskrifte. Sy het ook reeds meer as 75 bydraes by internasionale konferensies in verskeie lande gelewer. Haar navorsing word gefinansier deur die Nasionale Navorsingstigting, die Universiteit van Stellenbosch en sy het onlangs toekennings van die Nederlandse Nasionale Wetenskapstigting (NWO) ontvang om vir drie maande aan die Vrije Universiteit in Amsterdam navorsing te doen asook befondsing van die Nasionale Noorweegse Navorsingsinstansie vir 'n navorsingsbesoek aan die Universiteit van Oslo. Sy het ook uitgebreide navorsingsbesoeke aan Frankryk gebring.

SOPHIÉ REINECKE is currently executive head of the Department of Botany and Zoology at Stellenbosch University where she has been working since 1992. She currently holds an associate-professorship. She obtained her honours, masters and PhD degrees in Zoology at the former Rand Afrikaans University after completing her undergraduate degree and a honours degree in Botany at the former Potchefstroom University for CHE. For her masters degree she was awarded with both the S2A3 and Junior Captain Scott medals. During her time as senior lecturer at Potchefstroom University she received the university award for teaching excellence. She served for several years as council member and secretary of the Zoological Society of Southern Africa. Her research interests are in the ecotoxicology, focusing on the influence of chemical contaminants on animals, with emphasis on biochemical, molecular and cellular biomarker responses in invertebrates. She has acted as supervisor or co-supervisor of 19 MSc and 7 PhD students and currently supervises four doctoral students. She is author and co-author of some 80 research publications in accredited journals. She has presented some 75 contributions to international scientific conferences in several countries. Her research is financed by the National Research Foundation, the University of Stellenbosch and she has recently received awards from the Netherlands research organization (NWO) to conduct research for three months at the Vrije Universiteit in Amsterdam as well as funding from the Norwegian national research organization for a research visit to the University of Oslo. She has also undertaken extended research visits to France.

ABSTRACT**Cellular biomarker responses of limpets (*Mollusca*) as measure of sensitivity to cadmium contamination**

Due to the availability and chemical nature of some heavy metals, sub-lethal toxicant levels may persist in the ocean waters and may cause physiological problems and toxicity in invertebrates and other marine organisms. Although studies of metal concentrations in False Bay showed relatively low mean concentrations of Cd, invertebrates such as molluscs, crustaceans and many other groups are able to accumulate high levels of heavy metals in their tissues and still survive in the heaviest polluted areas. They can accumulate numerous pollutants from natural waters in quantities that are many orders of magnitude higher than background levels. Bioaccumulation of cadmium in intertidal species could cause stress which may be measurable at the cellular level. A variety of limpet species that may serve as suitable ecotoxicological monitoring species occur in abundance on rocky shores along the South African coastline. The aim of this study was to obtain sensitivity data which could contribute to the selection of a suitable monitoring species and the eventual establishment of a species sensitivity distribution model (SSD) with a biomarker response as endpoint. The limpets *Cymbula oculus*, *Scutellastra longicosta*, *Cymbula granatina* and *Scutellastra granularis* as well as water samples were collected at two localities in False Bay, South Africa. Analysis of water and biological samples were done by atomic absorption spectrometry. Exposures were done to three different sublethal concentrations of cadmium in the laboratory in static flow tanks over three days. There was a moderate increase in cadmium body concentrations over time. Results obtained at three exposure concentrations showed no significant differences in metal concentrations between the different *C. oculus* samples. Significant differences were obtained between the control and the exposure groups for each exposure time except between the control and the 1mg/L CdCl₂ exposure group after 24 and 72 hours of exposure. Cd body concentrations (soft tissue) varied between 4.56 and 21.41µg/g (wet mass).

Mean Cd concentrations in soft tissue of *S. longicosta* was considerably lower (varying between 1.18 and 19.58 µg/g Cd) than in the tissues of *C. oculus*. The control group differed significantly from the 0.8 and 1 mg/L CdCl₂ exposures after 48 and 72 hours.

Mean Cd body concentrations in *S. granularis* were the highest of all exposed species, reaching a level of 148 µg/g Cd at the highest exposure concentration and differed significantly from the means of the other samples of the 0.8 mg/L CdCl₂ exposure group after 72 hours and from the 1 mg/L CdCl₂ group after 24 hours. Significant differences were also obtained between the Cd body concentrations of *C. granatina* for the three exposure concentrations and three exposure times.

Lysosomal membrane integrity was determined for both exposed and control animals, using the neutral red retention assay. Three of the four species showed a significant decrease in retention times with an increase in Cd concentration. Inter-species differences in sensitivity to environmentally relevant cadmium concentrations were reflected in the biomarker responses. Based on reduction of NRR times, the order of relative sensitivity to cadmium was *S. granularis* > *C. oculus* > *S. longicosta* > *C. granatina*.

KEYWORDS: Limpets, NRRT (neutral red retention time), biomarker, metal bioaccumulation, Cd

TREFWOORDE: Klipmossels, NRRT (neutraalrooi retensietyd), biomerker, metaal bioakkumulاسie, Cd

OPSOMMING

Die bioakkumulering van kadmium in tussengety spesies kan stres veroorsaak wat op sellulêre vlak meetbaar is. Verskeie klipmosselspesies kom volop op rotse aan die Suid-Afrikaanse kuslyn voor en kan moontlik vir ekotoksikologiese monitering gebruik word. Die oogmerk van die studie was om sensitiviteitsdata te verkry wat kan bydrae tot die kies van 'n geskikte spesie vir monitering en die uiteindelige daarstelling van 'n model vir spesie sensitiviteitsverspreiding (SSV) wat 'n biomerkerrespons as eindpunt gebruik. Die klipmossels *Cymbula oculus*, *Scutellastra longicosta*, *Cymbula granatina* en *Scutellastra granularis* en watermonsters is in Valsbaai versamel. Analises van kadmium in water en biologiese monsters is met behulp van atoomabsorpsiespektrofotometrie uitgevoer. Blootstellings van organismes aan subletale vlakke van kadmium is uitgevoer in statiese vloeiende oor 'n periode van drie dae. Daar was 'n matige toename in liggaamskonsentrasies van kadmium oor tyd. Resultate wat by drie blootstellingskonsentrasies gekry is, het geen betekenisvolle verskille in metaalkonsentrasies tussen die verskillende *C. oculus* monsters uitgewys nie. Betekenisvolle verskille tussen die kontrole en die blootstellingsgroepe vir elke individuele blootstellingstyd is vir die spesie verkry behalwe tussen die kontrole en die 1 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep na 24 en 72 uur van blootstelling. Cd liggaamskonsentrasies (sagteweefsel) het tussen 4.56 en 21.41 µg/g (nat massa) gevarieer.

Gemiddelde Cd konsentrasies in sagteweefsel van *S. longicosta* was aansienlik laer (variërend tussen 1.18 en 19.58 µg/g Cd) as in weefsel van *C. oculus*. Die kontrolegroep van hierdie spesie het betekenisvol verskil van die 0.8 en 1 mg/L CdCl₂ blootstellings na 48 en 72 uur.

Gemiddelde Cd liggaamskonsentrasies in *S. granularis* was die hoogste van al die blootgestelde spesies en het 'n vlak van 148 µg/g Cd by die hoogste blootstellingskonsentrasie bereik en het betekenisvol verskil van die ander monsters se gemiddeldes met die uitsondering van die 0.8 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep by 72 uur en die 1 mg/L CdCl₂ groep by 24 uur. Betekenisvolle verskille is ook verkry vir die liggaamskonsentrasies van Cd van *C. granatina* tussen die drie verskillende blootstellingskonsentrasies en drie blootstellingstye.

Integriteit van lisosoommembrane is bepaal met behulp van die neutraalrooi retensiemetode. Drie van die vier spesies het 'n betekenisvolle afname in retensietye getoon met 'n toename in Cd konsentrasie. Tussenspesieverskille in gevoeligheid vir omgewingsrelevante kadmium-konsentrasies is deur die biomerkerresponse uitgewys. Gebaseer op die verlaging in NRR tye, is die volgorde van relatiewe gevoeligheid vir kadmium as volg: *S. granularis* > *C. oculus* > *S. longicosta* > *C. granatina*.

INLEIDING

Klipmossels kom besonder algemeen voor aan die Suid-Afrikaanse rotskusstreke en word verteenwoordig deur 'n ryke verskeidenheid van spesies.¹ Hulle teenwoordigheid op verskillende vlakke in die tussengetygebied maak hulle geredelik toeganklik om as moontlike moniterings-organismes van die kusstreke te dien. Alhoewel hulle nie sessiel is soos mossels nie, beweeg hulle nie oor groot afstande nie en is dus redelik verteenwoordigend van die omgewing waarin hulle gevind word. Daarbenewens verteenwoordig hulle 'n ander nis as die filtervoedende mossels omdat hulle afhanklik is van voedsel wat van die rotsoppervlaktes verkry word. Invertebrate, soos verteenwoordigers van die Mollusca, Crustacea en ander groepe, is in staat om hoë vlakke van swaarmetale in hulle liggaamsweefsel te akkumuleer en nogtans te oorleef in swaar besoedelde omgewings.² Hulle kan verskeie besoedelstowwe vanuit natuurlike waters ophoop in hoeveelhede wat verskeie orde groottes hoër is as die agtergrondvlakke.^{3,4,5} Klipmossels word beskou as selfs meer doeltreffende akkumuleerders van kadmium as die filtervoedende mossels volgens Nakhle et

al.⁶ en is daarom van moontlike waarde om as geskikte biomonteerders van kuswaters in die tussengegebiede gebruik te word.

Verskeie akwatiese invertebrate het ook reeds getoon dat daar interspesieverskille en inter-individuele variasie bestaan soverre dit die toksisiteit en bioakkumulering van metale^{7,8} betref. Akwatiese molluske (veral tweekleppiges) is in staat om Zn te reguleer sodat weefselkonsentrasies grootliks onafhanklik is van die duur en omvang van blootstellingskonsentrasies, mits dit binne redelike lae vlakke bly. Dit is in teenstelling met nie-essensiële metale soos kadmium.^{9,10} Kadmium (Cd) is een van die belangrikste giftige metale in industriële uitlate en word in beide die Environmental Protection Agency (EPA) van die Verenigde State van Amerika en die Europese Gemeenskap se prioriteitslyste van besoedelstowwe ingesluit. Kadmium is 'n nie-essensiële metaal met 'n wye verspreiding en is besonder toksies en volgens Morgan en Morris¹¹ akkumulerend in organismes. Dit word as 'n Groep 1 menslike karsinogeen geklassifiseer¹² en is ook karsinogien vir sekere diere.¹³ Daar is toenemende kommer omdat omgewingsvlakke van die metaal steeds toeneem as gevolg van voortgesette antropogeniese mobilisasie¹⁴ en vrylating. Dit is 'n besoedelstof met 'n wye omvang van ekologiese en fisiologiese effekte. Hoewel nie buitengewoon hoog in vergelyking met ander gebiede nie, is betekenisvolle vlakke van kadmiumbesoedeling wel in Valsbaai, Suid-Afrika gerapporteer^{15,16} maar die moontlike uitwerking daarvan op die mariene dierebevolking in hierdie baai is nie bekend nie. As gevolg van die beskikbaarheid en chemiese aard van die metaal, kan subletale toksiese vlakke in seewater voorkom wat fisiologiese probleme en toksisiteit by invertebrate en ander mariene organismes tot gevolg kan hê.

Dit is waarskynlik moontlik om biomerkerresponse van hierdie spesies te gebruik om verskille in hulle gevoelighede te evalueer asook die omvang van die toksiese stres wat op hulle uitgeoefen word deur die teenwoordigheid van 'n besoedelstof. Biomerkers het die potensiaal om effekte van subletale blootstelling asook subcellulêre effekte van xenobiotiese stowwe in individue uit te wys voordat effekte op die bevolkings- of gemeenskapsvlak waarneembaar is¹⁷ al is dit moeilik om 'n oorsaaklike verband direk af te lei. Dit mag wel nie 'n antwoord bied van wat die geheel-effek van die besoedelstof op bevolkingsvlak is nie, maar kan tog 'n aanduiding gee dat blootstelling aan die besoedelstof wel plaasgevind het en dat die diere onder stres verkeer. Die mees prominente veranderinge sal noodwendig vroeg op sellulêre vlak aanwesig wees en indien dit waarneembaar en meetbaar is, kan dit 'n aanduiding bied van verskille in gevoelighede. Dit kan dus nuttig wees indien dit meetbaar is as biomerkerresponse wat die veranderinge in die fragiliteit van selmembrane kan kwantifiseer¹⁸ of deur vasstelling van biochemiese meganismes waarby metallothioniene (MTs)¹⁹ en asetielcholinesterase (AChE) aktiwiteit²⁰ en veranderinge in energie allokasie²¹ betrokke is.

Die biemerker wat vir hierdie studie gekies is, is die neutraalrooi retensie-evaluering wat lisosoommembrane se stabiliteit meet en is een van dié wat aanbeveel word deur UNEP/MAP²² vir die monitering van biologiese effekte in die Middellandse See. Lisosomale veranderinge in die selle van molluske is reeds as algemene merkers van besoedelstof-geïnduseerde stres in verskeie laboratorium-^{23, 24} en veldstudies^{25, 26} gebruik. Hierdie metode is reeds besonder suksesvol op verskeie ander invertebrate aangewend.^{27, 28, 29}

Die doel van hierdie studie was om die gevoelighede van verskillende klipmosselspesies vir kadmium te vergelyk deur die meting van sellulêre response met behulp van die neutraalrooi retensie metode. Die oogmerk was om by te dra tot die generering van inligting oor spesies se relatiewe sensitiwiteite wat uiteindelik aangewend sou kon word vir die daarstelling van 'n spesie sensitiwiteitsverspreidingsmodel (SSV).^{30, 31,32} Die gevoelighede van die verskillende spesies is verkry deur gebruik te maak van hierdie biemerker wat die vermoë of kapasiteit meet van lisosome om die kationiese neutraalrooi vitale kleurstof op te neem en oor tyd te behou. Dit dien as aanduiding van die skade aan die lisosoommembran as gevolg van die teenwoordigheid van die

metaalbesoedeling.¹⁸ Die verwagting was dat die verskillende dosis-verwante response van elke spesie na blootstelling aan Cd dit moontlik mag maak om die spesies se individuele gevoelighede te onderskei.

2. MATERIAAL EN METODEDES

2.1 Versameling van diere

Eksemplare is versamel by twee lokaliteite nl. Gordonsbaai (34° 10 '0S, 18° 52 '0E) en Rooiels (34° 17 '60 S, 18° 49 '0 E) in Valsbaai, Suid-Afrika. By eersgenoemde lokaliteit is die enigste twee spesies wat voorgekom het, nl. *Cymbula oculus* en *Scutellastra longicosta* versamel. Hulle was albei baie volop. By Rooiels het 'n groter verskeidenheid van genera voorgekom en daar is eksemplare van *Scutellastra granularis* en *Cymbula granatina* versamel.

Versamelings is met die nodige permitte gedurende die periode Junie 2004 tot September 2005 tydens laagwater gedoen toe die rotskus blootgelê is. 'n Totaal van 62 individue van elk van die vier spesies is versamel vir elk van drie blootstellingskonsentrasies en 'n negatiewe kontrole. Ongeveer ewe groot eksemplare (volgens skulplengte) van dieselfde spesie is met behulp van 'n plat spatel van die rotse afgehaal deur die lem versigtig onder die skulp in te druk ten einde die dier van die rots los te woel. Die versamelde klipmossels is in 'n 20-L plastiek emmer met seewater van dieselfde lokaliteit geplaas en na die laboratorium vervoer vir eksperimentele blootstelling.

2.2 Eksperimentele ontwerp

Laboratoriumblootstellings is vir drie dae uitgevoer by drie verskillende konsentrasies van CdCl₂ vir elk van die vier spesies om hulle gevoeligheid vir Cd te bepaal. Twee eksemplare van elke spesie is ewekansig uit die versamelde klipmosselseksemplare geneem en gevries vir latere chemiese ontleding van die Cd inhoud nadat daar geleentheid gebied is oor 24 uur vir lediging van spysverteringskanale in aanhouding. Elk van die drie blootstellingskonsentrasies vir elk van die vier spesies is in samehang met 'n negatiewe kontrole uitgevoer. Twee 50-L glas akwariums met 40 liter seewater en deurlopende suurstofborreling is gebruik om die klipmossels aan te hou. Die akwariums is met 'n Perspex plaat bedek om verdamping tot 'n minimum te beperk. Dertig klipmossels vanuit die twee akwariums is as respektiewelik blootstellings- en kontrolegroepe gebruik. Die individue is ewekansig geselekteer uit die versamelde eksemplare en op Perspex plate geplaas. Die plate het gedien as vashegtingsoppervlakke vir die klipmossels. Die plate is horisontaal in die akwariums, bo-op vier glasbekers geplaas. Onder die bекers is filters geplaas om die diere te skei van die bodems van die akwariums en van enige faeces wat op die bodem kon versamel. Die Perspex plate het verhoed dat die diere na bo en uit die water beweeg of afwaarts, na die bodem wat afvalstowwe kon bevat. Die akwariums is in 'n klimaatbeheerde kamer gehou waar 'n temperatuur van 20 ± 1 °C gehandhaaf is.

Al die blootstellingsakwariums het seewater bevat wat versamel is by een enkele lokaliteit in Gordonsbaai wat, vir die doel van hierdie ondersoek, as "skoon" beskou is omdat die Cd konsentrasie tydens voorloperstudies baie laag bevind is in vergelyking met ander lokaliteite.¹⁶ Die klipmossels is vir twee dae in die akwariums gelaat voordat die blootstellings begin het. Dit het aan hulle die geleentheid gebied om spysverteringskanaalinhoude, wat moontlik 'n invloed sou kon hê op die heelliggaam analyses van Cd, te ledig.³³ Die blootstellingsdosisse wat gebruik is in die eksperimente was 0,8, 1, en 1,2 mg / L CdCl₂ respektiewelik. Hierdie konsentrasies is reeds voorheen bepaal as subletaal vir die tweekleppige *Donacilla cornea* deur Regoli et al.³⁴ en val ook

gerieflik binne die omvang van kadmiumkonsentrasies (0.69 – 31.67 µg/g droë massa) wat deur Mdzeke¹⁶ in lewende *C. oculus* in Valsbaai gevind is. Nadat 'n periode van 48 uur toegelaat is vir lediging van die spysverteringskanale, is die blootstellings uitgevoer vir periodes van 24, 48 en 72 uur. Aan die einde van elke blootstellingsperiode is tien eksemplare van elke blootstellingsgroep en die kontrole ewekansig geselekteer en hulle neutraalrooi retensietye (NRR) bepaal. Daarna is hulle gevries by –20 °C vir latere Cd analise. Die sistematiese monsterring van die negatiewe kontrole tesame met die verskillende blootstellingsgroepe tydens elke blootstellingstyd het bevestig dat minimale variasie in die gemiddelde NRR waardes van die negatiewe kontrole met die verloop van die drie dae van blootstelling plaasgevind het by al vier spesies.

2.3 Evaluering van neutraal rooi retensie (NRR)

Die neutraalrooi retensie evaluering (NRR) is gebruik om die relatiewe gevoelighede van die spesies vir Cd te assessee. Die metode meet kontaminant-geïnduseerde skade aan lisosoommembrane^{29, 27, 18} en is uitgevoer op selle wat in die hemolimf van die klipmossels voorgekom het. Hiervoor is hemosiete versamel met behulp van 'n indringetegnisk wat deur Lowe et al.¹⁸ beskryf is. Dit het die insteek behels van 'n fynpunt spuitnaald (wat fisiologiese Ringervloeistof vir molluske bevat)¹⁶ in die voetspier van die klipmossel ten einde hemolimf uit die eksemplaar te trek. Die tegniek is geskik vir versameling van lewende (lewensvatbaarheid 85%) onbeskadigde klipmossel- of slak hemosiete.^{35, 16} Om die NRR te bepaal, is versamelde hemosiete op 'n mikroskoopplaatjie geplaas en met neutraalrooi oplossing gekleur en vir 2 minute geskandeer deur verskeie waarnemingsvelde ewekansig te kies en die getal ongekleurde selle en selle met gekleurde sitosol (wat verlies van kleustof vertoon vanaf die lisosom na die sitosol) te tel. Waarnemings is gestaak sodra die getal gekleurde selle 50% van die totaal oortref het. Die tyd is as die retensietyd aangeteken. Neutraalrooi retensietyd is vir tien klipmossels by elke blootstellingstyd en blootstellingskonsentrasie sowel as die kontrole bepaal. Twee replikaatmetings is uitgevoer op elke klipmossel in 'n poging om die rol van individuele variasie en subjektiewe meting te beperk.

2.4 Swaarmetaal analyses

Die swaarmetaal analyses is spektrofotometries uitgevoer. Die metode van monstervoorbereiding en suurekstraksie is deur Katz en Jenniss³⁶ beskryf. Die gevriesde eksemplare is ontdooi en die sagteweefsel is van die skulpe geskei en met suur verteer. Die Cd analise is met 'n atoomabsorpsie-spektrofotometer (Varian AA – 1275), met 'n asetileen-lug vlam uitgevoer. Standaard van 1, 5, en 10 mg/L Cd is gebruik vir die analise en die ekstraksiedoeltreffendheid was ten minste 80% of hoër, soos beoordeel teen die oorspronklike konsentrasie van die verteerde toetsmonsters.

2.5 Water versameling

Water is op 0.5m benede die oppervlak by elke lokaliteit versamel tydens elke besoek. Dit is gedoen met 'n 1L poli-etileen houer wat dig geseël is en na die laboratorium vervoer is en gevries is, in afwagting van die swaarmetaal analise. Water is ook by die “skoon” lokaliteit in Gordonsbaai versamel en gebruik in die kontrolebakke sowel as in die blootstellingseksperimente in die laboratorium.

2.6 Statistiese analyses

Betekenisvolheid van verskille in retensietyd en swaarmetaal konsentrasies tussen spesies en tussen blootstellingstye is bepaal deur gebruik te maak van variansie-analise (ANOVA). Waar wisselwerkings te kompleks was om met eenrigting ANOVA's te bepaal en die oorblywendes nie-normaal was nie is 'n Bootstrap-analise gedoen met 95% Bootstrap betroubaarheidsintervalle.

Hierdie analises is gedoen deur 'n STATISTICA 7.0 sagtewarepakket (StatSoft Inc, Tulsa, OK, USA). Probit analise is gebruik en dosis-respons krommes is getrek om die gevoelighede van die verskillende Patellidae spesies vir Cd te bepaal. Hieruit is effektiewe konsentrasies vir 50% van die toetsbevolking (EC_{50} waardes) bepaal vir al vier spesies by elk van die drie verskillende blootstellingstye.

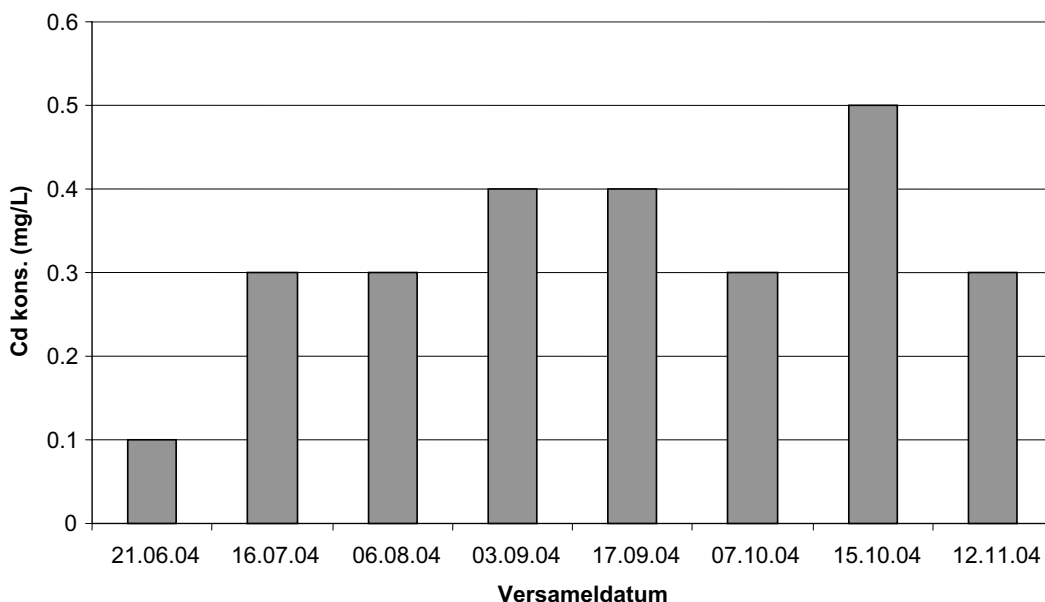
3. RESULTATE

3.1 Cd konsentrasies in seewater

Swaarmetaal analises van die seewatermonsters van elke versamelgeleentheid by beide lokaliteite het variërende Cd konsentrasies oor die tydperk getoon. Vanaf Junie 2004 tot September 2005 het die konsentrasie-omvang gewissel tussen 0.1 en 0.5 mg/L Cd (Figure 1 en 2). Eenrigting ANOVA, Bootstrap-analise en Mann-Whitney se U Toets het geen betekenisvolle verskille ($p > 0.05$) tussen die lokaliteite getoon nie. Omdat slegs een monster per versamelgeleentheid vir Cd geanaliseer is, was statistiese ontledings om vas te stel hoe betekenisvol verskille tussen versameltye was, nie moontlik nie.

3.2 Kadmium konsentrasies in eksperimentele diere.

Vergelyking van die resultate wat by al drie blootstellingskonsentrasies gekry is dmv 2-riktig ANOVA het geen betekenisvolle verskille ($p > 0.05$) in metaalkonsentrasies tussen die verskillende *C. oculus* monsters uitgewys nie. Vir hierdie spesie het Bootstrap-analise betekenisvolle verskille tussen die kontrole en die blootstellingsgroepe vir elke individuele blootstellingstyd aangedui ($p < 0.05$, Bootstrap gekorrigeerde waarde) behalwe tussen die kontrole en die 1mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep by 24 en 72 uur van blootstelling. Cd liggaamskonsentrasies (sagteweefsel)

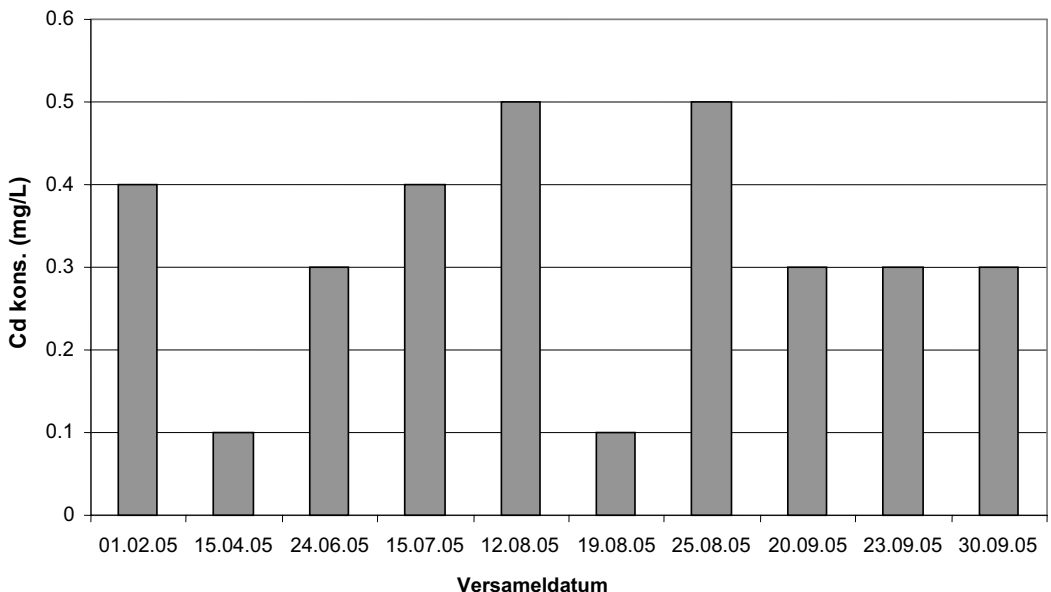


Figuur 1: Cd konsentrasies (mg/L) in seewater. Monsters is op verskillende tye by die Gordonsbaai lokaliteit in Valsbaai geneem

het tussen 4.56 en 21.41 µg/g (nat massa) gevarieer in blootstellingsgroepe oor die drie dae van blootstelling (Tabel 1).

Gemiddelde Cd konsentrasies in sagteweefsel van *S. longicosta* was aansienlik laer (variërend tussen 1.18 en 19.58 µg/g Cd) (Tabel 1) as in weefsel van *C. oculus*. Hoewel ANOVA aangedui het dat daar nie betekenisvolle verskille tussen blootstellingstye en en blootstellingskonsentrasie as veranderlikes was nie, is betekenisvolle individuele verskille ($p < 0.05$, Bootstrap gekorrigeer) wel aangetoon. 'n Bonferroni toets het hierdie individuele verskille tussen die gemiddelde Cd konsentrasies bevestig. Die kontrolegroep van hierdie spesie het betekenisvol verskil ($p < 0.05$, Bootstrap gekorrigeer) van die 0.8 en 1 mg/L CdCl₂ blootstellings by 48 en 72 uur maar nie by 24 uur van blootstelling nie. Gemiddelde Cd liggaamskonsentrasies in die 1.2 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep by 24 en 48 ure van blootstelling het betekenisvol verskil ($p < 0.05$, Bootstrap gekorrigeer) van die 0.8 en 1 mg/L CdCl₂ blootstellings by dieselfde blootstellingstye, maar het nie verskil by die 72 uur blootstelling nie.

Gemiddelde Cd liggaamskonsentrasies in *S. granularis* was die hoogste van al die blootgestelde spesies en het 'n vlak van 148 µg/g Cd by die hoogste blootstellingskonsentrasie bereik (Tabel 1 en Figuur 3). Hierdie gemiddelde vlak het betekenisvol verskil ($p < 0.05$) van al die ander monsters se gemiddeldes met die uitsondering van die 0.8 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep by 72 uur en die 1 mg/L CdCl₂ groep by 24 uur. Die kontrolegroep van die spesie het 'n hoë agtergrondkonsentrasie van Cd in die liggame gehad in vergelyking met die kontrole-organismes van die ander spesies (Tabel 1). Twee-riktig ANOVA het betekenisvolle verskille ($p < 0.01$) uitgewys tussen die blootstellingskonsentrasies en blootstellingstye. Betekenisvolle verskille is ook verkry vir die liggaamskonsentrasies van Cd van *C. granatina* tussen die drie verskillende blootstellingskonsentrasies en drie blootstellingstye ($p > 0.05$). Wat *C. granatina* betref, was daar in geheel gesien, geen betekenisvolle toename ($p > 0.05$, Bonferroni toets) in Cd liggaamskonsentrasie vir al die blootstellingskonsentrasies vanaf 24 tot 48 uur van blootstelling nie (Tabel 1).



Figuur 2: Cd konsentrasie (mg/L) in seewater. Monsters is op verskillende tye by die Rooiels lokaliteit in Valsbaai geneem

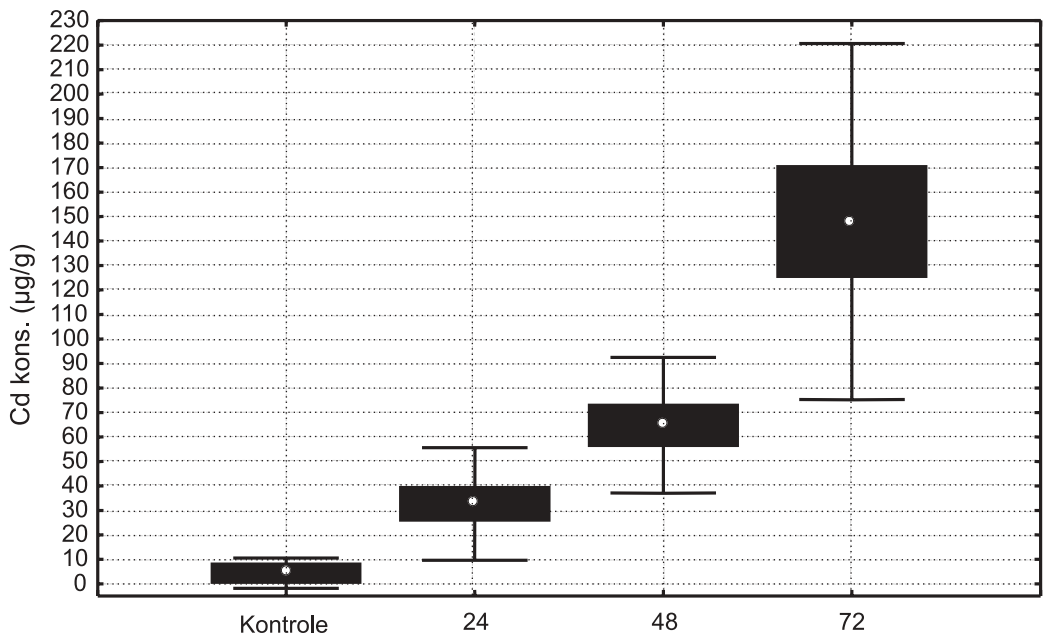
TABEL 1: Cd liggaamsladings ($\mu\text{g/g}$) vir *C. oculus*, *S. longicosta*, *S. granularis* en *C. granatina* na afloop van aaneenlopende blootstelling vir drie dae in kontroles en aan drie verskillende konsentrasies van kadmiumchloried

Blootstellings-kons. (mg/L CdCl ₂)	Blootstellings-tyd (ure)	<i>C. oculus</i>			<i>S. longicosta</i>			<i>S. granularis</i>			<i>C. granatina</i>		
		Gem. Cd kons. ($\mu\text{g/g}$)	Std. Ft	N	Mean Cd kons. ($\mu\text{g/g}$)	Std.Ft	N	Gem. Cd kons. ($\mu\text{g/g}$)	Std. Ft	N	Gem. Cd kons. ($\mu\text{g/g}$)	Std. Ft	N
Control	24	1.76	1.47	28	4.66	1.28	30	38.56	9.24	30	6.86	0.62	30
Control	48	1.65	1.47	28	2.18	1.28	30	52.52	9.24	30	8.46	0.62	30
Control	72	3.54	1.47	28	2.21	1.28	30	44.21	9.24	30	7.65	0.62	30
Cd 0.8	24	10.22	2.46	10	19.58	2.22	10	51.52	16.00	10	10.04	1.07	10
Cd 0.8	48	13.65	2.46	10	9.42	2.22	10	77.11	16.00	10	12.72	1.07	10
Cd 0.8	72	13.93	2.46	10	11.70	2.22	10	145.90	16.00	10	14.13	1.07	10
Cd 1	24	5.01	2.46	10	7.51	2.22	10	75.49	16.00	10	9.31	1.07	10
Cd 1	48	4.56	2.46	10	6.93	2.22	10	42.82	16.00	10	12.56	1.07	10
Cd 1	72	5.82	2.46	10	7.68	2.22	10	8.83	16.00	10	10.91	1.07	10
Cd 1.2	24	8.40	2.46	10	1.18	2.22	10	32.65	16.00	10	7.27	1.07	10
Cd 1.2	48	10.26	2.46	10	2.31	2.22	10	64.79	16.00	10	8.62	1.07	10
Cd 1.2	72	21.41	2.46	10	3.01	2.22	10	147.99	16.00	10	13.06	1.07	10

3.3 Neutraaroori retensietye (NRRT)

Die gemiddelde NRR tye wat verkry is in die kontrole- en blootstellingsgroepe van al vier spesies word in Tabel 2 weergegee. Twee-rigting ANOVA het geen betekenisvolle verskille ($p > 0.05$) tussen blootstellingstye en -konsentrasies vir *C. oculus* monsters uitgewys nie. Die NRR tye het gedaal soos wat die blootstellingskonsentrasie gestyg het ($p < 0.01$). Die patroon wat na vore gekom het toe gemiddeldes van NRR waardes vir kontroles en al drie blootstellingskonsentrasies grafies uitgestip is vir die drie verskillende blootstellingstye (Figuur 4) verteenwoordig 'n duidelike dosis-responsverhouding. Daar was nie betekenisvolle verskille ($p > 0.05$) tussen die kontrole en 0.8 mg/L CdCl₂ blootstellingskonsentrasie nie, maar betekenisvolle verskille ($p < 0.05$) tussen hierdie twee groepe en die 1 en 1.2 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroepe het wel voorgekom. Gemiddelde waardes van NRR tye (minute) vir *C. oculus* wat by drie blootstellingstye gemeet is ($n=58$, kontrole ingesluit) (gebaseer op die gekombineerde metings van retensietye vir kontrolediere en al drie blootstellingsgroepe) word in Figuur 4 weergegee.

Betekenisvolle verskille ($p < 0.01$) tussen blootstellingstye en -konsentrasies is met twee-rigting ANOVA verkry vir NRR tye van *S. longicosta* monsters. Die 0.8 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep het betekenisvol hoër ($p < 0.05$) retensietye vir alle blootstellingsgroepe getoon in vergelyking met die kontrole, 1 en 1.2 mg/L CdCl₂ blootstellings. Retensietye was die hoogste by 0.8 mg/L CdCl₂ en die laagste by blootstelling aan 1.2 mg/L CdCl₂ (Tabel 2). 'n Betekenisvolle verskil in die dosis-respons ($p < 0.05$) tussen die blootstellingskonsentrasies en die NRR tye by 24 uur van blootstelling was duidelik. Geen korrelasie ($p > 0.05$ and $r^2 = 0.02$ en 0.03 respektiewelik) tussen blootstellingskonsentrasie en NRR respons kon vasgestel word by die 48 en 72 blootstellingstye nie.



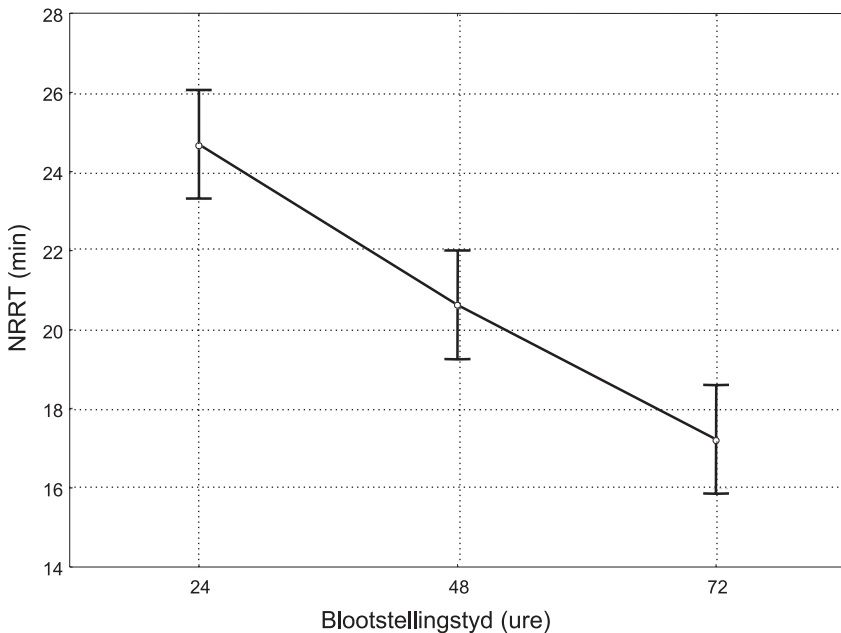
Figuur 3: Gemiddelde liggaamskonsentrasies van kadmium ($\mu\text{g/g}$) in die klipmossel, *S. granularis* direk na versameling en na drie verskillende periodes van blootstelling by 'n konsentrasie van 1.2 mg/L CdCl₂

TABEL 2: Neutraalrooi retensietye vir *C. oculus*, *S. longicosta*, *S. granularis* en *C. granatina* na afloop van deurlopende blootstellings vir drie dae aan drie verskillende konsentrasies van kadmiumchloried en in kontroles

Blootstellings- kons. (mg/L CdCl ₂)	Blootstellings- tyd (ure)	<i>C. oculus</i>			<i>S. longicosta</i>			<i>S. granularis</i>			<i>C. granatina</i>		
		Gem. NRRT (min)	Std. Ft.	N	Gemid. NRRT (min)	Std. Ft	N	Gem. NRRT (min)	Std.Ft.	N	Gem. NRRT (min)	Std. Ft.	N
Control	24	28.02	0.91	28	20.23	0.71	30	18.48	0.49	30	14.03	0.57	30
Control	48	23.38	0.91	28	17.28	0.71	30	19.22	0.49	30	13.07	0.57	30
Control	72	22.77	0.91	28	15.43	0.71	30	20.45	0.49	30	17.15	0.57	30
Cd 0.8	24	26.45	1.52	10	25.00	1.23	10	11.40	0.85	10	12.60	0.98	10
Cd 0.8	48	24.60	1.52	10	24.05	1.23	10	12.30	0.85	10	11.40	0.98	10
Cd 0.8	72	18.50	1.52	10	28.95	1.23	10	9.45	0.85	10	15.35	0.98	10
Cd 1	24	23.55	1.52	10	18.65	1.23	10	26.05	0.85	10	11.40	0.98	10
Cd 1	48	18.40	1.52	10	15.35	1.23	10	12.40	0.85	10	9.15	0.98	10
Cd 1	72	16.45	1.52	10	12.25	1.23	10	10.80	0.85	10	11.85	0.98	10
Cd 1.2	24	20.75	1.52	10	18.65	1.23	10	11.55	0.85	10	12.35	0.98	10
Cd 1.2	48	16.15	1.52	10	13.65	1.23	10	8.85	0.85	10	17.95	0.98	10
Cd 1.2	72	11.20	1.52	10	9.55	1.23	10	7.85	0.85	10	15.70	0.98	10

Twee-rigting ANOVA het betekenisvolle verskille ($p < 0.01$) tussen blootstellingskonsentrasies en blootstellingstye vir *S. granularis* aangetoon. Die kontrolegroep het betekenisvolle hoër ($p < 0.01$) NRR tye vir alle blootstellingstye gewys in vergelyking met die 0.8 tot 1.2 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroepe (Tabel 2). Die enigste uitsondering op die bogenoemde resultaat was die hoër NRR tyd vir die groep wat blootgestel was aan 1 mg/L CdCl₂ vir 24 uur, in welke geval die NRR tyd 26.05 minute was (Tabel 2). Die Bonferroni toets het betekenisvolle verskille ($p < 0.05$) tussen groepgemiddeldes van blootstellingskonsentrasies en -tye vir *S. granularis* aangetoon. Die NRR response was in die geval, soos uit die 24 uur blootstelling blyk, wisselvallig en die dosis-responsverband was betekenisloos ($p > 0.05$ en $r^2 = 0.02$). Statistiese analise van NRR tye teenoor blootstellingskonsentrasie het wel 'n dosis-respons verband by 48 en 72 uur van blootstelling opgelewer. By die hoogste blootstellingskonsentrasie het 'n betekenisvolle verlaging in NRR tyd oor tyd voorgekom (Figuur 5) wat ook gekorreleer het met 'n toename in liggaamslading van kadmium (Figuur 3).

Gemiddelde NRR tye vir *C. granatina* was laag vir al die blootstellingskonsentrasies en tye (Tabel 2). Twee-rigting ANOVA het betekenisvolle verskille ($p < 0.01$) getoon tussen die groepsgemiddeldes van blootstellingskonsentrasies en blootstellingstye. 'n Daling in NRR tyd het vanaf 24 tot 48 uur in die kontrole, 0.8 en 1 mg/L CdCl₂ blootstellinggroepe ($p > 0.05$) voorgekom terwyl 'n toename in NRR tyd by die 1.2 mg/L CdCl₂ blootstellingsgroep aangeteken is oor dieselfde periode ($p < 0.01$). Hierdie afname in NRR tyd is gevolg deur 'n toename vanaf 48 tot 72 uur van blootstelling in die kontrole, 0.8 en 1 mg/L CdCl₂ groepe maar was nie betekenisvol nie ($p > 0.05$), behalwe vir die kontrolegroep ($p < 0.01$). Swak korrelasies tussen die blootstellingskonsentrasies en die NRR response was opvallend oor die drie blootstellingsperiodes.



Figuur 4: Gemiddelde NRR tye (minute) vir *C. oculus*, gemeet by drie blootstellingstye (ure) ($n=58$, kontrole ingesluit). Gemiddeldes gebaseer op gekombineerde metings van retensietye vir al die diere by die kontrole en al drie blootstellingskonsentrasies. Vertikale lyne dui 95% sekerheidsintervalle aan.

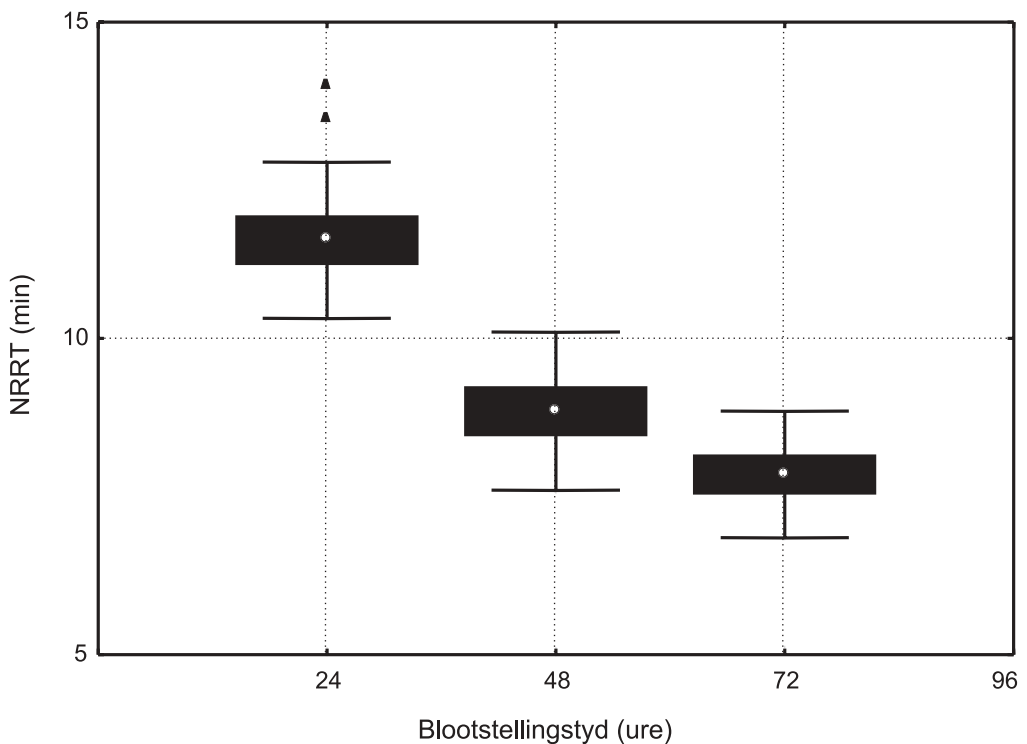
3.4 Effektiewe konsentrasies (EC_{50}) vir Cd.

Die EC_{50} waardes (met NRRT as respons op blootstelling aan verskillende Cd konsentrasies) wat vir die vier spesies verkry is toon baie ooreenstemmende korrelasiekoëffisiënte by 'n blootstellingstyd van 48 uur (Tabel 3). Slegs *C. oculus* en *S. longicosta* het EC_{50} waardes opgelewer wat sterk gekorreleer het by al drie blootstellingstye (24, 48 en 72 uur). Slegs by 66% van al die EC_{50} waardes vir die vier spesies is korrelasies gevind.

4. BESPREKING

4.1 Kadmium in seewater

Die gemiddelde kadmiuminhoud van seewater vanaf die Gordonsbaai en Rooiels lokaliteite was laer as die vlakke van tussen 0.04 en 10.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ wat voorheen deur Mdzeke¹⁶ bepaal is. 'n Moontlike toename in agtergrond konsentrasies vanaf 0.1 tot 0.4 mg/L Cd by die Gordonsbaai lokaliteit (Figuur 1) tussen Junie en September 2004, sowel as 'n toename in konsentrasie by Rooiels (Figuur 2) vanaf 0.1 tot 0.5 mg/L Cd tussen April en Augustus 2005 kan aan die uitwerking van die



Figuur 5: Neutraalrooi retensietye (minute) vir *S. granularis* oor drie blootstellingstye (ure) by 'n blootstellingskonsentrasie van 1.2 mg/L CdCl_2 , om die prominente verlaging in retensietye soos wat liggaamsladings van kadmium oor tyd toeneem, aan te toon (Kyk ook Figuur 3)

winterreënval gedurende hierdie periode toegeskryf word. Swaar neerslae verhoog die Cd vlakke (wat onder andere vanaf hoofpaaie met afloopwater in die tussengetygebiede spoel).³⁷ Reënvalsyfers wat vanaf die Suid-Afrikaanse Weerdiens verkry is, het aangetoon dat die winterseisoen se reënval tussen 200 en 300mm gedurende die periode Julie tot Augustus 2004 was en tussen 100 en 300mm gedurende Julie tot September 2005. Na afloop van die reënseisoen in die Weskaap het die Cd vlakke in die Rooiels lokaliteit 'n skielike verlaging getoon vanaf 0.5 tot 0.1 mg/L Cd, waarna die agtergrondvlakke weer gestyg het (Figuur 2).

4.2 Kadmium in klipmossels

Hoewel die agtergrondvlakke van kadmium redelik laag was tydens hierdie ondersoek, is kadmium geneig om selfs oor die korttermyn te bio-akkumuleer, soos hier eksperimenteel bevestig is en ook blyk uit vorige studies.¹⁶ 'n Deurlopende antropogeniese toevoeging van hierdie swaarmetaal tot die kusgebied, al is dit in relatief lae konsentrasies, kan lei tot bioakkumulering in die tussengetydiere. Shore et al.³⁸ het kadmiumkonsentrasies in die klipmossel, *Patella vulgate*, in die Bristol Channel gevind wat gewissel het tussen 27 ± 6 mg/l en 537 ± 137 mg/l Cd (droë massa). Mdzake¹⁶ het in 2004 Cd vlakke gemeet van tussen 0.69 en 31.67 $\mu\text{g/g}$ Cd (droë massa) in *Cymbula oculus* (voorheen *Patella oculus*) in Valsbaai. Cravo et al.³⁹ het in 2004 konsentrasies van 6.0 ± 1.7 $\mu\text{g/g}$ Cd in 'n mariene lokaliteit gevind en 1.6 $\mu\text{g/g}$ Cd in 'n gekontameneerde estuariene lokaliteit aan die suidwestelike kus van Portugal. Die onlangse studie van Nakhle et al.⁶ in 2006 het vlakke van tussen 2.5 tot 15.0 $\mu\text{g/g}$ in 'n *Patella* spesie aan die kus van Lebanon gemeet. Die huidige studie bevestig dat biokonsentrasie van kadmium eksperimenteel oor relatief kort periodes kan plaasvind en wel tot vlakke wat baie ooreenstem met die wat Nakhle et al.⁶ onder veldtoestande verkry het. Dit dui daarop dat die Patellidae spesies doeltreffende akkumuleerders van kadmium is en wel ook daardeur aan sellulêre stres onderworpe is. Niks is egter bekend oor die meer subtiele, langtermyn impak van hierdie subletale vlakke van Cd op die bevolkings van klipmossels nie. Aangesien langdurige stres 'n organisme se prestasie kan verminder, kan dit ook seleksiedruk plaas op 'n bevolking wat mettertyd tot veranderinge aanleiding kan gee.

Direkte vergelykings tussen die bevindinge van verskillende studies sonder inagneming van ouderdom of liggaamsgrootte van die diere, het egter beperkte waarde want verskeie navorsers het reeds aangetoon dat liggaamskonsentrasies ook verband hou met grootte en ouderdom. Volgens Boyden^{40, 41} en Nakhle et al.⁶ is liggaamsgrootte 'n belangrike faktor wat liggaamskonsentrasie bepaal. Die netto akkumulering van Cd met ouderdom is ook reeds bevestig.^{40, 41} Faktore wat die opname en behoud van swaarmetale in mariene organismes beïnvloed, is gevolglik velerlei,^{42, 43, 44} wat dit moeilik maak om liggaamslading direk met omgewingsvlakke in verband te bring. Die opnameroete is uiteraard ook belangrik wanneer liggaamskonsentrasies tussen spesies vergelyk word. Aangesien klipmossels oppervlakvoeders is, in teenstelling met byvoorbeeld filtervoedende mossels, kan verwag word dat swaarmetale grootliks via die voedsel ingeneem word en tot 'n mindere mate deur die liggaamsoppervlak. Indien die klipmossels dus oor die langer termyn van gekontameneerde voedsel voorsien sou word, kan selfs hoër kadmium konsentrasies in die liggame verwag word as wat in die huidige studie verkry is.

Die kadmiumkonsentrasie in die sagteweefsel van *C. oculus* het aansienlik gestyg na blootstelling vir drie dae aan CdCl₂, maar die veranderinge wat met tyd plaasgevind het, het die indruk geskep dat hierdie spesie in staat mag wees om hierdie swaarmetaal aktief te reguleer, hoewel getuienis om dit te staaf nog ontbreek. Dieselfde verskynsel blyk uit die eksperimentele gegewens wat met *S. longicosta* en *S. granularis* verkry is.

Van die vier Patellidae spesies het *S. granularis* die hoogste gemiddelde liggaamskonsentrasie van hierdie swaarmetaal gehad in sowel die kontrolediere as die eksperimentele diere wat aan kadmium blootgestel was. Liggaamskonsentrasies wat wissel van 51.52 tot 145.9 µg/g Cd is by die 0.8 mg/L CdCl₂ blootstelling gemeet. Die kleiner liggaamsgrootte van hierdie spesie in vergelyking met die ander het moontlik hier 'n rol gespeel. Die spesie bereik 'n maksimum lengte van 69mm terwyl die ander drie spesies lengtes van tussen 90 en 110mm⁴⁵ kan bereik.

Verdere getuigenis dat Cd oor die kort termyn sterk kan akkumuleer in die klipmossels het geblyk uit die gewens wat vir *C. granatina* verkry is. Die diere het 'n betekenisvolle toename Cd konsentrasie met tyd getoon by blootstelling aan 0.8 en 1.2 mg/L maar op 'n laer vlak as die ander spesies. Volgens Cubadda et al.⁴⁶ sal voedingsgedrag 'n belangrike rol speel in die opname van swaarmetale deur hierdie tussengetydiere. 'n Ondersoek na die verskille in voedingsgedrag en -wyses van individue van vergelykbare grootte van *S. granularis* en *C. granatina*, mag die redes vir die verskille in hulle liggaamsladings uitwys. Eersgenoemde spesie voed hoofsaaklik op swart ligene en kruipende alge terwyl laasgenoemde spesie volgens Richards⁴⁷ op die oppervlakneerleggings van diatome voed.

4.3 Sellulêre response van klipmossels

Die uitwerking van Cd op die lisosomale membrane se vermoë om die neutraalrooi kleurstof in te hou en te verhoed dat dit uitlek, is duidelik geïllustreer deur die feit dat al die kontrolediere deur die bank hoër gemiddelde retensietye as al die CdCl₂ blootgestelde groepe gehad het. Dit bevestig die nuttigheid van hierdie biomerker om aanvanklike stres op sellulêre vlak aan te toon.

Volgens Bebiano et al¹⁹ het sommige tussengetydiere spesifieke biochemiese meganismes ontwikkel om verhoogde omgewingsvlakke van swaarmetale teen te staan. Die klipmossel *Patella vulgata* gebruik metallothioneene (MTs) as hitte-stabiele, metaalbindingsproteïene met lae molekulêre massa en nie-ensiematiese aard om metale soos Ag, Cd, Cu, Hg en Zn te bind. Die verhoogde vlakke van swaarmetale in die omgewing induseer MTs in die selle van die diere. Daar speel hulle 'n belangrike rol in die verspreiding en detoksifisering van nie-essensiële metale sowel as die regulering van essensiële metale.¹⁹ Dit is nog nie bekend tot welke mate hierdie meganismes aanwesig is en 'n rol speel in die verskillende spesies wat in die huidige studie gebruik is nie.

Die gemiddelde NRR tye wat vir *C. oculus* verkry is in reaksie op blootstelling aan kadmium het 'n dosis-responsverhouding getoon en dit was duidelik dat die toename in die swaarmetaal se konsentrasie sterk gekorreleer het met 'n betekenisvolle afname in NRR tyd van bykans 30% by die hoogste konsentrasie.

In die algemeen het gemiddelde NRR tye wat met *S. longicosta* verkry is ook afgeneem met toenemende blootstellingskonsentrasies om 'n dosis-responsverhouding daar te stel. 'n Verlaging van ongeveer 23% in die gemiddelde NRR tyd het tussen die kontrole en die hoogste blootstellingskonsentrasie voorgekom en bied verdere getuigenis dat die biomerkerrespons gevoelig gereageer het op die aanwesigheid van die metaal.

S. granularis het die grootste verlaging in NRR tye by al die konsentrasies vanaf die 24 tot 72 uur blootstellingstye getoon nl. 52%. Op hierdie grondslag gemeet, was hierdie spesie dus die gevoeligste van al die getoetste spesies vir kadmium en het dit ook die meeste bioakkumulering van kadmium vertoon. Die spesie leef op blootgestelde rotse in die middelgetygebied waar dit slegs met water bedek is vir sekere tye tydens die hoogwater van spring- en dooiegety. Die spesie is waarskynlik goed aangepas om hierdie uiterste omgewingstoestande te weerstaan. Of hierdie posisie in die tussengetygebied ook verband mag hou met die gevoeligheid vir kadmium is steeds 'n ope vraag, maar die farma-toksikologiese beskikbaarheid van Cd in die organisme se liggaam mag in noue

verband staan met die homeostatische beheer en osmoreguleringsvermoë onder toestande van uitdroging wat waterverlies tot gevolg kan hê vir relatief lang tye op die blootgestelde rotse.

Die gemiddelde NRR tye van *C. granatina* was die laagste van alle spesies by alle blootstellingskonsentrasies en -tye. Gebaseer op slegs hierdie feit, in isolasie beskou, sou 'n mens kon redeneer dat hierdie spesie die sensitiefste was vir Cd, maar 'n vergelyking van die gemiddelde NRR tye van die kontrolegroepe van alle spesies met die blootgestelde groepe het getoon dat die gemiddelde NRR tye van die kontrolegroepe van *C. granatina* reeds aan die begin van die eksperiment baie laer as dié van die ander spesies was. Die verlaging in retensietye van hierdie spesie as gevolg van blootstelling aan Cd was dus relatief gering. Die lae tye aan die begin van die eksperiment kan beteken dat die kontrolediere al reeds onder stres verkeer het. Dit kan ook alternatiewelik beteken dat hulle nie so gevoelig gereageer het soos verteenwoordigers van die ander spesies nie. Hoewel laboratoriumtoestande konstant gehou is, was dit uiteraard onmoontlik om die natuurlike habitat van die diere ten volle te simuleer en kon verskillende faktore opgetree het om 'n impak uit te oefen op die response gedurende aanhouding en blootstelling. Indien *C. granatina* byvoorbeeld gevoeliger was vir die stres wat deur hantering veroorsaak is, kon dit die relatief lae NRR tye meebring het wat by die kontrolegroepe van die spesie gemeet is aan die begin van die eksperiment (Tabel 2) in vergelyking met sowel die kontrolegroepe as blootstellingsgroepe van die ander spesies. Omdat die NRR 'n algemene biomerker is wat op 'n verskeidenheid stresfaktore kan reageer, kan dit alleen maar vermoed word dat dit in hierdie geval 'n respons was wat sterk met die teenwoordigheid van kadmium in verband staan. Indien dit wel so is, was hierdie spesie minder gevoelig as die ander. Alhoewel direkte vergelyking van EC_{50} waardes (Tabel 3) suggereer dat *C. granatina* die gevoeligste van al die spesies was vir Cd by 48 en 72 uur van blootstelling, het dit 'n swak korrelasiekoëffisiënt opgelewer wat so 'n gevolgtrekking verhoed. *C. granatina* is die tweede grootste van die spesies en kom hoofsaaklik in die middelgetygebied in poele voor waar dit nie vir lang periodes aan lug blootgestel is as gevolg van getywisseling nie.

TABEL 3: Effektiewe konsentrasiewaardes (EC_{50}) vir die NRRT response van vier klipmosselspesies by drie verskillende blootstellingstye na deurlopende blootstelling aan $CdCl_2$

Spesies	Blootstellingstyd (ure)	EC_{50} (mg/L Cd)	Korrel. koëff
<i>C. oculus</i>	24	1.58	-0.997
<i>S. longicosta</i>	24	8.04	-0.999
<i>S. granularis</i>	24	0.07	0.063
<i>C. granatina</i>	24	31.9	-0.310
<i>C. oculus</i>	48	1.29	-0.943
<i>S. longicosta</i>	48	1.57	-0.977
<i>S. granularis</i>	48	1.2	-0.807
<i>C. granatina</i>	48	0.61	0.609
<i>C. oculus</i>	72	1.92	-0.970
<i>S. longicosta</i>	72	1.28	-0.957
<i>S. granularis</i>	72	0.78	-0.488
<i>C. granatina</i>	72	0.001	0.062

Daar kan slegs maar gespekuleer word dat die spesie waarskynlik ook minder goed aangepas is vir stresvolle veranderinge as ander spesies wat sodanige blootstelling meer dikwels ervaar weens hulle posisie in die tussengetyzone. Die meer gunstige posisie in die getyzone kan ook beteken dat die spesie meer kwesbaar is as ander spesies vir toestande wat ontstaan tydens versameling, hantering en vervoer na die laboratorium. Vandaar moontlik die reeds lae retensietye met die aanvang van die eksperiment. Finale uitsluitel hieroor kan egter nie op grond van die beskikbare gegewens gegee word nie.

5. GEVOLGTREKKINGS

Hierdie ondersoek het getoon dat die neutraalrooi retensie evalueringsmetode nuttig is om as biomerker te gebruik om sellulêre response in klipmossels te bestudeer ná eksperimentele blootstelling aan kadmium omdat 'n verlaging in retensietyd oor die algemeen gepaard gegaan het met 'n verbandhoudende toename in sowel blootstellingskonsentrasie as liggaamslading van die metaal. Ons bevinding is dat, onder laboratoriumtoestande, interpesieverskille in korttermyn-gevoeligheid vir omgewingsrelevante konsentrasies van kadmium grootliks uitgewys kon word deur die biomerkerrespons van die organismes ten spyte daarvan dat beduidendheid in enkele gevalle vir bepaalde blootstellingstye en -konsentrasies te laag was. Gebaseer op die omvang van die verlaging in NRR tye wat gevolg het op blootstelling aan kadmium, was die volgorde van relatiewe gevoeligheid soos volg: *S. granularis* > *C. oculus* > *S. longicosta* > *C. granatina*. Gebaseer op EC50-waardes, en sonder om te kompenseer vir verskille in grootte en ouderdom tussen verteenwoordigers van spesies, was die volgorde van relatiewe gevoeligheid soos volg: *S. granularis* = *C. granatina* > *C. oculus* > *S. longicosta*. Die verfyning en benutting van hierdie tipe inligting vir die ontwikkeling van spesiesensitiwiteitsfunksies soos deur Posthuma et al.³¹ voorgestel, in samehang met meer ekofisiologiese inligting oor die betrokke spesies en die biobeskikbaarheid van die metaal, is steeds nodig. Dit sal uiteindelik bepaal of *S. granularis* aanvaar kan word as die geskikste en ook gevoeligste van hierdie klipmosselspesies vir doeleindes van biomonitoring van die onderhawige kusegebiede waar dit voorkom. Indien dit bevestig kan word, sal gereelde monitoring en beskerming van hierdie spesie beteken dat, ten minste wat kadmium betref, die moontlikheid bestaan dat ander verwante klipmosselspesies ook beskerming mag geniet weens die feit dat hulle minder gevoelig is.

DANKBETUIGINGS

Die werk is moontlik gemaak deur 'n navorsingstoekenning van die Nasionale Navorsingstigting.

BIBLIOGRAFIE

1. Chambers, R.J., McQuaid, C.D. (1994). Notes on the taxonomy, spawn and larval development of South African species of the intertidal pulmonate limpet genus *Siphonaria* (Gastropoda: Pulmonata). *Journal of Molluscan Studies*, 60:263-275.
2. Rainbow, P.S. (1997). Trace metal accumulation in marine invertebrates: marine biology or marine chemistry? *Journal of Marine Biological Association of the U.K.*, 77: 195-210.
3. Nickless, G., Stenner R., Terrille, N., 1972. Distribution of cadmium, lead and zinc in the Bristol Channel. *Marine Pollution Bulletin*, 3: 188-191.
4. Howard, A.G., Nickless, G. (1977). Heavy metal complexation in polluted molluscs I. Limpets (*Patella vulgata* and *Patella intermedia*). *Chemico-Biological Interactions*, 16: 107-114.
5. Hung, T.C., Meng, P.J., Han, B.C., Chuang, A., Huang, C.C.H., Chang, T. (2001). Trace metals in different species of mollusca, water and sediments from Taiwan coastal area. *Chemosphere*, 44: 833-841.
6. Nakhlé, K.F., Cossa, D., Khalaf, G., Beliaeff, B. (2006). *Brachiontes variabilis* and *Patella* sp. as

- quantitative biological indicators for cadmium, lead and mercury in the Lebanese coastal waters. *Environmental Pollution*, 142: 73-82.
7. Lau, S., Mohamed, M. Tan Chi Yen, A., Su'ut, S. (1998). Accumulation of heavy metals in freshwater molluscs, *Science of the Total Environment*, 241: 113-121.
 8. Gundacker, C. (2000). Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. *Environmental Pollution*, 110: 61-71.
 9. Schoon, H., Van der Bosch, L., Kraak, H.S., Heida, H., Van der Oost, R. (1996). Bioaccumulation of heavy metals (Zn, Cu, Pb, Cd) in fish and invertebrate organisms from two Amsterdam freshwater lakes. *Marine Environmental Research*, 42: 53-54.
 10. Anandraj, A., Marshall, D.J., Gregory M.A. and McClurg, T.P. (2002). Metal accumulation, filtration and O₂ uptake rates in the mussel *Perna perna* (Mollusca: Bivalvia) exposed to Hg²⁺, Cu²⁺ and Zn²⁺. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 132C: 355-363.
 11. Morgan, A.J., Morris, B. (1982). The accumulation and intracellular compartmentation of cadmium, lead, zinc and calcium in two earthworm species (*Dendrobaena rubida* and *Lumbricus rubellus*) living in highly contaminated soil. *Histochemistry*, 75:269-285.
 12. IARC (1993). Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans. The International Agency for Research on Cancer of the World Health Organization. Monograph, 58.
 13. Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B.A., Beyermann, D. (2003) Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis, *Toxicology*, 192: 95-117.
 14. Goering, P.L., Waalkes, M.P., Klaassen, C.D. (1995). Toxicology of cadmium. In: Goyer, R.A. and Cherian, M.G. (eds) *Toxicology of Metals. Biochemical Aspects*, Springer, Berlin, pp.189-214.
 15. Taljaard, S., Van Ballengooyen, R.C., Morand, P.D., (2000). False Bay Water Quality Review, *CSIR Report Env-S-C-2000-086/1*: 1-10. Stellenbosch, South Africa.
 16. Mdzeke, N.P., (2004). Contamination levels in and cellular responses of intertidal invertebrates as biomarkers of toxic stress caused by heavy metal contamination in False Bay. PhD tesis, University of Stellenbosch, South Africa.
 17. Hyne, R.V., Maher, W.A. (2003). Invertebrate biomarkers: links to toxicosis that predict population decline. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54: 366-374.
 18. Lowe, D.M., Soverchia, C., Moore, M.N. (1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, 33: 105-112.
 19. Bebianno, M.J., Cravo, A., Miguel, C., Morais, S. (2003). Metallothionein concentrations in a population of *Patella aspera*: variation with size. *Science of the Total Environment*, 301: 151-161.
 20. Brown, R.J., Galloway, T.S., Lowe, D., Browne, M.A., Dissanayake, A., Jones, M.B., Depledge, M.H. (2004). Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 66: 267-278.
 21. Moolman, L., Van Vuren, J.H.J., Wepener, V. (2007). Comparative studies on the uptake and effects of cadmium and zinc on the cellular energy allocation of two freshwater gastropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 68: 443-450.
 22. UNEP/MAP, 2005. Facts Sheets on Marine Pollution Indicators, UNEP(DEC)/MED/WG.264/Inf.14, Athens, 249 pp.
 23. Moore, M.N. (1988). Cytochemical responses of the lysosomal system and NADPH-ferrohemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics. *Marine Ecological Programme Series*, 46: 81-98.
 24. Marigómez, I., Baybay-Villacorta, L. (2003). Pollutant-specific and general lysosomal responses in digestive cells of mussels exposed to model organic chemicals, *Aquatic Toxicology*, 64: 235-257.
 25. Marigómez, I., Orbea, A., Olabarrieta, I., Etxeberria, M., Cajaraville, M.P. (1996). Structural changes in the digestive lysosomal system of sentinel mussels as biomarkers of environmental stress in "Mussels-Watch" programmes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113: 291-297.
 26. Snyman, R.G., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2002). Field application of a lysosome assay as biomarker of copper oxychloride exposure in the snail, *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69: 117-122.
 27. Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Rimmer, V.R., Hopkin, S.P., Weeks, J.M., (2000). Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19: 1800-1808.

28. Reinecke, S.A., Reinecke, A.J. (1999). Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by long-term exposure to heavy metals. *Pedobiologia*, 43: 585-593.
29. Svendsen, C., Spurgeon, D.J., Hankard, P.K., Weeks, J.M., (2004). A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57: 20-29.
30. Van Straalen, N.M., Van Leeuwen, C.J., (2001). European history of species sensitivity distributions. In: Posthuma, L., Suter, G.W., Traas, T.P. (eds), *Species sensitivity distributions in ecotoxicology*. Lewis Publishers, Boca Raton.
31. Posthuma, L., Traas, T.P., Suter, G.W. (2002). General introduction to species sensitivity distributions. In: Posthuma, L. Suter, G.W., Traas, TP (eds). *Species Sensitivity Distributions in ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, 3-10.
32. Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. (2003). Die beskerming van biologiese diversiteit deur gebruik te maak van die gevoeligheidsvariasie van spesies vir toksiese stowwe. *S.A. Tydskrif vir Natuurwetenskap en Tegnologie*, 22: 94-101.
33. Anon. (1980). The International Mussel Watch: Report of a workshop. *National Academy of Sciences*, Washington DC.
34. Regoli, F., Orlando, E., Mauri, M., Nigro, M., Cognetti, G.A. (1991). Heavy metal accumulation and calcium content in the bivalve *Donacilla cornea*. *Marine Ecological Programme Series*, 74: 219-224.
35. Snyman, R.G. (2001). Cellular biomarkers of exposure to the fungicide copper oxychloride in the common garden snail *Helix aspersa* in Western Cape vineyards. PhD Tesis, University of Stellenbosch, South Africa.
36. Katz, S.A., Jenniss, S.W. (1983). *Regulatory compliance monitoring by atomic absorption spectroscopy*. Verlag Chemie International, Deerfield Beach, Florida.
37. Perdikaki, K., Mason, C.F. (1999). Impact of road run-off on receiving streams in Eastern England. *Water Research*, 33: 1627-1633.
38. Shore, R., Carney, G., Stygall, T. (1975). Cadmium levels and carbohydrate metabolism in limpets. *Marine Pollution Bulletin*, 6: 187-189.
39. Cravo, A., Bebianno, M.J., Foster, P. (2004). Partitioning of trace metals between soft tissues and shells of *Patella aspera*. *Environment International*, 30: 87-98.
40. Boyden, C.R. (1974). Trace element content and body size in molluscs. *Nature*, 251: 311-314.
41. Boyden, C.R. (1977). Effect of size upon metal content of shellfish. *Journal of the Marine Biological Association of the U.K.*, 57: 675-714.
42. Coombs, T.L. (1977). Uptake and storage mechanisms of heavy metals in marine organisms. *Proceedings of the Analytical Division of the Chemical Society*, 14: 218-221.
43. George, S.G., Coombs, T.L. (1977a). Effects of high stability iron complexes on the kinetics of iron accumulation and excretion in *Mytillus edulis*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 28: 133-140.
44. George, S.G., Coombs, T.L. (1977b). Effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytillus edulis*. *Marine Biology*, 39: 261-268.
45. Kilburn, R., Rippey, E. (1982). *Sea Shells of Southern Africa*. Macmillan, South Africa, Johannesburg.
46. Cubadda, F., Conti, M.E., Campanella, L. (2001). Size-dependent concentrations of trace metals in four Mediterranean gastropods. *Chemosphere*, 45: 561-569.
47. Richards, D. (1981). *South African Shells. A collector's guide*. Struik Publishers, Cape Town.