

Received: October 2018 Accepted: December 2018

**ALÜMİNYUM ZEHİRLENMESİNİN *CAPOETA CAPOETA* (GULDENSTAEDT 1773)'NİN SERUM PROTEİNLERİ VE SOLUNGAÇ HISTOPATOLOJİSİ ÜZERİNE ETKİLERİ****Muhitdin YILMAZ<sup>1,\*</sup>, Sevda GÖĞTEPE YANAR<sup>2</sup>, Evren KOÇ<sup>3</sup>, Yusuf ERSAN<sup>4</sup>**<sup>1</sup> Sinop Üniversitesi, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi Sinop/Türkiye<sup>2</sup> Kafkas Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kars/Türkiye<sup>3</sup> Kafkas Üniversitesi, Mühendislik Mimarlık Fakültesi, Kars/Türkiye<sup>4</sup> Karabük Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Karabük/Türkiye

\*myilmaz@sinop.edu.tr

**ÖZET**

Bu çalışmada, Alüminyum klorür ( $AlCl_3$ ) zehirlenmesinin *Capoeta capoeta*'nın serum proteinleri ve solungaç histopatolojisi üzerindeki etkileri incelendi. Kars Çayı'ndan yakalanan balıklar 300 litrelik tanklara konuldu ve 10 gün süreyle bekletildi. Daha sonra her grupta 7 adet balık bulunan 3 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar kontrol grubu, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 0.03 ve 0.06 mg/L  $AlCl_3$ 'e 10 gün süreyle maruz bırakıldı. Sonra, balıklardan kan ve doku örnekleri alındı. Serum numuneleri sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)'de yürütüldü. Solungaç dokuları ise %10'luk formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Bilinen histolojik yöntemlerle parafin bloklar hazırlandıktan sonra, 3-5  $\mu$  kalınlığında kesitler alındı ve kesitler hematoksilen ve eosinle boyanarak ışık mikroskopunda incelendi.

SDS-PAGE'de kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre, 0.03 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıkların 59 kD'luk protein bandında incelme, 94, 74, 46 ve 35 kD'luk protein bantlarında kalınlaşmalar meydana geldiği görüldü. 71 kD'luk protein bandının ise sentezlenmediği tespit edildi. Yine kontrol grubu balıklara göre, 0.06 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıklarda 101, 74, 71, 59, 46 ve 26 kD'luk protein bantlarında incelme ve 94 kD'luk protein bandında kalınlaşma gözlemlendi. 86 kD'luk protein bandının da sentezlenmediği saptandı.

Histopatolojik incelemelerde, 0.03 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, 0.06 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, ayrıca hipersellülarite ve bazı sekonder

lamellerin uçlarında kütleşme görüldü.

Bu çalışma da, 0.03 ve 0.06 mg/L'lık  $AlCl_3$  uygulamasının *Capoeta capoeta* için toksik olduğu sonucuna varıldı.

**Key Words:** Alüminyum klorür, *Capoeta capoeta*, Serum Protein, SDS-PAGE, Histopatoloji.

## EFFECTS OF ALUMINIUM POISONING ON SERUM PROTEINS AND GILL HISTOPATHOLOGY OF *CAPOETA CAPOETA* (GULDENSTAEDT 1773)

### ABSTRACT

In this study, effects on gill histopathology and serum proteins in *Capoeta capoeta* of Aluminium chloride ( $AlCl_3$ ) intoxication were examined. Fish caught from the Kars Creek were placed in 300-liter tank and allowed to stand for 10 days. Then, three groups were formed seven pieces of fish in each group. The fish in the first group was the control group. Fish in II. and III groups were exposed to 0.03 and 0.06 mg/L  $AlCl_3$  for 10 day, respectively. Then, blood and tissue samples from fish were taken. Serum samples were run in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Gill tissues were detected in the 10% formaldehyde solution. After preparing paraffin blocks by routine histological techniques, slices were taken at 3-5  $\mu$  thickness and slices were stained with hematoxylin and eosin and examined by light microscopy.

In SDS-PAGE, according to protein bands of the fish in the control group, thinning in 59 kD protein band and thickening in 94, 74, 46 and 35 kD protein band of fish applied 0.03 mg/L  $AlCl_3$  were seen to occur. Expression of 71 kD protein band was lack. Thinnings in 101, 74, 71, 59, 46 and 26 kD protein bands and thickening in 94 kD protein band of fish exposed 0.06 mg/L  $AlCl_3$  were observed expression of 86 kD protein band was lack.

In histopathological examination, in group treated 0.03 mg/L  $AlCl_3$  was observed degeneration in the epithelial cell of secondary lamellae, in group treated 0.06 mg/L  $AlCl_3$  was determined degenerations in the epithelial cells of secondary lamellae, as well as hyper cellularity and blunt-recovery in ends of some secondary lamellae were seen.

In the present study, it was concluded that applications of 0.03 and 0.06 mg/L  $AlCl_3$  could be a toxic for health of *Capoeta capoeta*.

**Key Words:** Aluminium chloride, *Capoeta capoeta*, Serum Protein, SDS-PAGE, Histopathology.

## GİRİŞ

Sucul organizmaların bazıları ağır metalleri belli bir dereceye kadar bünyelerinde depolayabilirler. Bu ağır metaller, organizmalara besin zinciri yoluyla insana kadar ulaşarak, insan sağlığını etkilerler (Merlini, 1971). Balık dokularındaki metal konsantrasyonları; besin zincirine, canlılar arasındaki rekabete, su kimyasına ve göldeki değişimlere bağlı olarak farklılık gösterdiği ifade edilmektedir (Förster ve Wittmann, 1981). Ağır metaller, normal şartlarda sucul ekosistemlerde ng/L yada µg/L düzeylerinde bulunur (Nussey ve ark., 1995). Ancak insan nüfus artışı, sanayileşme, kentleşme ve tarım uygulamaları gibi temelde insan aktivitesine dayalı faktörler, ağır metallerin sucul ekosistemlere bulaşmasını hızlandırmaktadır (Wepener ve ark., 2001). Alüminyum kömür işletmelerinden endüstriyel atıklar, asit yağmurları ve süspansiyon halindeki katı atıklar halindeki alüminyum sülfat olarak su ortamına girer (Driscoll, 1980). Ağır metallerin vücut bünyesine alımı bazı aşamalar içerir. Bilimsel araştırmalara göre, ağır metallerin metal bağlama verimliliği başlangıçta oldukça hızlı bir şekilde cereyan etmektedir ve bu olayda metal iyonlarının hücre duvarlarına temas etmesiyle birlikte hemen yüzey adsorpsiyonu ile mikroorganizmaların hücre yüzeyine bağlandığını göstermektedir. Yüzey adsorpsiyonu fiziko-kimyasal bir olay olarak, birçok biyolojik moleküllerin; hücre duvarı bileşenleri olan polisakkarit, protein ve lipidlerin sahip olduğu amino, karboksilik, sülfidril, fosfat ve tiol gibi fonksiyonel gruplarla gerçekleştiği belirtilmektedir (Ting ve ark.,1991; Holan ve ark., 1993). Bu fonksiyonel gruplar metalleri bağlamada farklı duyarlılık ve özgülüğe sahiptirler (Ting ve ark.,1991). Çeşitli yollarla su ortamına bulaşan ağır maddelerin sucul organizmalar üzerindeki etkileri çok ciddi ve önemlidir. Çünkü bu bileşikler kanser de dahil olmak üzere birçok hastalığa sebep olma kabiliyetine sahiptirler (Wegrzyn ve Czyz, 2003). Cd, Cu, Cr, Ni, Zn ve Mn gibi ağır metaller canlı bünyesinde birikir, belirli miktarın aşılması halinde toksik etkisi yapar, birikim miktarı metalin etki süresi ve ortamın değişmesine göre artar (Kargın ve Erdem, 1991).

Bu çalışmada, Kars Çayı'ndan yakalanan *Capoeta capoeta* (Guldenstaedt 1773) üzerine Alüminyum klorür uygulanarak solungaç dokusundaki histopatolojik ve serum proteinlerindeki elektroforetik değişiklikler belirlenmeye çalışıldı.

## MATERYAL VE METOT

### Hayvan Materyali ve Deney Düzenegi

Bu incelemede, Kars Çayı'nda yaşayan ve ağırlıkları 100-120 g arasında değişen 21 tane

*Capoeta capoeta* kullanıldı. Tanklarda kullanılan musluk suyunun kalitesi pH 8.1-8.3, çözünmüş oksijen miktarı 4.95-10.51 mg/L ve sıcaklığı 16.5-18.2 °C olarak bildirilmiştir (Yılmaz ve ark., 2008). Balıklar Kars Çayı'ndan yakalanarak laboratuvarında 300'er L'lik tanklara konuldu. 10 gün süreyle ortama adaptasyonları sağlanmak suretiyle 7'şer balık bulunan 3 grup oluşturuldu. I. gruptaki balıklar kontrol, II. ve III. gruptaki balıklar ise sırasıyla 0.03 ve 0.06 mg/L AlCl<sub>3</sub> içeren su ortamlarında 10 gün bekletildi. Balıklardan elektroforez için 0.25 ve 0.5 ml arasında kan ve histopatolojik inceleme için solungaç doku örnekleri alındı. Kan dorsal aort damarından alındı ve +4 °C ve 3000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmek suretiyle serumlar elde edildi. Sonra, serumlar -20 °C'de saklandı. Protein konsantrasyonları biüret yöntemi ile ölçüldü (Robert ve Michael, 1993). Solungaç doku örnekleri ise histopatolojik inceleme için %10'luk formalin solüsyonunda tespit edildi.

### **Histopatolojik Çalışmalar**

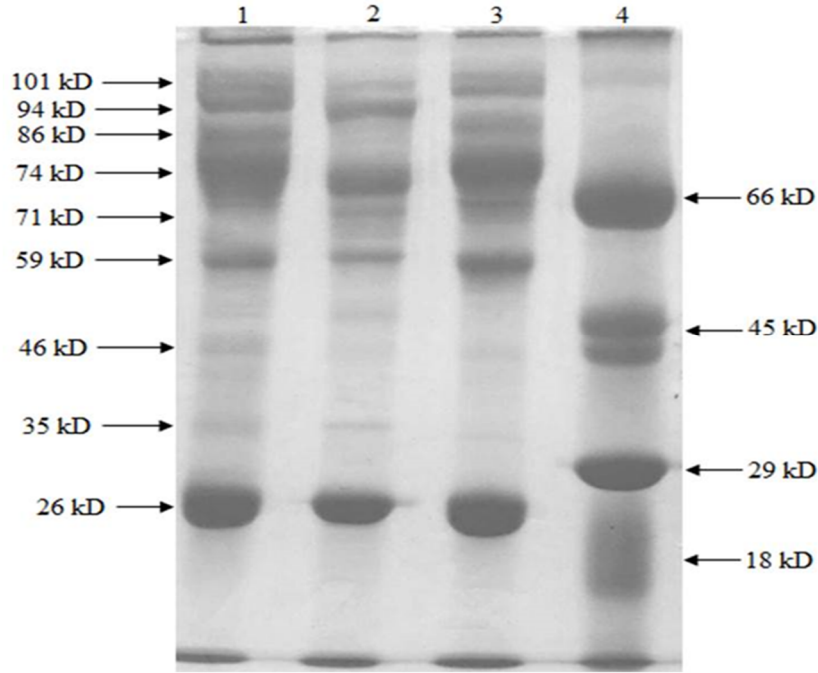
Formaldehit solüsyonunda 48 saat tespit edilen solungaç doku örneklerinden 3-5 µ kalınlığında kesitler alındı. Duplike olarak çalışılan kesitler Hematoksilin-Eosin ile boyandı ve ışık mikroskobunda (Olympus BX51, JAPAN) incelendi.

### **Elektroforetik Çalışmalar**

Biüret metoduna göre total protein tayini yapılan serum numuneleri SDS-PAGE'ye Laemmli, (1970) ve O'Farrell, (1975) metotlarına göre uygulandı. Standart proteinler olarak karbonik anhidraz (29 kD), tripsinojen (18 kD), yumurta albumini (45 kD), sığır albumini (66 kD) kullanıldı. SDS-PAGE uygulaması sonunda, jellerin fotoğrafları çekildi ve sonra proteinlerin moleküler ağırlıkları hesaplandı (Weber ve ark., 1972).

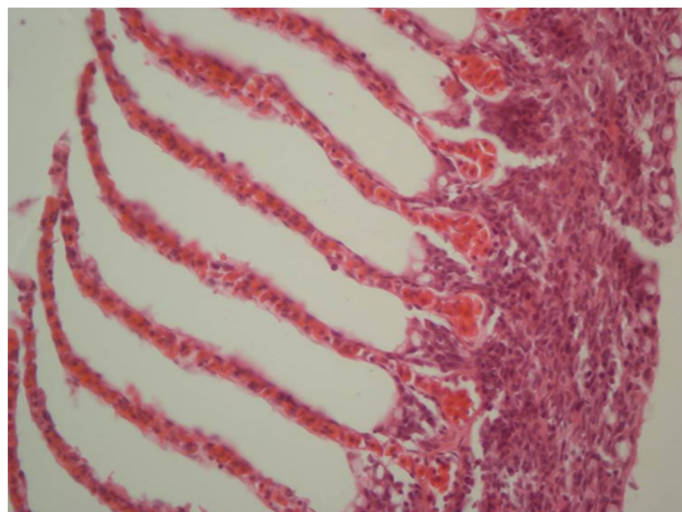
### **BULGULAR**

Serum numunelerinin SDS-PAGE'den elde edilen elektroforegramında kontrol grubundaki balıkların protein bantlarına göre 0.03 mg/L AlCl<sub>3</sub> uygulanan gruptaki balıkların 59 kD'luk protein bandında incelme, 94 kD, 74 kD, 46 kD, 35 kD'luk protein bantlarında kalınlaşma meydana geldiği ve 71 kD'luk protein bandının ise kaybolduğu tespit edildi. Yine kontrol grubu balıklara göre 0.06 mg/L AlCl<sub>3</sub> uygulanan gruptaki balıklarda 101 kD, 74 kD, 71 kD, 59 kD, 46 kD, 26 kD'luk protein bantlarında incelme, 94 kD'luk protein bandında kalınlaşma meydana geldiği ve 86 kD'luk protein bandının da kaybolduğu saptandı (Şekil 1).



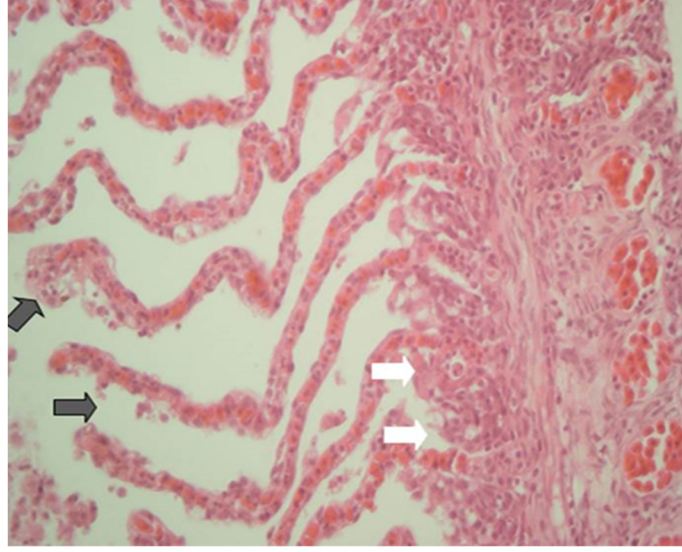
**Şekil 1:** Alüminyum klorür'e maruz bırakılan *Capoeta capoeta*'nın SDS-PAGE yöntemiyle elde edilen serum proteinlerinin elektroforegramı. 1. 0,03 mg/L, 2. 0,06 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan balıkların serum proteinleri, 3. kontrol grubu, 4. standart proteinler.

Kontrol grubu balıkların solungaç dokularında normal histolojik görünüm izlenmekteydi (Şekil 2). 0.03 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde dejenerasyon, 0.06 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan gruptaki balıkların sekonder lamellerinin epitel hücrelerinde de dejenerasyon, hiperselülarite ve bazı sekonder lamellerde kütleleşme görüldü (Şekil 3-4).

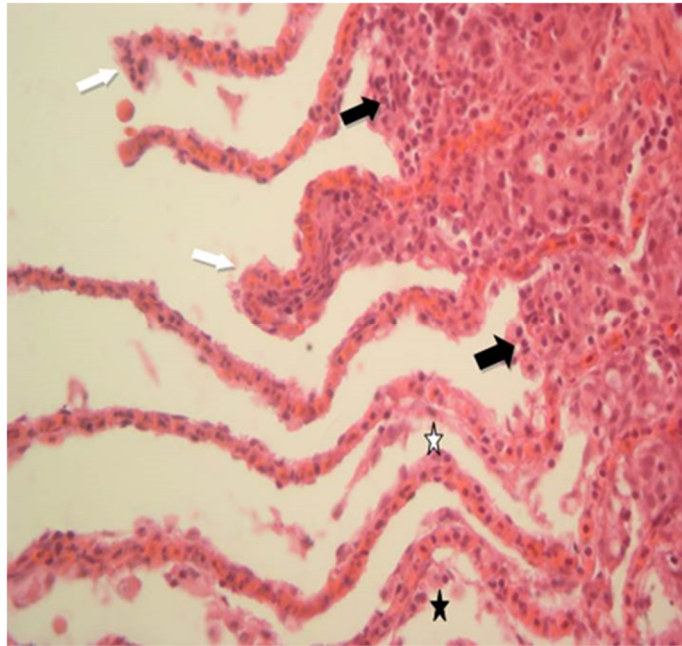


**Şekil 2:** Kontrol grubu solungaç dokusu.( X.360)





**Şekil 3:** 0.03 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan balıklardan elde edilen solungaç dokusunda, vakuoler dejenerasyon (beyaz ok) ve hidropik dejenerasyon (siyah ok). (X.360).



**Şekil 4:** 0.06 mg/L  $AlCl_3$  uygulanan balıklardan elde edilen solungaç dokusunda, hiperselülarite (siyah ok), bazı sekonder lamellerde kütleşme (beyaz ok), hidropik dejenerasyon (beyaz yıldız) ve vakuoler dejenerasyon (siyah yıldız) (X.360).

#### TARTIŞMA VE SONUÇ

*Cyprinus carpio* L. üzerine yapılan bir araştırmada, bakır, çinko ve bakır-çinko etkileşiminde karaciğer, solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi incelenmiş ve sonuçta

bakır-çinko karışımının etkisinde solungaç dokusundaki çinko birikimi dışında en yüksek bakır ve çinko birikimi karaciğerde olurken, en düşük birikim kas dokusunda meydana gelmiştir. Karışımın etkisinde doku ve organlardaki bakır ve çinko birikimi, metallerin tek tek etkisinde belirlenen metal birikiminden düşük düzeyde olmuştur (Cicik, 2003). Yine (*Cyprinus carpio*'da kadmiyum ve çinko maruziyetine bağlı olarak metalotiyonin miktarındaki değişiklikler araştırılmış ve hepatopankreas, böbrek, solungaç gibi organlardaki metalotiyonin içeriğinin Zn>Cd>kontrol şeklinde olduğu belirtilmiştir (Kito ve ark., 1986). *Oreochromis niloticus* üzerinde yapılan çalışmada, besin yoluyla 42 gün boyunca bakıra maruz bırakılan balıklarda, çalışma süresi sonunda balıkların solungaç ve bağırsak dokularında histolojik olarak bir değişiklik saptanmadığı fakat karaciğer dokusunda hepatositlerin yağ içeriğinin arttığı belirtilmiştir (Shaw ve Handy, 2006). Kobalt parahidroksibenzoat (CoBHB)' ın *Capoeta capoeta capoeta*'nın serum proteinleri üzerindeki etkileri incelenmiş ve doz artışına bağlı olarak yüksek molekül ağırlıklı protein bantlarında kalınlaşmalar, küçük molekül ağırlıklı protein bantlarında ise incelmeler olduğu, histopatolojik olarak ise karaciğer, solungaç ve bağırsak dokularında yine doz artışıyla orantılı olarak artan derecelerde nekroz ve dejenerasyonlar oluştuğunu belirtilmiştir (Yılmaz ve ark., 2008). Bu çalışmada da AlCl<sub>3</sub> uygulanan balıkların solungaç dokusunda doz artışına bağlı olarak nekroz ve dejenerasyon olduğu gözlenmiştir. Protein bantlarında da doz artışına bağlı olarak incelmeler olduğu saptanmıştır. Mevcut çalışma litaretürle benzerlik göstermektedir.

Gökkuşığı alabalığı üzerinde doku kalıntı analizi ve alüminyum-spesifik histokimyası araştırılmış ve alüminyuma kronik olarak maruz kalan gökkuşığı alabalıklarının beyinde sistemik alüminyum birikimi ve farklı bir neropatoloji gözlenmiştir. Alüminyumun; beyin serebrovasküler endoteli ile kalbin arteria soğanındaki endotel ve epitel yüzeyler ile bağlantılı olduğu saptanmıştır. Alüminyumun zarların bariyer özelliğini kaybettirmesinden dolayı, onun balıklar için toksik olduğu belirtilmiştir (Exley, 1996). Kurşun ve alüminyum iyonlarının laboratuvar hayvanlarına kısa dönem ve uzun dönemde ağız yoluyla uygulanması sırasında, geniş spektrumlu biyolojik etkiler meydana gelmiştir. Bu metallerin kısa dönemli bir deney sırasında genel toksik ve gonadotoksik etkilerinin birbiri ile aynı olduğu ortaya çıkmış ve bu etkilerin korelasyonu sürekli deneyler sırasında muhafaza edilmiştir. Sudaki kurşun (0.03 mg/L) ve alüminyum (0.5 mg/L) konsantrasyonları popülasyonun sağlığı için tehlikeli olabileceğinden içme suyu kalitesi açısından standartlara dahil edilmesi için hijyenik standartlar önerilmektedir (Krasovskii, 1979). Tatlı su balık türlerinin sudaki alüminyuma karşı bağlı duyarlılıklarını incelemek amacıyla İskandinavya'ya özgü yaygın yedi balık türü Al yönünden

zengin asidik su, Al yönünden fakir asidik su ve kontrol amaçlı yaklaşık olarak nötr suya maruz bırakılmışlardır. Akut alüminyum tehdidine karşı türler arasındaki *Salmo salar* en duyarlı iken daha sonra *Rutilus rutilus*, *Phoxinus phoxinus*, *Perca fluviatilis*, *Thymallus thymallus*, *Salmo trutta* ve *Salvelinus alpinus* gelmiştir. Al yönünden zengin ortama maruz bırakıldıklarında bütün türler arasında azımsanmayacak bir ölüm oranı gözlemlenmiştir. *Phoxinus phoxinus*, *Rutilus rutilus* ve *Salmo trutta*'da asidik Al yönünden fakir ortama ve kontrol ortamına maruz bırakıldıklarında da bir miktar ölüm oranı olduğu görülmüştür. Kontrollü deneysel çalışmalar sayesinde elde edilen sonuçlar, tatlı su balık türleri için alüminyumun asitli suların toksisitesi açısından önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir (Poleo, 1997). Hidroksialuminosilikatların balıklardaki toksisitesi üzerine yapılan bir çalışmada balıklardaki akut alüminyum zehirlenmesinin silikon ile bertaraf edilmesinde hidroksialuminosilikatların büyük rolü olduğunu kanıtlanmıştır (Exley, 1997). Toksik alüminyum ve düşük pH'ın gökkuşağı *Oncorhynchus mykiss* larvasının solungaç gelişimine etkileri incelenmiş, yalnız düşük pH ve yalnız alüminyuma maruz bırakılan larvaların solungaçları normal bir gelişme göstermekle birlikte filament uçlarında hafif bir kalınlaşma gözlenmiştir. Alüminyum ve düşük pH kombinesine maruz bırakılan larvalarda filamentler tamamen kalınlaşmış, kısalmış ve birbirine yapışık durumdayken, lameller sadece filamentlerin alt kısmında mevcut olup, filamentlere yapışık durumdadırlar. Filament ve lamel uzunluğu, her bir filamentte ki lamel sayısı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli derecede ( $P < 0.001$ ) düşük bulunmuştur (Çalta, 1999). Mevcut çalışmada,  $AlCl_3$  uygulanan balıkların doz artışına bağlı olarak filament uçlarında kalınlaşma gözlenmiştir. *Salmo salar* balıkları üzerinde yapılan bir çalışmada, balıklar üç yapay kanaldan tutulup, solungaçlarındaki morfometrik değişimler araştırılmıştır. Bir kanaldaki suya işlem yapılmazken (ortalama pH 6.25); diğerlerine asit ilavesi (ortalama pH 5.6) ya da asit ve alüminyum (ortalama pH 5.5; ortalama değiştirilebilir Al  $158 \mu g \text{ litre}^{-1}$ ) ilavesi yapıp 16 ile 23 gün sonrasında solungaçları incelenmiştir. Primer lamellerdeki klorid hücreleri her iki deneysel işlemde kontrol grubundaki balıklara göre daha fazla bulunmuştur. Buna karşılık ikincil lamellerdeki klorid hücrelerinin sayısı sadece Al katkısı olmaksızın aside maruz kalan balıklarda artmıştır. Klorid hücre büyüklüğü ve şekli de zaman ve işlem ile değişiklik göstermiştir. Asit ve Al'a maruz kalmış balıklarda kontrol grubundakilerden daha az mukoz hücresi bulunmuştur. Alım arttırılarak sağlanan klorid hücre çoğalması ve yapısal değişiklikler düşük pH gerilimli artan iyonik akıntıları telafi etmeye yönelik bir girişimi açıklıyor olabilir. Ancak, Al konsantrasyonları yüksekse klorid hücreleri ikincil lameller boyunca çoğalmaz ya da çoğalan hücreler zarar görür ve kaybolur. Bu, iyon alımını artırma potansiyelini kısıtlayabilir



(Jagoe ve Haines, 1997). *Oreochromis niloticus* üzerine 0.05, 0.3 ve 1 mg/L dozlarında Alüminyum sülfat uygulanmış ve süreye bağlı olarak karaciğerlerinde artan şiddette kan damarlarında bozulma, monükleer hücre infiltrasyonu, hepatik paransimada fokal nekroz ve pankreatik asinide atrofiler gözlenmiştir (Muhammad, 2011). Alüminyum kloride maruz bırakılan *Catla catla*'nın solungaçlarının epitellerinde vakuolleşme, epitel duvarlarında kırılma ve lamellerde kütleşme, karaciğerlerinde ise hepatik lezyonlar, nekroz alanları ve vakuol oluşumu görülmüştür (Maharajan ve Parurukmani, 2012). Alüminyum ve Demir yönünden kirlenmiş asidik Pansky göletinde yaşayan *Cyprinus carpio*'nun solungaçlarında nekrozlar gözlenmiştir. Ayrıca solungaçlarda demir bakterilerine rastlanılmıştır. Böbrek, karaciğer ve dalakta distrofik değişiklikler olarak paransimal dokularda hasar tespit etmişlerdir (Slaninova ve ark., 2014). Mevcut çalışmadan elde edilen bulgulara göre, solungaçlarda çeşitli dejenerasyonlar ve serum proteinlerinin ekspresyonlarında değişimler gözlenmiştir.

Sonuç olarak, sucul ortamlara düşük miktarlarda da olsa alüminyuma karışması durumunda, ortamda yaşayan balıklar üzerine toksik etki yapabileceği sonucuna varılmıştır. Bu nedenle, Alüminyumun sucul ortamlara karışmaması için endüstri bölgelerinde önlemler alınması gerekmektedir.

## AÇIKLAMA

Bu çalışma 2010 yılında, Kafkas Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

## KAYNAKLAR

- Çalta, M. (1999). The effects of toxic aluminium and low ph on gill development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) larvae. Turkish Journal of Zoology, 23, 285-291.
- Cicik, B. (2003). Bakır-çinko etkileşiminin sazan (*Cyprinus carpio* L.)'nın karaciğer solungaç ve kas dokularındaki metal birikimi üzerine etkileri. Ekoloji Çevre Dergisi, 12(48): 32-36.
- Driscoll, C.T., Baker, J.P., Bisigni, J.J., & Schofield, C.L. (1980). Effects of aluminium speciation on fish in dilute acidified waters. Nature, 284, 161-164.
- Exley, C. (1996). Aluminium in the brain and heart of the rainbow trout. Journal of Fish Biology, 48(4): 706-713.
- Exley, C., Pinnegar, K.J., & Taylor, H. (1997). Hydroxyaluminosilicates and acute aluminium toxicity in fish. Journal of Theoretical Biology, 189(2): 133-139.
- Förster, G., & Wittmann, T. (1981). Metal Pollution in the aquatic environment, Berlin heidelberg. Newyork Springer Verlag, 3(21): 271-318.
- Holan, ZR., Volesky, B., & Prasetyo, I. (1993). Biosorption of cadmium by biomass of marine algae. Biotechnology and Bioengineering, 41(8): 819-825.

- Jagoe, H.C., & Haines, A.T. (1997). Changes in gill morphology of atlantic salmon smolts due to addition of acid and aluminum to stream water. *Environmental Pollution*, 97(1-2) 137-146.
- Kargin, F., & Erdem, C. (1991). Accumulation of copper in liver, spleen, stomach, intestine, gill and muscle of *Cyprinus carpio*. *Doğa Turkish Journal of Zoology*, 15, 306-314.
- Kito, H., Ose, Y., & Sato, T. (1986). Cadmium-binding protein (metallothionein) in carp. *Environ Health Perspectives*, 65, 117-124.
- Krasovskii, N.G., Vasukovich, Y.L., & Chariev, G.O. (1979). Experimental study of biological effects of lead and aluminium following oral administration. *Environ Health Perspectives*, 30, 47-51.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227, 680-685.
- Maharajan, A., & Parurukmani, P.S. (2012). Effect of aluminium chloride toxicity against histopathology of gill and liver tissue of indian major carp, *Catla catla* (Hamilton). *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 3(3): 523-530.
- Merlini, M. (1971). Heavy metal contamination, in impingement of man on the Oceans. London and Newyork, 461-468.
- Authman, M.M. (2011). Environmental and experimental studies of aluminium toxicity on the liver of *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758) fish. *Life Science Journal*, 8(4): 764–776.
- Nussey, G., Van Vuren, J.H.J., & Du Preez, H.H. (1995). Effect of copper on haematology and osmoregulation of the mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 111C(3): 369-380.
- O'Farrell, P.H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of biological properties and significance. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 88, 497-501.
- Poléo, A.B., Østbye, K., Øxnevad, S.A., Andersen, R.A., Heibo, E., Vøllestad, L.A. (1997). Toxicity of acid aluminium-rich water to seven fresh water fish species: a comparative laboratory study. *Environmental Pollution*, 96(2): 129-139.
- Robert, R., & Michael, J.D. (1993). *Enzyme assays*, Oxford University Press. Newyork, 225-332.
- Shaw, B.J., & Handy, R.D. (2006). Dietary copper exposure and recovery in nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquatic Toxicology*, 76(2): 111–121.
- Slaninova, A., Machova, J., & Svobodova, Z. (2014). Fish kill caused by aluminium and iron contamination in a natural pond used for fish rearing: a case report. *Veterinari Medicina*, 59(11): 573-581.
- Ting, Y.P., Lawson, F., & Prince, I.G. (1991). Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris* II Multi-ion stiation. *Biotechnology and Bioengineering*, 37(5): 445-455.
- Wegrzyn, G., & Czyz, A. (2003). Detection of mutagenic Pollution of natural environment using microbiological assays. *Journal of Applied Microbiology*, 95(6): 1175-1181.
- Wepener, V., Van Vuren, J.H.J., & Du Preez, H.H. (2001). Uptake and distribution of a copper, iron and zinc mixture in gill, liver and plasma of a freshwater teleost, *Tilapia sparmanii*. *Water SA*, 27(1): 99-108.
- Yılmaz, M., Ersan, Y., Karaman, M., Koç, E., & Necefoğlu, H. (2008). Toxic effects of cobalt parahydroxybenzoate on tissue histopathology and serum proteins in *Capoeta capoeta capoeta*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 17(9a): 1322-1327.