

THE STUDY OF THE TOXIC EFFECTS OF MERCURY-II-CHLORIDE TO CHUB *Leuciscus cephalus* (L., 1758)

Ali GÜL, Mehmet YILMAZ, Mahmut SELVİ*

Gazi University, Gazi Faculty of Education, Department of Biology Education, Teknikokullar,
06500 Ankara, TURKEY,
e-mail: mselvi@gazi.edu.tr

ABSTRACT

Mercury is one of the most harmful heavy metals, present in many aquatic media. This study was aimed to determine the acute toxicity of mercury-II-chloride and behavioral changes in *Leuciscus cephalus* (L., 1758). *Leuciscus cephalus* were selected for the bioassays experiments and caught in Kirmir branch of Sakarya river. Behavioral changes at each mercury-II-chloride concentration were recorded. The experiments were repeated 3 times. Water temperature was regulated at $22\pm 1^\circ\text{C}$. The 96-h LC_{50} value of mercury-II-chloride ($\text{HgCl}_2\cdot\text{H}_2\text{O}$) on *Leuciscus cephalus* was found to be 0.55 mg/L (0.53-0.57) according to Probit Analysis. There were significant changes observed in the behavior of the fish as the concentration of the toxic compound increased.

Key Words: *Leuciscus cephalus*; Mercury-II-chloride; Lethal concentration; Bioassay

CİVA-II-KLORÜR'ÜN TATLISU KEFALİ *Leuciscus cephalus* (L., 1758) ÜZERİNDEKİ AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Cıva birçok su ortamında bulunan en zararlı ağır metallere biridir. Bu çalışma, cıva-II-klorür'ün tatlısu kefalı (*Leuciscus cephalus*) bireylerindeki akut toksisitesi ve davranış değişimlerinin belirlenmesini amaçlamaktadır. Denemelerde kullanılmak üzere tatlısu kefalı balıkları seçilmiş ve Sakarya nehri Kirmir çayından yakalanmıştır. Her bir cıva-II-klorür konsantrasyonundaki davranış değişimleri kaydedilmiştir. Deneyler 3 defa tekrarlanmıştır. Denemeler süresince su sıcaklığı $22\pm 1^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Cıva-II-klorür'ün 96 saatlik LC_{50} değeri *Leuciscus cephalus* bireylerinde probit analiz yöntemine göre 0,55 mg/L (0,53-0,57) bulunmuştur. Toksik maddenin konsantrasyonu arttıkça balıkların davranışlarında önemli değişimler olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Leuciscus cephalus*; Cıva-II-klorür; Lethal konsantrasyon; Biyodene

1. GİRİŞ

Doğa için en önemli kirliliklerden biri ağır metaller tarafından meydana getirilmektedir. Bugün sanayide 40'dan fazla metal ve alaşımın kullanıldığı bilinmektedir. Ağır metaller tarafından meydana getirilen kirlilik insan sağlığını tehdit eder bir seviyeye ulaşmıştır (1).

Bu ağır metallere biri olan cıva (Hg) pek çok akuatik alanda toksik bir ağır metal olarak bulunur. Kloralkali endüstrisi, maden çıkarma ve cıva türevlerinin kullanımı cıva kontaminasyonunun ana antropojenik kaynaklarıdır (2). Çöp fırınları ve fosil yakıtlarından kaynaklanan atmosferik tortu akuatik ortamların kontaminasyonuna katkıda bulunur (3).

Cıva akuatik sistemlerde esasen inorganik cıva ve

1. INTRODUCTION

One of the most serious pollution for nature is the one caused by the heavy metals. There are more than 40 metals and metal alloys used in the industry today. The pollution caused by heavy metals reached health threatening proportions (1).

Mercury (Hg), one of the most harmful heavy metals, is present in many aquatic media. The biggest sources of mercury pollution are chloride-alkaline industry, mining and use of mercury derivatives (2). The atmospheric residues coming from garbage burning and fossil fuels also contribute to this pollution (3).

Mercury is present mainly as inorganic mercury compounds or methylmercury (CH_3Hg^+) in aquatic media.

organik metilciva (CH_3Hg^+) olarak bulunur. Civanın biyolojik elde edilebilirliği pH, çözülmüş karbon ve suyun sıcaklığı gibi fizikokimyasal faktörlerden etkilenir (3, 4).

Akuatik tüketici organizmalarda civanın biyolojik birikimi direkt maruz kalma (suda bulunan metal) trofik maruz kalma (besinlerde bulunan metal) şeklinde iki kontaminasyon kaynağının kombinasyonundan meydana gelir (5). Akuatik sistemlerde bulunan doğal ve antropojenik kaynaklı birçok civa bileşiği deri, solungaç epiteli ve sindirim sistemi duvarları gibi organizmanın iç ortamını dış ortamdan ayıran biyolojik bariyerleri aşan, farklı kapasitelere sahiptir (6).

Civa en çok solungaçlarda, en az karaciğer, böbrekler, kaslar ve mukusta birikir (7). Civa balıklarda en çok metil formunda bulunur ve çeşitli dokularda sülfidril proteinlerine bağlanır (8).

Birçok balık popülasyonlarında görülen civa konsantrasyonlarının etkileri erginlerin sağlığında önemsizdir. Bununla beraber embriyo veya larva gibi hayat safhaları genellikle daha sonraki hayat safhalarına göre kontaminantlara daha duyarlıdır (9).

Civa ölüme, zayıf gelişmeye ve balıkların embriyo, larva, ve genç dönemlerinde, büyümenin azalmasına sebep olabilir (9-12).

Balığın embriyonik döneminde, hücre bölünmesinin erken safhaları civa toksisitesine çok hassastır ve metilciva, inorganik civadan daha toksiktir (13).

Tatlısu ortamlarındaki canlı grupları için toksik maddelerin lethal ve sublethal dozları her bir canlı grubu için ayrı ayrı düzenlenen biyodeneylemlerle sağlanmaktadır (14). Bu araştırmada, civanın çözünebilir inorganik tuzlarından olan Civa-II Klorürün *Leuciscus cephalus* bireylerinde LC_{50} değerinin tespiti ve davranışlarda meydana gelen değişimlerin tespiti amaçlanmıştır.

2. MATERYAL VE METOD

Sakarya Nehri Kirmir Çayı'ndan avlanan *Leuciscus cephalus* bireyleri su dolu akvaryumlara konulmuş, 30 gün boyunca ortama uyumları sağlanmıştır. Biyodeneylemler başlama tarihinden iki gün önce yemlemeye son verilmiş ve bu sürede ölüm oranının %5'den fazla olmamasına dikkat edilmiştir (15). Her bir 100 L'lik akvaryuma (boyutları 45X34.5X100 cm) ortalama ağırlığı 18 g ve ortalama boyu (çatal boy) 120 ± 13.5 (S.D. ± 1.98) mm. olan bireylerden 10'ar adet konulmuştur. Akvaryumlarda dinlendirilmiş şehir suyu kullanılmıştır (pH 7.2 ± 0.2 , sertlik 20 ± 1 FS⁰, çözülmüş oksijen 6.8 ± 1 mg/L, iletkenlik 205-245 mS, ve sıcaklık $22 \pm 1^\circ\text{C}$). Kontrol grubu olarak ayrılan akvaryumdaki balıklarda ölüm oranının %10'u geçmemesine ve %90'ının sağlıklı görünümde olmasına dikkat edilmiştir (15).

Biyodeneylemlerde zehirli madde olarak metal tuzlarından Civa-II Klorür ($\text{HgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) kullanılmıştır. Denemelerde 8 akvaryuma 0.44, 0.47, 0.50, 0.53, 0.56, 0.59, 0.62 ve 0.65 mg/L'lik konsantrasyonlarda Civa-II Klorür verilmiştir. Uygulanan konsantrasyonların etkisinde 96 saatlik süre dikkate alınmıştır (16). Bu süre içerisinde ölen balıklar akvaryumdan hemen uzaklaştırılmıştır. Biyodeneylemde 96

The biological presence of mercury in aquatic media is dependent upon chemical and physical factors such as pH, dissolved oxygen and temperature of water (3, 4).

The biological accumulation of mercury in aquatic organisms is the result of direct (by the metal present in water) and trophic exposures (by the metal in food) (5). Most of the mercury compounds natural or anthropogenic in origin have various capacities in crossing the barriers separating the internal part of the organisms from the outside world such as skin, epithelium of gills and walls of the digestive system (6).

Mercury is predominantly accumulated in gills of fish. It is also deposited in liver, muscles and mucus to a small extent (7). Mercury is mainly present in its methyl form in fish which attaches to sulphidryl proteins in various tissues (8).

Mercury contamination observed in many fish populations does not cause a significant harm on the adults. However the early forms of life such as embryo and larvae are much more sensitive and susceptible to it than the other contaminants (9).

Mercury may cause death or retardation of growth of fish in early forms of life (9-12).

The early stages of cell break up in embryological stage of fish are more sensitive to mercury toxicity. Methyl mercury is much more toxic than its inorganic forms (13).

The lethal and sublethal doses of the toxic compounds for fresh water organisms are determined separately for each organism (14). This study is concerned with the determination of acute LC_{50} value of a soluble inorganic salt of mercury-II-chloride upon *Leuciscus cephalus* individuals and the behavioral changes it causes on them.

2. MATERIALS AND METHODS

The *Leuciscus cephalus* individuals caught in the Kirmir branch of Sakarya River were put in aquaria filled with water conditioned for 30 days. The feeding was terminated two day before the bio-experiments and care was taken to keep the mortality rate below 5% during this period (15). Each 100 L-capacity aquaria (dimensions 45X34.5X100 cm) was stocked with 10 fish with an average weight of 18 g and an average length (fork length) of 120 ± 13.5 (S.D. ± 1.98) mm. The aquaria were filled with conditioned tap water (pH 7.2 ± 0.2 , French hardness 20 ± 1 FS⁰, dissolved oxygen 6.8 ± 1 mg/L, conductivity 205-245 mS, and temperature $22 \pm 1^\circ\text{C}$). Care was taken to keep the mortality rate of the control group below 10% (15).

Mercury-II-chloride ($\text{HgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), the toxic compound used in the bio-experiments, was administered at concentrations of 0.44, 0.47, 0.50, 0.53, 0.56, 0.59, 0.62 and 0.65 mg/L to the aquaria. The effect of the compound was determined in a period of 96 hours (16). The dead fish were immediately removed from the aquaria. At the end of 96 hours the numbers of dead and surviving fish in each aquarium were recorded. LC_{50} and 95% confidence limits

saat sonunda her akvaryumda ölen ve canlı kalan balık adedi tespit edilmiştir. LC₅₀ ve %95 güven sınırları bir bilgisayar programı ile tespit edilmiştir (17).

3. SONUÇLAR

Civa-II Klorür'ün 96 saatlik akut LC₅₀ değeri (%95 güven sınırları), probit analiz metodu kullanılarak statik biyodeneysel sistemi uygulanarak genç *Leuciscus cephalus* bireyleri üzerinde 0.55 mg/L (0.53-0.57) bulunmuştur (18). Kontrol grubunda hiç ölüm olmamıştır. Sonuçlar civa-II klorür'ün balıklara yüksek miktarda toksik olduğunu göstermektedir. Sonuçlar Çizelge 1 ve Şekil 1'de verilmiştir.

Kontrol grubundaki davranış değişimleri ve çeşitli civa-II klorür dozlarına maruz kalan *Leuciscus cephalus* bireyleri deney süresince birbirleriyle karşılaştırılmıştır. Deneme süresince kontrol grubu normal davranış göstermiştir. Davranış değişimleri dozlama yapıldıktan 1 saat sonra görülmeye başlamıştır. En düşük konsantrasyon (0.44 mg/L) kontrol grubu ile benzer davranışlara sahip olduğu görülmüştür. 0.47 mg/L dozdan sonra balıklar denge bozuklukları, ani irkilme hareketleri, solunum güçlükleri gibi davranış farklılıkları göstermeye başlamıştır. 0.53 mg/L'den itibaren titreme, artmış solunum güçlükleri, dikey ve baş aşağı yüzme görülmüştür.

En yüksek konsantrasyon olan 0.65 mg/L' de denge bozuklukları, titreme, artmış solunum güçlükleri, dikey ve baş aşağı yüzme ani irkilme hareketleri gibi balıkların davranış anormallikleri maksimuma ulaşmıştır.

were calculated by a computer program (17).

3. RESULTS

The calculated 96-h acute LC₅₀ value (95% confidence limits) of mercury-II-chloride, using a static bioassay system to adult *Leuciscus cephalus* individuals was 0.55 mg/L (0.53-0.57) by the use of Probit Analysis (18). Control mortality was zero. The results show that mercury-II-chloride is highly toxic to fish. Results are in Table 1 and Figure 1.

The behavioral changes of the control group and *Leuciscus cephalus* exposed to various doses of HgCl₂ were compared with each other during the experiments. The control group showed normal behaviour during the test period. The changes in behavioral response started 1 h after dosing. The lowest concentration (0.44 mg/L) had similar behaviour with the control group. From the dose of 0.47 mg/L the fish started to show behavioral disorders such as loss of equilibrium, sudden startling and respiratory difficulties. From 0.53 mg/L onwards, there were shivering, increased difficulty in respiration and swimming in capsized manner.

At the highest concentration of 0.65 mg/L the behavioral abnormalities of the fish such as, the loss of equilibrium, shivering, increased difficulty in respiration, swimming in capsized manner and sudden startling, reached to maximum.

Table 1. Acute 96-h toxicity of mercury-II- chloride in *Leuciscus cephalus*

Çizelge 1. Civa-II klorür'ün *Leuciscus cephalus* bireylerindeki 96 saatlik akut toksisitesi.

Point/ Nokta	Concentration (mg/L)/ Konsantrasyon	95% Confidence limits/ %95 Güven sınırları	Slope ± SE/ Eğim ± SH	Intercept ± SE/ İntersept ± SH
LC 1.00	0.43	0.37-0.46	21.16 ± 3.95	10.47 ± 1.03
LC 5.00	0.46	0.41-0.49		
LC 10.00	0.48	0.44-0.50		
LC 15.00	0.49	0.46-0.52		
LC 50.00	0.55	0.53-0.57		
LC 85.00	0.62	0.59-0.67		
LC 90.00	0.63	0.60-0.70		
LC 95.00	0.66	0.62-0.74		
LC 99.00	0.71	0.66-0.83		

Theoretical Spontaneous Response Rate = 0.0000 / Teorik Spontan Cevap Oranı = 0.0000

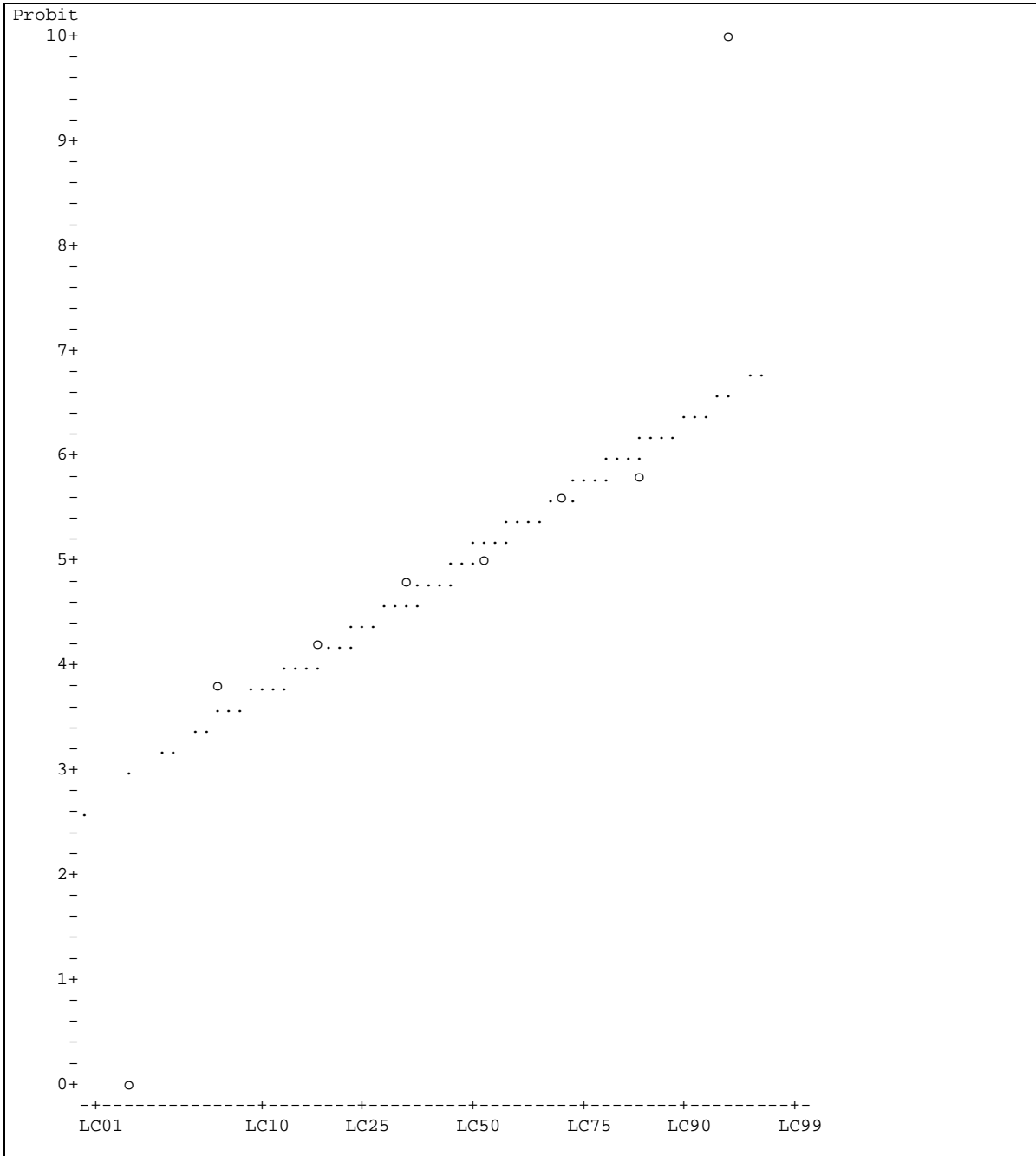


Figure 1. Plot of adjusted probits and predicted regression line for mercury-II-chloride to *Leuciscus cephalus*

Şekil 1. *Leuciscus cephalus* bireylerine civa-II klorür için hesaplanan probit değerleri ve regresyon grafiği

4. TARTIŞMA

Balıklardaki davranış değişiklikleri sucul ortamdaki kirlenmenin en önemli göstergesi olduğu belirtilmektedir (19).

Balıklardaki civa ile ilgili toksikoloji çalışmaları Türkiye’de ve diğer ülkelerde oldukça sınırlıdır. Gönen (20), Ankara piyasasında satılan kefal balığında Hg birikimi 0,052 ppm bulmuştur. Wobeser (21), Gökkuşığı alabalığında (*Oncorhynchus mykiss*) 10⁰C’de 96 saatlik

4. DISCUSSION

The behavioral changes in fish are regarded as one of the most important indicators of contamination in aquatic media (19).

The studies on mercuric toxicology on fish in Turkey or in other countries are rather limited. Gönen (20) found the Hg accumulation of *Leuciscus cephalus* (based on wet weight) sold in Ankara fish markets as 0.052 ppm. Wobeser (21) on the other hand found the 48-hour LC₅₀ of

LC₅₀ değerini 280µg/L olarak bulmuştur. Matida ve arkadaşları (22), Gökkuşluğu alabalığı üzerinde HgCl₂'ün toksik etkisini araştırmışlar ve 48 saatlik LC₅₀ değerini 0,21 mg/L olarak tespit etmişlerdir. Leblond ve Hontela (23), Gökkuşluğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) üzerinde yapmış oldukları çalışmada HgCl₂'ün LC₅₀ değerini 199 µM olarak tespit etmişlerdir. Duncan ve Klaverkamp (24), *Catostomus commersoni* üzerinde HgCl₂'ün toksik etkisini araştırarak LC₅₀ değerini 0,687 mg/L olarak saptamışlardır.

Aynı tür üzerinde yapılan çalışmalarda, LC₅₀ değerinin farklı bulunabileceği, LC₅₀ değeri üzerinde suyun sertliği, sıcaklık, deneyde kullanılan bireylerin büyüklüğü, gelişme dönemi ve hatta balıkların genotiplerinin etkili olabileceği belirtilmektedir (25).

Yapılan çalışmalarda; civanın balıkların sinir sistemini, böbreklerini, solungaçlarını ve ozmoregülatör görevlerini bozduğu, karaciğer ve kaslardaki enzim sentezini etkilediği saptanmıştır (26).

Yaz mevsiminde su sıcaklığındaki yükselme civanın sudaki çözünürlüğünü arttırmakta ve balıklardaki civa konsantrasyonunun artmasına etkili olmaktadır. Bu nedenle deneylerde kullanılan balıkların avlanma mevsimleri de LC₅₀ değerinin tespitinde etkili olacaktır.

Akarsu, göl ve denizlerdeki metal kirlilikleri aynı ekosistemde yaşayan canlılara yansiyarak besin zinciri boyunca birikebildiği sürece doğal denge ve insan sağlığı yönünden tehlikeli olabilir. Doğal sulardan elde edilen su ürünlerinin insan sağlığı yönünden doğurabileceği sakıncaların değerlendirilebilmesi için suların içerdikleri metal kirliliklerinin bilinmesi önem taşımaktadır. Bu nedenle sucul ortamlardaki besin kaynaklarının başında gelen balıklarda metal birikiminin insan ve diğer canlılar için letal etki limitlerinin periyodik olarak tespiti gerekmektedir.

mercury on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at 10 °C as 280 µg/L. Matida et al. (22) also investigated the toxic effect of HgCl₂ upon rainbow trout and found the 48-hr LC₅₀ value as 0.21 mg/L. Leblond and Hontela (23) determined the same value as 199 µM. Finally Duncan and Klaverkamp (24) determined the LC₅₀ value of HgCl₂ upon *Catostomus commersoni* as 0.687 mg/L.

It was reported that the LC₅₀ values may differ in different studies carried out on the same species since hardness of water, temperature, the size of the fish used in the experiment, maturity period and even the genotypes of the fish may effect the results (25).

The studies carried out showed that mercury damages the nervous system, kidneys, gill and osmoregulatory functions of fish and affects the enzyme synthesis in liver and muscles (26).

The increased water temperature in summer increases the solubility of mercury and thus its accumulation in fish. The season of the fish caught may affect the LC₅₀ value.

The metal pollution in rivers and lakes poses a threat to human health since the toxic metals accumulate through the food chain. Therefore it is important that the contamination of the aquatic media be determined in order to evaluate the harm it may cause upon human health. That is why it is necessary to determine the lethal effect limits of the metals accumulated in fish on a regular basis, which is the major source of food from the aquatic media.

KAYNAKLAR/ REFERENCES

1. Güley, M., Vural, N., *Toxicology, Ankara University Faculty of Pharmacy Publication*, No: 48 (In Turkish), (1987).
2. Sorensen, E.M, *Metal Poisoning in Fish, CRC Press.*, 285-328 (1991).
3. Driscoll, C.T., Yan, C., Schofiel, L., Munson, R., Holsapple, J., "The mercury cycle and fish in the adirondak lakes", *Environ. Sci.Technol.*, 28: 136-143 (1994).
4. Rodger, D., Wand Beamish, F.W.H., "Uptake of waterborne methylmercury by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in relation to oxygen consumption and methylmercury concentration", *Can. J. Fish. Aquatic. Sci.*, 38: 1309-1315 (1981).
5. Boudou, A., Ribeyre, F., *Aquatic Toxicology*, Nriagu, J.O. (Ed), *J. Wiley and Sons*; New-York, 73-116 (1983).
6. Boudou, A., Ribeyre, F., "Experimental study of tropic contamination of *Salmo gairdneri* by two mercury compounds HgCl₂ and CH₃HgCl-analysis at the organism and organ levels", *Water, Air, and Soil Pollution*, 26: 137-148 (1985).
7. Handy, R.D., Penrice, W.S., "The influence of high oral doses mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*", *Comp.Biochem.Physiol.*, 106C: 717-724 (1993).
8. Olson, K., Squibb, K.S., Cousins, R.J., "Tissue uptake, subcellular distribution and metabolism of ¹⁴ch₃hgcl and ch₃²⁰³hgcl by rainbow trout, *Salmo gairdneri*", *J. Fish. Res. Board Can.*, 35: 381-390 (1978).

9. Wiener, J.G., Spry, D.J., *Toxicological Significance of Mercury in Fresh Water Fish. In: Environmental Contaminants in Wildlife: Interpreting Tissue Concentrations*, Beyer, W. N., Hernz, G.H., Redmon-Norwood. A. W. (Eds.), **CRC Press**, New York, 297-339 (1996).
10. Snarski, W.M., Olson. G.F., “Chronic toxicity and bioaccumulation of mercuric chloride in the fathead minnow (*Pimephales promelas*)”, **Aqua. Toxicol.**, 2: 143-156 (1982).
11. Klaverkamp, J.F., MacDonald, W.A., Lillie, W.R., Lutz, A., “Joint toxicity of mercury and selenium in salmonid eggs”, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 12: 415-419 (1983).
12. Perry, D.M., Weis, J.S., Weis, P., “Cytogenetic effects of methylmercury in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*”, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, 17: 569-574 (1988).
13. Sharp, J.R., Neff, J.M., “The toxicity of mercuric chloride and methyl-mercuric chloride to fundulus heteroclitus embryos in relation to exposure conditions”, **Environ. Biol. Fish.**, 7: 277-284 (1988).
14. Turkish Standards TS.5676., *Water Pollution Control, Methods And Rules: Toxicity Tests*, Ankara (In Turkish) (1988).
15. APHA, AWWA, WPCF, *Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater 13. Ed*, Washington (1971).
16. Henle, K., “A unique case of malformations in a natural population of the green toad (*Bufo viridis*) and its meaning for environmental politics”, **Brit. Herpet. Soc. Bull.**, 4: 48-49 (1981).
17. US EPA, *LC50 software program, version 1.00, Center for Exposure Assessment Modeling (CEAM) Distribution Center* (1999).
18. Finney, D.J., *Probit Analysis*, **Cambridge University Press**, New York (1971).
19. Richmonds, C., Dutta. H.M., “Effect of malathion on the optomotor behavior of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*”, **Comp. Biochem. Physiol.**, 102: 523-526 (1992).
20. Gönen, H., “Heavy metal accumulation in fish commercially sold in Ankara fish markets”, MS Thesis, **University of Ankara**, Ankara (In Turkish) (1994).
21. Wobeser, G., “Prolonged oral administration of methylmercury chloride to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Fingerlings”, **J. Fish. Res. Board. Can.** 32: 2015-2023 (1975).
22. Matida, Y., Kumada, H., Kimura, S., Saiga, Y., Nase, T., Yokota, M., Kawatsu, H., “Toxicity of mercury compounds to aquatic organisms and accumulation of the compounds by the organisms”, **Bull. Freshw. Fish. Lab.** 21: 197-227 (1971).
23. Leblond, V.S., Hontela. A., “Effects of in-vitro exposures to cadmium, mercury, zinc, and 1-(2-chlorophenyl)-1-(4-chlorophenyl)-2, 2-dichloroethane on steroidogenesis by dispersed internal cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, **Tox. and App. Pharmacology**, 157: 16-22 (1999).
24. Duncan, D.A., Klaverkamp, J.F., “Tolerance and resistance to cadmium in white suckers (*Catostomus commersoni*) previously exposed to cadmium, mercury, zinc or selenium”, **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 40:128-138 (1983).
25. Bleau, H., Daniel, C., Chevalier G, Von Tra, H., Hontela, A., “Effects of acute exposure to mercury chloride and methylmercury on plasma cortisol, 13, 14, glucose and liver glycogen in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, **Aquatic Toxicolog.**, 34: 221-235 (1996).
26. Niimi, A.J., Kissoon, G.P., “Evaluation of the critical body burden concept based on inorganic and organic mercury toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)”, **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** 26: 169-178 (1994).