



Cyprinus carpio'da Bakırın Solungaç Dokusunda Birikimi ve Na/K İyon Düzeylerine Etkisi^[*]

Hikmet Yeter ÇOĞUN^{1*} Ferit KARGIN²

¹Çukurova Üniversitesi, Ceyhan Veteriner Fakültesi Ceyhan, Adana, hcogun@cu.edu.tr
²Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana, fkargin@cu.edu.tr

Geliş/Received: 08.06.2020

Kabul/Accepted: 07.07.2020

Atıf yapmak için: Çoğun, H.Y. & Kargin, F. (2020). *Cyprinus carpio*'da Bakırın Solungaç Dokusunda Birikimi ve Na/K İyon Düzeylerine Etkisi. *Anadolu Çev. ve Hay. Dergisi*, 5(3), 313-317.

How to cite: Çoğun, H.Y. & Kargin, F. (2020). Copper Accumulation and Na/K Ion Levels in Gill Tissue of *Cyprinus carpio*. *J. Anatolian Env. and Anim. Sciences*, 5(3), 313-317.

*ID: <https://orcid.org/0000-0001-6559-4397>
ID: <https://orcid.org/0000-0003-4315-5689>

*Sorumlu yazarın:
Hikmet Yeter ÇOĞUN
Çukurova Üniversitesi
Ceyhan Veteriner Fakültesi Ceyhan, Adan.
✉: hcogun@cu.edu.tr
İş Telefonu : +90 (322) 613 35 07

Öz: Bu çalışmada farklı bakır ortam derişimlerinin etkisine farklı sürelerle bırakılan *Cyprinus carpio*'nun solungaç dokusunda bakır birikimi ve bakırın Na⁺ ve K⁺ iyon düzeylerine etkileri incelenmiştir. Balıklar 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L Cu derişimlerine 10, 20 ve 30 günlük sürelerle bırakılarak solungaç dokularındaki bakır birikimi ile sodyum ve potasyum iyon düzeyleri Atomik Absorbsiyon Spektrofotometrik yöntemle saptanmıştır. Bakırın 1.0 mg/L derişiminin etkisinde 30. gün sonunda balıkların tümü ölmüştür. *C. carpio*'nun solungaç dokusunda bakır birikimi derişim artışına ve sürenin uzamasına bağlı olarak arttığı belirlenmiştir. *C. carpio*'da denenen tüm koşullarda bakır, solungaç Na⁺ ve K⁺ düzeyini azaltmıştır

Anahtar kelimeler: Bakır, birikim, *Cyprinus carpio*, iyon dağılımı.

Copper Accumulation and Na/K Ion Levels in Gill Tissue of *Cyprinus carpio*

*Corresponding author's:
Hikmet Yeter ÇOĞUN
Cukurova University
Ceyhan Veterinary Faculty Ceyhan,
Adana ✉: hcogun@cu.edu.tr
Telephone : +90 (322) 613 35 07

Abstract: In this study, accumulation of copper in gill tissue of *Cyprinus carpio* and effect of Cu on Na⁺ and K⁺ levels were tested at varying concentrations of copper in the medium and over different periods of time. Fish were exposed to 0.1, 0.5, 1.0 and 5.0 mg-L⁻¹ Cu over periods of 10, 20 and 30 days and Na⁺, K⁺ levels and accumulation of copper in gill were determined using atomic absorption spectrophotometry. At the end of the 30th day, all of the fish died under the effect of 1.0 mg / L concentration of copper. Copper accumulation in the gill tissue of *C. carpio* increased with increasing concentrations of copper in the medium and with increasing periods of exposure. In all conditions tested in *C. carpio*, copper caused a decrease in gill tissue Na⁺ and K⁺ levels.

Keywords: Accumulation, Copper, *Cyprinus carpio*, Ion distribution.

GİRİŞ

Ağır metaller sucul ortamda çok düşük düzeyde bile çevreye zarar verdikleri gibi aynı zamanda sucul organizmalar tarafından doku ve organlarında birikebilmekte ve bu canlılara zarar verebilmektedirler. Endüstri ve kentsel gelişimin çok yoğun olduğu bölgelerde oluşan atıklar sucul ortamlar için önemli kirlilik kaynaklarıdır.

Ağır metallerin organizmalara toksik etkileri, ya enzimin aktif bölgesinde yararlı bir metalle yer değiştirerek veya molekül üzerinde aktif olmayan bölgeye bağlanarak yaptıkları saptanmıştır (Viarengo, 1985). Metaller organizmalarda, proteinlerin imidazol, amino, sülfidril ve karboksil guruplarına bağlandıkları belirtilmiştir (Murphy & Spiegel., 1983; Viarengo, 1985).

[*], Bu araştırma Doktora çalışmasından üretilmiştir.

This study was produced from the doctora thesis.

Bakır hemen tüm sularda eser düzeyde bulunmaktadır. Kentsel ve endüstriyel gelişimin bir sonucu olarak yaygın bir şekilde kullanılan bakır su ortamının kirlenmesine ve dolayısıyla organizmalarda birçok hasarlara neden olmaktadır (Munoz vd., 1991). Bakırın subletal derişimleri balıklarda büyüme, gelişme ve üreme üzerine olumsuz etkiler yaptığı bir çok araştırmacı tarafından belirtilmiştir (Buckley vd., 1982; Hilmy vd., 1985).

Balıkların dokularında ağır metallerin birikimi, metalin alımın şekline, derişimine ve etki süresine bağlı olarak değişim göstermektedir. Metallerin toksik etkileri ve birikimleri dokuların işlevsel ve fizyolojik durumlarına bağlı olarak değişim göstermektedir (Campana vd., 2003). Metallerin tatlı su balıkları tarafından hızlı bir şekilde vücuda alınmasında, solungaçların üzerindeki biyolojik olarak aktif bölgelerin bulunmasından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (McDonald vd., 2002). Balıklarda solungaçlar, solunumu sağlayan, iyon alımının ve homeostasisini sağlayan önemli bir dokudur (McDonald vd., 1989; Pelgrom vd., 1995).

Canlı organizmalarda iyonlar, protein ve lipid gibi birçok birleşiklerin yapılarında bulunurlar, enzimatik reaksiyonlarda kofaktör olarak görev alırlar ve asit-baz dengesini sağlarlar. Ağır metaller hücre zarının geçirgenliğini değiştirmesi, birçok enzimatik reaksiyonda değişikliklere neden olması ve yaşamsal öneme sahip inorganik katyonların düzeylerini değiştirmesiyle iyon dengesini bozmaktadır (Viarengo, 1985; Suresh vd., 1995; Çoğun & Kargın 2019). Organizmalarda ağır metaller ile Na^+ ve K^+ gibi iyonların derişimleri arasında sıkı bir ilişki olduğu belirlenmiştir (Astorga-Espana vd., 1999).

Bu çalışmada; 10, 20 ve 30 günlük sürelerle farklı bakır derişimlerinin etkisine bırakılan *C. carpio*'nun solungaç dokusunda birikimi ve bakırın sodyum ve potasyum iyon düzeyleri üzerine etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu araştırmada kullanılan *C. carpio* D.S.İ. işletmesinden alınmış ve iki ay süre ile 40X120X40 cm boyutlarındaki altı stok akvaryum içerisinde laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. *C. carpio* 15.03±0.23 cm boy ve 38.77 ± 2.53 g. ağırlığa ulaşmışlardır. Deneyler 25 ± 1 °C sıcaklıkta yürütülmüş, akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve günde sekiz saat aydınlanma (8 saat gündüz / 16 saat gece) periyodu uygulanmıştır. Balıklar, günde iki kez olmak üzere balık ağırlığının % 1'i kadar hazır balık yemi (Pınar Balık Yemi, Türkiye) ile beslenmişlerdir.

Balıklar 10, 20 ve 30 gün sürelerde bakırın 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L ortam derişimlerine bırakılmıştır. Deneyde

her biri 40X120X40 cm. boyutlarında olan ve her birinin içerisinde 18 balık bulunan 4 cam akvaryum kullanılmıştır. Akvaryumlardan üçüne 120'şer litre 0.1, 0.5 ve 1.0 mg/L dördüncü akvaryum kontrol olarak kullanılmıştır. Deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüştür ve her tekrarda iki balık kullanılmıştır.

Deney ortamında metallerin derişiminin zamana bağlı değişimler olabileceği için deney boyunca akvaryum suları ve bakır derişimleri iki günde bir değiştirilmiştir. Kullanılan bakır $CuCl_2 \cdot 2 H_2O$ (Merck) olup deney boyunca çözeltinin akvaryumda homojen dağılması ve çökelmeyi önlemek için tri-sodyum sitratla ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ Merck) birlikte çözeltiler deiyonize su ile taze hazırlanmıştır. Bu hazırlanan çözeltiler uygun derişimler uygun seyreltmelerle akvaryumlara uygulanmıştır.

Her deney süresi bitiminde balıklar MS-222 (Etil ester 3-amino benzoik asit) ile $0.1gL^{-1}$ çözeltisi hazırlanarak balıklara genel anestezi uygulanarak bayıltılmıştır (Hawkins., 1981). Daha sonra çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve kurutma kâğıdı ile yüzeylerinde bulunan su damlacıkları alınmıştır. Her deney süresi bitiminde balıklar MS-222 (Etil ester 3-amino benzoik asit) ile $0.1gL^{-1}$ çözeltisi hazırlanarak balıklara genel anestezi uygulanarak bayıltılmıştır (Hawkins., 1981). Daha sonra çeşme suyu ile iyice yıkanmış ve kurutma kâğıdı ile yüzeylerinde bulunan su damlacıkları alınmıştır. Bayılan balıkların solungaç dokularının diseksiyonu yapılmıştır. Daha sonra bu dokular etüvde $150^{\circ}C$ 'de 48 saat süreyle kurumaya bırakılmışlardır. Kuru ağırlıkları belirlenen dokular deney tüplerine aktararak üzerlerine 2 mL. nitrik asit (Merck, % 65, Ö. A. : 1.40) ve 1 mL. perklorik asit (Merck, % 60, Ö. A. :1.53) eklenmiş (Muramoto, 1983) ve çeker ocakta $120^{\circ}C$ 'de 3 saat süreyle yakılmıştır. Yakımı tamamlanan örnekler polietilen tüplere aktarılmış ve üzerleri deiyonize su ile 5 mL.' ye tamamlanarak bakır analizine hazır hale getirilmiştir.

Solungaç dokularındaki bakır analizleri Perkin Elmer AS 3100 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi ile saptanmıştır. Na^+ ve K^+ derişimleri ise Philips PU 9100X marka Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi ile (sodyum 589.0 nm ve potasyum 766.5 nm dalga boyulu emilsiyonla) elde edilen derişimlerden belirlenmiştir.

Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 10.0 bilgisayar programı kullanılarak "Regresyon analizi" ve "Student-Newman Keul's Test (SNK)" testleri uygulanarak yapılmıştır.

BULGULAR

C. carpio'da bakırın denenen tüm derişimlerinde ve belirlenen süreler sonunda canlı kalan ve ölen balık sayıları Çizelge 1'de verilmiştir. $1.0 mgL^{-1}$ ortam

derişiminde 30. gün sonunda tüm balıkların öldüğü gözlenmiştir.

Tablo 1. Ortam bakır derişimi ve etkide kalma süresinin *C. carpio*'da mortalite üzerine etkisi.

Table 1. Effect of ambient copper concentration and time of effect on mortality in *C. Carpio*.

Derişim (mgL ⁻¹)	SÜRE (gün)					
	10		20		30	
	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü
0,1	6	0	6	0	6	0
0,5	6	0	6	0	6	0
1,0	6	0	6	0	0	6

10 günlük süre sonunda *C. carpio*'da, ortamda bulunan bakır derişimi arttıkça solungaç dokularındaki bakır düzeyinde de önemli oranlarda artma gözlenmiştir (Çizelge 2; SNK, P<0.01). En yüksek birikimin 20 günlük süre sonunda 2.5 katlık bir artışa neden olduğu gözlenmiştir. Bu artış derişimler arasında istatistik önem taşımaktadır (Çizelge 2, SNK, P<0.01).

Tablo 2. *C. carpio*'da farklı ortam derişimlerinde solungaç dokusu bakır birikimi (µg Cu/g k.a.).

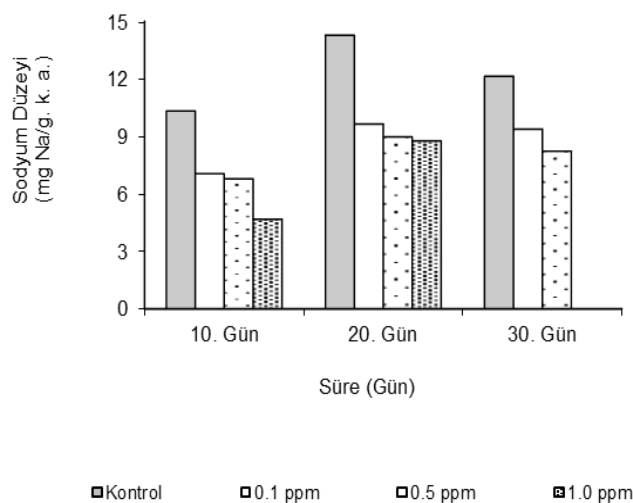
Table 2. Copper accumulation of gill tissue at different ambient concentrations in *C. carpio* (µg Cu / g k.a.).

Süre (gün)	Ortam Derişimi (µg Cu / g k.a.)			
	0,0	0,1	0,5	1,0
10 gün	D.A. ax	17.21 ± 0.10 bx	31.20 ± 0.92 cx	42.10 ± 0.70 dx
20. gün	D.A. ax	23.55 ± 0.71 by	35.41 ± 1.59 cy	54.18 ± 1.13 dy
30. gün	D.A. ax	33.55 ± 1.35 bz	38.55 ± 0.11 cz	

* : a, b,c ve d harfleri derişimleri belirlemek; x, y ve z harfleri günler arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında istatistik ayırım vardır (P<0.01).

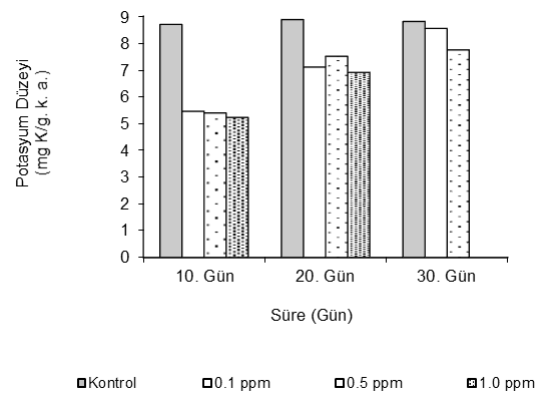
$\bar{X} \pm S\bar{X}$: Aritmetik ortalama ± Standart hata, D.A. : Duyarlılık düzeyinin altında.

Solungaç sodyum düzeyinin tüm ortam derişimlerinde ve etkide kalınan tüm sürelerde kontrole göre azaldığı saptanmıştır (Şekil 1). Solungaç dokusu potasyum düzeyi 30. günde 0.1 mgL⁻¹ Cu ortam derişimi hariç tüm ortam derişimi ve sürelerde kontrole göre bir azalma göstermiştir (Şekil 2).



Şekil 1. *C. carpio*'da solungaç dokusu sodyum düzeyi üzerine bakır ortam derişimleri ve sürenin etkisi.

Figure 1. Copper concentrations and time effect on gill tissue sodium level in *C. carpio*.



Şekil 2. *C. carpio*'da solungaç dokusu potasyum düzeyi üzerine bakır ortam derişimleri ve sürenin etkisi.

Figure 2. Copper concentrations and time effect on gill tissue potassium level in *C. carpio*.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Metallerin mortalite üzerine etkileri, genellikle metallerin alımın mekanizmasının uyarılması ve eliminasyon mekanizmalarının engellenmesi nedeniyle metalin hızlı bir şekilde alınarak fazla miktarda biriktirilmesi sonucu mortalitenin oluştuğu belirlenmiştir (Cearley & Coleman, 1974). Bu çalışmada *C. carpio*'da bakırın 1.0 mg/L ortam derişiminin etkisinde kalan balıkların 30. gün sonunda tümünün öldüğü gözlenmiştir. Balıklarda mortalitenin, iyon regülasyonunun bozulması, solungaçlarda oksijen alımının engellenerek hipoksiyanın oluşması (Lacrox vd., 1985; Heath, 1987) ve enzim aktivitelerinin engellenmesi (Viarengo, 1989) sonucu oluşabileceği belirlenmiştir.

Balıklarda solungaçlar iyon ve gaz değişiminde önemli rol oynayan ve aynı zamanda metal bağlayıcı proteinler sentezleyerek ağır metallerin vücuda geçişini önleyen bir dokudur (Lauren & McDonald, 1987). Bununla birlikte ağır metallerin etkisine bırakılan balıklarda solungaçlar fazla miktarda mukus salgılayarak onları bağlamakta ve metallerin vücuda girişini engellemektedir. Ancak mukus tabakasının tutamadığı metaller dokuya geçerek birikebilmektedir. *O. mykiss* ile yapılan bir çalışmada diğer dokularla kıyaslandığında solungaçların kurşunun toksik etkilerinden en fazla zarar gören bir doku olduğu ve birikiminde yüksek düzeyde gerçekleştiği saptanmıştır (Roger vd., 2003). Araştırmamızda denenen tüm ortam koşullarında solungaçlar bakır birikiminin yüksek düzeyde gerçekleştiği belirlenmiştir. *T. mossambicus*'da bakır ve çinkonun en yüksek birikiminin karaciğer ve solungaçlarda olduğu saptanmıştır (Lam vd., 1998).

Balıklar iyon alımını iki organdan gerçekleştirirler. Bunlardan biri iyonların taşınmasında görev yapan hücreleri veya klorid hücrelerini bol miktarda içeren solungaçlar, diğeri ise bağırsaklardır (Flik & Verboost, 1993).

Balıklarda fizyolojik olayların tam olarak yapılabilmesi ve canlılığın sürdürülebilmesi için hücre içi ve hücre dışı arasında iyon derişimindeki dengenin sürekli olarak korunması gerekmektedir. Bunu sağlamak için çeşitli sistemler geliştirilmiştir. Örneğin Na^+ , K^+ -ATPaz sistemi hücre içinde potasyumun, hücre dışında da sodyumun yüksek derişimlerde tutulmasını (Satyavath & Rao, 2000), Na^+ , K^+ -ATPaz ile Ca^{++} - Mg^{++} ATPaz sistemi solungaçlarda ilgili iyonların aktif taşınmalarını (Roger vd., 2003), karbonik anhidraz enzimi Na^+ ve Ca^{++} iyonlarının taşınmalarını (McGeer vd., 2000) sağlayarak iyon dengesinin korunmasında büyük önem taşırlar. Ağır metaller bu enzimlerin sülfidril gruplarına bağlanarak bu sistemlerin inhibisyonuna neden olabilmektedirler. Bu inhibisyon sonucunda gerek solungaçlarda gerekse hücre membranlarından iyon geçişleri aksamakta ve iyon dengesi büyük ölçüde bozulmaktadır. Örneğin bakır *O. mykiss*'de solungaç Na^+ , K^+ -ATP az aktivitesini (Wang vd., 1998), bakır ve kadmiyum *O. mykiss*'de solungaç karbonik anhidraz aktivitesini (McGeer vd., 2000), krom *Periophthalmus dispes*'de solungaç Ca^{++} - Mg^{++} -ATPaz ile Na^+ , K^+ -ATPaz aktivitelerini (Thaker vd.,1996) inhibe etmiştir.

Balıklar ağır metal etkisine bırakıldıkları zaman balıklarda iyon regülasyonu, osmoregülasyon, enerji metabolizması ve solunum bozuklukları oluşmaktadır (Bjerregaard & Vislie, 1986; Depledge vd., 1995). Pelgrom vd., (1995) *O. mossambicus* ile yaptıkları bir araştırmada bakırın etkisinde ilk olarak solungaç dokusu ve serum etkilendiği, ikincil olarak da bunları iyon regülasyon bozulmasının izlediğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar, yüksek bakır derişimlerinde solungaçlarda görülen yapısal bozuklukların, iyon taşınmasındaki azalma ve iyon permeabilitesindeki artışın sonucu olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmada denenen bakır ortam derişimleri *C. carpio*'nun solungaç Na^+ düzeyini derişime ve etkide kalma süresine bağlı olarak azaltmıştır. Solungaç dokusu K^+ düzeyi bakır ortam derişimlerinin etkisiyle azaldığı belirlenmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, *C. carpio*'nun solungaç dokusu bakır birikim ve toksisitesine karşı hassas bir tür olduğu ve iyon regülasyonu ile osmoregülasyonun bakırın etkisiyle bozulduğu belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri birimi (BAP) tarafından desteklenmiştir (Proje No: FEF2003D13).

KAYNAKLAR

- Astorga-Espana, M.S., Pena-Mendez, E.M. & Montelongo F.J. (1999).** Application of principal component analysis to the study of major cations and trace metals in fish from Tenerife (*Canary Islands*). *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **49**, 173-178.
- Bjerregaard, P. & Vislie, T. (1985).** Effect of mercury on ion and osmoregulation in the shore Crab *Carcinus maenas* (L.). *Comparative Biochemistry & Physiology*, **82C**(1), 227-230.
- Buckley, J.T., Roch, M., Mccarter, J.A., Rendell, C.A. & Matherson, A.T. (1982).** Chronic exposure of Coho Salmon to sublethal concentrations of copper-I. effects of growth, on accumulation and distribution of copper and on copper tolerance. *Comparative Biochemistry & Physiology*, **72C**(1), 15-19.
- Campana, O., Sarasquete, C. & Blasco, J. (2003).** Effect of lead on ALA-D activity, metallothionein levels, and lipid peroxidation in blood, kidney, and liver of the Toadfish *Halobatrachus didactylus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 116-125.
- Cearley, J.E. & Coleman, R.L. (1974).** Cadmium toxicity and bioconcentration in largemouth bass and bluegill. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **11**, 146-151.
- Croke, S.J. & McDonald, D.G. (2002).** The further development of ionoregulatory measures as biomarkers of sensitivity and effect in fish species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**(8), 1683-1691.
- Çoğun, H. & Kargın, F. (2019).** *Oreochromis niloticus*'un solungaç dokusu iyon düzeyleri üzerine kurşunun etkisi. *Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences*, **4**(1), 22-26. DOI: 10.35229/jaes.527071
- Depledge, M.H., Aagaard, A. & Gyorkos, P. (1995).** Assessment of Trace Metal Toxicity Using Molecular, Physiological and Behavioural Biomarkers. *Marine Pollution Bulletin*, **31**, 19-27.
- Erdem, C. & Kargın, F. (1992).** A comparative study on the accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle tissues of *Cyprinus carpio* and *Tilapia nilotica*. *Biyokimya Dergisi*, **XVII**(1), 13-27.
- Flik, G. & Verbost, P.M. (1993).** Calcium transport in fish gills and intestine. *Journal of Experimental Biology*, **184**, 17-29.
- Hawkins, A.D. (1981).** *Aquarium systems*, Academic Pres. London. 452pp.

- Heath, A.G. (1987).** *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC Press. Florida USA, 24pp.
- Hilmy, A.M., Shabana, M.B. & Daabees, A.Y. (1985).** Bioaccumulation of cadmium: toxicity in *Mugil cephalus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **81C**(1), 139-143.
- Lacrox, G.L., Gordon, D.J. & Johnstan, D.J. (1985).** Effects of low environmental pH on the survival, growth, and ionic composition of postemergent Atlantic Salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**, 768-775.
- Lam, K.L., Ko, P.W. & Judy, K.Y. (1998).** Metal toxicity and metallothionein gene expression studies in Carp and Tilapia. *Marine Environ. Res.*, **46**, 563-566.
- Lauren, D.J. & Mc Donald, D.G. (1987).** Acclimation to copper by Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*: *Physiology*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **44**, 99-104.
- McDonald, A., Silk, L., Schwartz, M. & Playle, R.C. (2002).** A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry & Physiology, C*, **133**, 227-242.
- McDonald, D.G., Tang, Y. & Boutilier, R.G. (1989).** Acid and ion transfer across the gills of fish: mechanisms and regulation. *Canadian Journal of Zoology*, **67**, 3046-3054.
- McGeer, J.C., Szebedinszky C., McDonald D.G. & Wood C.M. (2000).** Effect of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in Rainbow trout 2: tissue specific metal accumulation. *Aquatic Toxicology*, **50**, 245-256.
- Munoz, M.J., Carballo, M. & Tarazona, J.V. (1991).** The Effect of sublethal levels of copper and cyanide on some biochemical parameters of Rainbow Trout along subacute exposure. *Comparative Biochemistry & Physiology*, **100C**(3), 577-582.
- Muramoto, S. (1983).** Elimination of Copper from Cu-contaminated fish by long-term exposure to EDTA and fresh-water. *J. Environ. Sci. Health A*, **18**(3), 455-461.
- Murphy, C.B.Jr, and Spiegel, S.J. (1983).** Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements, *Water Pollution*, **55**(6), 816-821.
- Pelgrom, S.M.G.J., Lock, R.A.C., Balm, P.H.M. & Wendelaar Bonga, S.E. (1995).** Effects of Combined Waterborne Cd and Cu Exposures on Ionic Composition and Plasma Cortisol in Tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comparative Biochemistry & Physiology, C: Toxicol. And Endocrin*, **111**(2), 227-235.
- Roger, J.T., Richards, J.G. & Wood, C.M. (2003).** Ionoregulatory disruption as the toxic mechanism for lead in the Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, **64**(2), 215-234.
- Satyavathi, C. & Rao, Y.P. (2000).** Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase in *Penaeus indicus* postlarvae by lead. *Comparative Biochemistry & Physiology, C*, **127**, 11-22.
- Suresh, A., Sivaramakrishna, B. & Radhakrishnaiah, K. (1995).** Cadmium induced changes in ion levels and ATPase activities in the muscle of the fry and fingerlings of the freshwater fish, *Cyprinus carpio*. *Chemosphere*, **30**(2), 365-375.
- Thaker, J., Chhaya, J., Nuzhat, S., Mittal, R., Mansuri, A.P. & Kundu, R. (1996).** Effects of chromium (VI) on some ion-dependent ATPases in gills, kidney and intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dipsas*. *Toxicology*. **112**, 237-244.
- Viarengo, A. (1985).** Biochemical effects of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **16**(4), 153-158.
- Viarengo, A. (1989).** Heavy metals in marine invertebrates. mechanism of regulation and toxicity at the cellular level. *Aquatic Sciences*, **1**(2), 295-317.
- Wang, T., Knudsen, P.K., Brauner, C.J, Busk, M., Vijayan, M.M. & Jensen, F.B. (1998).** Copper exposure impairs intra-and extracellular acid-base regulation during hypercapnia in the fresh water Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *The Journal of Comparative Physiology, B*, **168**, 591-599.