

УДК 63.3:576.7:577.15:577.115:577.16

СОДЕРЖАНИЕ МАЛОНОВОГО ДИАЛЬДЕГИДА В ТКАНЯХ КАРПА В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ПОВЕРХНОСТНО-АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**Н. А. СИМОНОВА, Т. В. МАКОВИЙЧУК, О. Б. МЕХЕД, В. А. КОВАЛЬ***Национальный университет «Черниговский колледж» имени Т. Г. Шевченко,
Чернигов, Черниговская область, Украина 14000**(Поступила в редакцию 10.01.2019)*

Статья посвящена исследованию показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ), а именно определению гидроперекисей липидов в тканях карпа чешуйчатого при действии фосфатов, фосфатосодержащего и бесфосфатного синтетических моющих средств, содержащихся в водной среде. Проведенный эксперимент показал, что повышенная концентрация натрия фосфата вызывает увеличение содержания малонового диальдегида во всех исследуемых тканях (печени, мозге, жабрах и белых мышцах). Его максимальное токсическое воздействие проявляется при 5 ПД в белых мышцах карпа. Увеличение содержания малонового диальдегида наблюдается и при влиянии фосфатосодержащего и бесфосфатного синтетических моющих средств. Минимальные изменения под действием водной среды содержащей исследуемые токсические вещества зарегистрированы в тканях мозга.

Ключевые слова: карп, поверхностно-активные вещества, малоновый диальдегид.

The article is devoted to the study of lipid peroxidation (LPO), namely the determination of lipid hydroperoxides in the tissues of scale carp under the action of phosphates, phosphate-containing and non-phosphate synthetic detergents contained in the aquatic environment. The experiment showed that an increased concentration of sodium phosphate causes an increase in the content of malonic dialdehyde in all tissues studied (liver, brain, gills, and white muscles). Its maximum toxic effect is manifested at 5 PD in the white muscles of the carp. An increase in the content of malonic dialdehyde is also observed under the influence of phosphate-containing and non-phosphate synthetic detergents. Minimal changes under the action of the aquatic environment containing the studied toxic substances are registered in the brain tissues.

Key words: carp, surfactants, malonic dialdehyde.

Введение

Основными источниками загрязнения пресноводных водоемов и водотоков в глобальном масштабе являются промышленность и сельское хозяйство. В последние годы возрос потенциал использования биомаркеров для мониторинга качества среды и оценки состояния здоровья животных, заселяющих водные экосистемы [13]. Важными индикаторами метаболического и физиологического состояния организма гидробионтов являются показатели процессов перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы [14]. Статья посвящена исследованию показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ), а именно определению малонового диальдегида в тканях карпа чешуйчатого. Основная цель исследования – определение изменений в тканях при действии ксенобиотиков различных концентраций.

Как известно, в тканях при физиологических условиях в процессе окислительно-восстановительных реакций постоянно образуются активные формы кислорода (АФК), которые играют ведущую роль во многих биохимических и физиологических процессах, в частности в поддержании гомеостаза и обеспечении адаптации к меняющимся условиям среды [2]. Чрезмерная интенсификация процессов с участием АФК приводит к усилению перекисного окисления липидов (ПОЛ), модификации молекул протеинов и нуклеиновых кислот [3]. Организм рыб более чувствителен к процессам ПОЛ, чем организм млекопитающих [9], поскольку содержание полиненасыщенных жирных кислот в фосфолипидах клеточных мембран тканей рыб выше [1].

Интенсивность процессов ПОЛ и активность ферментов антиоксидантной системы в организме рыб детерминируется генетическими факторами и в значительной степени зависит от влияния многих факторов, в частности питания. Ранее нами были изучены некоторые звенья обмена веществ карпа под воздействием поверхностно-активных веществ (ПАВ) [10, 11]. Имеющиеся в литературе данные о перекисных процессах, активности ферментов антиоксидантной системы под воздействием токсикантов не включают изучение влияния на ПОЛ фосфатов и поверхностно-активных веществ, которые содержатся в воде природных водоемов [8].

Поверхностно-активные вещества широко применяются в хозяйственной деятельности и быту как моющие средства, антикоррозийные вещества, эмульгаторы и суспензаторы пестицидов, в производстве минеральных удобрений и кормовых добавок, компонентов лекарственных препаратов и косметики. Одним из представителей ПАВ является лаурилсульфат натрия, который является смесью алкилсульфатов, содержащий от 55 до 85 % додецилсульфата натрия. Это эффективный и недорогой способ, также как лаурилсульфат аммония и амина [6].

В состав современных стиральных порошков входят более 20 компонентов. Среди них особого внимания заслуживают поверхностно-активные вещества, которые в подавляющем большинстве являются синтетическими (СПАВ) и фосфаты (ортофосфат натрия, триполифосфат натрия) [7].

Фосфатные добавки создают условия для более интенсивного проникновения анионных ПАВ через кожу: способствуют усиленному обезжириванию кожи, резко снижают ее барьерную функцию, провоцируют дерматологические заболевания. Фосфаты также проникают в капилляры кожи, всасываются в кровь и распространяются по всему организму [4]. В то же время они изменяют содержание гемоглобина, структуру и плотность плазмы крови, что приводит к нарушению работы внутренних органов: почек, печени, скелетных мышц. Запускается механизм нарушения обмена веществ, обострение хронических заболеваний и появление новых. Механизм действия фосфатов заключается в их взаимодействии с липидно-белковыми мембранами и проникновении их в структуру клетки, вызывает изменения в биохимических и биофизических процессах [4].

Система антиоксидантной защиты играет одну из ключевых ролей в жизнедеятельности организма за счет регуляции ряда метаболических процессов, использование оценки состояния данной системы дает возможность получать количественную информацию о ходе этих процессов. Таким образом, уровень активности системы антиоксидантной защиты в организме рыб под влиянием факторов эндогенного и экзогенного характера может выступать важным фактором адаптации к изменениям окружающей среды [1].

При определенных условиях (воспаление, токсическое воздействие, гипоксия и т. д.) происходит резкое усиление липопероксидации с образованием в избыточном количестве свободных радикалов, что приводит к развитию оксидативного стресса, и ПОЛ становится универсальным механизмом повреждения как одной молекулы, так и клеток на уровне мембран и тканей органов. Количественное содержание малонового диальдегида возникает в организме при деградации полиненасыщенных жиров активными формами кислорода и служит маркером ПОЛ и оксидативного стресса [5].

Цель работы: исследовать влияние фосфатов, фосфатосодержащего и бесфосфатного синтетического моющего средства на содержание малонового диальдегида в тканях карпа чешуйчатого (белые мышцы, печень, мозг, жабры).

Основная часть

Объектом исследования служил карп (*Cyprinus carpio L.*). Рыб отбирали из естественного водоема (ЧАО «Черниговрыбхоз»). В течение всего периода исследований контролировался гидрохимический режим воды. Содержание кислорода колебался в пределах 9,6–12,5 мг / дм³; рН – 7,4–8,4; содержание аммиака – 0,014 мг / дм³. Указанные условия не вызвали развития в организме карпа гипоксии, гиперкапнии, гипотермии. По данным ихтиопатологических наблюдений рыб, кожных возбудителей и паразитарных болезней не выявлено. Ленточных паразитов также не зафиксировано. опыты по изучению влияния ксенобиотиков проводили в 200-литровых аквариумах с отстоянной водопроводной водой, в которой рыбу размещали из расчета 1 экземпляр на 40 дм³ воды. Температуру выдерживали близкой к естественной. Исследования проводились в течение октября 2017 года. Масса рыб колебалась в пределах 160–210 г.

Концентрацию исследуемых ксенобиотиков (соответствует 2 ПДК (предельно допустимая концентрация) и 5 ПДК) создавали путем внесения расчетных количеств лаурилсодержащего синтетического моющего средства, фосфатов и фосфонатов. Исследования проводились с соблюдением требований международных принципов Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным. Метод основан на том, что при высокой температуре в кислой среде малоновый диальдегид реагирует с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием окрашенного триметинового комплекса с максимумом поглощения при 532 нм. К 3 см³ фосфатного буфера (рН 7,4) добавляли 0,2 см³ биологической жидкости; 0,5 см³ 1 мМ КМnO₄, перемешивали, а через 10 мин добавляли 0,5 см³ 1 мМ FeSO₄. После этого добавляли 1 см³ 20 % ТХУ и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин.

К 2 см³ супернатанта добавляли 0,5 см³ 1 н HCl и 1 см³ 0,7 % -й тиобарбитуровой кислоты. Смесь выдерживали 20 мин на кипящей водяной бане (95–100 °С). После резкого охлаждения в пробирку вносили 3 см³ бутанола, тщательно перемешивали раствор и центрифугировали 10 мин при 3000 об/мин.

Оптическую плотность раствора определяли спектрофотометрически при 532 нм. Содержание МДА выражали в нмоль / г ткани. Статистическая обработка результатов осуществлялась с использованием программы «Excel» пакета «Microsoft Office-2003».

Анализ полученных результатов эксперимента показал, что максимальное содержание исследуемого вещества отмечали в печени ($5,9 \pm 0,2$ нмоль / г ткани) и жабрах ($5,8 \pm 0,3$ нмоль / г ткани), несколько меньше в белых мышцах ($4,0 \pm 0,6$ нмоль / г ткани) и мозге ($3,5 \pm 0,4$ нмоль / г ткани) у рыб, которые содержались в физиологических условиях.

Основной целью исследования было изучение влияния фосфатов различной концентрации на содержание МДА в белых мышцах, печени, мозге и жабрах карпа. Результаты эксперимента при воздействии натрия фосфата в концентрации 2 ПДК и 5 ПДК представлены на рис. 1 и 2.

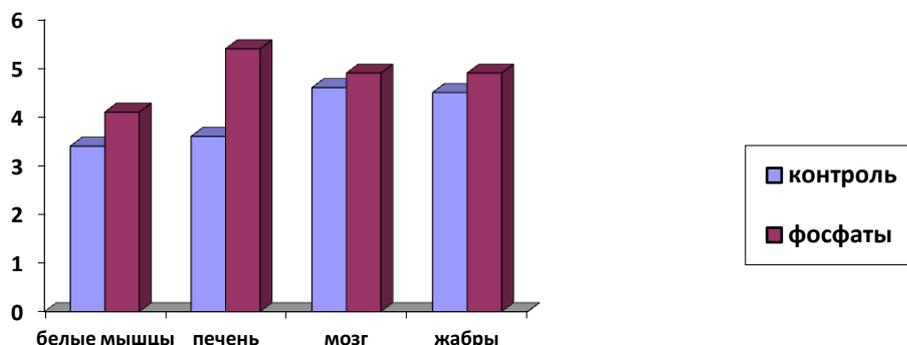


Рис. 1. Содержание малонового диальдегида в тканях и органах карпа при действии 2 ПДК фосфатов, нмоль / г ткани,

$M \pm m, n = 5$

Под воздействием 2 ПДК натрия фосфата не отмечено его существенного влияния на содержание малонового диальдегида, хотя во всех тканях наблюдали незначительное увеличение содержания исследуемого показателя. Максимальные изменения характерны для печени и составляют 50 % ($5,4 \pm 0,5$ нмоль/г ткани под действием фосфатов против $3,6 \pm 0,5$ нмоль / г ткани у рыб, находящихся в физиологических условиях).

По убыванию влияния (содержания малонового диальдегида) исследуемые ткани можно расположить следующим образом: печень (50 %) – белые мышцы (21 %) – мозг и жабры (по 6,5 %).

Увеличение концентрации натрия фосфата до 5 ПДК в аквариумах вызвало несколько иную картину относительно содержания МДА в тканях (рис. 2). В данном случае максимальное влияние фосфатов зарегистрировано в белых мышцах, где изменения малонового диальдегида достигли 3,4 раза, значительно меньшие изменения показателя зарегистрировано в жабрах (увеличение на 40 %), в печени – 24 %, менее лабильным показатель оказался в мозге (увеличение содержания МДА на 17 % ($4,1 \pm 0,9$ нмоль / г ткани за действия фосфатов против $3,5 \pm 0,4$ нмоль/г ткани у рыб, находящихся в физиологических условиях)).

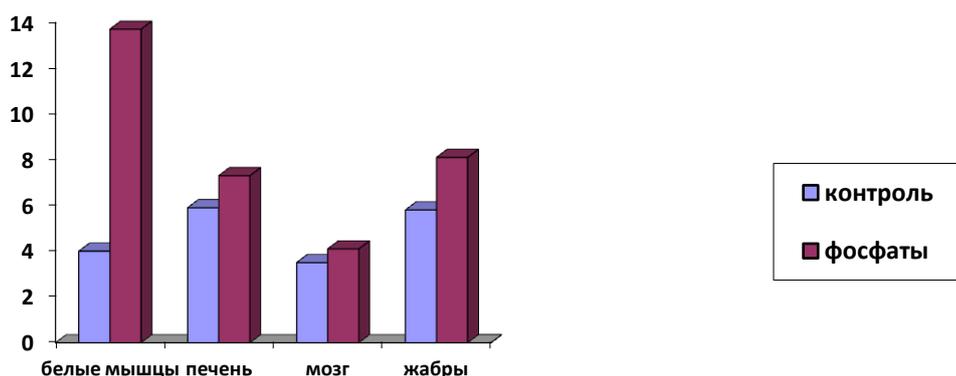


Рис. 2. Содержание малонового диальдегида в тканях и органах карпа при действии 5 ПДК фосфатов, нмоль / г ткани,

$M \pm m, n = 5$

В литературных источниках имеются данные о том, что наиболее интенсивно течение пероксидных процессов происходит в жабрах рыб при изменении температуры, аэрации, жесткости воды, в селезенке – при инфицировании и иммунных реакциях, в печени – при интоксикации [5], чем можно объяснить неоднозначность зарегистрированных изменений в тканях карпа.

Значительную часть антропогенной нагрузки, которая приходится на поверхностные водные объекты, составляют сточные воды, содержащие синтетические поверхностно-активные вещества. Они входят в состав всех хозяйственно-бытовых и большинства промышленных сточных вод. Поверхностно-активные вещества – разновидность ксенобиотиков, которые широко применяют в хозяйственной деятельности и быту как моющие средства, антикоррозийные вещества, эмульгаторы и суспендизаторы пестицидов и другие составляющие [9].

Вышеупомянутое обуславливает актуальность изучения особенностей протекания обмена веществ и их интенсивности в тканях гидробионтов, в частности рыб, в условиях загрязнения среды данным ксенобиотиками. Попадая в водоемы, ПАВ вызывают многочисленные негативные последствия для гидробионтов в результате непосредственного токсического действия или в результате глубокого нарушения цепей питания [9].

В качестве синтетического моющего средства (СМС) с фосфатсодержащими группами использовали натрий лаурилсульфатсодержащее ПАВ. Синтетическое моющее средство, которое использовалось для исследования, содержит анионноактивное поверхностно-активное вещество. Оно представляет собой смесь алкилсульфатов, содержащие от 55 до 85 % натрия лаурилсульфата (ЛСН). Результаты исследования содержания малонового диальдегида в тканях и органах карпа при действии 2 ПДК данного СМС представлены на рис. 3.

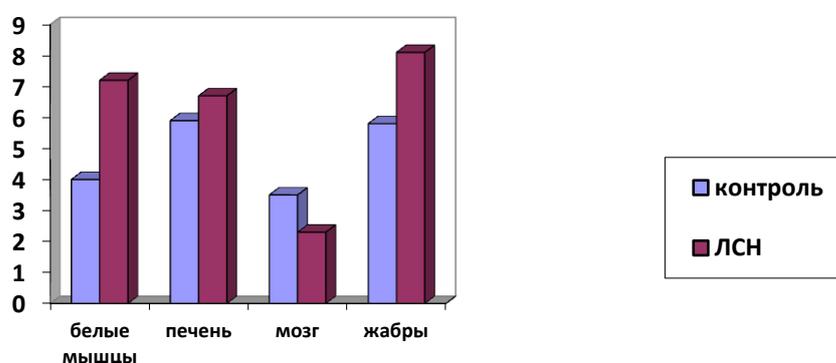


Рис. 3. Содержание малонового диальдегида в тканях и органах карпа при действии 2 ПДК ЛСН, нмоль / г ткани, $M \pm m, n = 5$

Как видно из результатов эксперимента, представленных на рис. 3, количественное содержание малонового диальдегида увеличивается в большинстве исследованных тканей. Исключение составляет нервная ткань (ткани мозга), где наблюдали недостоверное уменьшение показателя на 34% ($2,3 \pm 0,2$ за действия ЛСН против $3,5 \pm 0,4$ нмоль / г ткани у рыб, находящихся в физиологических условиях). Максимальные изменения 80 % зарегистрированы в белых мышцах ($7,2 \pm 0,5$ за действия ЛСН против $4,0 \pm 0,6$ нмоль / г ткани у рыб контрольной группы, $P \leq 0,01$). Подобные тенденции наблюдали и для фосфатов в концентрации 5 ПДК, когда максимальные изменения произошли в мышечной ткани.

Нужно отметить, что белые мышцы рыб – основной продукт, который потребляет в пищу человек, соответственно поднимается вопрос о более подробном анализе данной ткани в условиях загрязнения среды СМС, содержащих фосфаты. Так как один из основных компонентов, натрий лаурилсульфат, входит в состав почти всех синтетических моющих средств. Его низкая себестоимость и эффективность действия даже в небольших концентрациях обязывает производителей использовать это вещества в большинстве производств. Низкая себестоимость и эффективность действия даже в небольших концентрациях вызывает производителей использовать это вещество в большинстве производств [15].

Наряду с биологическими эффектами натрия лаурилсульфата чистого – представителя поверхностно-активных веществ уместно охарактеризовать биологическое действие натрия лаурилсульфат-содержащих комплексных препаратов и композиций, а именно синтетических моющих средств, в составе которых он и другие синтетические ПАВ попадают в водную среду, ведь реальное загрязнение биосферы носит комплексный характер [7].

Синтетические моющие средства имеют многокомпонентный состав, где каждое вещество выполняет определенную функцию и дополняет друг друга, что имеет целью как можно лучше удалять те или иные загрязнения с различных тканей и поверхностей. Чаще всего в состав СМС входят: анионноактивные, катионноактивными, неионогенные ПАВ, соли щелочей (карбонат и силикат

натрия), нейтральные соли (сульфат и фосфат натрия), полифосфаты, карбоксиметилцеллюлоза, химические и физические (оптические) отбеливатели, энзимы и др.

В состав СМС, который мы использовали в своей работе входили следующие компоненты: 5–15 % анионные ПАВ, фосфаты, <5 % катионные ПАВ, ЭДТА и ее соли, кислородсодержащий отбеливатель, поликарбоксилаты, энзимы, оптический отбеливатель, отдушка.

С одной стороны, СМС прошли проверку на подопытных животных и удовлетворяют требования (отсутствие внятной токсичности) относительно веществ, постоянно контактирующих с человеком. С другой стороны, есть данные, которые заставляют задуматься об их экологическом значении и об их потенциальной опасности [7]. Сегодня на законодательном уровне многих стран существует ряд требований по сокращению или даже запрету использования фосфатов в моющих средствах. Этому способствовали многочисленные исследования круговорота фосфора в гидросфере [15], его динамики в водоемах [16], процессов биodeградации и биоаккумуляции [12], а также работы о влиянии фосфатов на различные звенья жизнедеятельности гидробионтов [7].

Однако производители синтетических моющих средств в связи ограничениями и запретами законодательства на использование фосфатов, находят другие пути, чтобы не отказываться от такого эффективного и дешевого сырья для производства моющих средств.

Альтернативой являются фосфонаты – эфиры фосфоновой кислоты, содержащие одну или несколько групп $\text{C-PO}(\text{OH})_2$. В профессиональной литературе более подробно освещены вопросы биоаккумуляции [17] и биodeградации фосфонатов, чем исследование токсического воздействия этих соединений на гидробионтов.

Нами было исследовано влияние бесфосфатного СМС на карпа в концентрации 2 ПДК в течение 14 суток. Результаты эксперимента, изображены на рис. 4 свидетельствуют об увеличении количественного содержания малонового диальдегида в большинстве исследованных тканей.

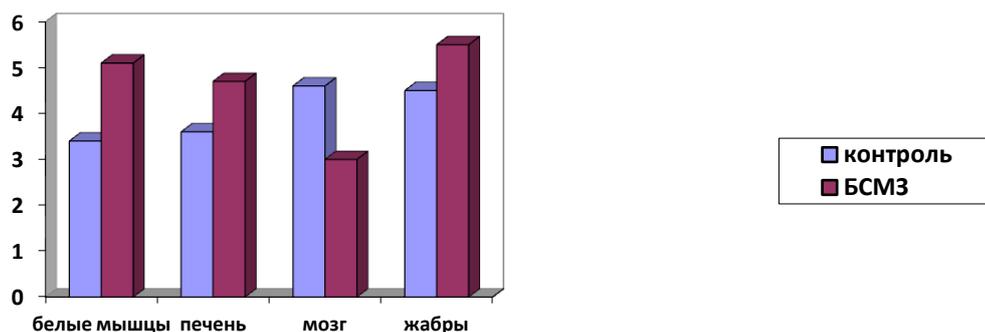


Рис. 4. Содержание малонового диальдегида в тканях и органах карпа при действии 2 ПДК фосфонатов, нмоль / г ткани, $M \pm m$, $n = 5$

Исключение составляет, как и для ЛСН, нервная ткань, где наблюдали недостоверное уменьшение показателя на 35 % ($3,0 \pm 0,5$ при действии бесфосфатного СМС против $4,6 \pm 0,9$ нмоль / г ткани у рыб, находящихся в физиологических условиях).

Максимальные изменения достигли около 50 %, зарегистрированы в белых мышцах ($5,1 \pm 0,9$ при действии СМС против $3,4 \pm 1,2$ нмоль / г ткани у рыб контрольной группы). В печени изменения содержания МДА составляют 31 %, а минимальные отклонения от содержания исследуемого показателя у рыб было в жабрах (22 %).

Результаты исследования свидетельствуют, что альтернатива фосфатам – фосфонаты – эфиры и соли фосфоновых кислот, которые изменяют содержание МДА в тканях и органах карпа несколько меньшие отклонения от показателей у рыб контрольной группы, хотя и наблюдается определенная тенденция. Фосфонаты отличаются от фосфатов тем, что в фосфонатах одна Р-С связь, а в фосфатах таких связей нет. Однако, фактически это те же соединения фосфора, которые стимулируют рост водорослей в водоемах.

Таким образом из-за действия токсикантов система ПОЛ существенно активизируется, чем вызывает деструктивные процессы в тканях рыб. В ответ на это повышается эффективность системы антиоксидантной защиты, которая участвует в обезвреживании продуктов ПОЛ – это также важный элемент адаптации рыб к экологическим изменениям в водной среде.

Необходимо сделать вывод о том, что, являясь составной мембранных ансамблей клеток различной степени специализации, липиды формируют состояние проницаемости и текучести мембран, что в свою очередь является определяющим фактором в модификации активности большинства ферментных комплексов по экологической нагрузке. Активация процессов ПОЛ и

формирование состояния окислительного стресса, сопровождается адекватными изменениями в системе детоксикации. Это требует дополнительных энергетических затрат.

Заключение

По воздействию повышенных концентраций натрия фосфата отмечено повышение содержания МДА во всех исследуемых тканях. Ведущую роль в определении токсического действия имеет концентрация фосфатов в водной среде. По действию 2 ПДК не отмечено существенного влияния токсиканта на содержание малонового диальдегида, хотя во всех исследуемых тканях наблюдали незначительное увеличение содержания МДА. Максимальные изменения характерны для печени и составляют 50 %. Под воздействием 5 ПДК натрий фосфата максимальное токсическое воздействие зарегистрировано в белых мышцах, где изменения МДА достигли 3,4 раза, значительно меньшие изменения показателя зарегистрированы в жабрах (увеличение на 40 %), в печени – 24 %, менее лабильным показателем оказался мозг.

При воздействии синтетических моющих средств количественное содержание малонового диальдегида увеличивается в большинстве исследованных тканей. Исключение составляет нервная ткань, где наблюдали недостоверное уменьшение показателя на 34 % ($2,3 \pm 0,2$ при действии ЛСН против $3,5 \pm 0,4$ нмоль / г ткани у рыб, находящихся в физиологических условиях). Максимальные изменения зарегистрированы при воздействии ЛСН и бесфосфатного СМС в белых мышцах на 80 % и 50 % соответственно.

Наиболее чувствительной к действию фосфатов в повышенных концентрациях и СМС, содержащих фосфаты и фосфонаты, оказалась мышечная ткань. Минимальная чувствительность зарегистрирована для нервной ткани. Ткани печени и жабр занимают промежуточное положение.

Разносторонняя и комплексная оценка патологических изменений в тканях и органах рыб имеет важное значение и с точки зрения их неодинаковой чувствительности к токсикантам в водной среде. Патологические изменения в организме рыб позволяют определить степень токсичности водной среды и сформировать представление о потенциальной опасности различных групп токсичных веществ, которые попадают в водоемы, и их кумулятивного действия на организм в течение жизненного цикла животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Грабовська, С. С. Біологічний вплив поверхнево-активних речовин на живий організм / С. С. Грабовська, В. В. Грабовський, О. Р. Каплінський // Біологія тварин. – 2006. – 8, №1/2. – С. 63–71.
2. Кульцицький, О. К. Особенности пероксидного окисления липидов в тканях головного мозга и печени старых крыс при стрессе / О. К. Кульцицький, Р. И. Потапенко, С. Н. Новикова // Укр.біохім.журн. – 2001. – Т. 73. – №4. – С. 73.
3. Лабори, А. Регуляция обменных процессов / А. Лабори. – М.: Медицина, 1985. – 365 с.
4. Левадная, О. В. Соотношение между величинами активности ферментов антиоксидантной системы в различных тканях интактных крыс / О. В. Левадная // Укр.біохім.журн. – 1998. – Т. 70. – №6. – С. 53–58.
5. Леус, Ю. В. Перекисное окисление липидов и антиоксидантная защита у рыб / Ю. В. Леус, В. В. Грубинко // Гидробиол. журн. – 2001. – Т. 37. – № 1. – С. 64–78.
6. Мурадян, Х. К. Коррелятивные связи между активностью супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы печени мышей / Х. К. Мурадян // Укр.біохім.журн. – 2003. – Т.75. – №1. – С. 33–37.
7. Фосфор мийних засобів та його вплив на водні організми (огляд) / М. О. Савлущинська, Л. О. Горбатюк, О. М. Платонов [та ін.] // Наук. зап. Терноп. нац. пед. ун-ту. Сер. Біол. – 2013 г. – № 3(56). – С. 119–125.
8. Шахматова, О. А. Активность антиоксидантной системы личинок рыб как показатель качества морской среды / О. А. Шахматова // Экология моря. – 2001. – Вып. 59. – С. 48–50.
9. Шпякіна, А. Вплив забруднення водою фосфатами на навколишнє середовище та здоров'я людини (електронний ресурс). – Режим доступу: http://econf.at.ua/publ/konferencija_2016_05_19_20/sekcija_2_biologichni_nauki/vpliv_zabrudnennja_vodojm_fosfatami_na_navkolishne_seredovishhe_ta_zdorov_ia_ljudini/44-1-0-975.
10. Яковенко, Б. В. Вплив натрій лаурилсульфату на деякі біохімічні показники крові коропа / Б. В. Яковенко, О. П. Третяк, О. Б. Мехед, О. В. Ленько // Наукові записки Тернопільського національного педагогічного університету імені Володимира Гнатюка. Серія: Біологія. Спецвипуск: Гідроecологія. – 2015. – №3–4 (64). – С. 772–776.
11. Яковенко, Б. В. Зміни вмісту цитохромів P-450 і b5 та активності НАДФ-генеруючих ферментів у тканинах коропа під впливом поверхнево-активних речовин / Б. В. Яковенко, О. Б. Мехед, О. В. Іскевич // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна, Серія Біологія. – 2015. – №1153. – С. 23–28.
12. Boström, B. Bioavailability of different phosphorus forms in freshwater systems / B. Boström, G. Persson, B. Broberg // Hydrobiologia. – 1988. – Vol. 170. – Is. 1. – P. 133–155.
13. De Assis H.C. Biochemical biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Ancistrus multispinis* / De Assis H.C., L.Nicareta, L.M.Salvo, C.Klemz, J.H.Truppel, R.Calegari // Brazilian Arch. Biol. Technol. – 2009. – Vol. 52, N 6. – P. 1401–1407.
14. El-Gazzar, A. M. Physiological and oxidative stress biomarkers in the freshwater Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L., exposed to sublethal doses of cadmium / El-Gazzar A.M., K.E. Ashry, Y.S. El-Sayed // A.J.V.S. – 2014. – Vol. 40, N 1. – P. 29–43.

15. Golterman, H. Presence of and phosphate release from polyphosphates or phytate phosphate in lake sediments / H. Golterman, J. Paing, L. Serrano, E. Gomez // *Hydrobiologia*. – 1997. – Vol. 364. – Is. 1. – P. 99–104.
16. Panigatti, M. C. Phosphate dynamics in the Middle Paraná wetlands using ³²P isotopic technique / M. C. Panigatti, M. A. Maine // *Hydrobiologia*. – 2002. – Vol. 472. – Is. 1–3. – P. 45–51.
17. Soldatov, A. A. Effects of Temperature, pH, and Organic Phosphates on Fish Hemoglobins / A. A. Soldatov // *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*. – 2003. – Vol. 33. – Is. 2. – P. 159–168.