

***Oreochromis niloticus*'un (Nil Tilapyası) solungaç ve kas dokularında civanın bazı enzimlere etkisi**

Effects of mercury on some enzymes in the gill and muscle tissues of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia)

Gülbin Firdin 

Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Çevre Bilimleri Anabilim Dalı, 06503 Teknikokullar, Ankara, Türkiye
gulbinfirdin@gazi.edu.tr

Received date: 15.11.2016

Accepted date: 09.02.2017

How to cite this paper:

Firdin, G. (2017). Effects of mercury on some enzymes in the gill and muscle tissues of *Oreochromis niloticus* (Nile tilapia). *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 34(2): 133-137. doi:10.12714/egejfas.2017.34.2.03

Öz Akuatik ekosistemler üzerine metallerin toksik etkileri balıklarda enzim aktivitelerinin ölçülmesiyle değerlendirilebilmektedir. Bu çalışmada civanın (Hg) *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)'un solungaç ve kas dokularında asetilkolinesteraz (AChE), glutatyon peroksidaz (GPx) ve glutamik piruvat transaminaz (GPT) aktivitelerine etkisi incelenmiştir. Balıklar 7 ve 21 günlük sürelerle 0,1 ve 0,01 ppm Hg konsantrasyonlarının etkisine maruz bırakılmıştır. Dokuların enzim aktiviteleri ultraviyole spektrofotometrik yöntem ile belirlenmiştir. Civa etkisinde AChE aktivitesi kontrol grubuna göre solungaç ve kas dokularında genel olarak azalırken GPx aktivitesi artmıştır. Kas GPT aktivitesi her iki sürede de kontrol grubuna göre artmıştır. Solungaçta GPT aktivitesi ise ilk 7 günlük sürede artarken 21 günlük sürede azalmıştır. Araştırma sonuçları düşük ve yüksek civa konsantrasyonlarının *Oreochromis niloticus*'un solungaç ve kas dokularında AChE, GPx ve GPT aktivitelerinin değişmesine neden olduğunu göstermiştir.

Anahtar kelimeler: *Oreochromis niloticus*, solungaç, kas, civa, enzim

Abstract: The toxic effects of the metals on the aquatic ecosystems can be found by measuring enzyme activities of fish tissues. This study aimed to analyze the results of mercury (Hg) exposure on the change of the acetylcholinesterase (AChE), glutathione peroxidase (GPx) and glutamic pyruvate transaminase (GPT) activities in gills and muscles of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758). The fish were exposed to 0.1 and 0.01 ppm Hg for periods of 7 and 21 days. The enzyme activities in the tissues were determined by the use of ultraviolet spectroscopy. The AChE activity decreased while the GPx activity increased in both muscle and gills as a result to exposure to Hg in experimental group when compared to the control group. The GPT activity in gills were found to increase in the first 7 days of exposure and decreased after the exposure of 21 days. The data obtained revealed that AChE, GPx and GPT activities in the gill and muscle tissues of *Oreochromis niloticus* were observed to change as a result of the exposures of both low and high mercury concentrations.

Keywords: *Oreochromis niloticus*, gill, muscle, mercury, enzyme

GİRİŞ

Hızlı sanayileşme sonucunda ağır metal içeren endüstriyel atıkların akvatik ortamlara girmesi önemli derecede artmaktadır. Akvatik ortama ulaşan ağır metaller, balıklarda strese neden olmakta ve buna bağlı olarak hormon, enzim, karbonhidrat ve protein metabolizmalarını etkileyerek fizyolojik değişikliklere yol açmaktadır. Civa, metabolizmada herhangi bir rolü olmayan metaldir ve akvatik ortamda en tehlikeli metal sayılmaktadır. Canlılar için çok toksiktir ve özellikle su canlıları bunların düşük konsantrasyonlarının etkisinde uzun süreli kalmaları sonucu bu metalleri biriktirerek besin yoluyla insanlara transfer etmektedir (Chen vd., 2006; Fırat ve Şahin İnanlı, 2016).

Ekotoksikolojik biyomarkırlar, kirleticilere karşı erken olumsuz (uyarıcı) tepkileri yansıttıkları için çevre kalite ve risk

değerlendirme protokollerinin yanı sıra toksite biyodeneylemlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Hem omurgalıların hem de omurgasızların sinir sisteminde bulunan AChE (EC 3.1.1.7), nörotransmitter asetilkolinin parçalanmasından sorumlu çok önemli bir enzimdir (Souid vd., 2013). Metallerin ChE'ların anyonik bölgelerine bağlanması nedeniyle asetilkolin enzimle uygun bir şekilde bağlanamamakta ve indirgenememektedir. Dolayısıyla organizmanın sinir sisteminde bozukluklara ve hastalıklara neden olmaktadır (Costa vd., 2007; Alves vd., 2015). Ağır metaller balıklarda ve omurgasızlarda ChE (kolinesteraz) aktivitesini inhibe eden ve spesifik olmayan antikolinesteraz ajanları olarak kabul edilmektedir. GPx (EC 1.11.1.9), temel antioksidant bir enzimdir ve redükte glutatyonun (GSH) okside glutatyon (GSSG) oksidasyonundan sorumludur; hidrojen peroksidi

(H₂O₂) uzaklaştırmaktadır ve lipid hidroperekisidlerini ilgili alkollerine indirgemektedir (Sevcikoca vd., 2011). Alanin transaminaz (ALT) olarak da adlandırılan GPT (EC 2.6.1.2), stoplazmada bulunan önemli bir enzimdir ve amino asitlerle keto asitlerin birbirine dönüşümünü katalizlemektedir. Proteinlerin ve karbonhidratların kullanımında görev alan GPT karaciğer, solungaç ve kas gibi dokularda kirlenmelerin neden olduğu doku hasarlarının teşhisinde çok sık kullanılmaktadır (De La Torre vd., 1999).

Balıklar çevre kirliliğine karşı çok hassas oldukları için su kirliliğinde indikatör olarak kullanılmaktadır (Saravanan vd., 2011). Solungaçlar dış ortamla doğrudan temas halinde olduklarından dolayı kirlenmeler tarafından etkilenen ilk hedef organlardır. Kas dokusu, besin olarak tüketilmesi sebebiyle besin zincirindeki önemi ve yüksek AChE aktivitesinden dolayı toksisite çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. Toksikolojik çalışmalar balık dokularında biyokimyasal parametrelerinin incelenmesiyle akuatik ortamlarda kirlenmelerin etkisinin değerlendirilebileceğini göstermektedir.

Afrika orijinli olan tropikal balık türlerinden *O. niloticus*, çevre koşullarındaki ekstrem değişimler ve kirlenmelere karşı dirençli olması, kolay üretilmesi ve protein kaynağı olarak yaygın bir şekilde kullanılmasından dolayı araştırma materyali olarak seçilmiştir.

Bu çalışmada civa etkisinde tatlı su balığı *O. niloticus*'un solungaç ve kas dokusunda AChE, GPT ve GPx aktivitelerinin ölçülmesiyle biyokimyasal değişikliklerin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Araştırmada kullanılan *Oreochromis niloticus*'lar Çukurova Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi balık yetiştirme havuzlarından alınarak laboratuvara getirilmiş ve dinlendirilmiş çeşme suyu bulunan akvaryumlar içerisinde iki ay süre ile bekletilerek ortam koşullarına adaptasyonları sağlanmıştır. Bu süre içerisinde deneyde kullanılacak balıklar ortalama 12,3±6,9 cm boy ve 18,3±5,7 g ağırlığa ulaşmıştır.

Deneyler 25±1°C sıcaklıkta yürütülmüş, akvaryumlar merkezi havalandırma sistemi ile havalandırılmış ve günde sekiz saat aydınlatma periyodu uygulanmıştır. Balıklar, laboratuvar koşullarına adaptasyonları süresince hazır balık yemiyle (Pınar Balık Yemi, Türkiye) beslenmiştir. Deney ortam suyunun kimyasal özellikleri; toplam sertlik 351,65±8,92 mg/L CaCO₃, pH 8,28±0,92, çözülmüş oksijen 7,56±0,25 mg/L, akvaryum ısı 22,02±0,75°C olarak ölçülmüştür.

Balıklar 7 ve 21 günlük sürelerle civanın (HgCl₂, Merck) 0,01 ve 0,1 ppm derişimlerinin etkisine bırakılmıştır. Her birinin içerisinde 12 adet balık bulunan 120 litrelik 3 cam akvaryum kullanılmıştır. Birinci akvaryuma kontrol grubu olarak dinlendirilmiş çeşme suyu; ikinci akvaryuma 0,01 ppm civa; üçüncü akvaryuma ise 0,1 ppm civa çözeltisi konmuştur. Deneyler üç tekrarlı yapılmıştır. Deneme süresi sonunda balıkların solungaç ve kas dokuları disekte edilerek enzimlerde aktivite kaybı olmaması için izotonik %0,59'luk soğuk NaCl

çözeltisi ile yıkanmıştır. Dokular, analizleri yapılana kadar -80°C 'de saklanmıştır.

Enzim aktiviteleri ve protein miktarlarının belirlenmesi için dokular üzerine ağırlıklarının 1/10'u oranında homojenizasyon tamponu eklenerek (250 mM sukroz, 20 mM Trizma-Baz, 1mM EDTA, pH: 7,8) 9500 rpm'de 1,5 dk süreyle buz üstünde homojenize edilmiştir. Homojenatlar 10.000 g'de +4°C'de 20 dk santrifüj edilmiş ve elde edilen süpernatantlarda AChE (Ellman vd., 1961), GPx (Beutler, 1984) GPT (Reitman ve Frankel, 1957) aktiviteleri ve protein miktarı (Lowry vd., 1951) spektrofotometrik (Varian Cary 50 UV-Vis Spectrophotometer) olarak ölçülmüştür.

Analizlerden elde edilen verilerin istatistik analizi (Aritmetik Ortalama ± Standart Hata), IBM SPSS Statistics 20.0 paket programında yapılmıştır. Konsantrasyonlara bağlı olarak deney grupları arasındaki istatistiksel ayrımlar Tek Yönlü Varyans Analizi takiben çoklu karşılaştırma testlerinden Student – Newman Keul's (SNK) Testi ve süreye bağlı olarak deney grupları arasındaki istatistiksel ayrımlar ise Student-t testi kullanılarak belirlenmiştir (Sokal ve Rholf, 1969).

BULGULAR

Civa derişimlerinin etkisine 7 ve 21 gün süreyle bırakılan *O. niloticus*'un solungaç ve kas dokularındaki AChE, GPx ve GPT aktivitelerindeki değişiklikler Tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

Solungaç AChE aktivitesi, 21 günlük etki süresinde kontrol grubuna göre 0,01 ve 0,1 ppm civa derişimlerinde %69 ve %93 azalma göstermiştir. Etki süresinin uzamasına bağlı olarak, AChE aktivitesi yüksek civa derişiminde %88 oranında inhibe olmuştur. Ayrıca ilk etkileşim süresinde (7. gün) solungaç AChE aktivitesi 0,01 ppm civa etkisinde (0,039±0,015 U/mg protein), kontrole (0,082±0,008 U/mg protein) göre azalmış ancak Tablo 1'de de görüleceği gibi bu azalma istatistik olarak önemli olmamıştır (P>0,05). Kas AChE aktivitesi kontrole (0,1981±0,020 U/mg protein) göre 0,01 ppm Hg (0,1001±0,013 U/mg protein) etkisinde 7 günlük sürede önemli azalma gösterirken 0,1 ppm Hg etkisinde (0,1411±0,016 U/mg protein) istatistik olarak değişiklik göstermemiştir (P>0,05). Düşük ve yüksek civa derişimlerinin etkisinde, kas AChE aktivitesi 7 günlük sürede kontrole göre yaklaşık olarak sırasıyla %49 ve %29 oranında inhibisyon göstermiştir (Tablo 2).

Solungaç GPx aktivitesi 0,1 ppm civa etkisinde kontrol grubuna göre 7 günlük süre sonunda yaklaşık olarak 5 katlık, 21 günlük süre sonunda 9 katlık artış göstermiştir. Her iki ortam derişiminde de süreye bağlı olarak (0,01 ppm Hg: 7. gün 0,918±0,35 U/mg protein; 21. gün 3,291±1,129 U/mg protein, 0,1 ppm Hg: 7. gün 3,723±0,86 U/mg protein; 21. gün 4,899±1,202) önemli fark gözlenmemiştir (P>0,05). Tablo 1'de görüldüğü gibi civanın 0,01 ppm etkisinde 7. günde (0,918±0,35 U/mg protein) kontrole (0,681±0,171 U/mg protein) göre önemli değişiklik olmamıştır (P>0,05). Kas GPx aktivitesi (0,01 ppm Hg: 7. gün 0,1720±0,12; 21. gün 0,2487±0,036 U/mg protein, 0,1 ppm Hg: 7. gün 0,2543±0,031 U/mg protein; 21. gün 0,3583±0,119 U/mg protein) süreler

arasında herhangi bir değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$). Düşük civa etkisinde kas GPx aktivitesinde, 7 ve 21 günlük süreler sonunda kontrole göre herhangi bir değişiklik olmazken yüksek civa derişiminde %78 ve %96 oranında artış olmuştur (Tablo 2).

Tablo 1. Civanın (ppm) etkisine 7 ve 21 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'un solungaç dokusunda enzim aktiviteleri (U/mg protein)

Table 1. Enzyme activities in the gill tissue of *O. niloticus* exposed to mercury (ppm) for 7 and 21 days (U/mg protein)

AChE (U/mg protein)	Süre	
	7, Gün	21, Gün
Kontrol	0,082±0,008 ax	0,0913±0,015 ay
0,01 Hg	0,039±0,015 ax	0,0280±0,007 bx
0,1 Hg	0,051±0,019 ax	0,0058±0,001 cy
GPx (U/mg protein)		
Kontrol	0,681±0,171 ax	0,510±0,181 ax
0,01 Hg	0,918±0,35 ax	3,291±1,129 abx
0,1 Hg	3,723±0,86 bx	4,899±1,202 bx
GPT (U/mg protein)		
Kontrol	3,591±1,058 ax	5,224±1,299 ax
0,01 Hg	5,433±1,330 abx	4,141±0,585 ax
0,1 Hg	8,698±0,430 bx	0,832±0,409 by

a, b, c harfleri konsantrasyonlar; x, y harfleri ise süreler arası ayrımı belirlemek amacı ile kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında $P<0,05$ düzeyinde istatistik ayrımı vardır. (Aritmetik Ortalama ± Standart Hata). Letters a, b and c indicate differences between concentrations and letters x and y indicate statistical differences between time for the same group. There is statistical difference between the data shown with different letters at level $P<0,05$. (Mean±Standard Error)

Tablo 2. Civanın (ppm) etkisine 7 ve 21 günlük sürelerle bırakılan *O. niloticus*'un kas dokusunda enzim aktiviteleri (U/mg protein)

Table 2. Enzyme activities in the muscle tissue of *O. niloticus* exposed to mercury (ppm) for 7 and 21 days (U/mg protein)

AChE (U/mg protein)	Süre	
	7. Gün	21. Gün
Kontrol	0,1981±0,020 ax	0,1606±0,017 ax
0,01 Hg	0,1001±0,013 bx	0,1810±0,005 ay
0,1 Hg	0,1411±0,016 ax	0,1743±0,014 ax
GPx (U/mg protein)		
Kontrol	0,1430±0,09 ax	0,1827±0,018 ax
0,01 Hg	0,1720±0,12 ax	0,2487±0,036 ax
0,1 Hg	0,2543±0,031 bx	0,3583±0,119 bx
GPT (U/mg protein)		
Kontrol	1,874±0,368 ax	2,0280±0,395 ax
0,01 Hg	2,317±0,107 ax	3,424±0,505 abx
0,1 Hg	3,65±0,929 ax	5,699±1,227 bx

Solungaç GPT aktivitesi, düşük ve yüksek civa derişimlerinde ilk etkileşim süresi sonunda kontrole göre 1,5 ve 2 katlık artış göstermiştir. Yüksek civa etkisinde GPT aktivitesi, kontrole göre 7 günlük süre sonunda artarken 21 günlük süre sonunda azalmıştır ve etki süresinin uzamasına bağlı olarak 10

katlık azalma kaydedilmiştir. Kontrole göre 21 günlük etki süresi sonunda, düşük civa etkisinde önemli değişiklik olmazken yüksek civa etkisinde 6 katlık azalma olmuştur (Tablo 1). Kas GPT aktivitesi, 7 günlük süre sonunda civa derişimlerinin (0,01 ppm Hg: 2,317±0,107 U/mg protein; 0,1 ppm Hg: 3,65±0,929 U/mg protein) etkisinde kontrole (1,874±0,368 U/mg protein) göre istatistik olarak önemli değişiklik göstermemiştir ($P>0,05$). Düşük ve yüksek civa derişimlerinin etkisinde kontrol grubuna göre kas GPT aktivitesi, 21 günlük etki süresi sonunda yaklaşık olarak 1,7 ve 2,8 kat artmıştır (Tablo 2).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Dokulardaki ezim aktivite değişikliklerinin belirlenmesi, balıkların fizyolojik durumlarının izlenmesinde ve hastalıkların tanısında önemlidir. Bu çalışmada civanın *O. niloticus*'un solungaç ve kas dokularında AChE, GPx ve GPT aktivitelerini ortam derişimine ve etkisi süresine bağlı olarak değiştirdiği belirlenmiştir. Bir elementin toksisitesi kimyasal yapısına, konsantrasyonuna, etki süresine, ortamdaki fizikokimyasal faktörlere, dokuların işlevsel ve fizyolojik durumuna bağlı olarak değişebilmektedir (Karthikeyan vd., 2007).

Kirleticiler için oldukça hassas bir enzim olan AChE aktivitesinin ölçülmesi bazı ekotoksikolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır ve düşük AChE aktivitesi nörotoksitenin biyomarkırı olarak değerlendirilmektedir (Badiou ve Belzunces, 2008). Bu çalışmada civanın, solungaç AChE aktivitesini ortam derişimine ve etki süresine bağlı olarak azalttığı belirlenmiştir. Kas AChE aktivitesi, civa etkisinde ilk etkileşim süresi sonunda azalırken 21 günlük etki süresi sonunda değişmemiştir. Sonuçlar balıkların toksikantlara maruz kalmasıyla AChE fonksiyonunun değiştiğini göstermektedir. Enzim aktivitesindeki azalışlar enzim yapısındaki sülfidril gruplarına metallerin bağlanması ve dokudaki yapısal farklılıklardan kaynaklanabilmektedir. Metilciva etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada *Hoplias malabaricus*'un (kaplan balığı) kas dokusunda ChE aktivitesinin kontrol grubuna göre azaldığı bildirilmiştir (Costa vd., 2007). Karides (*Penaeus monodon*) larvaları ile yapılan bir çalışmada AChE aktivitesinin düşük civa derişiminde arttığı, yüksek civa derişiminde ise azaldığı rapor edilmiştir (Harayashiki vd., 2016). Viera vd. (2009), *Pomatoschistus microps* (küçük kaya balığı) ile yaptıkları bir çalışmada civa ve bakır etkisinde dokularda AChE inhibisyonunun olduğunu ve toksikantların AChE inhibisyonuyla nörotoksik etkilere sebep olduğunu, böylece balık nörolojik ve nöromuskular fonksiyonunun bozulabildiğini bildirmişlerdir. Metilciva etkisinin *Oryzias latipes* (medeka) balığının beyin, karaciğer, solungaç ve kas dokularında AChE inhibisyonuna neden olduğu belirtilmiştir (Liao vd., 2006).

Serbest radikal temizleyicisi olan GPx organizmayı olası nöropatolojik koşullar ve hücre hasarına karşı korumaktadır (Hussain vd., 1999). Yüksek GPx aktivitesi, peroksit toksisitesine karşı savunma mekanizmasını artırmaktadır (Hasspieler vd., 1994). Bu çalışmada civa etkisinde GPx aktivitesi solungaç ve kas dokularında artmış ve bu artış 21 günlük etki süresinde 7 güne göre daha fazla olmuştur. GPx

aktivitesindeki artışın H₂O₂ ve serbest radikallerin olumsuz etkilerinden organizmayı korumak amacıyla oksidatif strese karşı bir yanıt olabileceği düşünülmektedir. Civa etkisine bırakılan tatlı su balıklarından *Brycon amazonicus* ile yapılan bir çalışmada GPx aktivitesinin karaciğerde değişmediği solungaç, kas ve kalpte artış gösterdiği bildirilmiştir (Monteiro vd., 2010). Zheng vd. (2016) civa derişiminin *Pseudosciaena crocea* balığının karaciğer GPx aktivitesinde etki göstermediğini belirtmişlerdir. Berntssen vd. (2003)'nin *Salmo salar* (somon balığı) ile yaptığı bir çalışmada GPx aktivitesi, metil-civa etkisinde beyinde azalırken karaciğer ve böbrekte artmış; inorganik civa etkisinde ise karaciğerde artmış, beyinde azalmış ve böbrekte değişmemiştir. *Diplodus cervinus* balığının beyin, karaciğer ve böbrek dokularında GPx aktivitesi üzerine civanın etkisinin olmadığı bildirilmiştir (Branco vd., 2012).

O. niloticus ile yapılan bu çalışmada civa etkisinde GPT aktivitesi kasta artmış, solungaçta ise 7 günlük etki sonunda artarken 21 günlük etki sonunda azalmıştır. Bu azalmanın, büyük bir olasılıkla civanın enzimin çeşitli fonksiyonel gruplarına bağlanarak enzim yapısını değiştirmesi nedeniyle olabileceği düşünülmektedir. Civanın etkisine bırakılan yayın balıklarından *Clarias batrachus* ile yapılan bir çalışmada böbrek GPT aktivitesi ve protein miktarının azaldığını, civanın bu tür için etkili toksikant olduğunu ve böbrek fizyolojisini değiştirdiğini ileri sürmüşlerdir (Tiwari vd., 2014). Kadmiyum ile yapılan diğer çalışmalarda karaciğer GPT aktivitesinin *C. carpio*'da (De La

Torre vd. 2000) arttığı, *Sparus aurata*'da (Vaglio ve Landriscina, 1999) ise azaldığı rapor edilmiştir. *Cirrhinus mrigala* balığında kurşun etkisinin solungaç, kas ve karaciğer dokularında GPT aktivitesini artırdığı belirtilmiştir (Mary vd., 2014). Kurşuna maruz bırakılan sazan balıklarından *Ctenopharyngodon idella*'nın karaciğer, solungaç ve kas dokularında ise GPT aktivitesinde önemli azalma olduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar bu durumun hücre organellerindeki bozuklukları gösterebileceğini ileri sürmüşlerdir (Mary vd., 2015). Tarımsal ve evsel atık sularındaki ağır metallerin çok olduğu bir gölden alınan *Anguilla anguilla* (yılan balığı) ile yapılan bir çalışmada solungaç, karaciğer ve kas dokularında GPT aktivitesi kontrol grubuna göre yüksek bulunmuştur (Mazrouh, 2016). Endüstriyel atık suların bırakıldığı bir nehirden alınan *Arius maculatus* balığında, karaciğer ve solungaç dokularında GPT aktivitesinin yüksek olduğu ve bu durumun nekrozisten kaynaklanabileceği ve dokularda hasarla sonuçlanan hücre zarı geçirgenliğinin artışına sebep olabileceği bildirilmiştir (Kumaresan ve Karuppasamy, 2011).

Metallerin, balıklar üzerine olan etkilerini araştırmak ekosistemin geleceği ve balıkları bir besin kaynağı olarak kullanan insanların sağlığı için önemlidir. Sonuç olarak bu çalışma civanın *O. niloticus*'un solungaç ve kas dokularında AChE, GPx ve GPT aktivitelerinde artış ve azalışlara neden olduğunu ve bu etkinin metalin yüksek ortam derişimlerinde ve etki süresinin uzamasıyla genellikle arttığını göstermiştir.

KAYNAKÇA

- Alves, L.M., Lemos, M.F.L., Correia, J.P.S., Costaa, N.A.R. & Novais S.C. (2015). The potential of cholinesterases as tools for biomonitoring studies with sharks: Biochemical characterization in brain and muscle tissues of *Prionace glauca*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 465: 49-55. doi: 10.1016/j.jembe.2015.01.006
- Badiou, A. & Belzunces, L.P. (2008). Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. *Chemico-Biological Interactions*, 25: 175(1-3):406-409. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.040
- Berntssen, M.H.G, Aatland, A. & Handy, R.D. (2003). Chronic dietary mercury exposure causes oxidative stress, brain lesions, and altered behaviour in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquatic Toxicology*, 65: 55-72. doi: /10.1016/S0166-445X(03)00104-8
- Beutler, E. (1984). *Red cell metabolism: A manual of biochemical methods*, 2nd ed., New York, Grune and Stratton.
- Branco, V., Canario, J., Lu, J., Holmgren, A. & Carvalho, C. (2012). Mercury and selenium interaction in vivo: Effects on thioredoxin reductase and glutathione peroxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 52: 781-793. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.002
- Chen, C.Y., Wooster, G.S., Getchell, R.G., Bowser, P.R. & Timmons, M.B. (2003). Blood chemistry of healthy, nephrocalcinosis-affected and ozonetreated tilapia in a recirculation system, with application of discriminant analysis. *Aquaculture*, 218: 89-102. doi:10.1016/S0044-8486(02)00499-4
- Costa, J.R.M., Mela, M., Assis, H.C.S., Pelletier, E., Randi, M.A.F. & Oliveira-Ribeiro, C.A. (2007). Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead (II) or methylmercury. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67: 82-88.
- De La Torre, F., Salibian, A. & Ferrari, L. (1999). Enzyme Activities as Biomarkers of Freshwater Pollution: Responses of Fish Branchial (Na +K) ATPase and Liver Transaminases. *Environmental Toxicology*, 14: 313-319.
- De La Torre, F., Salibian, A. & Ferrari, L. (2000). Biomarkers assessment in juvenile *Cyprinus carpio* exposed to waterborne cadmium. *Environmental Pollution*, 109: 277-282.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. & Featherstone, R.M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Firat, Ö. & Şahin İnanlı, A. (2016). Investigation of combined effect of zeolite and mercury toxicity on some serum biochemical parameters of *Oreochromis niloticus*. *Ege Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 33(3): 251-257. doi:10.12714/egjfas.2016.33.3.09
- Harayashiki, C.A., Reichelt-Brushett, A.J., Liu, L. & Butcher, P. (2016). Behavioural and biochemical alterations in *Panaeus monodon* post-larvae diet-exposed to inorganic mercury. *Chemosphere*, 164: 241-247. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.08.085
- Hasspieler, B.M., Behar, I.V. & DiGiulio, R.T. (1994). Glutathione-dependent defense in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28: 82-90.
- Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S.J. & Khan, A.T. (1999). Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver and kidneys of mice. *Journal of Environmental Science and Health B*, 34: 645-660. doi:10.1080/03601239909373219
- Karthikeyan, S., Palaniappan, P.L.R.M. & Sabhanayakan, S. (2007). Influence of pH and water hardness upon nickel accumulation in edible fish *Cirrhinus mrigala*. *Journal of Environmental Biology*, 28:484-492.
- Kumaresan, T. & Karuppasamy, R. (2011). Impact of industrial effluents on some biomarker enzymes in selected tissues of *Arius maculatus* from Uppanar Estuary, Cuddalore District, Tamilnadu. *Asian Journal of Science and Technology*, 1(11): 70-75.

- Liao, C.Y., Fu, J.J., Shi, J.B., Zhou, Q.F., Yuan, C.G. & Jiang G.B. (2006). Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 22(2): 225–233. doi:10.1016/j.etap.2006.03.009
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 266-275.
- Mazrouh, M.M. (2016). Effects of some heavy metals in different organs and some hepatic enzymes for European eel (*Anguilla anguilla*) at Lake Edku. *International Journal of Science and Research*, 5(2): 1872-1876.
- Mary, S.C.H., Silvan, S. & Elumalai, E.K. (2014). Toxicology study on lead nitrate induced fresh water fish *Cirrhinus mrigala* (Hamilton). *European Journal of Academic Essays* 1(7): 5-8.
- Mary, S.C.H., Bhuvaneshwari, D. & Anandan, R. (2015). Biochemical and histopathological studies on lead nitrate induced toxicity in fresh water fish grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *European Journal of Experimental Biology*, 5(11): 24-30.
- Monteiro D.A, Rantin F.T. & Kalinin A.L. (2010). Inorganic mercury exposure: toxicological effects, oxidative stress biomarkers and bioaccumulation in the tropical freshwater fish matrinxã, *Brycon amazonicus* (Spix and Agassiz, 1829). *Ecotoxicology*, 19:105–123. doi: 10.1007/s10695-010-9418-3
- Reitman, S. & Frankel, S. (1957). A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *American Journal of Clinical Pathology*, 28: 56-63.
- Saravanan, M., Kumar, K.P. & Ramesh, M. (2011). Haematological and biochemical responses of freshwater teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cypriniformes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 100(3): 206–211. doi: 10.1016/j.pestbp.2011.04.002
- Sevcikova, M., Modra, H., Slaninova, A. & Svobodova, Z. (2011). Metals as a cause of oxidative stress in fish: a review. *Veterinary Medicine*, 56(11): 537–546.
- Sokal, R.R., & Rohlf, J.F. (1969). *Biometry*. Freeman and Company, San Francisco, 776 pp.
- Soud, G., Souayed N, Yaktiti, F. & Maaroufi, K. (2013). Effect of acute cadmium exposure on metal accumulation and oxidative stress biomarkers of *Sparus aurata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89: 1-7. doi: 10.1016/j.ecoenv.2012.12.015
- Tiwari, R., Wast, N., Siddiqui, A., Gaherwal S. & Prakash, M.M. (2014). Mercury and selenium induced changes in kidney biochemistry of *Clarias batrachus*. *European Journal of Applied Sciences*, 6 (4): 64-71. doi: 10.5829/idosi.ejas.2014.6.4.9160
- Vaglio, A. & Landriscina, C. (1999). Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43: 111-116. doi: 10.1006/eesa.1999.1778
- Vieira, L.R., Gravato, C., Soares, A.M.V.M, Morgado, F. & Guilhermino L. (2009). Acute effects of copper and mercury on the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: linking biomarkers to behavior. *Chemosphere*, doi: 76: 1416–1427. 10.1016/j.chemosphere.2009.06.005
- Zheng, J.L., Zeng, L., Xu, M.Y., Shen, B. & Wu, C.W. (2016). Different effects of low- and high-dose waterborne zinc on Zn accumulation, ROS levels, oxidative damage and antioxidant responses in the liver of large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*. *Journal of Physiology and Biochemistry*, doi:10.1007/s10695-016-0275-6