

1-1-1999

Accumulaton of Metal and Metal Mixture in the Spleen, Brain and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica*

MURAT KARAKOÇ

FERİT KARGIN

Follow this and additional works at: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology>



Part of the [Zooology Commons](#)

Recommended Citation

KARAKOÇ, MURAT and KARGIN, FERİT (1999) "Accumulaton of Metal and Metal Mixture in the Spleen, Brain and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica*," *Turkish Journal of Zoology*. Vol. 23: No. 6, Article 31. Available at: <https://journals.tubitak.gov.tr/zoology/vol23/iss6/31>

This Article is brought to you for free and open access by TÜBİTAK Academic Journals. It has been accepted for inclusion in Turkish Journal of Zoology by an authorized editor of TÜBİTAK Academic Journals. For more information, please contact academic.publications@tubitak.gov.tr.

***Tilapia nilotica*'da Metal ve Metal Karışımının Dalak, Beyin ve Kas Dokularındaki Birikimi**

Murat KARAKOÇ, Ferit KARGIN

Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Adana-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 18.02.1997

Özet: Bu araştırmada çinko, bakır ve çinko-bakır karışımında *Tilapia nilotica*'nın dalak, beyin ve kas dokularındaki metal birikimi belirlenmiştir.

Üç seri olarak planlanan deneylerde, balıklar birinci seride bakırın 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm, ikinci seride çinkonun 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm ve üçüncü seride bakır-çinko karışımlarının 0.1+1.0, 0.5+5.0 ve 1.0+10.0 ppm derişimlerinin etkisine 30 ve 60 gün sürelerle bırakılmışlardır.

Deneylerde en yüksek bakır, çinko ve bakır-çinko derişimlerinde mortalite gözlenmemiştir. Belirlenen süreler sonunda her iki halde de (tek tek ve karışım halinde) en yüksek bakır ve çinko birikimleri dalakta olurken, bu iki metalin en düşük birikimleri ise beyinde olmuştur. Dokularda bir metalin birikimi diğer metalin varlığında azalmıştır.

Anahtar Sözcükler: Ağır Metal Birikimi, Bakır-Çinko Karışımı, Balık.

Accumulaton of Metal and Metal Mixture in the Spleen, Brain and Muscle Tissues of *Tilapia nilotica*

Abstract: Accumulation of zinc and copper in the spleen, brain and muscle tissues of *Tilapia nilotica* was investigated by using copper (0.1, 0.5 and 1.0 ppm) and zinc (1.0, 5.0 and 10.0 ppm) and copper-zinc mixture (0.1+1.0, 0.5+5.0 and 1.0+10.0 ppm) in the medium for the periods of 30 and 60 days.

No mortality was observed during the exposure to of copper, zinc and copper-zinc mixtures over 60 days In both cases (alone and mixture) the highest levels of zinc and copper were accumulated in the spleen, whereas accumulation was the lowest in the brain. Accumulation of a metal in the tissues decreased in the presence of the other metal.

Key Words: Heavy metal accumulation, Capper-Zinc mixture, Fish.

Giriş

Bakır ve çinko omurgalı hayvanlarda kemik oluşumu, kalbin çalışması, hücreler arası bağışıklık ve bağı dokusu gelişiminde işlev yapmaları nedeniyle (1) diğer ağır metallerle oranla organizmaların yaşamını devam ettirebilmele-ri için eser miktarlarda gereksinim duydukları metallerdir (2,3). Ancak ortamdaki derişimlerinin artması durumunda organizmalara toksik etki yapar (4,5).

Ağır metal karışımlarının balıklardaki birikimleri, metallerin tek tek etkisine göre yeterli bir şekilde çalışılmamış olması ve doğada metallere genelde çeşitli kombinasyonlarda bulunması nedeniyle konu ile ilgili araştırmalar son yıllarda yoğunluk kazanmıştır (6-9).

Çeşitli metal karışımlarının organizmalar üzerine olan toksik etkileri ve birikimleri söz konusu metallere ve organizmaya bağılı olarak derişim gösterir (10-12).

Balıklarda metal karışımının çalışılması, metallerin birikimi, biyotransformasyonu ve atılımlarının belirlenmesi açısından çok önemlidir (13). Genel olarak bazı ağır metallerin diğer metallere birlikte bulunmaları durumunda, organizmalara olan toksik etkilerinde derişimler olabileceğı çeşitli araştırmacılar tarafından ileri sürülmektedir (14,15).

Bu çalışmada bakır ve çinko ile bu iki metalin karışımının *Tilapia nilotica*'nın dalak, beyin ve kas dokularındaki birikimlerinin derişim ve süre artışına paralel olarak belirlenmesi amaçlanmıştır.

Materyal ve Yöntem

Araştırma materyali olarak yetiştirme havuzlarından laboratuvara getirilen *T.nilotica* 40x120x40 cm

boyutlarında 10 stok akvaryum içerisinde bir ay süre ile beslenmiş ve laboratuvar koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde balıklar 11.24±1.54 cm boya ulaşmışlardır.

Deneyler bakır, çinko ve bakır-çinko karışımının dokudaki metal birikimine etkisini belirlemek amacıyla üç seri olarak yürütülmüştür. Balıklar birinci seride bakırın 0.1, 0.5 ve 1.0 ppm, ikinci seride çinkonun 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm ve üçüncü seride bakır-çinko karışımlarının 0.1+1.0, 0.5+5.0 ve 1.0+10.0 ppm derişimlerinin etkisine 30 ve 60 gün sürelerle bırakılmışlardır.

Deneylerin sona erdirildiği 30 ve 60 günlük süreler dikkate alınarak her seride bulunan 40x120x40 cm boyutlarında 120 şer litre deney ortamı içeren 4 akvaryumdan ilk üçüne gerekli metal çözeltisi eklenmiş dördüncü akvaryumlara ise aynı miktarlarda balıkların normal olarak yaşadıkları su konarak kontrol akvaryumu olarak kullanılmışlardır. Her akvaryum içerisine başlangıçta 12 balık konularak deneyler üç tekrarlı olarak yürütülmüş ve her tekrarda 2 balık olmak üzere her süre ve metal/metal karışımı için 6 balık analiz edilmiştir. Balıklar birey başına günde yaklaşık 20 mg yem olacak şekilde beslenmişlerdir.

Deney ortamının bazı fiziksel ve kimyasal parametreleri aşağıda belirtildiği şekilde saptanmıştır;

Sıcaklık	25 °C ± 1°C
Toplam sertlik	235±1.17 ppm CaCO ₃
pH	7.7 ± 0.62

Çözünmüş Oksijen 7.4±0.28 ppm

Deneylerde kullanılan bakır çözeltileri 1M bakır-sodyum sitrat (6350 ppm Cu) stok çözeltisinden, çinko çözeltisi ise 1M çinko-sodyum sitrat (6538 ppm Zn) stok çözeltisinden seri seyreltme yöntemi ile hazırlanmış ve tüm ortam çözeltileri her üç günde bir yeni hazırlanmış stok çözelti kullanılarak değiştirilmiştir.

Belirlenen süreler sonunda doku örneklerinin bakır ve çinko analizleri Perkin Elmer as 3100 Atomik Absorbsiyon Spektrofotometresi ile yapılmıştır. Bu amaçla balıkların dalak, beyin ve kasları disekte edilmiş 105 °C'ye ayarlanmış bir etüv içerisinde 48 saat süreyle kurutulmaya bırakılmışlardır. Bu süre sonunda kuru ağırlıkları belirlenen doku ve organlar deney tüplerine aktarılarak üzerlerine nitrik asit (Merck %65)-perklorik asit (Merck %60) karışımı (2:1) eklenmiş (16) ve geri soğutma sistemli ocaklarda 120 °C sıcaklıkta 3 saat süreyle yakılmıştır. Yakımı tamamlanan çözeltiler polietilen tüplere aktarılarak üzerleri saf su ile 5 cc'ye tamamlanmış ve bu çözeltilerde metal analizleri yapılmıştır. Deneylerden elde edilen verilerin istatistik analizleri Student-Newman Keul's (SNK) ile yapılmıştır (17).

Araştırma Bulguları

Deneylerde en yüksek bakır (1.0 ppm), çinko (10.0 ppm) ve bakır-çinko (1.0+10.0 ppm) karışımlarına 60 gün süreyle bırakılan balıklarda ölüm gözlenmemiştir.

Belirlenen her derişim ve sürede bir doku için üç tekrarlı olarak saptanan metal düzeylerinin aritmetik

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	150.6±3.02 as	149.2±1.82 as
	Çinko	414.1±1.23 bs	710.5±3.15 bt
	Karışım	367.5±2.75 cs	640.3±3.15 ct
Kas	Kontrol	79.4±2.02 as	81.1±1.23 as
	Çinko	164.9±2.56 bs	186.5±1.73 bt
	Karışım	129.5±1.13 cs	168.1±2.10 ct
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Çinko	114.9±2.98 as	161.7±1.23 at
	Karışım	90.23±1.32 bs	145.1±1.57 bt

Tablo 1. 1.0 ppm çinko ve 1.0+0.1 ppm çinko+bakır karışımına bırakılan *T. nilotica*'nın dokularında çinko birikimi ($\mu\text{g Zn/g}$ kuru ağırlık.)

* = SNK; a, b ve c harfleri kontrol, çinko ve karışım arasındaki ayırmaları; s ve t harfleri dokulardaki metal birikimine sürenin etkisini belirtmek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.01$ düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	150.6±3.02 as	149.2±1.82 as
	Çinko	457.3±1.73 bs	814.5±3.05 bt
	Karışım	403.8±2.75 cs	701.4±3.82 ct
Kas	Kontrol	79.4±2.02 as	81.1±1.23 as
	Çinko	179.5±2.25 bs	290.7±1.86 bt
	Karışım	147.9±1.92 cs	176.6±2.36 ct
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Çinko	149.8±1.35 as	186.5±2.12 at
	Karışım	123.9±1.65 bs	161.7±1.92 bt

* = Kısaltmalar Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 2.

5.0 ppm çinko ve 5.0+0.5 ppm çinko+bakır karışımına bırakılan *T.nilotica*'nın dokularında çinko birikimi ($\mu\text{g Zn/g}$ kuru ağırlık.)

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	150.6±3.02 as	149.2±1.82 as
	Çinko	534.2±3.61 bs	994.6±3.87 bt
	Karışım	474.2±3.06 cs	829.7±3.92 ct
Kas	Kontrol	79.4±2.02 as	81.1±1.23 as
	Çinko	210.2±2.47 bs	340.3±2.34 bt
	Karışım	162.6±1.12 cs	208.6±2.15 ct
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Çinko	173.7±2.24 as	204.5±2.36 at
	Karışım	134.6±2.15 bs	174.81±1.74 bt

* = Kısaltmalar Tablo 1'deki gibidir.

Tablo 3.

10.0 ppm çinko ve 10.0+1.0 ppm çinko+bakır karışımına bırakılan *T.nilotica*'nın dokularında çinko birikimi ($\mu\text{g Zn/g}$ kuru ağırlık.)

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	58.6±0.72 as	60.4±2.12 as
	Bakır	130.6±2.56 bs	151.6±2.30 bt
	Karışım	100.8±2.59 cs	137.9±1.26 ct
Kas	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	10.1±0.21 as	14.3±0.39 at
	Karışım	7.1±0.16 bs	12.0±0.05 bt
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	5.2±0.12 as	7.3±0.20 at
	Karışım	3.2±0.03 bs	5.1±0.07 bt

* = SNK; a, b ve c harfleri kontrol, bakır ve karışım arasındaki ayırmaları; s ve t harfleri dokulardaki metal birikimine sürenin etkisini belirtmek için kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P < 0.01$ düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Tablo 4.

0.1 ppm bakır ve 0.1+1.0 ppm bakır+çinko karışımına bırakılan *T.nilotica*'nın dokularında bakır birikimi ($\mu\text{g Cu/g}$ kuru ağırlık.)

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	58.6±0.72 as	60.4±2.12 as
	Bakır	150.1±2.61 bs	181.9±1.65 bt
	Karışım	123.0±1.73 cs	161.7±1.72 ct
Kas	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	11.9±0.15 as	24.7±0.20 at
	Karışım	8.2±0.21 bs	14.9±0.75 bt
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	6.3±0.13 as	8.6±0.18 at
	Karışım	4.2±0.09 bs	6.2±0.12 bt

* = Kısaltmalar Tablo 4'deki gibidir.

Tablo 5. 0.5 ppm bakır ve 0.5+5.0 ppm bakır+çinko karışımına bırakılan *T.nilotica*'nın dokularında bakır birikimi ($\mu\text{g Cu/g}$ kuru ağırlık.)

Doku	Grup	Süre (gün)	
		30	60
		$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$	$\bar{X} \pm S\bar{X}^*$
Dalak	Kontrol	58.6±0.72 as	60.4±2.12 as
	Bakır	172.5±2.97 bs	213.8±1.83 bt
	Karışım	154.9±1.55 cs	190.2±1.14 ct
Kas	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	17.5±0.41 as	31.6±0.85 at
	Karışım	13.0±0.19 bs	24.4±0.52 bt
Beyin	Kontrol	0.00	0.00
	Bakır	8.3±0.18 as	10.7±0.23 at
	Karışım	6.1±0.14 bs	8.5±0.18 bt

* = Kısaltmalar Tablo 4'deki gibidir.

Tablo 6. 1.0 ppm bakır ve 1.0+10.0 ppm bakır+çinko karışımına bırakılan *T.nilotica*'nın dokularında bakır birikimi ($\mu\text{g Cu/g}$ kuru ağırlık.)

ortalamarı alınarak Tablo 1-6'da verilmiştir. Metallerin tek başına ve karışımlarındaki doku birikimlerini karşılaştırmak, aynı zamanda etkide kalma süresinin doku birikimine etkisini saptamak amacı ile yapılan istatistik testlerin sonuçları Tablo 1-6'da sunulmuştur.

Tüm ortam derişimlerinde *T.nilotica*'nın dokularındaki çinko birikimi, hem çinko tek başına kullanıldığında hemde bakır-çinko karışımında süreye bağlı olarak artma göstermiştir. Denenen tüm süreler sonunda karışımın etkisindeki balıklarla doğrudan çinkonun etkisine bırakılan balıklardaki çinko düzeyi arasında önemli bir istatistik ayırım vardır (Tablo 1-3, SNK; $P < 0.01$). Karışımındaki balıkların kas dokularındaki çinko birikimi, doğrudan çinko'nun etkisine bırakılan balıklara göre %20 azalmıştır. Tüm ortam koşullarında çinko birikimi en fazla dalakta olmuş bunu kas ve beyin izlemiştir.

Denenen koşullarda *T.nilotica*'nın dokularındaki bakır birikimi hem doğrudan bakırın etkisinde hemde çinko-bakır karışımında süreye bağlı olarak artmıştır. Belirli bir derişim ve süre sonunda dokudaki bakır birikimi, doğrudan bakırın etkisinde kalan balıklarda, karışımın etkisinde kalan balıklara oranla önemli derecede yüksektir (Tablo 4-6, SNK; $P < 0.01$). Yalnız bakıra oranla, çinko-bakır karışımındaki balıkların kas dokusundaki bakır birikimi yaklaşık %40 azalmıştır. Denenen tüm süre ve ortam derişimlerinde bakır birikimi en fazla dalakta bulunmuş, bunu kas ve beyin izlemiştir.

Tartışma

Bu çalışmada, çinko-bakır karışımının en yüksek derişimlerine 60 gün süre ile bırakılan *T.nilotica*'da

mortalite saptanmamıştır. Aynı zamanda balıklarda herhangi bir davranış bozukluğu görülmemiştir. Ortamda birden fazla metal bulunması durumunda bu metallerin mortalite üzerine etkileri metallere ve organizmaya bağlı olarak değişim göstermektedir (18, 19). Bakırın *Cyprinus carpio* ile *T.nilotica*'da doku birikimi ve mortalite üzerine etkisi ilgili yapılan bir çalışmada 10 ppm bakırın etkisinde *C.carpio*'da mortalite %100 iken *T. nilotica*'da %33 olarak bulunmuştur (20). Eisler ve Gardner (6), *Fundulus heteroclitus* ile yaptıkları çalışmada bakır ve çinko tuzlarının karışımı mortaliteyi arttırdığını belirtmektedirler. *T.nilotica* bakır-çinko kirliliğine diğer tatlı su balıklarından daha dirençlidir (21). Metal karışımlarının balıklar üzerindeki toksik etkilerinin artışına sıcaklık, pH, sertlik ve oksijen gibi faktörlerin etkili olduğu belirtilmiştir (22). Bu çalışmada deneyler süresince ortam faktörleri normal sınırlarda belirlenmiştir.

Balıklarda doku ve organlarda biriken bakır ve çinko gibi metaller, etkide kalınan süreye ve ortam derişimine bağlı olarak artmaktadır (23, 24). *T.nilotica* ile yapılan bu çalışmada çinko, bakır ve çinko-bakır karışımının etkisinde incelenen dalak, beyin ve kas dokularındaki bakır ve çinko birikimi ortam derişimi ve etkide kalınan sürenin artışına paralel olarak deney süresinin sonuna kadar artmıştır.

Ağır metaller öldürücü olmayan derişimlerde genellikle balıkların metabolik olarak aktif olan organlarında daha fazla birikmektedir. Dalak balık metabolizmasında aktif bir organ olup, metallerin alınımları ve atılımları önemli bir organ olarak görev yapar. Çeşitli balıklar üzerinde (25, 26) yapılan çalışmalarda dalaktaki metal birikiminin diğer dokulara göre oldukça

yüksek düzeyde olduğu saptanmıştır. Balıklarda dalak, metallerin depolanmasında önemli bir organ olup metalleri bağlayarak toksik etkilerinin yok edilmesinde işlev yapan metallothionein gibi düşük molekül ağırlıklı proteinleri başlıca sentezleme yeridir (27). *T.nilotica*'nın dalığında saptanan yüksek çinko ve bakır derişimleri, dalığın bu metalleri depolamada etkin bir işlevi olduğunu göstermektedir.

Balıkların beyin ve kas dokusu her iki metalde etkide kalınan sürelerde düşük düzeylerde biriktirmişlerdir. Civa'nın dışında (28) kasların metalleri bağlamada aktif olmadıkları belirtilmektedir (29). Beyin ve kemik kurşunu yüksek düzeyde biriktiren (30) diğer metalleri biriktirmede önemli bir organ olmadığı belirlenmiştir (26,31). *T.nilotica*'dan elde edilen bulgular da beyin ve kas dokusundaki çinko ve bakır derişimlerinin, dalağa oranla çok düşük değerde olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmada bakır-çinko karışımının etkisinde incelenen doku ve organlardaki bakır ve çinko birikiminin, doğrudan bakır ve çinkonun etkisine bırakılanlara oranla daha düşük olduğu saptanmıştır. *C.lazera*'da bakır-çinko etkileşiminde doku birikimi üzerine yapılan bir çalışmada, bir metalin alınımı veya birikiminin diğer metalin varlığında azaldığı saptanmıştır (21). Rolaes ve Perlmutter (32), *Trichogaster trichopterus* ile yaptıkları bir çalışmada civa ve bakırın birbirine antagonistik etki yaptıklarını belirtmişlerdir. *T.nilotica*'nın doku ve organlarında metal birikimi yönünden bakır ve çinkonun birbirlerine antagonistik etki yapmalarının nedeni, kısmen metallothionein gibi protein taşıyıcılar üzerinde bağlanma noktaları ve metallerin vücuda alınım yeri için bu iki metal arasındaki rekabetle açıklanabilir.

Kaynaklar

1. Coins, R.J., Absorbtion, Transport and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc; Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Hphysiological Reviews, 65 (2), 238-309, 1985.
2. Tort, L., Torres, P. and Flos, R. Effects on dogfish Haematology and Liver Composition After Acute Exposure. Comp. Biochem. Physiol., 87 C, No. 2, 349, 353, 1987.
3. Johnson, I., The Effects of Combinations of Heavy Metals, Hypoxia and salinity on Ion Regulation in Crangon crangon (L.) Comp. Biochem. Physiol., 91C, No. 2, 459-463, 1988.
4. Crespo, S. and Blasch, J. Mortality, Accumulation and Distribution of Zinc in the Gill System of Dogfish Following Zinc Treatment. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24, 940-944, 1980.
5. Arumugam, M. and Ravindranath, M.H., Copper Toxicity in the Crab, *Scylla serrate*. Copper Levels in Tissues and Regulation After Exposure to a Copper-Rich Medium. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39, 708-715, 1987.
6. Eisler, R. and Gardner, G.R., Acute Toxicology to an Estuarine Teleost of Mixtures of Cadmium, Copper and Zinc Salts. J. Fish. Biol., 5, 131-142, 1973.
7. Ahsanullah, M., Negilski, D.S. and Mobley, M.C., Toxicity of Zinc, Cadmium and Copper to the Shrimp *Callinassa australiensis*. III. Accumulation of Metals. Mar. Biol., 64, 311-316, 1981.
8. Elliot, N.G., Swain, R. and Ritz, D.A., Metal Interaction During Accumulation by the Mussel *Mytilus Edilus planulatus*. Marine Biology., 93, 395-399, 1986.

9. Hutchinson, N.J. and Sprague, J.B., Lethality of Trace Metal Mixtures to American Flagfishes in Neutralized Acid Water. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18, 249-254, 1989.
10. Moraitou-Apostolopoulou, M. and Verriopoulos, G., Individual and Combined Toxicity of three Heavy Metals, Cu, Cd and Cr for the Marine Copepod *Tisbe holothuria*. Hydrobiologia, 87, 83-87, 1982.
11. Weis, J.S., Effect of Zinc on Regeneration in the Fiddler Crab *Uca pugnator* and its Interaction with Methylmercury and Cadmium. Marine Environmental Research, 3, 249-255, 1980.
12. Lucu, C. and Skreblin, M., Evidence on the Interaction of Mercury and Selenium in the Shrimp *Palaemon elegans*. Marine Environmental Research, 3, 265-274, 1981.
13. Wicklund, A., Runn, P. and Norrgren, L., Cadmium and Zinc Interaction in Fish: Effects of Zinc on the Uptake, Organ Distribution and Elimination of ^{109}Cd in the Zebrafish, *Brachydanio rerio*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17, 345-354, 1988.
14. Pagenkopf, G.K., Gill Surface Interaction Model for Trace Metal Toxicity to Fishes: Role of Complexation, pH and Water Hardness. Environ. Sci. Technol., 17, No.6, 342-347, 1983.
15. Negiski, D.S., Ahsanullah, M. and Mobley, M.C., Toxicity of Zinc, Cadmium and Copper to the Shrimp *Callinassa australiensis* II. Effect of Paired and Triad Combinations of Metals. Marine Biology, 64, 305-309, 1981.
16. Muramoto, S., Elimination of Copper from Cu-Contaminated Fish by Long-Term Exposure to EDTA and Fresh-Water. J. Environ. Sci Health., A18(3), 455-461, 1983.
17. Sokal, R.R. and Rohlf, J.F., "Biometry". W.II. Freeman and Company, San Francisco. 776 pp., 1969.
18. Verriopoulos, G., Moraitou-Apostolopoulou, M. and Milliou, E., Combined Toxicity of Four Toxicants (Cu, Cr, Oil, il Dispersant) to *Artemia salina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38, 483-490, 1987.
19. Brown, M.W., Thomas, D.G., Shurben, D., Solbe, J.F., De, L.G., Kay, J. and Creyer, A., A Comparison of Differential Accumulation of Cadmium in the Tissue of Three Species of Freshwater Fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus*, *Noemachilus barbatulus*. Comp. Biochem. Physiol., 84 C (2), 213-217, 1986.
20. Erdem, C. and Kargin, F., 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, Cilt XVII, Sayı: 1, S: 13-27, 1992.
21. Hilmy, A.M., El-Domiatiy, N.A., Daabees, A.Y. and Alsarha, A., The Toxicity to *Clarias lazera* of Copper and Zinc Applied Jointly. Comp. Biochem. Physiol, 87C, No. 2, 309-314, 1987.
22. Gupta, A.K. and Rojbanshi, V.K., Toxicity of Copper and Cadmium to *Heteropneustes fossilis*. Acta Hydrochim Hydrobiol, 19, 3, 331-340, 1991.
23. Brungs, W.A., Leonard, E. N. and McKim, J.M; Acute and Long Term Accumulation of Copper by the Brown Bullhead, *Ictalurus nebulosus*. J. Mar. Res. Board. Can., 30, 583-586, 1973.
24. Sanpera, C., Vallibera, M. and Crespo, S., Zn, Cu and Mn Levels in the Liver Dogfish Exposed to Zn. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 31, 415-417, 1983.
25. Flos, R., Caritat, A. and Balasch, J., Zinc Content in Organs of Dogfish (*Scyliorhinus canicula* L.) Subjected to Sublethal Experimental Aquatic Zinc Pollution. Comp. Biochem. Physiol, 64C, 77-81, 1979.
26. Thomas, D.G., Brown, M.W., Shurben, D., Solbe, J.F; D.G., Cryer, A and Kay, J., A Comparison of the Sequestration of Cadmium and Zinc in the Tissues of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) following Exposure to the Metals Singly or in Combination. Comp. Biochem. Physiol, 82C, (1), 55-62, 1985.
27. Cherian, M.G. and Goyer, R.A., Metallothioneins and their Role in the Metabolism and Toxicity of Metals. Life Sciences, 23, 1-10, 1978.
28. Heath, A.G., Water Pollution and Fish Physiology. CRC Press, Inc. Boca Rotan, Florida, 245 pp, 1987.
29. El-Nabawi, A., Heinzow, B. and Kruse, H., As, Cd, Cu, Pb; Hg and Zn in Fish from the Alexandria Region, Egypt. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39, 889-897, 1987.
30. Varanasi, U. and Markey, D., Uptake and Release of Lead and Cadmium in Skin and Mucus of Cho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comp. Biochem. Physiol. Vol. 60C, pp. 1987-191, 1977.
31. Felts, P.A. and Heath, A.G., Interactions of Temperature and Sublethal Environmental Copper Exposure on the Energy Metabolism of Bluegill, *Lepomis Macrochirus*. J. Fish. Biol., 25-444-453, 1984.
32. Roales, R.R. and Perlmutter, A., Toxicity, of Methylmercury and Copper, Applied Singly and Jointly, to the Blue Gourami, *Trichogaster trichopterus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., Vol. 12, No. 5, 633-638, 1974.