

TILAPIA NILOTICA'DA BAKIRIN KARACİĞER VE KAS DOKULARINDAKİ  
NİCEL PROTEİN DEĞİŞİMLERİNE ETKİLERİ

Bedii CİCİK

**T. C.**  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

Ç. U.

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ADANA

OCAK 1991

Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne,

Bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında  
YUKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Doç.Dr. Cahit ERDEM

Uye

Prof.Dr. Nevin UNER

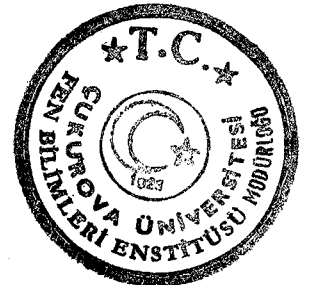
Uye

Doç.Dr. Seyhan TUKEL

Kod No : 447

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu  
onaylarım.

*M. Ural DİNÇ*  
Prof.Dr. Ural DİNÇ  
Enstitü Müdürü



## İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ.....	II
ŞEKİL LİSTESİ.....	III
ÖZ.....	V
ABSTRACT.....	VI
GİRİŞ.....	1
MATERYAL VE METOD.....	4
ARAŞTIRMA BULGULARI.....	7
TARTIŞMA.....	28
ÖZET.....	35
SUMMARY.....	36
KAYNAKLAR .....	37
TEŞEKKUR.....	48
ÖZGEÇMİŞ.....	49
EK TABLOLAR.....	50

## TABLO LİSTESİ

TABLO I	<i>T. nilotica</i> 'da bakırın karacigerdeki birikimi ( $\mu\text{g Cu/g k.a.}$ ) üzerine ortam derişimi ve sürenin etkileri.	11
TABLO II	<i>T. nilotica</i> 'da bakırın kastaki birikimi ( $\mu\text{g Cu/g k.a.}$ ) üzerine ortam derişimi ve sürenin etkileri.	12
TABLO III	<i>T. nilotica</i> 'da bakırın karacigerdeki birikiminin protein derişimi ( $\text{mg/g y.a.}$ ) üzerine etkileri.	15
TABLO IV	<i>T. nilotica</i> 'da bakırın kastaki birikiminin protein derişimi ( $\text{mg/g y.a.}$ ) üzerine etkileri.	16
EK TABLO I	<i>T. nilotica</i> 'da karaciger ve kas dokularının yaş ve kuru ağırlıkları ile bakır için atomik absorbsiyon spektrofotometresinden, protein için spektrofotometreden elde edilen absorbans değerleri.	51
EK TABLO II	<i>T. nilotica</i> 'nın kas ve karaciger dokularındaki bakır ( $\mu\text{g/g k.a.}$ ) ve protein ( $\text{mg/g y.a.}$ ) derişimleri.	52

## ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1 Bakır derişimi ve absorbens arasındaki dogrusal ilişki 8
- Şekil 2 Protein derişimi ve absorbens arasındaki dogrusal ilişki 13
- Şekil 3 *Tilapia nilotica*'da 0.1 ppm Cu ortam derişiminde karacigerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri. 19
- Şekil 4 *Tilapia nilotica*'da 1.0 ppm Cu ortam derişiminde karacigerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri. 20
- Şekil 5 *Tilapia nilotica*'da 5.0 ppm Cu ortam derişiminde karacigerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri. 21
- Şekil 6 *Tilapia nilotica*'da 10.0 ppm Cu ortam derişiminde karacigerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri. 22
- Şekil 7 *Tilapia nilotica*'da 0.1 ppm Cu ortam derişiminde kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri. 24

Şekil 8 *Tilapia nilotica*'da 1.0 ppm Cu ortam derişiminde  
kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine  
etkileri.

25

Şekil 9 *Tilapia nilotica*'da 5.0 ppm Cu ortam derişiminde  
kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine  
etkileri.

26

Şekil 10 *Tilapia nilotica*'da 10.0 ppm Cu ortam derişiminde  
kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine  
etkileri.

27

ÖZ

*Tilapia nilotica*'da bakırın karaciğer ve kas dokularındaki birikiminin, bu dokulardaki nicel protein derişimlerine etkileri dört farklı ortam derişiminde (0.1, 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm Cu) ve beş farklı zaman sürecinde (1, 7, 15, 30 ve 60 gün) belirlenmiştir.

Deneyler süresince bakırın karaciğer ve kas dokularındaki birikimi ortam derişimi ve etkide kalma süresine bağılı olarak artış göstermiştir.

Tüm ortam derişimlerinde, karaciğer protein derişiminin ilk 30 gün içerisinde maksimum bir degere ulaştığı, 30 ve 60. günler arasında ise belirli oranlarda tekrar düşme gösterdiği saptanmıştır. Kas protein derişimi ise dokudaki bakır birikimine bağılı olarak 30. güne değin azalmış, 30 ve 60. günler arasında ise 10.0 ppm Cu dışındaki tüm derişimlerde bu dokudaki protein düzeyleri bir denge durumuna ulaşmıştır.

## ABSTRACT

The effects of copper accumulation on the total protein content of liver and muscle tissues of *Tilapia nilotica* were recorded over 1, 7, 15, 30 and 60 days after exposure to copper concentrations of 0.1, 1.0, 5.0 and 10.0 ppm Cu in the medium.

Accumulation of copper in liver and muscle tissues increased with increasing concentrations of copper and with increasing exposure periods to a particular copper solution.

The protein content of liver, showed a decline between days 30 and 60 after reaching its highest level in the first 30 days of exposure to a given copper solution. Muscle protein content, however, decreased in the first 30 days of exposure and leveled thereafter except in 10.0 ppm Cu.



## GİRİŞ

Eser miktarlarda canlıda temel işlevleri olan bakır ve çinko gibi ağır metaller gerek doğal kaynaklardan, gerekse antropojenik faktörlerin etkisi ile çevre kirleticisi bir ajan olarak su ortamına girdiklerinde canlılara ulaşarak hücresel veya moleküler düzeyde yapısal ve işlevsel zararlara neden olurlar (Romanenko ve Yevtushenko, 1985; Tort ve ark., 1987).

Bakır, çeşitli metallo-enzimlerde prostetik gurup olarak temel bir bileşeni oluşturmaktadır (Bingöl, 1983; Villareal-Trevino ve ark., 1986). Omurgalılarda kan plazmasında bulunan seruloplazmin, karaciğerden izole edilen hepatoküprein ve beyinde bulunan serebroküprein (Mahler ve Cordes, 1971; Lehninger, 1975) bakır içeren proteinler olup ve Arthropod'ların solunum ile ilgili proteini olan hemosiyaninin de bileşiminde bakır bulunur (Bagatto ve Alikhan, 1987). Ayrıca tirozinaz, askorbik asit oksidaz,

sitokrom oksidaz ve monoamin oksidaz gibi enzimlerin de bakır içerdigi bilinmektedir (Berman, 1980). Omurgalı hayvanlarda bakırın kemik oluşumu, kalbin çalışması, bağ dokusu gelişimi, omuriligin miyelinleşmesi ve doku pigmentasyonu gibi çeşitli olaylarda işlevi vardır.

Bakırın çeşitli omurgasız (Bryan, 1968; Brown ve Ahsanullah, 1971; Evans, 1980; Engel, 1987; Beaumont ve ark., 1987; Depledge, 1989), omurgalı (Scheuhammer ve ark., 1985; Lui, 1987) ve bu kapsamda balıklar (Brungs ve ark., 1973; Buckley ve ark., 1982; Honda ve ark., 1983; Gautam, 1989) üzerine olan toksik etkileri ve birikimi ile ilgili çok sayıda araştırma yapılmıştır. Son yıllarda konu ile ilgili araştırmalar daha çok bakırın öncelikli olarak depolandığı organlar (Honda ve ark., 1983; Romanenko ve Yevtushenko, 1985; Hilmy ve ark., 1987a), organizmanın temel bileşenleri üzerine olan etkileri (Tort ve ark., 1987; Nemcsok ve Hughes, 1988) ile organizmadaki toksifikasyon ve detoksifikasyon mekanizmaları (Buckley ve ark., 1982; McCarter ve ark., 1982; Roch ve McCarter, 1984) üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Letal olmayan ortam derişimlerinde ağır metaller balıklarda daha çok karaciger ve böbrek gibi metabolik aktivitenin fazla olduğu organlarda birikmektedir (Thomas ve ark., 1983 ve 1985; Capelli ve Mingati, 1987; Hilmy ve ark., 1987a; Jana ve Sahana, 1988).

Balıklarda karaciğer, ağır metallerin alınması ve depolanmasında önemli rolü olan bir organdır (Collvin, 1984; Haesloop ve Schrimmer, 1985; Miklovics ve ark., 1985; Bradley ve Morris 1986). Ağır metalleri bağlayarak toksik etkilerinin yok edilmesinde işlev yapan, molekül ağırlıkları düşük, sistein bakımından zengin ve histidin gibi aromatik yapıdaki amino asitlerden yoksun olan metallothioneinlerin (MT) başlıca sentez yerlerinden birisi de karaciğerdir (Cherian ve Goyer, 1978; Tort ve ark., 1984; Harrisson ve Lam, 1985; Olsson ve Haux, 1986; Arumugam ve Ravindranath, 1987; Gagne ve ark., 1990). Balık ve memelilerle yapılan araştırmalar, epinefrin ve glukokortikoid gibi hormonların etkisiyle dolaşım sisteminden fazla miktarlarda absorbe edilerek hücre içi derişimi artan bakırın, metallothioneinleri kodlayan geni aktive ederek bunların sentezini arttırdığını göstermiştir (Cousins, 1985; Olsson ve ark., 1988). Bakırın bağlanmasında karaciğer mitokondrileri de etkin işlev yapmaktadır (Zaba ve Harris, 1978).

Balıklarda kasların bakırı bağlamada etkin bir doku olmamasına karşın, metalin besin zinciri yolu ile insanlara degin taşınmasında önemli bir işlevi olması nedeniyle bu dokudaki metal birikimi üzerine yapılan çalışmalar oldukça fazladır (Cross ve ark., 1973; Sharma, 1983; Miklovics ve ark., 1985; Blevins ve Pancorbo, 1986).

Balıklarda alınan bakır derişimindeki artışın protein metabolizmasında hızlı ve önemli bozulmalar oluşturması nedeni ile

bu araştırmada 0.1, 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm Cu olmak üzere dört farklı ortam derişiminde 1, 7, 15, 30 ve 60 gün sürelerle bırakılan *Tilapia nilotica*'nın karaciğer ve kas dokularındaki bakır birikiminin bu dokulardaki total proteinlerin nicel değişimleri üzerine etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

#### MATERYAL VE METOD

Araştırma materyali olan *T.nilotica*  $7.56 \pm 0.12$  cm boy ve  $7.21 \pm 0.03$  g ağırlığa ulaştığında yetiştirme havuzlarından laboratuvara alınarak  $30*120*40$  cm boyutlarında iki stok akvaryum içerisinde 2 ay süre ile deney koşullarına uyumları sağlanmıştır. Balıklar bu süre içerisinde  $9.08 \pm 0.07$  cm boy ve  $10.76 \pm 0.69$  g ağırlığa ulaşmışlardır. Deneyler süresince balıklara 148 cm uzunluktaki dört floresan lamba (Daylight 65/80 W) ile 8 saatlik aydınlanma periyodu uygulanmıştır. Deney akvaryumlarında havalandırma, akvaryum motorları ile sağlanmış ve balıklar birey başına günde 25mg hazır balık yemi ile beslenmiştir.

Deneyler süresince bazı ortam koşulları aşağıdaki şekilde belirlenmiştir:

Sıcaklık :  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$   
Total sertlik :  $230 \pm 0.75$  ppm  $\text{CaCO}_3$ ,  
pH :  $8.2 \pm 0.15$   
Total alkalinite:  $326 \pm 1.50$  ppm  $\text{CaCO}_3$

Belirlenen 1, 7, 15, 30 ve 60 günlük süreler dikkate alınarak, beş seri halinde yürütülen deneylerde her seride beş akvaryum kullanılmıştır. Bir seride bulunan ve herbiri üç eşit bölmeye ayrılmış olan 20\*60\*25 cm boyutlarındaki beş cam akvaryumun ilk dördüne beşer litre 0.1, 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm derişimlerindeki bakır çözeltileri konarak, metalin karaciger ve kas dokularındaki birikimi ve protein düzeylerine etkileri incelenmiş, beşinci akvaryum ise kontrol gurubu olarak denenmiştir. Deneyler her bölmede ikişer balıkla üç kez tekrarlanmıştır.

Stok bakır çözeltisi olarak kullanılan bakır sodyum sitrat ( $C_6H_5CuNa$ ) çözeltisi (6350 ppm Cu), bakır (II)klörüre ( $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ ), bakırın presipitasyonunu engellemek amacıyla, tri-sodyum sitrat ( $C_6H_5O_7Na \cdot 5H_2O$ ) katılarak hazırlanmıştır (Wisely ve Blick, 1967; Brown ve Ahsanullah, 1971). Zaman içerisindeki değişimler göz önüne alınarak, deney çözeltileri her üç günde bir taze hazırlanan stok çözeltiden uygun seyreltmeler yapılarak değiştirilmiştir.

Belirlenen süreler sonunda deneyden çıkartılan bir seriye ait balıkların karaciger ve kasları canlı bireylerden ayrı ayrı disekte edilerek iki kısma ayrılmış ve bunlar dokuların bakır derişimi ve total protein düzeylerini saptamak amacıyla kullanılmışlardır.

Doku örneklerinin bakır analizleri atomik absorpsiyon spektrofotometrik yöntemler kullanılarak yapılmıştır. Yakma işlemlerinden önce, 150°C de 72 saat süre ile sabit tartıma getirilen dokular, kuru ağırlıkları saptanarak deney tüplerine

aktarılmış ve üzerlerine nitrik asit (Merck, %65; Ö.A.:1.40) - perklorik asit (Merck, %60; Ö.A.:1.53) (2:1 v/v) karışımı eklenmiştir (Muramoto, 1983). Yakma işlemini tamamlamak üzere doku örnekleri 120°C da 60 dakika süre ile kaynatılmıştır. Daha sonra balon jojelere aktarılan örneklerin hacmi damıtık su ile 5 ml'ye tamamlanmıştır.

Bakır absorpsiyon değerleri Instrumentation Laboratories (IL 751) marka atomik absorpsiyon spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. Aynı marka çukur katodlu bakır lambasının kullanıldığı spektrofotometrede, slit aralığı 0.3 nm, lamba akımı 5 ma, fotokatlandırıcı gerilim 530 V, asetilen ve hava akımları ise sırasıyla 4.5 ve 20 ft<sup>3</sup>/dak. olarak ayarlanmış ve ölçümler 324.8 nm dalga boyunda yapılmıştır.

Total protein düzeyi belirlenecek olan doku örneklerine, yaş ağırlıkları saptandıktan sonra, 20 ml, %10'luk triklorasetik asit (TCA; Merck, extra pure) eklenerek (Roe ve ark., 1961), Ultra-Turrax; T-25 homojenizatör ile 24.000 dev./dak.'da 3 dakika homojenleştirilmiştir. Homojenat, 3500 dev./dak.'da 20 şer ml TCA ile iki kez 15 er dakika santrifüjlenerek (Hettich; Universal-1200) üst faza geçen glikojen uzaklaştırılmıştır. Çökelti içerisindeki lipidler, santrifüj tüplerine her defasında 5 er ml etil alkol (%96) eklenerek ve 3500 dev./dak.'da 15 dakika süre ile üç kez santrifüjlenerek, üst faz içerisinde ayrılmıştır. Çökelti 37°C etüvde 48 saat süre ile bekletilerek alkolü uçurulmuştur. Bir

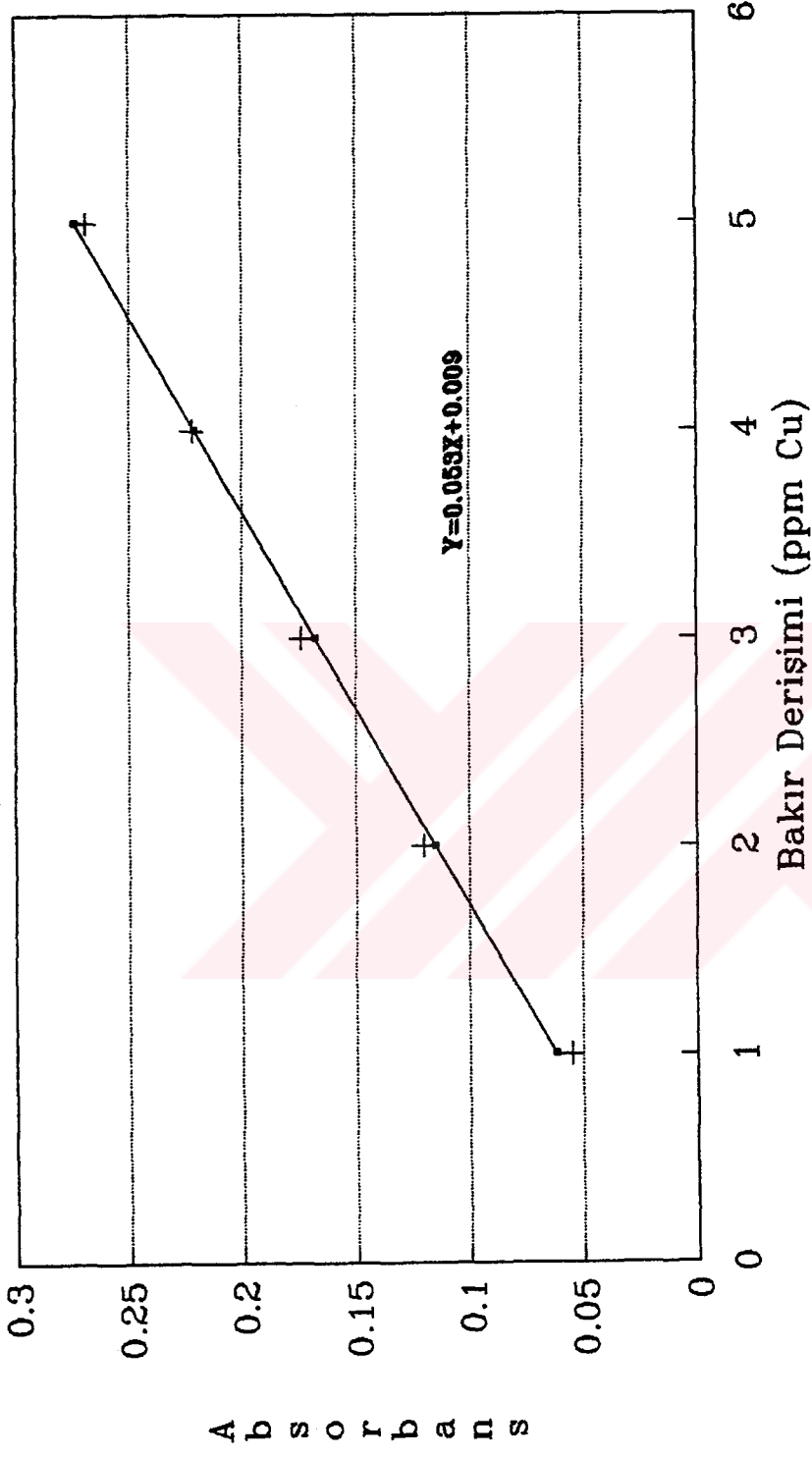
spatül yardımı ile ezilerek toz haline getirilen örneğe, toplam hacim 5ml olacak şekilde damıtık su eklenerek, elde edilen bu çözeltideki protein derişimi "Kantitatif Biüret Testi" ile belirlenmiştir (Plummer, 1971). Bu amaçla, iyice çalkalanan çözeltiden 2 ml alınarak üzerine 3 ml biüret ayıracı eklenmiştir. Örnekler 37°C etüvde 10 dakika bekletildikten sonra 3500 dev./dak.'da 10 dakika santrifüjlenerek spektrofotometre tüplerine aktarılmıştır. Örneklerdeki total protein absorbans değerleri 540 nm dalga boyunda, spektrofotometre (Bausch and Lomb; Spectronic 20) yardımı ile ölçülmüştür.

Deney verilerinin istatistik değerlendirilmesi "Regresyon Analizi", "Varyans Analizi" ve "Student-Newman Keul's Test (SNK)" uygulanarak yapılmıştır (Rohlf ve Sokal, 1969; Sokal ve Rohlf, 1969).

## BULGULAR

Farklı bakır ortam derişimlerinde incelenen *Tilapia nilotica*'nın kas ve karacigerinde yapılan bakır ve total protein analizlerinden elde edilen absorbans değerleri ile dokuların kuru ve yaş ağırlıkları Ek TABLO 1'de verilmiştir.

Bu dokulardaki bakır derişimlerinin belirlenmesi amacıyla, Şekil 1'de verilen ve absorbans ve bakır derişimi arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu kullanılmıştır. Regresyon



Şekil 1: Bakır derişimi ve absorbanans arasındaki doğrusal ilişki.



dogrusunu elde etmek için taze stok çözeltilerden hazırlanan 5.0, 4.0, 3.0, 2.0 ve 1.0 ppm derişimlerdeki bakır çözeltilerinin absorbands değerleri saptanarak bu değerlerden regresyon eşitliği;

$Y = 0.053 X + 0.009$  olarak hesaplanmıştır. Bu eşitlikte Y absorbands, X ise bakır derişimini göstermektedir.

Doku örneklerindeki bakır derişimlerinin saptanmasında aşağıda belirtilen yol izlenmiştir. Karacigerde 15.günde 5 ppm bakır çözeltilisinin "a" tekrarı dikkate alındığında;

Absorbans = 0.156

Örnek Ağırlığı = 0.044 g k.a.

$$\text{Derişim} = \frac{\text{Absorbans} - 0.009}{0.053} \text{ ppm Cu}$$

$$\text{Derişim} = \frac{0.156 - 0.009}{0.053} = 2.773 \text{ ppm Cu}$$

(Örnek, 5 ml asitte yakıldıktan sonra damıtık suyla 5ml'ye tamamlandığından, 0.044 g örnekteki derişim;

$$\text{Derişim} = 2.773 * 5 = 13.865 \text{ } \mu\text{g Cu} / 5 \text{ ml}$$

1 g örnekteki bakır derişimi ise;

$$\text{Derişim} = \frac{13.865}{0.044} = 315.1 \text{ } \mu\text{g Cu/g k.a. olarak bulunur.}$$

Aynı işlemler "b" ve "c" tekrarları için yapıldığında, bakır derişimleri sırasıyla 311.8 µg Cu/g k.a. ve 317.9 µg Cu/g k.a. olarak hesaplanır. Bu değerler Ek TABLO II'de, bunların aritmetik ortalaması olan 314.9 µg Cu/g k.a. değeri ise TABLO I'de 15.günün 5.0 ppm bakır derişimi için verilmiştir.

Belirlenen her süre ve ortam derişiminde dokularda üç tekrarlı olarak saptanan bakır düzeylerinin aritmetik ortalamaları karaciğer ve kas için sırası ile TABLO I ve II'de sunulmuştur.

Dokuların protein düzeylerinin belirlenmesinde, protein düzeyi ve absorbands arasındaki ilişki kullanılmıştır. Bilinen derişimlerdeki albumin çözeltilerine karşı gelen absorbands değerlerinin saptanması için taze hazırlanmış stok albumin (100 mg Albumin/ml) çözeltilisinden seyreltmeler yapılarak 6.0, 4.0, 2.0, 1.0 ve 0.5 mg/ml derişimlerindeki çözeltiler elde edilmiştir. Bu derişimlere karşı gelen absorbands değerleri materyal ve metod bölümünde belirtildiği şekilde elde edilerek verilere regresyon analizi uygulanmış ve protein derişimi ile absorbands arasında doğrusal bir ilişki bulunmuştur (Şekil 2). Absorbans Y, protein derişimi ise X ile gösterildiğinde bu doğrunun regresyon eşitliği

$$Y = 0.1 X + 0.044$$

olarak vurgulanabilir.

Kas ve karaciğerdeki protein derişimlerinin saptanmasında Ek TABLO I'de verilen dokuların yaş ağırlıkları, absorbands değerleri ve Şekil 2'de gösterilen protein derişimi ve absorbands arasındaki ilişkiyi gösteren regresyon doğrusu kullanılmıştır.

TABLE 1. T.nilotica'da bakırın karacigerdeki birikimi ( $\mu\text{g Cu/g k.a.}$ ) üzerine ortam derişimi ve sürenin etkileri

DERİŞİM (ppm Cu)	SURE				
	1 Gün	7 Gün	15 Gün	30 Gün	60 Gün
	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	34.60 $\pm$ 0.49	101.2 $\pm$ 5.28	160.3 $\pm$ 1.07	251.9 $\pm$ 1.61	436.1 $\pm$ 3.03
1.0	52.55 $\pm$ 0.89	136.2 $\pm$ 2.40	246.0 $\pm$ 3.20	359.1 $\pm$ 6.49	610.8 $\pm$ 5.75
5.0	67.81 $\pm$ 0.78	173.5 $\pm$ 3.22	314.9 $\pm$ 1.76	416.8 $\pm$ 5.47	756.0 $\pm$ 15.72
10.0	87.77 $\pm$ 0.75	216.4 $\pm$ 12.46	416.2 $\pm$ 1.70	509.9 $\pm$ 7.48	- - -

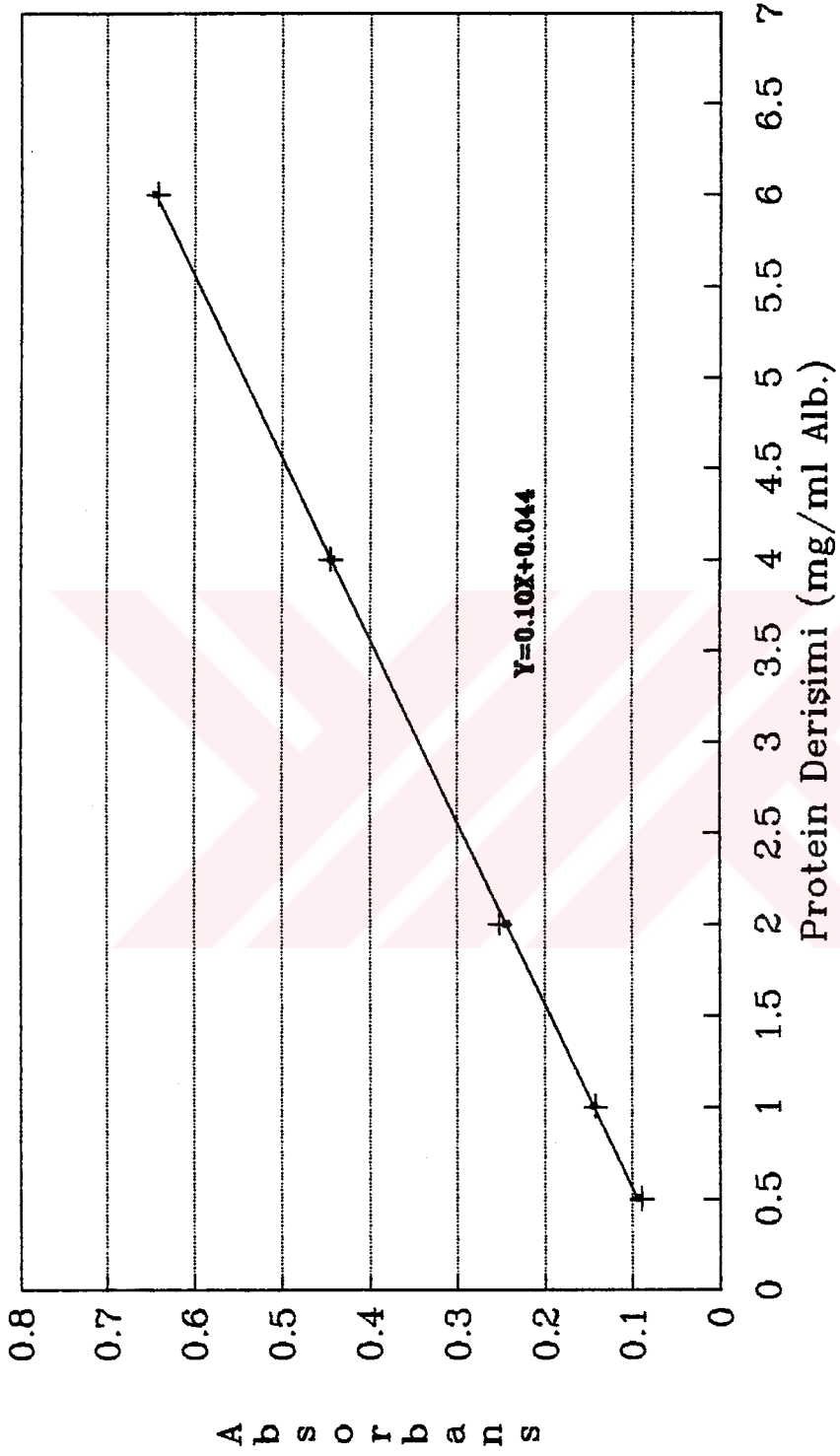
\* = SNK ; a, b, c, d ve e derişimler; s, t, x, y ve z harfleri süreler arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.01$  düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{X}$  = Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata

TABLO II. T.nilotica'da bakırın kastaki birikimi ( $\mu\text{g Cu/g k.a.}$ ) üzerine ortam derişimi ve sürenin etkileri

DERİŞİM (ppm Cu)	SURE				
	1 Gün	7 Gün	15 Gün	30 Gün	60 Gün
	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$	$\bar{X} \pm s\bar{X}$
0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.1	7.172 $\pm$ 0.40	12.50 $\pm$ 0.61	17.89 $\pm$ 0.53	21.66 $\pm$ 0.36	28.65 $\pm$ 0.20
1.0	8.949 $\pm$ 0.59	17.40 $\pm$ 0.26	23.72 $\pm$ 0.23	32.39 $\pm$ 0.60	45.11 $\pm$ 1.74
5.0	9.682 $\pm$ 0.31	23.12 $\pm$ 0.53	29.50 $\pm$ 0.36	38.03 $\pm$ 0.25	55.90 $\pm$ 0.85
10.0	12.13 $\pm$ 0.37	26.71 $\pm$ 0.50	34.94 $\pm$ 0.42	42.81 $\pm$ 0.45	- - -

\* = SNK ; a, b, c, d ve e derişimler; s, t, x, y ve z harfleri süreler arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.01$  düzeyinde istatistik ayrım vardır.  
 $\bar{X} \pm s\bar{X}$  = Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata



Şekil 2: Protein derişimi ve absorbans arasındaki doğrusal ilişki.

Bu işlemlere örnek olarak aşağıda, 15 gün 5.0 ppm Cu çözeltisinde kalan balıkların karacigerlerinde yapılan ölçümlerin "a" tekrarı verilmiştir.

Absorbans = 0.135

Örnek Ağırlığı = 0.1357 g y.a.

$$\text{Derişim} = \frac{\text{Absorbans} - 0.044}{0.10} \text{ mg/ml}$$

$$\text{Derişim} = \frac{0.135 - 0.044}{0.10} = 0.91 \text{ mg/ml}$$

Kurutulan örnek damıtık su ile 5 ml'ye tamamlandığından toplam örnekteki protein derişimi;

$$\text{Derişim} = 0.91 * 5 = 4.55 \text{ mg/5 ml}$$

Bir gram yaş ağırlıktaki protein derişimi ise;

$$\text{Derişim} = \frac{4.55}{0.1357} = 33.52 \text{ mg/g y.a. olarak saptanır.}$$

Aynı işlemler "b" ve "c" tekrarları için yapıldığında protein düzeyleri sırası ile 34.54 ve 32.68 mg/g y.a. olarak belirlenir. Bu üç değer Ek TABLO II'de "Protein Derişimi" kolonunda , bunların aritmetik ortalaması olan 33.58 mg/g y.a. değeri ise TABLO III'de, 15.günün 5.0 ppm bakır derişimi için verilmiştir.

Belirlenen her süre ve ortam derişiminde üç tekrarlı olarak saptanan protein düzeylerinin aritmetik ortalamaları karaciger ve kas için sırası ile TABLO III ve IV de sunulmuştur.

TABLO III. *T.nilotica*'da bakırın karaciğerdeki birikiminin protein derişimi (mg/g y.a.)  
üzerine etkileri

DERİŞİM (ppm Cu)	SURE				
	1 Gün	7 Gün	15 Gün	30 Gün	60 Gün
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *	$\bar{X} \pm s\bar{x}$ *
0.0	9.792 $\pm$ 0.36 as	9.966 $\pm$ 0.42 as	9.924 $\pm$ 0.57 as	10.74 $\pm$ 0.54 as	9.867 $\pm$ 0.74 as
0.1	12.32 $\pm$ 0.87 bs	12.30 $\pm$ 0.33 bs	24.86 $\pm$ 0.76 bt	28.21 $\pm$ 0.67 bx	15.37 $\pm$ 0.63 by
1.0	15.66 $\pm$ 0.13 cs	16.19 $\pm$ 0.33 cs	28.75 $\pm$ 0.60 ct	33.05 $\pm$ 0.64 cx	19.93 $\pm$ 1.01 cy
5.0	19.43 $\pm$ 0.49 ds	24.68 $\pm$ 0.88 dt	33.58 $\pm$ 0.53 dx	39.64 $\pm$ 3.01 dy	33.42 $\pm$ 0.40 dx
10.0	22.94 $\pm$ 0.41 ds	37.28 $\pm$ 0.83 et	40.11 $\pm$ 0.67 ex	52.26 $\pm$ 0.72 ey	- - -

\* = SNK ; a, b, c, d ve e derişimler; s, t, x ve y harfleri süreler arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.01$  düzeyinde istatistik ayrım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$  = Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata

TABLO IV. T.nilotica'da bakırın kastaki birikiminin protein derişimi (mg/g y.a.)  
üzerine etkileri

DERIŞİM (ppm Cu)	SURE				
	1 Gün	7 Gün	15 Gün	30 Gün	60 Gün
	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$	$\bar{X} \pm s\bar{x}$
0.0	17.00 $\pm$ 0.68 as	17.52 $\pm$ 1.21 as	16.78 $\pm$ 1.35 as	18.00 $\pm$ 1.32 as	17.87 $\pm$ 0.53 as
0.1	16.47 $\pm$ 0.45 as	16.03 $\pm$ 0.15 as	15.20 $\pm$ 1.10 as	13.24 $\pm$ 0.36 bt	12.89 $\pm$ 0.45 bt
1.0	15.55 $\pm$ 0.67 as	13.16 $\pm$ 0.28 bt	12.42 $\pm$ 0.46 bt	9.975 $\pm$ 0.18 cx	9.034 $\pm$ 0.22 cx
5.0	13.23 $\pm$ 0.14 bs	10.55 $\pm$ 1.04 ct	9.750 $\pm$ 0.54 ct	7.709 $\pm$ 0.41 dx	5.855 $\pm$ 0.41 dx
10.0	11.13 $\pm$ 0.29 cs	8.305 $\pm$ 0.51 ct	7.064 $\pm$ 0.17 dx	4.911 $\pm$ 0.18 ey	- - -

\* = SNK ; a, b, c, d ve e derişimler; s, t, x ve y harfleri süreler arası ayrımı belirlemek amacıyla kullanılmıştır. Farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.01$  düzeyinde istatistik ayırım vardır.

$\bar{X} \pm s\bar{x}$  = Aritmetik ortalama  $\pm$  Standart hata



Belirli bir derişimde etkide kalma süresinin ve yine belirli bir süre sonunda artan ortam derişiminin dokulardaki bakır birikimine etkisini saptamak amacı ile TABLO I ve II deki veriler SNK testi ile analiz edilerek sonuçlar bu tablolarda sunulmuştur. Tablolardaki a, b, c, d, ve e harfleri artan ortam derişiminin, s, t, x, y ve z harfleri ise artan sürenin etkisini belirtmek amacı ile kullanılmıştır. Tablolarda farklı harflerle gösterilen veriler arasında  $P < 0.01$  düzeyinde istatistik ayırım vardır.

Aynı ortam derişiminde, etkide kalma süresi ile *T. nilotica*'nın karaciğer ve kas dokularındaki bakır birikimi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur. Dokularda süreye bağlı olarak gözlenen bu artış tüm ortam derişimlerinde istatistik önem taşımaktadır (TABLO I ve II; SNK,  $P < 0.01$ ). Birinci ve altmışıncı günler dikkate alındığında karaciğerdeki bakır birikiminde 10 katdan daha fazla bir artma gözlenirken, kasta 5 katlık bir artış olmuştur. Belirli bir ortam derişimi ve sürede karaciğer ve kas dokularındaki bakır birikimi arasındaki ayırımı belirlemek amacı ile veriler SNK testi ile analiz edilmiş ve karaciğerdeki birikimin tüm derişim ve sürelerde kastaki birikimden, önemli derecede yüksek olduğu saptanmıştır ( $P < 0.01$ ). Etkide kalma süresi arttıkça, karaciğer/kas bakır birikimi oranı da artmaktadır.

Belirli bir zaman sürecinde doku birikimi ortam derişimine bağlı olarak artmaktadır. Bu artma, 1.0 ve 5.0 ppm Cu etkisinde bir gün kalan balıkların kasları dışında, tüm süreler için

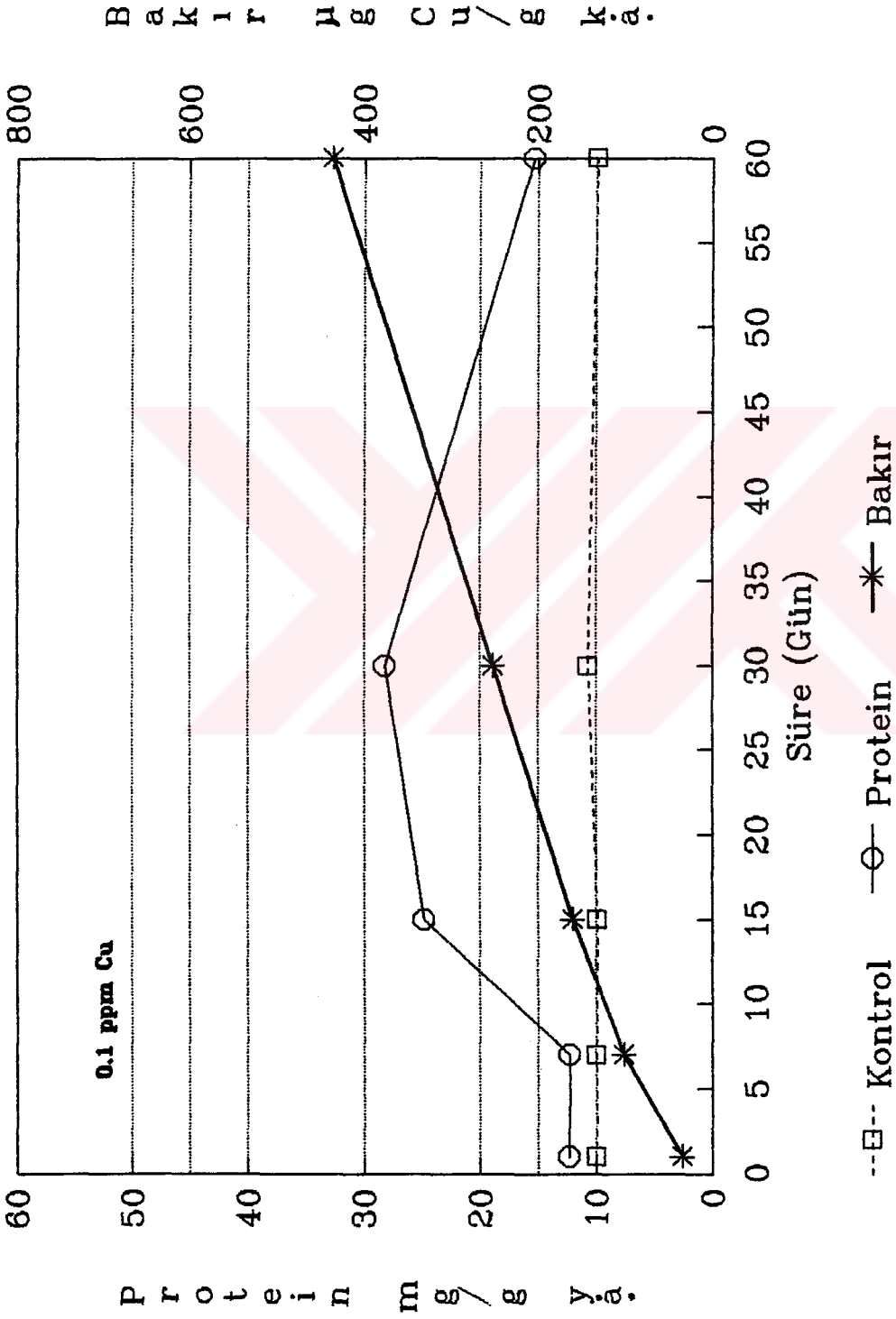
İstatistik önem taşımaktadır (TABLO I ve II; SNK,  $P < 0.01$ ). Belirli bir sürede ortam derişimindeki 10 katlık bir artma her iki dokuda da 1-1.5 katlık artmalara neden olmuştur.

Belirlenen her süre ve ortam derişiminde dokularda üç tekrarlı olarak saptanan protein düzeylerinin (Ek TABLO II) aritmetik ortalamaları karaciger ve kas için sırası ile TABLO III ve IV'de verilerin istatistik analizleri ile birlikte sunulmuştur.

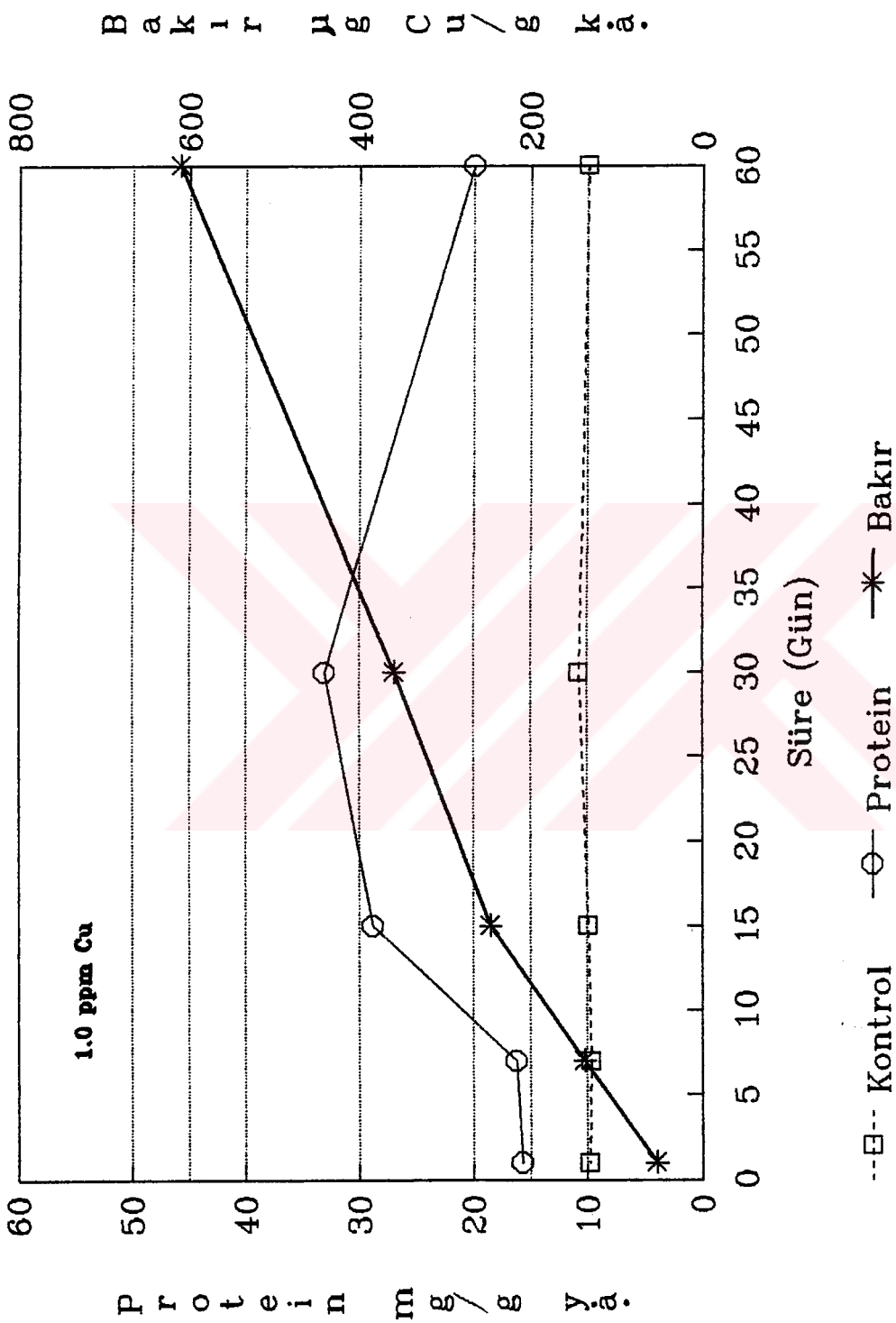
Karacigerde 0.1 ve 1.0 ppm ortam derişimlerinde 7.gün sonuna değin protein düzeyinde önemli bir değişim olmamıştır (TABLO III; SNK,  $P > 0.05$ ). Diğer tüm ortam derişimlerinde, 5.0 ppm Cu'da 15 ve 60. günler dışında, protein düzeyi etkide kalınan süreye bağlı olarak değişim göstermiştir ( $P < 0.01$ ).

Kas protein düzeyi 0.1 ppm derişimde 15.güne kadar değişim göstermezken, 1.0 ve 5.0 ppm derişimlerinde 7-15. ve 30-60. günler arasında değişim göstermemiştir. 10.0 ppm Cu ortam derişiminde ise etkide kalma süresinin artması kastaki protein düzeyinde önemli bir azalmaya neden olmuştur (TABLO IV; SNK,  $P < 0.01$ ).

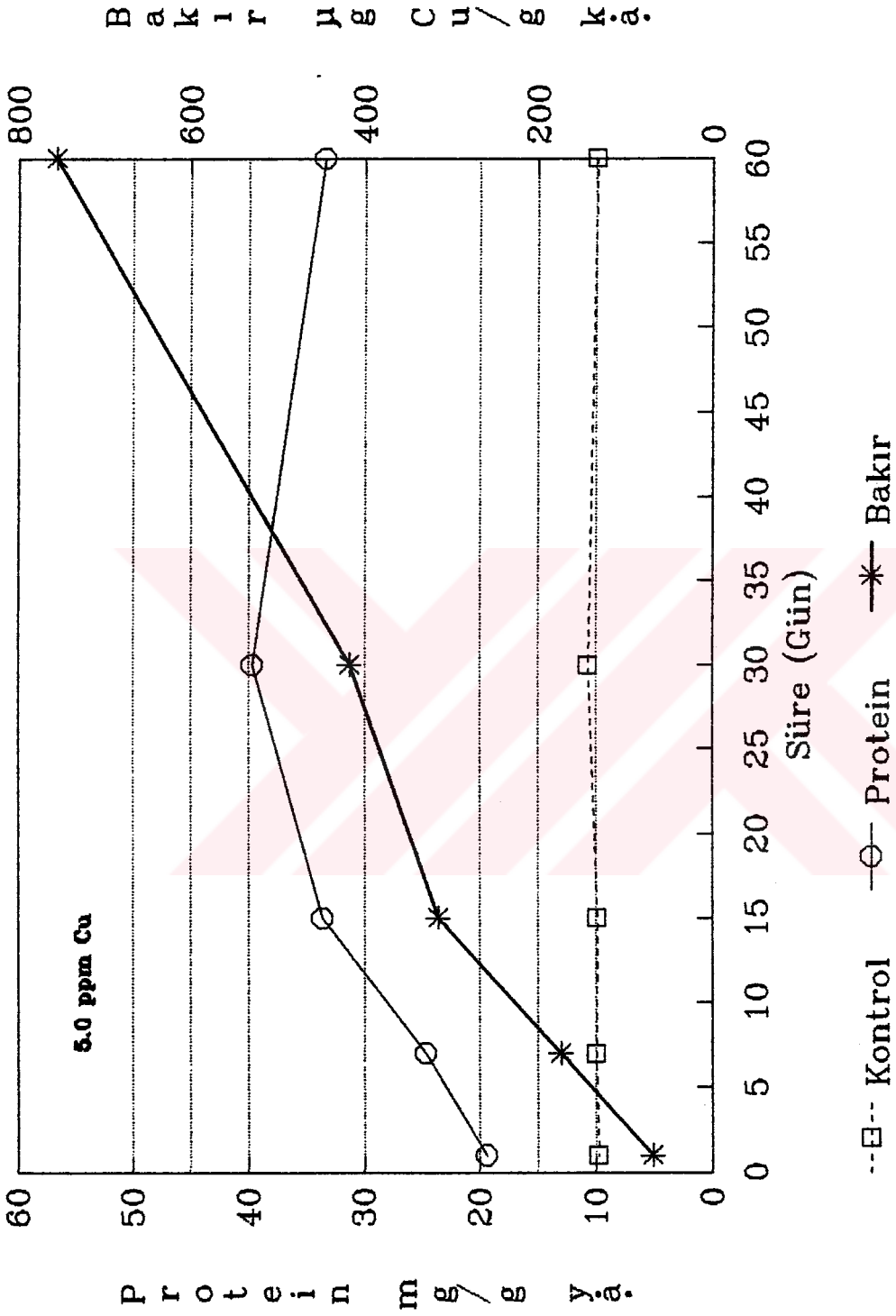
TABLO I ve III'de karaciger için sunulan verilerin grafiksel anlatımları Şekil 3-6'da verilmiştir. Karaciger protein düzeyleri tüm derişimlerde 30.güne kadar bir yükselme göstermiştir. Protein düzeyinde otuzuncu güne kadar gözlenen bu artış, ortam derişimi ve buna bağlı olarak karaciger bakır birikimi ile doğru orantılıdır. Karaciger bakır birikimi, 0.1, 1.0 ve 5.0 ppm Cu derişimlerinde otuzuncu günden sonra da artmasına devam etmiş ancak protein



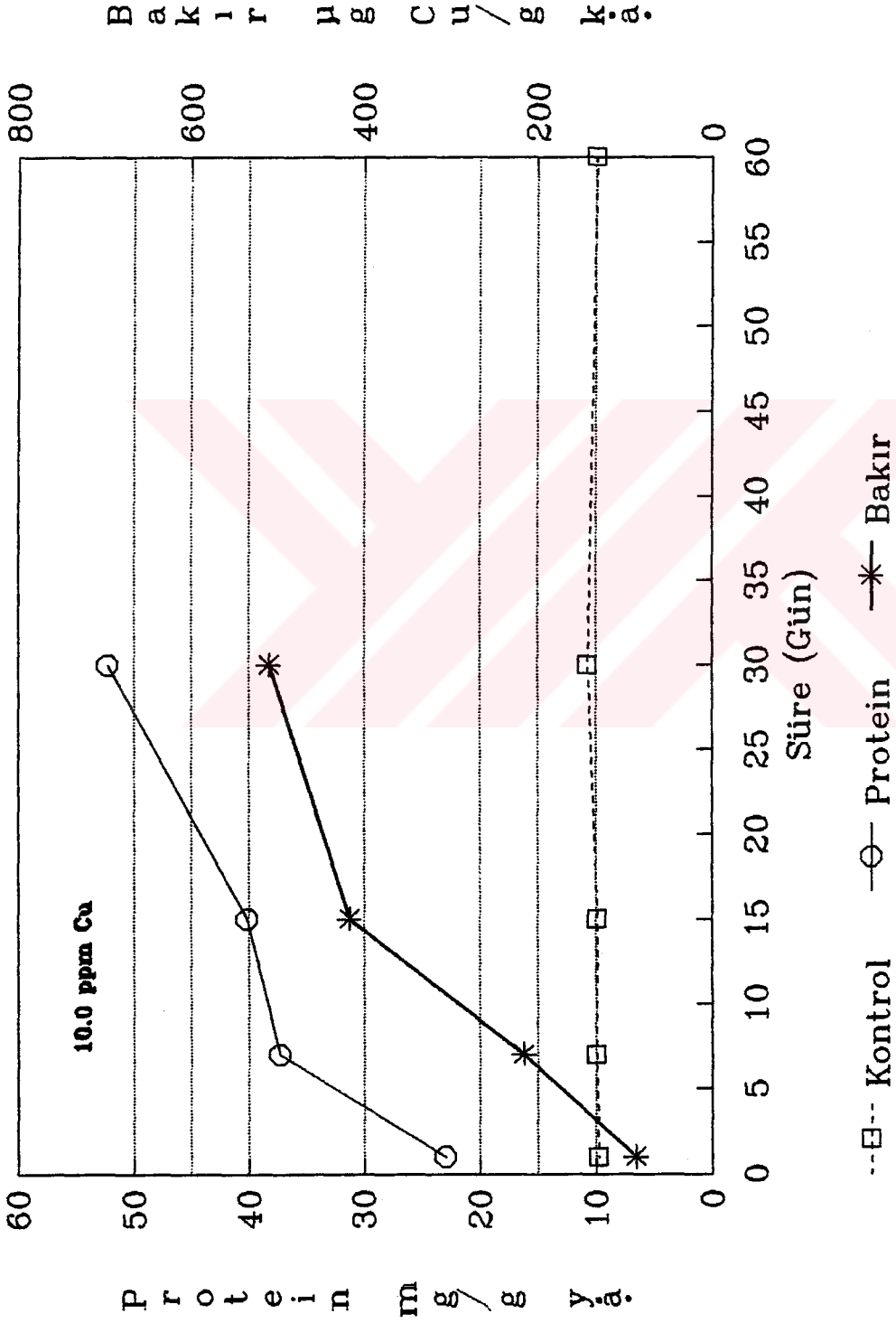
Şekil 3 : Tilapia nilotica'da 0.1 ppm Cu ortam derişiminde karaciğerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.



Şekil 4 : Tilapia nilotica'da 1.0 ppm Cu ortan derişiminde karaciğerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.



Şekil 5: Tilapia nilotica'da 5.0 ppm Cu ortam derişiminde karaciğerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.



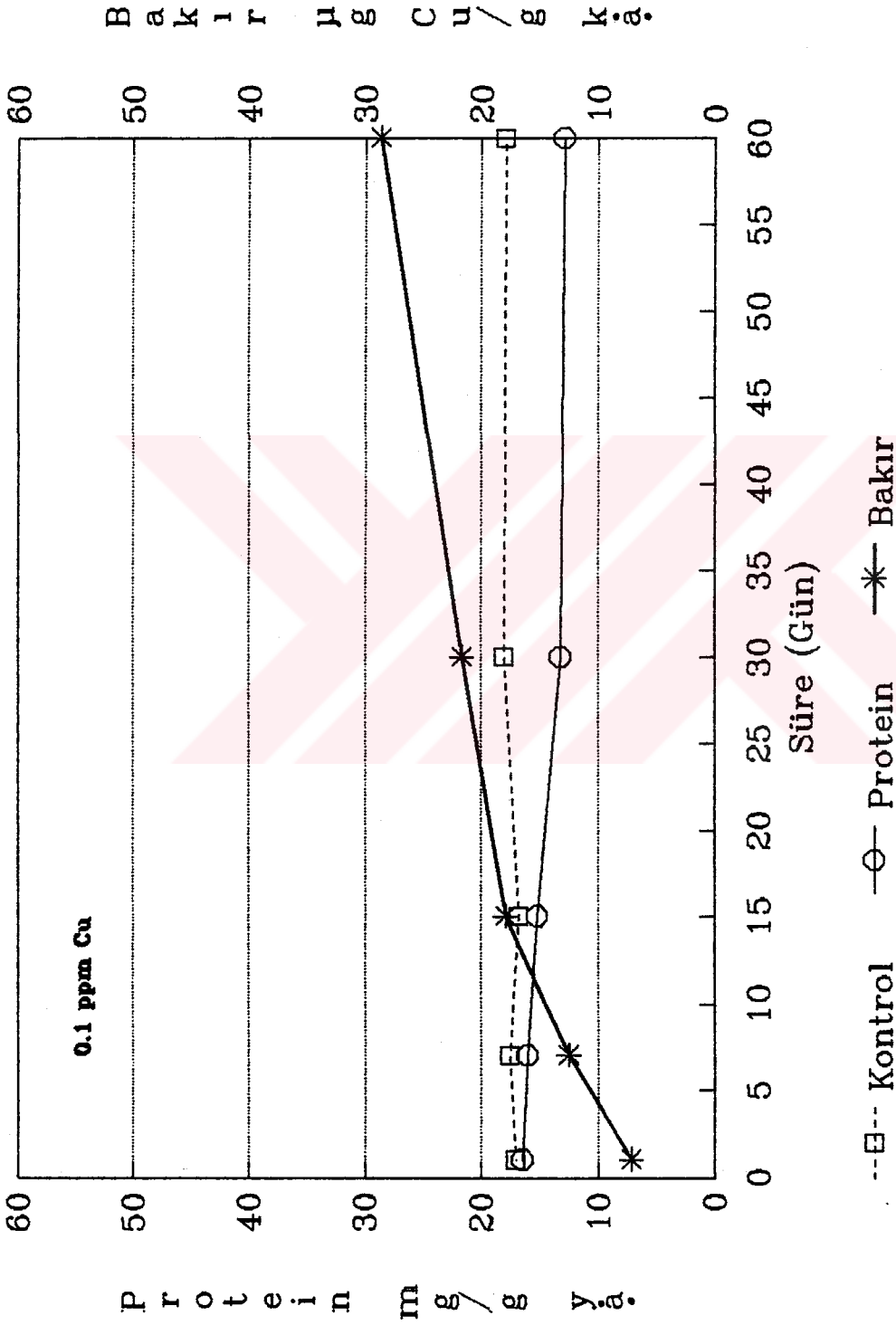
Şekil 6: *Tilapia nilotica*'da 10.0 ppm Cu ortam derişiminde karaciğerdeki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.

düzeylerinde önemli düşmeler olmuştur. 10.0 ppm ortam derişiminde 30.güne kadar karaciger bakır birikimi ve protein düzeyi artmış, bu gurupta bulunan balıklar 30. günle 60. gün arasında ölmüşlerdir.

Tablo II ve IV'de kas için saptanan verilerin grafiksel anlatımları Şekil 7-10'da verilmiştir.Etkide kalma süresi ve ortam derişiminin artması kastaki bakır birikimini artırırken, protein düzeyini düşürmüştür.

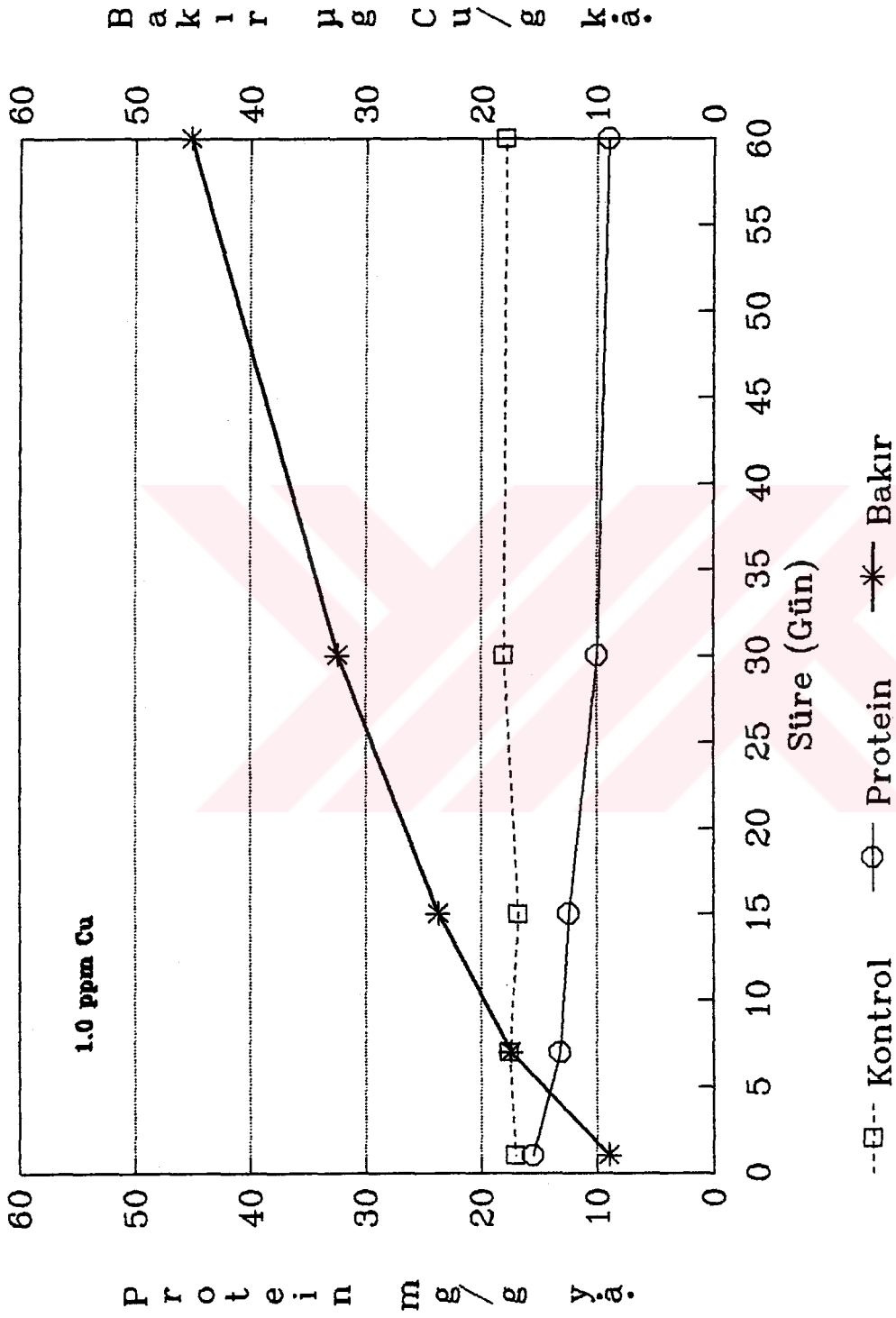
Çalışılan dokular protein düzeyleri bakımından karşılaştırıldıklarında, tüm kontrol guruplarında karaciger ve kas protein düzeyleri arasındaki ayırım istatistik olarak önemlidir ( $P<0.01$ ). Bu guruplarda karaciger protein düzeyi kastakinden daha düşüktür.

Protein düzeyleri tüm ortam derişimlerinde karacigerde süreye bağlı olarak artarken, kasta azalma göstermiştir. Karaciger protein düzeyi 0.1 ppm Cu ortam derişiminde 15.günde, diger derişimlerde ise 1.günde kastaki düzeyini geçmiştir. Dokuların protein düzeyleri arasındaki ayırım, 0.1 ppm Cu derişiminde bir gün kalan balıklar dışında, istatistik önem taşımaktadır (SNK;  $P<0.01$ ). Ortam derişimindeki on katlık bir artma karacigerdeki protein düzeyini 1-2 kat kadar artırırken, kastaki düzeyinde aynı oranlarda düşmeye neden olmaktadır.

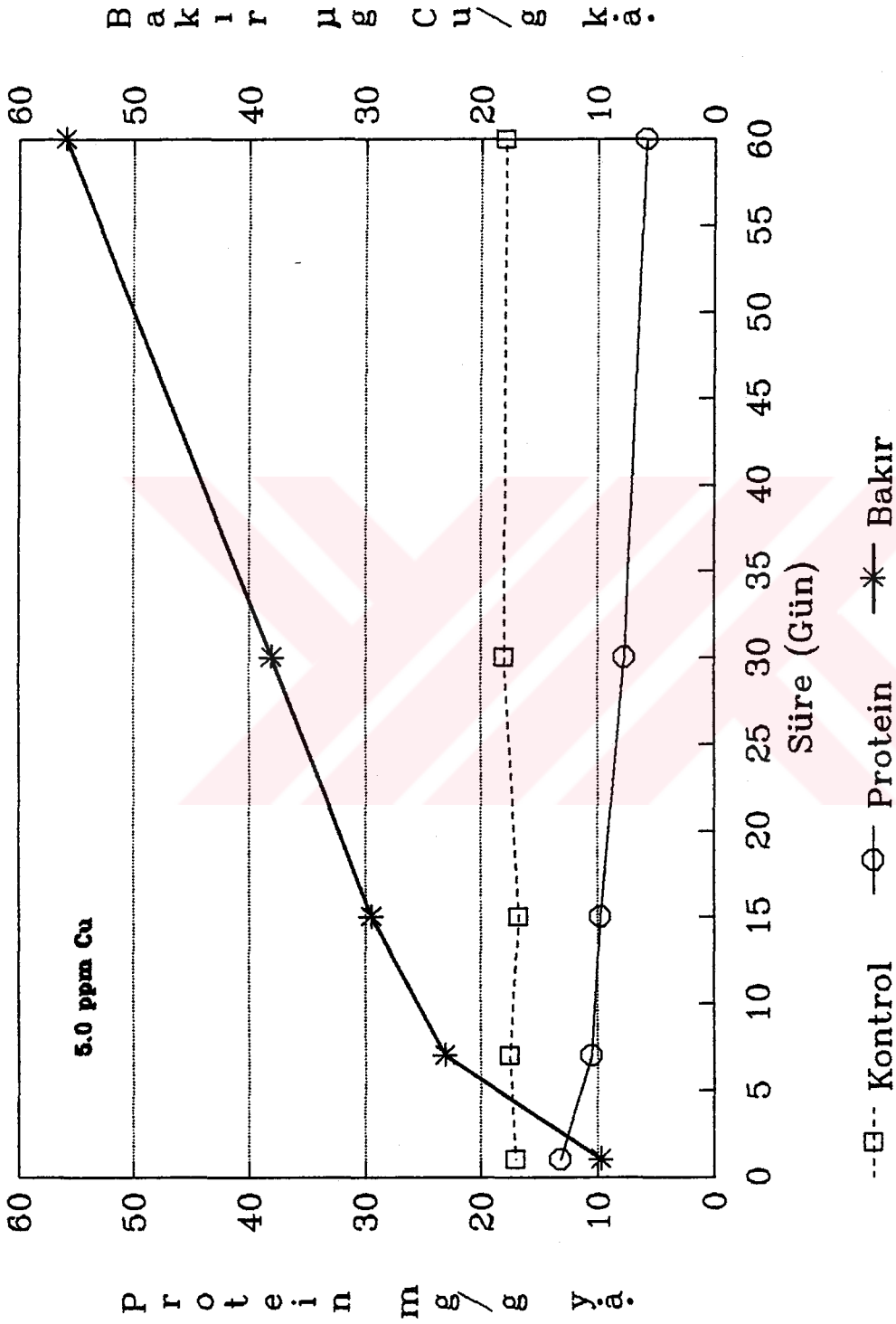


Şekil 7: Tilapia nilotica'da 0.1 ppm Cu ortam derişiminde kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.

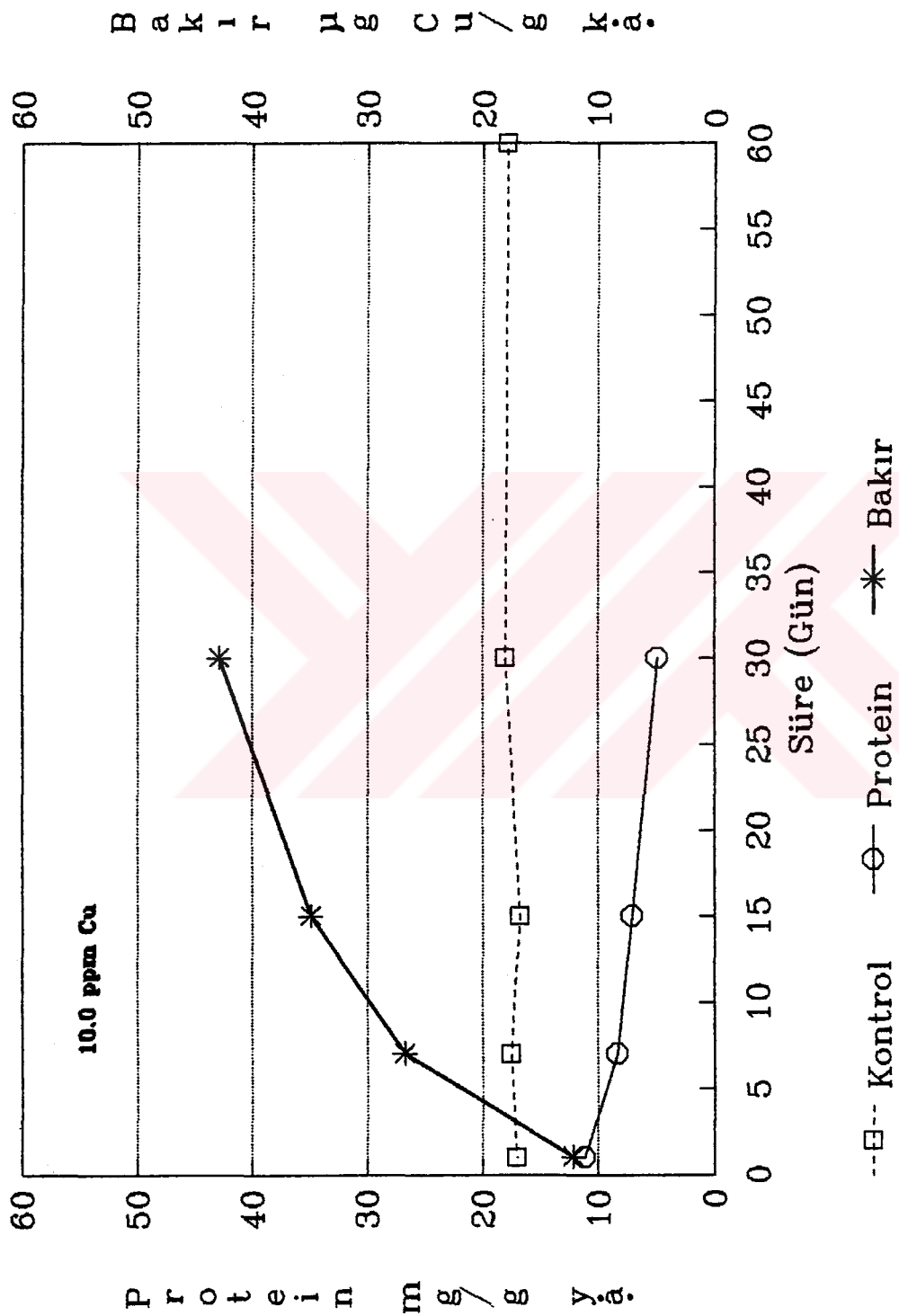




Şekil 3: *Tilapia nilotica*'da 1.0 ppm Cu ortan derişiminde kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.



Şekil 9: Tilapia nilotica'da 5.0 ppm Cu ortan derişiminde kastalci bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.



Şekil 10: Tilapia nilotica'da 10.0 ppm Cu ortan derişiminde kastaki bakır birikiminin total protein düzeyine etkileri.

## TARTIŞMA

Balıklarda ağır metallerin mortalite üzerine etkileri türler arasında ayırım göstermekle birlikte (Brown ve ark., 1986), çeşitli türler üzerinde yapılan araştırmalar belirli bir derişim aralığının üzerinde mortalite oranının hızla arttığını göstermektedir (Abel ve Papoutsoglou, 1986). Aynı çalışmada *Tilapia aurea* için 35 günde LC<sub>50</sub>'nin 0.7 ve 20 ppm Cd arasında değiştiği saptanmıştır. Aynı bakır derişimlerinde *Tilapia nilotica*, *Cyprinus carpio*'ya oranla daha uzun süre yaşayabilmektedir (Kargin, 1990). *T. nilotica* ile yapılan bu araştırmada 0.1, 1.0 ve 5.0 ppm Cu ortam derişimlerinde 60 günlük deney süresince mortalite gözlenmemiş, ancak 10.0 ppm Cu derişiminde 30 ile 60. günler arasında mortalite oranı % 100 olmuştur.

Balıklarda yüksek bakır derişimlerinde gözlenen mortalite çeşitli etkiler sonucu ortaya çıkabilmektedir. Örneğin bakır *Salmo gairdneri*'de plazmadaki asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesini inhibe ederek kalbin fonksiyonunu engellemekte ve dolaşım sistemindeki aksama nedeniyle O<sub>2</sub> - CO<sub>2</sub> alışverişini etkileyerek doku düzeyinde hypoxia'ya neden olmaktadır (Nemcsok ve Hughes, 1988). Aynı araştırmacılar bakırın, solungaç epitel hücrelerinin sekonder lamellerine zarar vererek O<sub>2</sub> diffüzyon kapasitesini azalttığını belirtmişlerdir. Bakırın apikal hücrelerin membranlarında geçirgenliği artırarak K<sup>+</sup> kaybına neden olduğu saptanmıştır (Zaba ve Harris, 1978; Lauren ve McDonald, 1985).

Balıklarda benzer etkiler kurşun (Katti ve Sathyanesan, 1986), kadmiyum (Tort ve Rosell, 1989) ve çinko (Tort ve ark., 1984) ile de gözlenmiştir.

Bu araştırmadan tüm ortam derişimlerinde karacigerde kasa oranla çok daha yüksek derişimlerde bakır biriktirdiği saptanmıştır. *T.nilotica*'nın farklı dokularında bakır birikimi üzerine yapılan bir araştırmada, bakırın en yüksek derişimleri dalak ve karacigerde en düşük derişiminin ise kasta saptanmış olması (Erdem ve Kargin 1990) bulgularımızı desteklemektedir. Balıklarda bakır birikimi bakımından karacigerin aktif bir organ olduğu, kas için saptanan değerlerin ise genelde düşük olduğu doğal koşullarda (Honda ve ark., 1983; Kulikova ve ark., 1985; Roch ve ark., 1985; Bradley ve Morris, 1986) ve laboratuvarında (Buckley ve ark., 1982; Collvin, 1985; Hilmy ve ark., 1987a) yapılan araştırmalarla saptanmıştır.

Bakırın portal sisteme girmesi ve karacigere ulaşmasında albumin işlev yapmaktadır. Albumine zayıf bağlanmış olması bakırın doku alış-verişini kolaylaştırmaktadır. Romanenko ve Yevtushenko (1985) *Cyprinus carpio*'da ortamdaki bakır derişiminin artmasına paralel olarak plazma albumin düzeylerinde de bir artış saptamışlardır. Serum içerisinde bakırın taşınmasında albumine ek olarak amino asitler de işlev yapmaktadır. Omurgalılarda protein sentezinin %85'inin yapıldığı karacigerde bakırın alınma ve depolanması oldukça etkin ve hızlı bir şekilde yapılmaktadır.

Örneğin serumda bulunan bakırın, farelerde %50, insanlarda ise %80'i bir gün içerisinde karaciğerlere geçmektedir (Collvin, 1984; Cousins, 1985).

Karaciğer ve böbrekler, Cu ve Zn gibi metallerin depolanma yeri olarak işlev yapan metallothionein (MT) sentezinin yapıldığı başlıca organlardır. Bunların hemen her dokuda belirli miktarlarda normal koşullarda da bulunmaları (Noel-Lambot ve ark., 1978; Olsson ve ark., 1988), MT'lerin hücre içi ve hücre dışı metal metabolizmasının kontrolünü yapmakta olduğunu göstermektedir. MT sentezini Cu, Zn ve Cd'ye ek olarak epinefrin ve glukokortikoid hormonlar da arttırmaktadır. Düşük molekül ağırlıklı MT'lerin temel işlevleri arasında Cd, Hg gibi toksik metallerle, aşırı derişimlerdeki Cu ve Zn gibi mikroelementlerin hücre içerisinde detoksifikasyonu, Cu ve Zn depolanması, taşınması ve belirli yerlerde tutulması sayılabilir (Ley ve ark., 1983).

Bakır iyonlarının derişiminin artması MT geninin transkripsiyonunu artırarak fazla bakırı bağlamak üzere metal proteinlerinin sentezini hızlandırmaktadır (Noel-Lambot ve ark., 1978). Bu proteinler metalleri öncelikle bağlayarak enzimler gibi yüksek molekül ağırlıklı hücre proteinlerinin (Harrison ve Lam, 1985) metabolik aktivitelerini ağır metal toksisitesine karşı korumaktadır (Winge ve ark., 1973; Buckley ve ark., 1982). Etkide kalma süresinin uzaması ile fare karaciğerindeki bu tip proteinlerde bakır derişiminin arttığı saptanmıştır (McCarter ve ark., 1982).

Bu araştırmada tüm ortam derişimlerinde *T.nilotica'nın* karaciğer protein düzeyleri 30. güne değin nicel olarak artmıştır. *Clarias batrachus* ile yapılan bir çalışmada da bakırın karaciğer proteinlerinde bir artışa neden olduğu saptanmıştır (Jana ve Sahana, 1988). Diğer ağır metallerin balıkların karaciğer proteinlerinde bir artmaya neden olduğu çeşitli araştırmacılar tarafından saptanmıştır (Hilmy ve ark., 1985; Jana ve ark., 1986; Sahana ve ark., 1986). Kadmiyum etkisi *Mugil cephalus'un* karaciğer protein düzeyini arttırmıştır (Hilmy ve ark., 1985). Hilmy ve ark. (1987b) *Clarias lazera* ve *Tilapia zilli'de* inko ortamında karaciğerdeki protein artışının, bu organdaki MT sentezinin artması nedeniyle olduğunu belirtmişlerdir.

*T.nilotica'da* aynı süre içerisinde ortam derişimindeki artışla karaciğerdeki bakır birikimi ve protein düzeyinde de artmalar saptanmıştır (şekil 3-6). *Oncorhynchus kisutch'da* karaciğerdeki MT sentezi ortamdaki bakır derişimine bağlı olarak artmaktadır (McCarter ve Roch, 1984). *Pleuronectes platessa'da* karaciğer Zn derişimi ile MT düzeyi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (Overnell ve ark., 1987).

Belirli bir bakır derişiminin etkisinde kalan balıklarda karaciğer MT'leri başlangıçta çok yüksek dzeyele ulaşmakta, bir süre sonra azalarak bir denge durumuna gelmektedir (McCarter ve Roch, 1984). Araştırmacılar farklı derişimlerde bakırın etkisinde kalan *Oncorhynchus kisutch'un* karaciğer MT düzeyinin 4 haftalık

bir artıştan sonra ise bir denge durumuna ulaşıldığını saptamışlardır. *T. nilotica*'da da karaciğer protein düzeyleri deneylerin ilk 4 haftası süresince artış göstermekte, 30-60. günler arasında ise azalmaktadır.

MT'lerin parçalanması lizozomal proteazlarca yapılmaktadır. Ancak bakır MT'lerinin polimerizasyona uğramaları nedeniyle çinko ve kadmiyum MT'lerine oranla parçalanmaları çok daha zor olmaktadır. MT ve lizozomlar bakır homeostasisinde önemli rol oynamaktadırlar (Viarengo ve ark. 1988). Yüksek bakır derişimlerinde bakır MT'leri lizozomlarda depolanmaktadır. *Fundulus heteroclitus*'ta yüksek bakır derişimlerinin lizozom sayısında artmaya neden olduğu saptanmıştır (Weis ve ark., 1986).

Glukokortikoid, epinefrin ve cAMP'nin yanı sıra bakır da seruloplazmin ve MT sentezini yapan genlerin transkripsiyonunu artırmaktadır (McCarter ve ark., 1982; Cousins, 1985; Segner, 1987). Hepatositlerden bakırın salınması taşıyıcı bir glukoprotein olan seruloplazmin aracılığı ile olmaktadır. Bakır seruloplazmine albumine oranla daha sıkı bir şekilde bağlanmaktadır.

Glukokortikoidler bakırın karaciğer hücrelerinden seruloplazmin aracılığı ile salgılanmasını ve ayrıca safra yolu ile atılımını arttırmaktadır. Bu nedenle seruloplazmin ekstrahepatik dokularda bakırın temel kaynağını oluşturmaktadır. Serum bakırının %90 - 95'i seruloplazminde bulunmaktadır. Yamamoto ve ark. (1977) bakırın *Cyprinus carpio*'nun kan serumunda seruloplazmin düzeyini



artırdığını saptamışlardır. Seruloplazminin temel görevinden birisi bakırı dokulara taşımaktır. Hücre membranı reseptörlerinde bakırın  $Cu^{++}$  den  $Cu^{+}$ 'e indirgendigi belirtilmektedir (Cousins, 1985). Brubaker ve ark. (1971) Metil civa hidroksit (MCH), sıçanlarda ribozom sayısını ve işlevsel etkinliğini ayrıca poliribozom oluşumunu arttırdığını buna bağlı olarak da karacigerin protein sentez yeteneğinde bir artışa neden olduğunu saptamışlardır. MCH serum proteinlerinin sentezinin yapıldığı granüllü endoplazmik retikulumda bir artışa ,enzim proteini sentezleyen granülsüz endoplazmik retikulumda ise bir azalmaya neden olmuştur. Aynı şekilde *Rutilus rutilus*'ta bakır granüllü endoplazmik retikulum miktarında önemli artışlara neden olmaktadır (Segner,1987).

*T. nilotica*'da karaciger proteinlerinde 30. güne kadar saptanan artışın alınan fazla bakırın karacigere taşınması, burada depolanması, ekstrahepatik dokulara dağılımı ve atılımı ile ilgili olan proteinlerin sentez artışlarına bağlı olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Karaciger proteinlerinde 30. günden başlayarak gözlenen azalma ise MT sentez kapasitesinin bu süre içerisinde maksimuma ulaşmasına bağlanabilir.

Denenen tüm derişimlerde ilk 30 günlük sürede karacigerdeki protein artmasına karşın, bakır *T. nilotica*'nın kas proteinlerinde bir azalmaya neden olmuştur. Kas protein düzeyleri 10.0 ppm Cu dışındaki tüm derişimlerde 30. günden sonra denge durumuna

gelmiştir. *Clarias batrachus*'da bakırın karaciger proteinlerini arttırırken, kas proteinlerini azalttığı gösterilmiştir (Jana ve Sahana, 1988). Collvin (1985) düşük derişimlerde bakırın etkisinde kalan *Perca fluviatilis*'te deneylerin ilk yirmi gününde önemli derecede ağırlık kaybı olduğunu ve balıkların 20-25 gün içerisinde, daha yüksek enerji gerektiren bir düzeyde fizyolojik denge sağladıklarını saptamıştır.

Karaciger proteinlerindeki 30 günlük artışa paralel olarak aynı süre içerisinde kas proteinlerinde saptanan önemli azalmanın, karacigerde bakırın depolanması ve taşınması için gereken proteinlerin sentezlenmesinde kullanılan aminoasitlerin kas proteinlerinin yıkımı ile sağlandığını düşündürmektedir.

## ÖZET

*TILAPIA NILOTICA*'DA BAKIRIN KARACİĞER VE KAS DOKULARINDAKİ  
NİCEL PROTEİN DEĞİŞİMLERİNE ETKİLERİ

Bu araştırmada farklı ortam derişimlerinde ki bakırın *Tilapia nilotica*'nın karaciğer ve kas dokularında etkide kalma süresine bağılı olarak birikimi ile bu dokuların nicel protein değışimlerine etkileri incelenmiştir.

Deney hayvanları, 0.1, 1.0, 5.0 ve 10.0 ppm Cu ortam derişimlerinde 1, 7, 15, 30 ve 60 gün sürelerle bırakılarak, karaciğer ve kas dokularındaki bakır birikimi atomik absorpsiyon spektrofotometrik yöntemlerle, protein derişimleri ise spektrofotometrik yöntemlerle saptanmıştır.

Deneyler süresince 10.0 ppm Cu ortam derişimi dışında balıklarda mortalite gözlenmemiştir. Bakır birikimi tüm derişimlerde karaciğerde kasa oranla daha fazla olmuş, her iki dokuda da ortam derişimi ve etkide kalma süresine bağılı olarak artış göstermiştir.

Deneylerin ilk 30 gününde bakır, tüm ortam derişimlerinde karaciğer proteinlerinde bir artışa, kaslarda ise bir azalmaya neden olmuştur. Dokulardaki protein derişimleri 30. ve 60. günler arasında karaciğerde ortam derişimine bağılı bir düşme göstermiş, kaslarda ise 10.0 ppm Cu dışında bir denge durumuna ulaşmıştır.

Balıklarda bakır metabolizması ve karaciğer ve kas dokularının protein düzeylerinde, bakır derişimine bağılı değışimlerin olası mekanizmaları tartışılmıştır.

## SUMMARY

EFFECT OF COPPER ON THE QUANTITATIVE PROTEIN CHANGES  
IN LIVER AND MUSCLE TISSUES OF *TILAPIA NILOTICA*

Accumulation of copper and the consequent changes in the liver and muscle tissue proteins of *T.nilotica* were investigated at different concentrations of metal in the medium over two months period.

Copper concentrations and protein contents of the liver and muscle tissues were measured using AAS and spectrophotometric techniques respectively, after exposing the fish to 0.1, 1.0, 5.0 and 10.0 ppm Cu, in the medium over periods of 1, 7, 15, 30 and 60 days.

No mortality was observed during the experiments, except in 10.0 ppm Cu in which all the animals were dead before day 60. Accumulation of copper was higher in liver than in muscle in all the concentrations tested and increased with copper concentration and exposure period.

The protein content increased in liver and decreased in muscle during the first 30 days of experiments. The protein content of the liver, however, decreased between days 30 and 60, and reached to a steady state level in muscle during the same period.

Copper metabolism in fishes and the possible mechanisms for the tissue Cu concentration dependant changes in protein contents of liver and muscle tissues were discussed.

## KAYNAKLAR

- ABEL, P.D. and PAPOUTSOGLU, S.E. (1986). Lethal Toxicity of Cadmium to *Cyprinus carpio* and *Tilapia aurea*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 37, 382-386.
- ARUMUGAM, M. and RAVINDRANATH, M.H. (1987). Copper Toxicity in the Crab, *Scylla serrata*, Copper Levels in Tissues and Regulation After Exposure to a Copper-Rich Medium. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 39, 708-715.
- BAGATTO, G. and ALIKHAN, M. A. (1987). Copper, Cadmium and Nickel Accumulation in Crayfish Population Near Copper-Nickel Smelters at Sudbury, Ontario, Canada. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38, 540-545.
- BEAUMONT, A. R., TSERPES, G. and BUDD, M.D. (1987). Some Effects of Copper on the Veliger Larvae of the Mussel *Mytilus edulis* and the Scallop *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). Marine Environmental Research, 21, 299-309.
- BERMAN, E. (1980). Copper. In " Toxic Metals and Their Analysis". Chapter 12, pp.88-100, Heyden Son LTD., London.
- BİNGÖL, G. (1982). "Biyokimya". Hacettepe -Taş Kitapçılık LTD. Şirketi, Ankara. 418 s.
- BLEVINS, R.D. and PANCORBO, D.C. (1986). Metal Concentrations in Muscle of Fish from Aquatic Systems in East Tennessee, U.S.A. Water, Air and Soil Pollution, 29, 361-371.

- BRADLEY, R.W. and MORRIS, J.R. (1986). Heavy Metals in Fish from a Series of Metal-Contaminated Lakes near Sudbury, Ontario. *Water, Air and Soil Pollution*, 27, 341-354.
- BROWN, B. and AHSANULLAH, M. (1971). Effect of Heavy Metals on Mortality and Growth. *Mar. Poll. Bull.*, 2(12), 182-187.
- BROWN, M.W., THOMAS, D.G., SHURBEN, D., SOLBE, J.F., KAY, J. and CRYER, A. (1986). A Comparison of the Differential Accumulation of Cadmium in the Tissues of Three Species of Freshwater Fish, *Salmo gairdneri*, *Rutilus rutilus* and *Noemacheilus barbatulus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C, No.2, 213-217.
- BRUBAKER, P.E., LUCIER, G.W. and KLEIN, R. (1971). The Effects of Methylmercury on Protein Synthesis in Rat Liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 44, No.6, 1552-1558.
- BRUNGS, W.A., LEONARD, E.N. and McKIM, J.M. (1973). Acute and Long-Term Accumulation of Copper by the Brown Bullhead, *Ictalurus nebulosus*. *J. Fish. Res. Board Can.*, 30: 583-586.
- BRYAN, G.W. (1971). The Effects of Heavy Metals (Other than Mercury) on Marine and Estuarine Organisms. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.*, 177, 389-410.
- BUCKLEY, J.T., ROCH, M., McCARTER, J.A., RENDELL, C.A. and MATHESON, A.T. (1982). Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper-I. Effect on Growth, on Accumulation and Distribution of Copper, and on Copper Tolerance. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C, No:1, 15-19.

- CAPELLI, R. and MINGANTI, V. (1987). Total Mercury, Organic Mercury, Copper, Manganese, Selenium, and Zinc in *Sarda sarda* from the Gulf of Genova. The Science of the Total Environment, 63, 83-99.
- CHERIAN, M.G., GOYER, R.A. (1978). Metallothioneins and Their Role in the Metabolism and Toxicity of Metals. Life Sciences, 23, No.1, 1-10.
- COLLVIN, L. (1984). Uptake of Copper in the Gills and Liver of Perch, *Perca fluviatilis*. Ecological Bulletins, 36, 57-61.
- COLLVIN, L. (1985). Effects of Copper on Growth and Starvation in Perch, *Perca fluviatilis* L. J. Fish. Biol., 27, 757-764.
- COUSINS, R.J. (1985). Absorption, Transport, and Hepatic Metabolism of Copper and Zinc: Special Reference to Metallothionein and Ceruloplasmin. Physiological Reviews, 65, No.2, 238-309.
- CROSS, F.A., HARDY, L.H., JONES, N.Y. and BARBER, R.T. (1973). Relation Between Total Body Weight and Concentrations of Manganese, Iron, Copper, Zinc, and Mercury in White Muscle of Bluefish (*Pomatomus saltatrix*) and a Bathy - Demersal Fish *Antimora rostrata*. J. Fish. Res. Board Can., 30, 1287-1291.
- DEPLEDGE, M.H. (1989). Re-evaluation of Metabolic Requirements for Copper and Zinc in Decapod Crustaceans. Marine Environmental Research, 27, 115-126.
- ENGEL, D.W. (1987). Metal Regulation and Molting in the Blue Crab *Callinectes sapidus*: Copper, Zinc and Metallothionein. Biol. Bull, 172, 69-82.

- ERDEM, C. ve KARGIN, F. (1990). Farklı Ortam Değişimlerinde *Tilapia nilotica* (L.)'nin Doku ve Organlarında Bakır Birikimi. Doğa-Tr. J. of Zoology, 14, 173-178.
- EVANS, M.L. (1980). Copper Accumulation in the Crayfish (*Orconectes rusticus*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 24, 916-920.
- GAGNE, F., MARION, M. and DENIZEAU, F. (1990). Metallothionein Induction and Metal Homeostasis in Rainbow Trout Hepatocytes Exposed to Mercury. Toxicology Letters, 51, 99-107.
- GAUTAM, A.K. (1989). Effect of Copper Intoxication on the Growth (Biomass) of Freshwater Teleost *Channa punctatus* (BL.)., Comp. Physiol. Ecol., 14, No.4, 207-209.
- HAESLOOP, U. and SCHIRMER, M. (1985). Accumulation of Orally Administered Cadmium by the Eel (*Anguilla anguilla*). Chemosphere, 14, No:10, 1627-1634.
- HARRISON, F.L. and LAM, J.R. (1985). Partitioning of Copper among Copper-binding Proteins in the Mussel *Mytilus edulis* Exposed to Soluble Copper. Marine Environmental Research, 16, 151-163.
- HILMY, A.M., SHABANA, M.B. and DAABEES, A.Y. (1985). Effects of Cadmium Toxicity upon the *In vivo* and *In vitro* Activity of Proteins and Five Enzymes in Blood Serum and Tissue Homogenates of *Mugil cephalus*. Comp. Biochem. Physiol., 81C, No.1, 145-153.



- HILMY, A.M., EL-DOMIATY, N.A., DAABEES, A.Y. and ALSARHA, A. (1987a).  
The Toxicity to *Clarias lazera* of Copper and Zinc Applied  
Jointly. Comp. Biochem. Physiol., 87C, No.2, 309-314.
- HILMY, A.M., EL-DOMIATY, N.A., DAABEES, A.Y. and ABDEL LATIFE,  
H.A. (1987b). Some Physiological and Biochemical Indices  
of Zinc Toxicity in Two Freshwater Fishes, *Clarias lazera* and  
*Tilapia zilli*. Comp. Biochem. Physiol., 87C, No.2, 297-301.
- HILMY, A.M., EL-DOMIATY, N.A., DAABEES, A.Y. and ABDEL LATIFE,  
H.A. (1987c). Toxicity in *Tilapia zilli* and *Clarias lazera*  
(Pisces) Induced by Zinc, Seasonally. Comp. Biochem. Physiol.,  
86C, No:2, 263-265.
- HONDA, K., SAHRUL, M., HIDAKA, H. and TATSUKAWA, R. (1983). Organ  
and Tissue Distribution of Heavy Metals and Their  
Growth-Related Changes in Antarctic Fish, *Pagothenia*  
*borchgrevinki*. Agric. Biol. Chem., 47, 2521-2532.
- JANA, S. and SAHANA, S.S. (1988). Effects of Copper, Cadmium and  
Chromium Cations on the Freshwater Fish *Clarias batrachus* L..  
Physiol. Bohemoslov., 37(1), 79-82.
- JANA, S., SAHANA, S.S., CHOUDHURI, M.A. and CHOUDHURI, D.K. (1986).  
Heavy Metal Pollution Induced changes in Some Biochemical  
Parameters in the Freshwater Fish *Clarias batrachus* L. Acta  
Physiologica Hungarica, 68, (1), 39-43.
- KARGIN, F. (1990). Bakırın *Cyprinus carpio* ve *Tilapia*  
*nilotica*'da Doku ve Organlardaki Birikimi ile Mortalite  
Uzerine Etkisi. Ç.U., Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji  
Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Adana, 68 s.

- KATTI, S.R. and SATHYANESAN, A.G. (1986). Lead Nitrate Induced Changes in the Brain Constituents of the Freshwater Fish *Clarias batrachus* (L). *Neurotoxicology*, 7 (3), 47-52.
- KULIKOVA, I., SEISUMA, Z. and LEGZDINA, M. (1985). Heavy Metals in Marine Organisms. *Symposia Biologica Hungarica*, 29, 141-151.
- LAUREN, D.J. and McDONALD, D.G. (1985). Effects of Copper on Branchial Ionoregulation in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri* Richardson. Modulation by Water Hardness and pH. *J.Comp.Physiol.*, 155, 635-644.
- LEHNINGER, A.L. (1975). "Biochemistry". Worth Publ. Inc., New York, 1104 pp.
- LEY, H.L., FAILLA, M.L. and CHERRY, D.S. (1983). Isolation and Characterization of Hepatic Metallothionein from Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Comp.Biochem.Physiol.*, 74B, No.3, 507-513.
- LUI, E.M.K. (1987). Metabolism of Copper and Zinc in the Liver and Bone of the Perinatal Guinea-pig. *Comp.Biochem.Physiol.*, 86C, No.1, 173-183.
- MAHLER, H.R. and CORDES, E.H. (1971). "Biological Chemistry". 2<sup>nd</sup> Ed., Harper and Row Publishers, New York, 1009 pp.
- MCCARTER, J.A., MATHESON, A.T., ROCH, M. and OLAFSON, R.W. (1982). Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper - II. Distribution of Copper Between High- and Low

Molecular Weight Proteins in Liver Cytosol and the Possible Role of Metallothionein in Detoxification. *Comp.Biochem. Physiol.*, 72C., No:1, 21-26.

McCARTER, J.A. and ROCH, M. (1983). Hepatic Metallo-thionein and Resistance to Copper in Juvenile Coho Salmon. *Comp.Biochem. Physiol.*, 74C., No:1, 133-137.

McCARTER, J.A. and ROCH, M. (1984). Chronic Exposure of Coho Salmon to Sublethal Concentrations of Copper III. Kinetics of Metabolism of Metallothionein. *Comp.Biochem.Physiol.*, 77C, No:1, 83-87.

MIKLOVICS, M.H., KOVACS-GAYER, E. and SZAKOLCZAI, J. (1985). Accumulation and Effect of Heavy Metals in the Fishes of Lake Balaton. *Symposia Biologica Hungarica*, 29, 111-118.

MURAMOTO, S. (1983). Elimination of Copper from Cu-Contaminated Fish by Long-Term Exposure to EDTA and Fresh Water. *J. Environ. Sci. Health*, A18 (3), 455-461.

NEMCSOK, J.G. and HUGHES G.M. (1988). The Effect of Copper Sulphate on some Biochemical Parameters of Rainbow Trout. *Environmental Pollution*, 49, 77-85.

NOEL-LAMBOT, F., GERDAY, C.H. and DISTECHE, A. (1978). Distribution of Cd, Zn and Cu in Liver and Gills of the Eel *Anguilla anguilla* with Special Reference to Metallothioneins. *Comp.Biochem.Physiol.*, 61 C, 177-187.

- OLSSON, P. ve HAUX, C. (1986). Increased Hepatic Metallothionein Content Correlates to Cadmium Accumulation in Experimentally Exposed Perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicology*, 9, 231-242.
- OLSSON, P., LARSSON, A. and HAUX, C. (1988). Metallothionein and Heavy Metal Levels in Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) During Exposure to Cadmium in the Water. *Marine Environmental Research*, 24, 151-153.
- OVERNELL, J., McINTOSH, R. and FLETCHER, T.C. (1987). The Levels of Liver Metallothionein and Zinc in Plaice *Pleuronectes platessa* L., during the Breeding Season and the Effect of Oestradiol Injection. *J. Fish Biol.*, 30, 539-546.
- PLUMMER, D.T. (1971). "Practical Biochemistry". McGraw Hill Book Company Ltd., England. 369 pp.
- ROCH, M. and McCARTER, J.A. (1984). Metallothionein Induction, Growth, and Survival of Chinook Salmon Exposed to Zinc, Copper, and Cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 32, 478-485.
- ROCH, M. and McCARTER, J.A. (1984 b). Hepatic Metallothionein Production and Resistance to Heavy Metals By Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) - I. Exposed to an Artificial Mixture of Zinc, Copper and Cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77C, No:1, 71-75.
- ROCH, M., NORDIN, R. N., AUSTIN, A., McKEAN, C. J. P., DENISEGER, J., KATHMAN, R. D., McCARTER, J. A. and CLARK, M.J.R. (1985).

- The Effects of Heavy Metal Contamination on Aquatic Biota of Buttle Lake and the Campbell River Drainage (Canada). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14, 347-362.
- ROE, H.J. BAILEY, J.M. GRAY, R.R. and ROBINSON, J.N. (1961). Complete Removal of Glycogen from Tissues by Extraction with Cold Trichloroacetic Acid Solution. J. Biol. Chem., 236, 1224-1246.
- ROHLF, J.F. and SOKAL, R.R. (1969). "Statistical Tables". W.H. Freeman and Company, San Francisco. 253 pp.
- ROMANENKO, V.D. AND YEVTUSHENKO, N.Y. (1985). The Tissue Accumulation of Heavy Metals and Their Influence on the Biosynthesis in the Fish Organisms. Symposia Biologica Hungarica 29, 299-311.
- SAHANA, S.S., JANA, S., CHOUDHURI, M.A. and CHOUDHURI, D.K. (1986). Hg (II)-Induced Changes in Some Biochemical Parameters in the Freshwater Fish *Clarias batrachus*. Physiologia Bohemoslovaca, 35, Fasc.1, 81-85.
- SCHEUHAMMER, A.M., ONOSAKA, S., RODGERS, K. and CHERIAN, M.G. (1985). The Interaction of Zinc and Cadmium in the Synthesis of Hepatic Metallothionein in Rats. Toxicology, 36, 101-108.
- SEGNER, H. (1987). Response of Fed and Starved Roach, *Rutilus rutilus*, to Sublethal Copper Contamination. J. Fish Biol., 30, 423-437.
- SHARMA, R.P. (1983). Ligands Binding Cadmium, Zinc and Copper in a Species of New Zealand Oyster (*Ostrea lutaria*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 428-434.

- SOKAL, R. R. and ROHLF, J. F. (1969). "Biometry". W.H. Freeman and Company, San Francisco. 776 pp.
- THOMAS, D.G., CRYER, A., SOLBE, J.F. and KAY, J. (1983). A Comparison of the Accumulation and Protein Binding of Environmental Cadmium in the Gills, Kidney and Liver of Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). Comp. Biochem. Physiol., 76C, No:2, 241-246.
- THOMAS, D.G., BROWN, M.W., SHURBEN, D., SOLBE, J.F., CRYER, A. and KAY, J. (1985). 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, No:1, 55-62.
- TORT, L. and ROSELL, M. (1989). Variations of Organ-Body Weight Allometric Relationship in the Dogfish after Chronic Subacute Cadmium Treatment. Comp. Physiol. Ecol., 14, No.2, 49-56.
- TORT, L., FLOS, R. and BALASCH, J. (1984). Dogfish Liver and Kidney Tissue Respiration after Zinc Treatment. Comp. Biochem. Physiol., 77C, No:2, 381-384.
- TORT, L., TORRES, P. and FLOS, R. (1987). Effects on Dogfish Haematology and Liver Composition After Acute Copper Exposure. Comp. Biochem. Physiol., 87C, No.2, 349-353.
- VIARENGO, A., CANESI, L., PERTICA, M., MANCINELLI, G., ORUNESU, M., MAZZUCOTELLI, A. and BOUQUEGNEAU, J.M. (1988). Biochemical Characterization of a Copper-Thionein Involved in Cu Accumulation in the Lysosomes of the Digestive Gland of

Mussels Exposed to the Metal. Marine Environmental Research, 24, 163-166.

VILLARREAL - TREVINO, C.M., OBREGON - MORALES, M.E., LOZANO-MORALES, J.F. and VILLEGAS-NAVARRO, A. (1986). Bioaccumulation of Lead, Copper, Iron, and Zinc by Fish in a Transect of the Santa Catarina River in Cadereyta Jimenez, Nuevo Leon, Mexico. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 37, 395-401.

WEIS, P. BOGDEN, J.D. and ENSLEE, E.C. (1986). Hg- and Cu-Induced Hepatocellular Changes in the Mummichog *Fundulus heteroclitus*. Environmental Health Perspectives, 65, 167-173.

WINGE, D., KRASNO, J. and COLUCCI, A.V. (1973). Cadmium Accumulation in Rat Liver: Correlation between Bound Metal and Pathology. In "Trace Element Metabolism in Animals". Vol.2 Ed. by Hoekstra, W.G., Suttie, J., Ganther, H.E. and Mertz, W. University Park Press, Baltimore pp 500-501.

WISELY, B. and BLICK, R.A.P. (1967). Mortality of Marine Invertebrate Larvae in Mercury, Copper and Zinc Solutions. Aust.J.Mar.Freshwat.Res., 18, 63-72.

YAMAMOTO, Y., ISHII, T. and IKEDA, S. (1977). Studies on Copper Metabolism in Fishes.-The Site of Copper Accumulation in Tissues of Carp. Bull.Jap.Soc.Sci.Fish., 43, 1327-1332.

ZABA, B.N. and HARRIS, E.J. (1978). Accumulation and Effects of Trace Metal Ions in Fish Liver Mitochondria. Comp.Biochem. Physiol., 61C, 89-93.

**TEŞEKKÜR**

Araştırmalarımı yöneten ve her türlü yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Doç.Dr.Cahit ERDEM'e, yakın ilgisini gördüğüm Biyoloji Bölüm Başkanı Sayın Prof.Dr.Nevin ÜNER'e ve Yard.Doç.Dr. İskender EMRE'ye teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen arkadaşların Sayın Arş.Gör. Dr.Ferit KARGIN ve Arş.Gör. Mehmet SULANÇ'a, ayrıca deneysel materyalin sağlanmasında gösterdiği kolaylık nedeniyle Ç.U. Su Ürünleri Yüksek Okulu Müdürü Sayın Prof.Dr. Ercan SARUHAN'a teşekkür ederim.



## ÖZGEÇMİŞ

1966 yılında Adana'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Adana'da tamamladım. 1987 yılında Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünden "Biyolog" ünvanı ile mezun oldum. Aynı yıl, Çukurova Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans çalışmasına başladım. 1988 yılında Ç.U. Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümüne araştırma görevlisi olarak atandım. Halen bu görevde bulunmaktayım.



## EK TABLOLAR

EK TABLO I *T.nilotica*'da karaciger ve kas dokularının yaş ve kuru ağırlıkları ile bakır için atomik absorpsiyon spektrofotometresinden, protein için spektrofotometreden elde edilen absorbanans değerleri.

EK TABLO II *T.nilotica*'nın kas ve karaciger dokularındaki bakır ( $\mu\text{g/g}$  k.a.) ve protein ( $\text{mg/g}$  y.a.) derişimleri.



EK TABLO II

SÜRE (gün)	Derişim ppm	TAYKAR	KARAGÖNER		KAS		
			PROTEİN DERİŞİMİ mg/g y.a.	BAKİR DERİŞİMİ mg Cu/g k.a.	PROTEİN DERİŞİMİ mg/g y.a.	BAKİR DERİŞİMİ mg Cu/g k.a.	
1	0.0	a	9.197	0.000	15.64	0.000	
		b	10.46	0.000	17.49	0.000	
		c	9.721	0.000	17.87	0.000	
	0.1	a	10.84	35.52	16.69	6.620	
		b	13.86	34.42	15.60	6.936	
		c	12.26	33.81	17.12	7.961	
	1.0	a	15.76	52.56	14.58	8.460	
		b	15.82	54.10	15.23	8.279	
		c	15.40	50.99	16.84	10.14	
	5.0	a	20.42	66.24	13.23	10.10	
		b	18.98	68.51	12.99	9.100	
		c	18.91	68.69	13.40	9.766	
	10.0	a	22.67	86.74	10.70	12.34	
		b	22.40	87.35	11.69	12.69	
		c	23.75	89.24	11.02	11.41	
	7	0.0	a	9.687	0.000	15.81	0.000
			b	9.412	0.000	16.87	0.000
			c	10.80	0.000	19.88	0.000
0.1		a	11.77	104.3	15.75	12.53	
		b	12.24	90.91	16.27	13.55	
		c	12.91	106.4	16.07	11.43	
1.0		a	16.77	131.5	13.65	17.89	
		b	15.68	139.4	13.10	16.77	
		c	16.19	137.7	12.65	17.34	
5.0		a	23.01	174.3	10.26	22.14	
		b	25.00	167.6	12.50	23.25	
		c	26.04	178.7	8.908	23.90	
10.0		a	35.62	223.1	7.274	27.30	
		b	38.28	192.3	8.796	27.05	
		c	37.95	233.9	8.845	25.72	
15		0.0	a	9.579	0.000	16.30	0.000
			b	11.04	0.000	19.33	0.000
			c	9.155	0.000	14.73	0.000
	0.1	a	25.21	158.8	17.22	10.06	
		b	25.90	169.4	13.43	17.01	
		c	25.40	159.8	14.96	17.01	
	1.0	a	27.66	246.1	12.25	24.10	
		b	29.75	240.4	13.30	23.78	
		c	28.04	251.5	11.72	23.30	
	5.0	a	33.52	315.1	9.119	29.02	
		b	34.54	311.8	9.302	29.27	
		c	32.60	317.9	10.83	30.23	
	10.0	a	40.55	412.8	7.408	35.61	
		b	41.00	417.7	6.951	34.14	
		c	38.00	410.1	6.835	35.08	
	30	0.0	a	10.07	0.000	20.47	0.000
			b	9.749	0.000	17.58	0.000
			c	11.63	0.000	15.95	0.000
0.1		a	28.16	252.6	13.87	21.70	
		b	29.41	254.4	13.26	21.01	
		c	27.06	246.9	12.59	22.27	
1.0		a	33.33	346.4	10.25	32.74	
		b	34.01	363.1	9.615	31.52	
		c	31.83	367.8	10.06	33.21	
5.0		a	45.66	426.8	8.383	38.00	
		b	36.36	407.9	6.956	37.01	
		c	36.90	415.9	7.789	38.48	
10.0		a	52.26	505.0	5.198	42.88	
		b	53.52	524.6	4.915	43.56	
		c	51.01	500.1	4.562	41.99	
60		0.0	a	8.441	0.000	17.67	0.000
			b	10.18	0.000	17.07	0.000
			c	10.90	0.000	18.88	0.000
	0.1	a	16.66	432.5	13.71	20.93	
		b	14.52	442.2	12.83	28.78	
		c	16.03	433.8	12.15	20.24	
	1.0	a	20.12	600.6	8.860	43.07	
		b	18.09	611.5	8.762	43.70	
		c	21.60	620.5	9.482	40.58	
	5.0	a	33.56	765.8	5.899	56.60	
		b	32.67	777.1	5.142	56.90	
		c	34.05	785.3	6.565	54.21	
	10.0	a					
		b					
		c					