



Callinectes sapidus'un (Mavi Yengeç) Hepatopankreas Esteraz (E. C. 3.1.1.1) Aktivitesine Metal İyonlarının (Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2}) *in Vitro* Etkilerinin Belirlenmesi

Determination of in Vitro Effects of Metal Ions (Zn^{+2} , Co^{+2} , Cd^{+2} , Ni^{+2}) on the Hepatopancreas Esterase (E. C. 3.1.1.1) Activity of Callinectes sapidus (Blue Crab)

Salih Görgün* 

Sivas Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, Sivas, Türkiye

Öz

Bu çalışmada insanlar tarafından besin olarak tüketilen bir yengeç türü olan *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896)'nın hepatopankreas esteraz (E. C. 3.1.1.1) aktivitesine çinko (Zn), kobalt (Co), kadmiyum (Cd), nikel (Ni) metallerinin etkileri *in vitro* olarak belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; araştırılan tüm metal iyonlarının hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi sergilemekle birlikte, IC_{50} değerlerinin 0.83 mM (Cd) ile 32.21 mM (Co) arasında değişim gösterdiği bulunmuştur. Metal iyonlarının inhibisyon tipleri değerlendirildiğinde, Zn ve Co un-kompetitif inhibisyona neden olurken, Cd ve Ni karışık tip inhibisyon sergilemişlerdir. Elde edilen veriler, çevresel metal kirliliğinin belirlenmesinde mavi yengecin rolüne biyokimyasal veriler sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *Callinectes sapidus*, Hepatopankreas, Esteraz, Metal iyonları

Abstract

In this study, *in vitro* effects of zinc (Zn), cobalt (Co), cadmium (Cd), nickel (Ni) on the hepatopancreas esterase (E. C. 3.1.1.1) activity of *Callinectes Sapidus* (Rathbun, 1896), a crab species consumed as a food by humans, were investigated. According to the obtained results; IC_{50} values were found to vary between 0.83 mM (Cd) and 32.21 mM (Co), in addition to the inhibition effect of all the metal ions investigated on the hepatopancreas esterase activity. When assessed the inhibition types of the metal ions investigated, while Zn and Co caused un-competitive inhibition, Cd and Ni had exhibited mixed type inhibition. The data obtained provide biochemical data on the role of blue crab in determination of environmental metal pollution.

Keywords: *Callinectes sapidus*, Hepatopancreas, Esterase, Metal ions


1. Giriş

Organizmalar metabolik fonksiyonlarını düzenlemek için çinko (Zn) gibi (esansiyel) bazı metallere gereksinim duyarlar. Bununla birlikte, kadmiyum gibi (esansiyel olmayan) metallerin organizmalarda metabolik rolünün bulunmadığı bildirilmektedir (Cresswell vd. 2015). Dekapod krustaselerde bakır (Cu) ve çinko gibi esansiyel metaller, organizmanın metale maruz kalmasına bakılmaksızın belirli bir dokuda metalin görece bir sabit konsantrasyonda kalmasına olanak

sağlayan biyokimyasal mekanizmalar ile bağdaştırılmaktadırlar. Bununla birlikte, esansiyel metallerin regüle edilmiş konsantrasyonlarında çeşitli faktörlere bağlı olarak bireysel bir organizmada ve bireyler arasında farklılıklar olabileceği de bildirilmektedir. Kadmiyum (Cd) ve civa (Hg) gibi esansiyel olmayan metaller söz konusu olduğunda, bu metaller metabolik olarak regüle edilmezler ve maruz kalmaya bağlı olarak dokulardaki konsantrasyonları değişiklik göstermektedir (Turoczy vd. 2001).

Ağır metaller önemli çevresel kirleticiler arasında yer alıp (Liu vd. 2014), akuatik omurgasızlardaki metal birikimi beslenme yoluyla insan sağlığını etkilemesi nedeniyle son dönemlerde dikkat çekici bir konu haline gelmiştir (Zhang vd. 2019). Metallerin biyolojik birikiminin (biyoakümülyasyon) doğasının, genellikle organizmanın belirli bir süreçte sadece bir metal yerine, birçok farklı metalin bir karışımına

*Sorumlu yazarın e-posta adresi: sgorgun@cumhuriyet.edu.tr

Salih Görgün  orcid.org/0000-0002-2121-2577



maruz kalması nedeniyle oldukça karmaşık olduğu bildirilmiştir (Cresswell vd. 2015). Organizmalar tarafından alınan metallerin toksik etkilerini sarf edebilecekleri seviyeler metale göre ve organizmalar arasında farklılıklar göstermekle birlikte, akuatik omurgasızlarda bu metallerin alınış, biyokümülyasyon ve toksisite mekanizmaları Rainbow ve Luoma (2011) tarafından geniş bir şekilde tartışılmıştır. Akuatik dekapodlar arasında, nehir ağzı ve kıyı ekosistemlerinin anahtar türlerinden olan yengeçler tipik olarak bentik organizmalardır ve yüzey sedimentinde yaşamlarının yanı sıra, kontamine olmuş sedimentler arasında yaşayan organizmaları besin olarak kullanmaları (Zhao vd. 2012, Cheng vd. 2017, Cheng vd. 2018) ve insana kadar ulaşan akuatik besin ağında, toksik bileşenlerin daha üst trofik seviyelere taşınmalarından dolayı ekotoksikolojik çalışmaların odağındadırlar (Peterson vd. 2002). Bahsedilen bu ekolojik karakteristikleri nedeniyle yengeçler, çevresel metal kontaminasyonlarının izlenmesinde kullanılan önemli biyo-indikatör türler arasında yer alırlar (Arya vd. 2014). Çevresel kirlenici olarak metaller, krustaselerde enzim ve hormon sistemlerine etki ederek organizmanın hayatta kalma, gelişim ve üreme gibi faaliyetlerini etkilemektedirler. Bu esnada, özellikle asetilkolinesteraz ve esterazların da yer aldığı çeşitli enzimlerin aktivitelerinde değişimler saptanmaktadır (Elumalai vd. 2005). Bu enzimlerde çevresel kirliliğin izlenmesinde indikatör olarak kullanılan moleküler araçlardır.

Omurgasızlarda hepatopankreas, metabolik ve fizyolojik reaksiyonlar açısından son derece aktif bir organ olup, omurgalıların karaciğer, pankreas ve ince bağırsağına analogdur (Lima vd. 2013). Ayrıca hepatopankreas esteraz aktivitesinin krustaselerde detoksifikasyon başta olmak üzere, vitellogenizasyon, oogenezi, hormon metabolizması ve sinir impulsu kontrolü gibi çok önemli fizyolojik reaksiyonlar için esansiyel olduğu bildirilmektedir (Franceschini-Vicentini vd. 2009; Frasco vd. 2010; Lima vd. 2013). Ayrıca, ağır metallerin metabolik açıdan aktif organlar olan solungaç ve özellikle hepatopankreas dokusunda birikime uğradıkları belirtilmektedir (Çoğun vd. 2017).

Callinectes sapidus mavi yengeç olarak bilinmektedir ve protein açısından zengin olması nedeniyle son dönemlerde insanlar tarafından besinsel tüketimi ve ekonomik değerinin giderek arttığı anlaşılmaktadır. Literatürde mavi yengeç dahil diğer yengeç türlerinin çeşitli dokularındaki metal birikiminin seviyeleri ve metal kontaminasyonuna bağlı olarak bazı enzimlerin aktivitelerindeki değişimleri belirlemeye yönelik çalışmalar bulunmasına rağmen, biyo-indikatör olarak kullanılan enzimlerin inhibisyon kinetiğine dair çalışmalar

yok denecek kadar azdır. Bu nedenle, çalışmamızda, *C. sapidus*'un metabolik ve fizyolojik süreçlerinde kritik roller oynayan hepatopankreas esteraz aktivitesine Zn, Co, Cd ve Ni metallerinin etkilerinin *in vitro* olarak araştırılması ve sergiledikleri inhibisyon tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. Gereç ve Yöntemler

2.1. *C. sapidus* Örneklerinin Sağlanması

Çalışmada kullanılan *Callinectes sapidus* (Rathbun, 1896) örnekleri Muğla İli Köyceğiz Dalyan'ından elde edilmiştir. Laboratuvara getirilen örneklerin hepatopankreasları buzlu ortamda diseke edilmiş ve çalışılana kadar -20 °C'da muhafaza edilmiştir.

2.2. Homojenat Hazırlanması

Homojenat hazırlanması Althalji ve Görgün (2019)'a göre bazı modifikasyonlar ile yerine getirilmiştir. Bu amaçla örneklerden elde edilen 5 gram hepatopankreas dokusu, Ultra-Turrax T 25 homojenizatörde 25.000 devir/dk hızda 3 dakika süresince 50 mM Tris-HCl (pH 7.40, 1 mM DTT, 1 mM EDTA) tamponunda homojenize edilmiştir. Elde edilen homojenat 4000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmek suretiyle kaba partiküllerin çöktürülmesi sağlanmış ve üstteki süpernatant alınarak enzim aktivitesi çalışmalarında kullanılmıştır.

2.3. Enzim Aktivitesi Tayinleri

Esteraz aktivitesi ölçümleri 405 nm dalga boyunda ve 4-nitrofenil butirat (p-NPB) substratı kullanılarak çift ışın yollu spektrofotometrede gerçekleştirilmiştir. Aktivite tüpü 20 µL örnek, asetinitril içerisinde çözünmüş 50 mM p-NPB substratının 20 µL'si ve 960 µL aktivite tamponundan (% 4 etanol içeren pH 8.0 Tris-HCl) oluşmuş ve 30 °C'da aktivite ölçümleri gerçekleştirilmiştir (Althalji ve Görgün, 2019). Kör tüpünde enzim çözeltisi yerine aynı hacimde aktivite tamponu kullanılmıştır. Hepatopankreas esteraz aktivitesi için değişen substrat konsantrasyonları (0.05 mM, 0.125 mM, 0.25 mM, 0.50 mM ile 1 mM final konsantrasyondaki beş farklı noktada) ile kadmiyum (0.3, 0.5 ve 0.8 mM), çinko (1.5, 2.5 ve 4 mM), kobalt (10, 15 ve 20 mM) ve nikel (5, 10 ve 20 mM) metalleri ile inkübe edilmiştir. Kör tüpü her bir ölçüm için örnek tüpündeki metal iyonunun konsantrasyonunu içermiştir. Belirtilen bu deney koşullarında esteraz aktivitesi rutin enzim aktivitesi tayinine göre belirlenmek suretiyle kontrol ve inhibitör bulunan tüplere ait elde edilen hızlardan Lineweaver-Burk eğrisi çizilerek her bir metal için inhibisyon kinetiği

belirlenmiştir. Ayrıca çalışılan metal iyonlarının farklı konsantrasyonları kullanılarak IC_{50} değerleri belirlenmiştir.

3. Bulgular

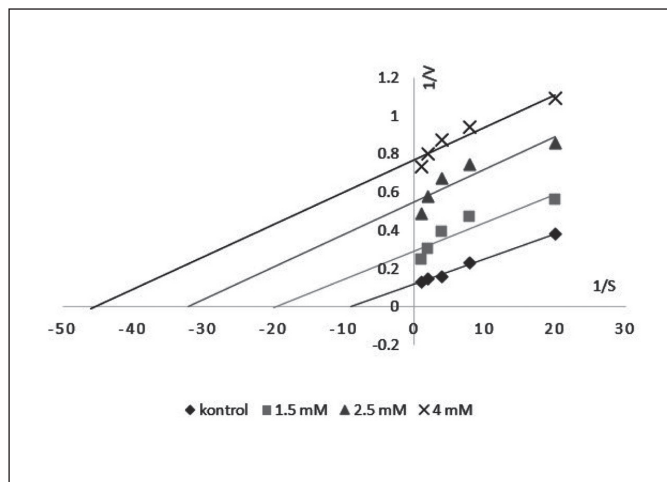
C. sapidus hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine Cd, Co, Zn, Ni metal iyonlarının inhibisyon tipleri, IC_{50} ve K_i değerleri Çizelge 1'de görülmektedir. Hepatopankreas dokusu esteraz aktivitesi üzerine inhibisyon etkisi gösteren metal iyonlarının IC_{50} değerleri, 0.83 mM (Cd) ile 32.21 mM (Co) arasında olduğu belirlenmiştir. Bu veriler Çizelge 1 ve Şekil 5'te sergilenmiştir. Hepatopankreas kas dokusu esteraz aktivitesi üzerine metal iyonlarının sergilemiş oldukları K_i değerlerinin Zn için 0.508 mM (Şekil 1), Cd için 0.692 mM (Şekil 2), Ni için 8.672 mM (Şekil 3) ve Co için ise 14.651 mM (Şekil 4) olduğu bulunmuştur. Çalışmamızda hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine en yüksek inhibisyon etkisi gösteren metallerin çinko ve kadmiyum olduğu belirlenmiştir. En az inhibisyon etkisine sahip olan metallerin ise kobalt ve nikel olduğu görülmektedir.

4. Tartışma

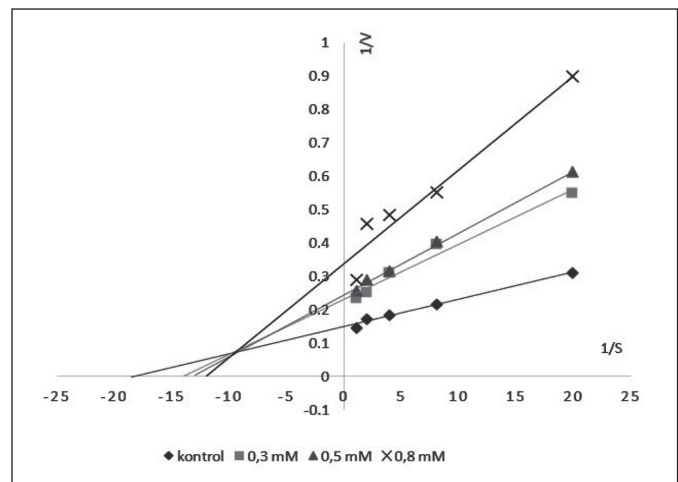
Çalışmamızda elde edilen sonuçlar, insan beslenmesi, ekonomik ve ekolojik açıdan önemli konumdaki bir yengeç türü olan *C. sapidus*'un hepatopankreas esteraz aktivitesinin araştırmamızda kullanılan ağır metallere (Zn, Cd, Co ve Ni) duyarlı olduğunu göstermektedir. Bu duyarlılığın farklı metal iyonlarında farklı derecelerde olduğu göz önüne alındığında, çalışmamızda elde edilen veriler, IC_{50} değerlerinin, Çizelge 1 ve Şekil 5'te görüldüğü üzere, en düşükten en yükseğe doğru Cd, Zn, Ni ve Co sıralamasında olduğunu göstermektedir. Elde edilen bu bulguya göre, hepatopankreas esteraz aktivitesine en yüksek inhibisyon etkisine sahip olan metal iyonu kadmiyumdur. Esansiyel olmayan ve çok düşük konsantrasyonlarda dahi toksik olabileceği belirtilen (Soegianto vd. 2013; Zhang vd. 2019) bir metal iyonu olarak kadmiyum, yengeç dokuları tarafından metabolik olarak regüle edilememektedir. Ayrıca, ülkemiz sularından toplanan mavi yengeç örneklerinde değerlendirildiği üzere, çevresel kirliliğin belirlenmesinde önemli bir indikatör oldu-

Çizelge 1. *Callinectes sapidus* (mavi yengeç) hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine metal iyonlarının inhibisyon tipleri, IC_{50} ve K_i değerleri.

İnhibitör İyon	HEPATOPANKREAS		
	IC_{50} (mM)	K_i (mM)	İnhibisyon Tipi
Cd^{2+}	0.835	0.692	Karışık tip
Zn^{2+}	1.384	0.508	Un-kompetitif
Ni^{2+}	18.140	8.672	Karışık tip
Co^{2+}	32.210	14.651	Un-kompetitif



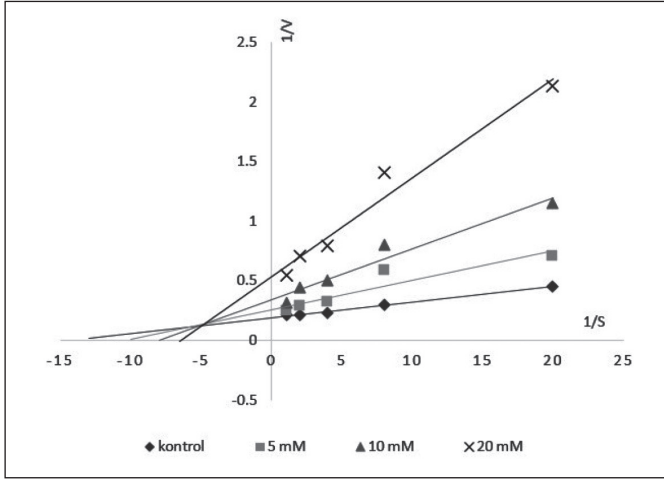
Şekil 1. Çinko'nun (Zn) farklı konsantrasyonlarının *C. sapidus* hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine etkisi.



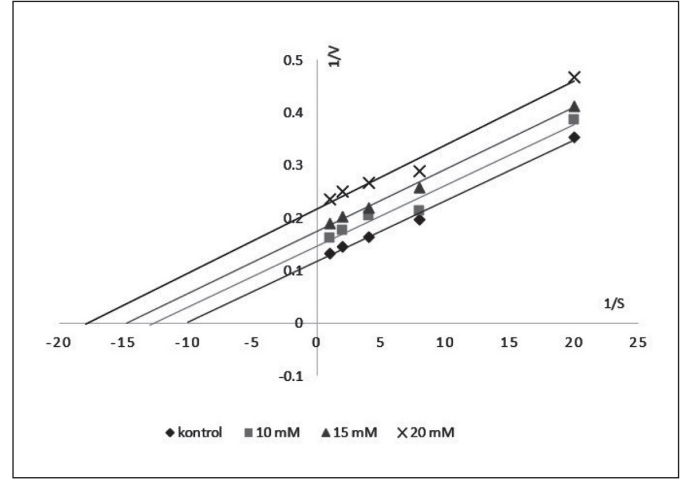
Şekil 2. Kadmiyum'un (Cd) farklı konsantrasyonlarının *C. sapidus* hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine etkisi.

ğu belirtilmektedir (Türkmen vd. 2006; Çoğun vd. 2017). Kadmiyumun birikimi *Pseudocarcinus gigas* (Turoczy vd. 2001), *Cancer irroratus* (Chou vd. 2002) ve *Eriocheir sinensis* (Cheng vd. 2018) gibi diğer yengeç türlerinden de değerlendirilmiştir.

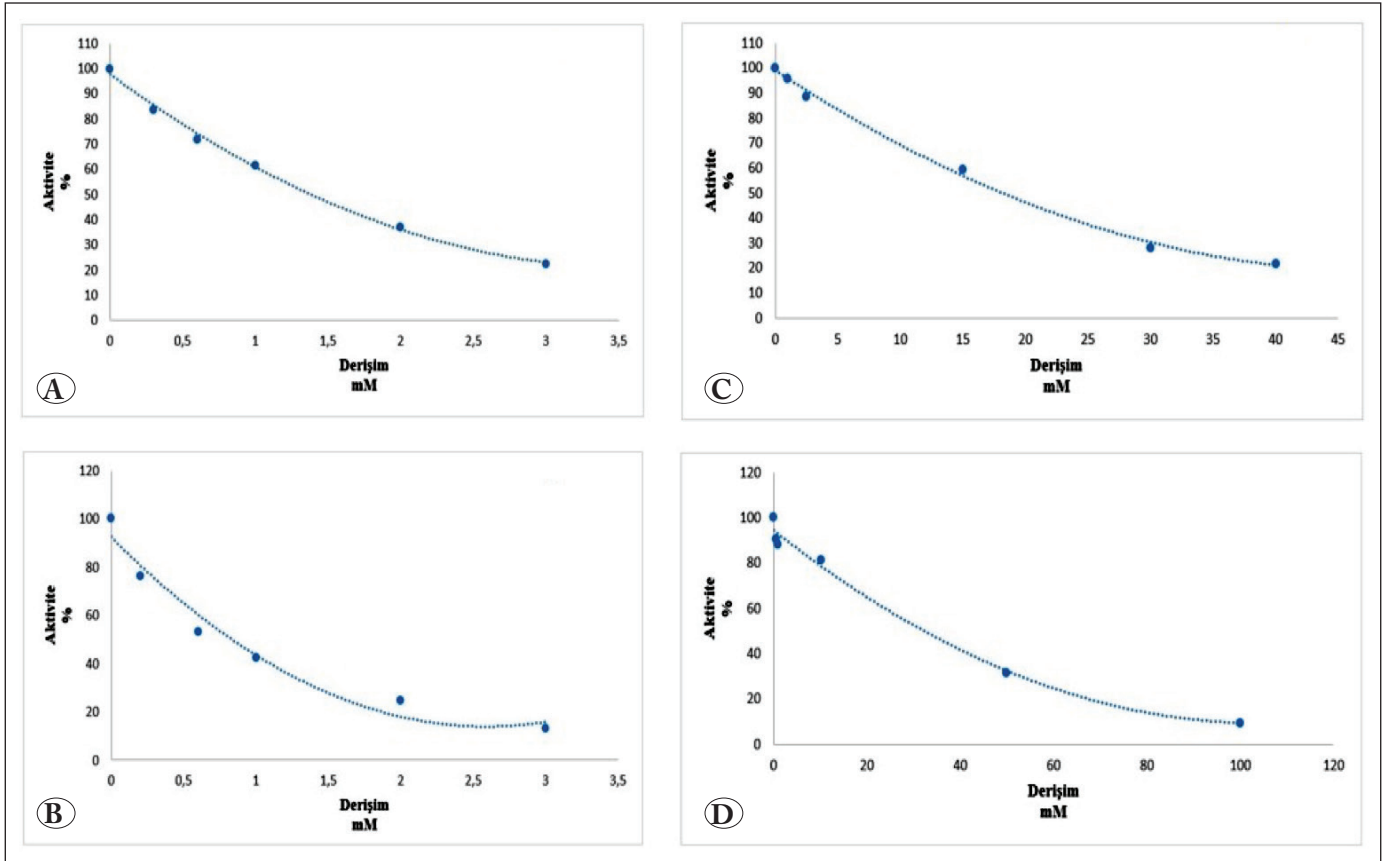
Çalışmamızda hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine kadmiyumdan sonra en fazla inhibisyon etkisi gösteren metal iyonu çinkodur. Ayrıca araştırılan metal iyonları içerisinde en düşük K_i değeri (0.508 mM) çinko için belirlenmiştir. Metabolik olarak gereksinilen ve esansiyel bir metal olan



Şekil 3. Nikel'in (Ni) farklı konsantrasyonlarının *C. sapidus* hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 4. Kobalt'ın (Co) farklı konsantrasyonlarının *C. sapidus* hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerine etkisi.



Şekil 5. Metal iyonlarının IC_{50} değerlerinin belirlenmesi. A) Zn, B) Cd, C) Ni, D) Co

çinkonun dokularda çok fazla birikime uğramadığı daha önceki çalışmalarda (Turoczy vd. 2001; Cresswell vd. 2015) vurgulanmakla birlikte, çalışmamızda kullanılan diğer iyonlar olan kobalt ve nikel ile karşılaştırıldığında, kadmiyuma benzer bir şekilde, çinkonun da düşük konsantrasyonlarının hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerinde önemli inhibisyon etkisine yol açtığı görülmüştür.

Gerek IC_{50} gerekse K_i parametreleri açısından en yüksek değerler sırasıyla kobalt ve nikel iyonları için belirlenmiştir. Bu veriler kobalt ve nikelin *C. sapidus* hepatopankreas esteraz aktivitesi üzerinde inhibisyon etkisinin olduğunu göstermekle birlikte, kadmiyum ve çinkoya göre daha az inhibisyon sergileyen metaller olduklarını önermektedir. Nikel ve kobaltın sucul omurgasızlardaki etkilerini değerlendiren çalışmaların oldukça sınırlı sayıda olduğu görülmektedir. Nikelin bazı hayvansal organizmalarda mikro-esansiyel element olduğu ve aşırı miktarlarının sucul organizmaların davranış, büyüme, gelişim ve üremesini etkilediği bildirilmiştir (Verma 2012). Vitamin B_{12} 'nin yapısında bulunan kobaltın iz miktarları canlılar için esansiyel olmakla birlikte, çevresel konsantrasyonlarının sucul organizmalardaki risk etkileri neredeyse belirsizdir (Stubblefield vd. 2020). Sonuç olarak, sucul omurgasızlarda ağır metallerin dokulardaki birikimlerini ve miktarlarını saptamaya yönelik çok sayıda çalışma olmasına karşın, metabolik enzimler üzerinde sergiledikleri inhibisyon tiplerini belirleyen çalışmaların oldukça sınırlı olduğu görülmektedir. Yapılan bu çalışma ile mavi yengeç hepatopankreas esteraz aktivitesinin çalışmada kullanılan ve inhibisyon seviyeleri farklı olan metallere karşı duyarlı olduğu görülmüş ve çevresel metal kirliliğinin belirlenmesinde önemli bir belirteç enzim olabileceği kanısına varılmıştır.

5. Teşekkür

Bu çalışma Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (CÜBAP) Birimi tarafından F-624 No'lu proje olarak desteklenmiştir. Bu nedenle, teşekkürlerimizi sunuyoruz. Ayrıca, örneklerin toplanması ve teşhisinde yardımcı olan Prof. Dr. Ali Günlü'ye (Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi) teşekkür ederiz.

6. Kaynaklar

Althajji, M., Görgün, S. 2019. Purification and characterization of an esterase from larval *Diplolepis fructuum* (Rübsaamen, 1895) (Hymenoptera: Cynipidae). *Turk. Entomol. Derg.-Tu.* 43(4): 367-376. Doi: 10.16970/entoted.533752

Arya, S., Trivedi, JN., Vachhrajani, KD. 2014. Brachyuran crabs as a biomonitoring tool: A conceptual framework for chemical pollution assessment. *Int. Res. J. of Environment Sci.* 3(1): 49-57.

Cheng, L., Chen, Y., Zheng, YY., Zhan, Y., Zhao, H., Zhou, JL. 2017. Bioaccumulation of sulfadiazine and subsequent enzymatic activities in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Mar. Pollut. Bull.* 121: 176-182. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2017.06.006

Cheng, L., Zhou, JL., Cheng, J. 2018. Bioaccumulation, tissue distribution and joint toxicity of erythromycin and cadmium in Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Chemosphere.* 210: 267-278. Doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.07.005

Chou, C., Paon, L., Moffatt, J. 2002. Cadmium, copper, manganese, silver, and zinc in rock crab (*Cancer irroratus*) from highly copper contaminated sites in the inner Bay of Fundy, Atlantic Canada. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68: 885-892. Doi: 10.1007/s00128-002-0037-2

Cresswell, T., Simpson, SL., Mazumder, D., Callaghan, PD., Nguyen AP. 2015. Bioaccumulation kinetics and organ distribution of cadmium and zinc in the freshwater decapod crustacean *Macrobrachium australiense*. *Environ. Sci. Technol.* 49(2): 1182-1189. Doi: 10.1021/es505254w

Çoğun, HY., Firat, Ö., Aytakin, T., Firidin, G., Firat, Ö., Varkal, H., Temiz, Ö., Kargin, F. 2017. Heavy metals in the blue crab (*Callinectes sapidus*) in Mersin Bay, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 98: 824-829. Doi: 10.1007/s00128-017-2086-6

Elumalai, M., Antunes, C., Guilhermino, L. 2005. Alterations of reproductive parameters in the crab *Carcinus maenas* after exposure to metals. *Water Air Soil Pollut.* 160: 245-258. Doi: 10.1007/s11270-005-2992-9

Franceschini-Vicentini, IB., Ribeiro, K., Papa, LP. 2009. Histoarchitectural features of the hepatopancreas of the amazon river prawn *Macrobrachium amazonicum*. *Int. J. Morphol.* 27: 121-128. Doi: 10.4067/S0717-95022009000100022

Frasco, MF., Erzen, I., Stojan, J., Guilhermino, L. 2010. Localization and properties of cholinesterases in the common prawn (*Palaemon serratus*): A kinetic-histochemical study. *Biol. Bull.* 218: 1-5. Doi: 10.1086/BBLv218n1p1

Lima, AVB., Guerra AL., de Almeida, EA., Taddei, FG., Castiglioni, L. 2013. Characterization of esterase patterns in hepatopancreas of three species of *Macrobrachium* (Palaemonidae). *Biochem. Syst. Ecol.* 47: 132-138. Doi: 10.1016/j.bse.2012.10.006

Liu, J., Wu, H., Feng, J., Li, Z., Lin, G. 2014. Heavy metal contamination and ecological risk assessments in sediments and zoobenthos of selected mangrove ecosystems, South China. *Catena.* 119, 136-142. Doi: 10.1016/j.catena.2014.02.009

- Peterson, MJ., Smith, JG., Southworth, GR., Ryon, MG., Eddlemon, GK. 2002.** Trace element contamination in benthic macroinvertebrates from a small stream near a uranium mill Tailings Site. *Environ. Monit. Assess.* 74:193–208. doi:10.1023/A:1013872103460
- Rainbow, PS., Luoma, SN. 2011.** Metal toxicity, uptake and bioaccumulation in aquatic invertebrates: Modelling zinc in crustaceans. *Aquat. Toxicol.* 105(3–4): 455–465. Doi: 10.1016/j.aquatox.2011.08.001
- Soegianto, A., Winarni, D., Handayani, US., Hartati, H. 2013.** Bioaccumulation, elimination, and toxic effect of cadmium on structure of gills and hepatopancreas of freshwater prawn *Macrobrachium sintangense* (De Man, 1898). *Water Air Soil Pollut.* 224: 1575–1585. Doi: 10.1007/s11270-013-1575-4
- Stubblefield, WA., Genderen, EV, Cardwell, AS., Heijerick, DG., Janssen, CR., De Schampelaere, KAC. 2020.** Acute and chronic toxicity of cobalt to freshwater organisms: using a species sensitivity distribution approach to establish international water quality standards. *Environ. Toxicol. Chem.* 39(4): 799–811. Doi: 10.1002/etc.4662
- Turoczy, NJ., Mitchell, BD., Levings, AH., Rajendram, VS. 2001.** Cadmium, copper, mercury, and zinc concentrations in tissues of the king crab (*Pseudocarcinus gigas*) from southeast Australian waters. *Environ. Int.* 27(4): 327–34. Doi: 10.1016/s0160-4120(01)00064-2
- Türkmen, A., Türkmen, M., Tepe, Y., Mazlum, Y., Oymael, S. 2006.** Metal concentrations in blue crab (*Callinectes sapidus*) and mullet (*Mugil cephalus*) in İskenderun Bay, Northern East Mediterranean, Turkey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 77:186–193. Doi: 10.1007/s00128-006-1049-0
- Verma, RS. 2012.** Acute toxicity of nickel to fresh water prawns. *Turk. J. Zool.* 36(4): 534–542. Doi: 10.3906/zoo-1102-18
- Zhang, Z. Fang, Z., Li, J., Sui, T., Lin, L., Xu, X. 2019.** Copper, zinc, manganese, cadmium and chromium in crabs from the mangrove wetlands in Qi'ao Island, South China: Levels, bioaccumulation and dietary exposure. *WEE.* 1(2019): 26–32. Doi: 10.1016/j.wsee.2019.09.001
- Zhao, S., Feng, C., Quan, W., Chen, X., Niu, J., Shen, Z. 2012.** Role of living environments in the accumulation characteristics of heavy metals in fishes and crabs in the Yangtze River Estuary, China. *Mar. Pollut. Bullet.* 64, 1163–1171. Doi: 10.1016/j.marpolbul.2012.03.023