ACTA ENVIRONMENTALICA UNIVERSITATIS COMENIANAE (BRATISLAVA)
Vol. 18, 2(2010): 27–33 ISSN 1335-0285

VPLYV KOMPLEXÁCIE MEDI NA ZLOŽKY SLADKOVODNÝCH EKOSYSTÉMOV

Agáta Fargašová, Mirko Bohuš

Katedra ekosozológie a fyziotaktiky, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava, Slovenská republika,
e-mail: fargasova@fns.uniba.sk; bohus@fns.uniba.sk

Abstract: ***Impact of Cu complexes on freshwater ecosystems components.*** *Chronic effects of $Cu(NO_3)_2$ and Cu(II) cyanato-complexes with biologically active heterocyclic imidazole ligands expressed as inhibition of algal growth, chlorophyll a and b contents in alga Desmodesmus quadricauda have been studied. The accumulation of Cu in alga cells was also determined. The corresponding IC_{50} values for growth inhibition varied in the range of 1.2-3.4 mg Cu/l and in the ranges of 2.4-5.8 mg Cu/l for Chl<u>a</u> and 1.7-7.0 mg Cu/l for Chl<u>b</u>. The inhibitory orders were: for algal growth and Chl<u>b</u> content: $Cu(NO_3)_2$ > $Cu(NCO)_2$(imidazo-le)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(2-methylimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(1,2-dimethylimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(2-methylbenzimidazole)$_2$; for Chl<u>a</u> content: $Cu(NO_3)_2$ > $Cu(NCO)_2$(2-methylbenzimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(1,2-dimethyl-imidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(2-methylimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(imidazole)$_2$. For copper accumulation from cultivation media with tested compounds (1.0 mg Cu/l medium) was after 15 days cultivation the following rank order arranged (from the highest to the lowest Cu amount accumulated): $Cu(NCO)_2$(imidazole)$_2$ ≥ $Cu(NO_3)_2$ > $Cu(NCO)_2$ (2-methylimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(1,2-dimethylimidazole)$_2$ > $Cu(NCO)_2$(2-methylbenz-imidazole)$_2$.*

Kľúčové slová: Cu(II) kyano-komplexy, imidazolový ligand, toxicita, fotosyntetické pigmenty, akumulácia Cu, *Desmodesmus quadricauda*

ÚVOD

Znečisťovanie životného prostredia veľmi výrazne ovplyvňuje nielen terestrické ale aj sladkovodné ekosystémy. Kontaminácia vôd, môže viesť k výrazným zmenám v ich druhovom zložení a následne ku zníženiu ich produkčnosti. Riasy, ako organizmy tvoriace základný článok trofických úrovní vo vodných ekosystémoch, sú medzinárodne akceptované ako organizmy vhodné na sledovanie potenciálneho rizika chemických látok vo vodnom prostredí (Klaine, Lewis 1995; OECD 2002). Antropogénne vstupy medi do vôd sa pozorujú ako v priemyselných tak aj vidieckych oblastiach. Meď sa môže v prostredí transportovať hydrosférou (rieky, podzemné vody), suchou depozíciou alebo zrážkami (Drever 1997). V dôsledku jej intenzívneho priemyselného využívania, mobility a toxicity sa v súčasnosti stáva, aj napriek

tomu, že je biogénnym prvkom takmer pre všetky formy života, veľmi dôležitým kontaminantom. Rozpätie koncentrácií medzi jej esecialitou a toxicitou je malé a už nepatrné množstvá medi, môžu mať fatálne následky na niektoré vodné organizmy (Bruland et al. 1991). V dôsledku stresu s prítomnosti Cu sú niektoré organizmy schopné produkovať bielkoviny a ligandy, ktoré ju viažu a tým znižujú jej toxicitu (Moffett, Brand 1996). Z hľadiska kvality vôd, ich druhovej divergencie a produkcie je preto dôležité sledovať zdroje a záťaže prostredia meďou a stanoviť jej biodostupnosť a toxicitu pri rôznych koncentráciách. Vo vodnom prostredí závisí toxicita Cu viac od jej aktivity (alebo „voľnej“ koncentrácie) ako od celkovej hladiny Cu prítomnej vo vode (Lüderitz et al. 1989).

Vo vodnom prostredí sa meď prednostne vyskytuje vo forme Cu(II) komplexov. Keďže meďnatý ión je vysoko reaktívny vytvára vo vodách stredne až silno komplexované roztoky a zrazeniny s mnohými anorganickými a organickými komponentmi a ľahko sa sorbuje na povrchu suspendovaných častíc. Hoci sa vo vodách vyskytuje v najrozmanitejších formách jej toxicita sa vzťahuje primárne k aktivite meďnatého iónu a snáď aj niektorých hydroxylových komplexov (Allen, Hansen 1996).

Významnou mierou ku zvýšenej koncentrácii komplexov medi vo vodnom prostredí prispievajú aj liečivá zaraďované do skupiny antireumatík, ktorých spotreba neustále narastá. Jednou z heterocyklických organických zlúčenín, ktorá sa používa pri príprave antireumatík na báze medi je imidazol a bezimidazol. Imidazol má dva atómy dusíka – jeden je slabo kyslý, druhý je zásaditý. Benzimidazol je dicyklický a imidazolový kruh je pripojený k benzénu. Imidazol a jeho deriváty sa vo veľkej miere používajú ako medziprodukty pri syntéze organických a anorganických zlúčenín vrátane liekov, agrochemikálií, farbív, fotografických zlúčenín, inhibítorov korózie, epoxidových vulkanizačných látok, lepidiel a plastových modifikátorov (Kráľová et al. 1998; Langer et al. 2004). Do prostredia sa teda môže dostávať z rôznych antropogénnych činností. Pre žiadnu zlúčeninu imidazolového typu nie sú dostupné ani ekotoxikologické údaje ani ich environmentálne dopady.

MATERIÁL A METÓDY

Ako testovací objekt sa pri sledovaní účinkov Cu(II) kyanátových komplexov s heterocyklickým N-donorovým imidazolovým ligandom používala riasa *Desmodesmus quadricauda* (TURP.) BRÉB. kmeň Greifswald 15. Riasy sa kultivovali v kultivačnom médiu podľa normy ISO (2004) s pH hodnotou 7,2 pri konštantnej teplote 22 ± 2 °C a permanentnom osvetlení s intenzitou 70 $\mu E/m^2/s$. Počiatočná hustota riasovej suspenzie bola 25 000 cenóbií/ml (cenóbium – štyri bunky spojené do jednej jednotky). Rast riasovej suspenzie sa stanovoval ako v kontrole tak aj v prítomnosti testovaných komplexov spektrofotometricky (λ = 750 nm) (Spektrofotometer SP-850) každé dva dni (Pastierová et al. 2009). Po 15 dňoch kultivácie sa z buniek rias

extrahovali do 95 % etanolu fotosyntetické pigmenty – chlorofyl a (Chl*a*) a chlorofyl b (Chlb) a ich obsah sa stanovoval spektrofotometricky meraním absorbancie pri 665 a 649 nm. Na výpočet koncentrácie chlorofylov v bunkách rias sa použili rovnice (Pastierová et al. 2009):

$$Chl\mathit{a} = 13{,}70(A_{665}) - 5{,}76(A_{649})$$

$$Chl\mathit{b} = 25{,}80(A_{649}) - 7{,}96(A_{665}) \text{ v } \mu g/ml.$$

Inhibičné účinky Cu(II) komplexov a $Cu(NO_3)_2$ ako porovnávacej látky sa vyjadrovali ako IC_{50} hodnoty (nominálne hodnoty, pri ktorých dochádza k 50 % inhibícii sledovaného parametra) a ich 95 % intervaly spoľahlivosti (IC). Na odhad IC_{50} hodnoty sa použila probitova analýza a tieto hodnoty vyjadrujú intenzitu chronického účinku (OECD 2002).

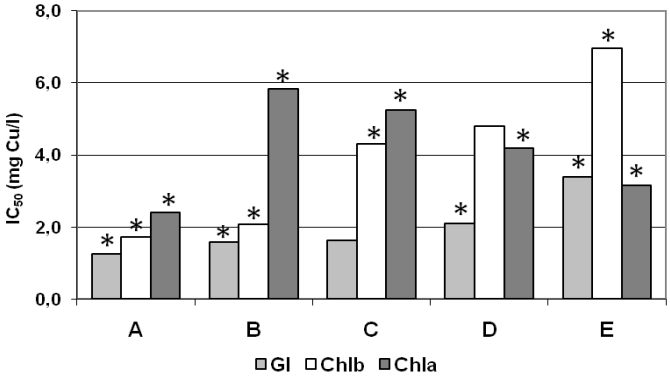
Obsah medi v bunkách rias, ktoré rástli v prítomnosti Cu(II) komplexov alebo porovnávacej látky sa stanovoval po mineralizácii disperzným multikanálovým röntgen-fluorescentným analyzátorom (model Canberra 8100, U.S.A) s detekčným limitom spoľahlivosti pod 1 μg/l, ktorý bol prepojený s digitálnym zapisovačom. Ako referenčné materiály sa používali P-ACHK (esenciálne a toxické prvky v zelených riasach) z Ústavu rádioekológia a aplikovaných radiačných techník v Košiciach. Pred mineralizáciou a stanovením akumulácie medi v bunkách sa riasy najprv premyli destilovanou vodou, aby sa z nich odstránila meď zachytená na ich povrchu. Pri hodnotení akumulácie sa všetky testované látky pridávali do kultivačného média v koncentrácii ekvivalentnej 10 μg Cu/l a obsah Cu sa prepočítal na suchu hmotu (DW) (Fargašová et al. 1999).

Na hodnotenie inhibičných účinkov a akumulácie Cu v bunkách rias *D. quadricauda* sa použili ako porovnávacia látka $Cu(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (p.a.) (MERC Darmstadt, FRG) a Cu(II) kyanátové komplexy s heterocyklickými N-donorovými imidazolovými ligandmi – $Cu(NCO)_2(iz)_2$, $Cu(NCO)_2(Meiz)_2$, $Cu(NCO)_2(Me_2iz)_2$ a $Cu(NCO)_2(Mebz)_2$ (iz = imidazol; Meiz = 2-metylimidazol; Me_2iz = 1,2-dimetylimidazol; Mebz = 2-metylbenzimidazol). Komplexy $Cu(NCO)_2L_2$ (L je iz, Meiz, Me_2iz alebo Mebz) majú tetragonálnu stereochémiu. Obsahujú koordinované molekuly imidazolu alebo jeho derivátov a anionické NCO^- ligandy. Všetky imidazolové ligandy sú koordinované k Cu(II) cez atóm dusíka a kyanátové anióny sú k Cu(II) viazané cez N (Mašlejová et al. 1980). Vo vodných roztokoch je $Cu(NO_3)_2$ prítomné ako aquakomplex $[Cu(H_2O)_6]^{2+}$, NO_3^- anión nie je koordinovaný. Cu(II) kyanátové komplexy boli pripravené na Katedre anorganickej chémie, Fakulty chemickej a potravinárskej technológie, STU v Bratislave. Zásobné roztoky testovaných látok sa pripravovali v DMSO tak, aby výsledná koncentrácia DMSO v 50 ml kultivačného média bola 0,4 %. Každá z testovaných látok sa použila v 10 koncentráciách, ktoré tvorili geometrický rad v rozsahu od 0,1 do 10 μg Cu/l s hladinou účinku od 10 do 90 % inhibície rastu riasovej suspenzie. Obsah medi v zásobných roztokoch sa stanovoval chelatometricky po rozklade látok pomocou H_2SO_4 a $K_2S_2O_8$ pred každým testom. Analýza prvkov sa robila Flash EA 112 analyzátorom.

Účinok každej koncentrácie sa hodnotil v troch paralelných stanoveniach a porovnával sa s kontrolnou vzorkou s nulovou koncentráciou testovanej látky. Kontrola sa robila v šiestich opakovaniach.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky testov potvrdili, že Cu(II) komplexy inhibovali rast a tvorbu chlorofylov v riase *D. quadricauda* slabšie ako $Cu(NO_3)_2$. Inhibičné účinky testovaných komplexov vyjadrené ako IC_{50} hodnoty sa pohybovali v nasledovných rozmedziach: pre rast rias od 1,6 $[Cu(NCO)_2(iz)_2]$ do 3,4 μg Cu/l $[Cu(NCO)_2(Mebz)_2]$, obsah Chl*a* od 3,2 $[Cu(NCO)_2(Mebz)_2]$ do 5,8 μg Cu/l $[Cu(NCO)_2(iz)_2]$ a obsah Chl*b* od 2,1 $[Cu(NCO)_2(iz)_2]$ do 7,0 μg Cu/l $[Cu(NCO)_2(Mebz)_2]$ (graf 1). Na základe IC_{50} hodnôt a ich 95 % CI sa dajú pre jednotlivé hodnotené parameter zostaviť nasledovné zozstupné inhibičné rady: pre inhibíciu rastu rias a obsah Chl*b*: $Cu(NO_3)_2 > Cu(NCO)_2(iz)_2 > Cu(NCO)_2(Meiz)_2 > Cu(NCO)_2(Me_2iz)_2 > Cu(NCO)_2(Mebz)_2$; pre obsah Chl*a*: $Cu(NO_3)_2 > Cu(NCO)_2(Mebz)_2 > Cu(NCO)_2(Me_2iz)_2 > Cu(NCO)_2(Meiz)_2 > Cu(NCO)_2(iz)_2$. Rozdiely v inhibičnej aktivite sledovaných Cu(II) komplexov boli väčšinou preukazné a účinky ligandov sa prejavovali výrazne. Tieto zistenia popierajú závery Kráľovej et al. (1998) uvádzané pre dva typy Cu(II) komplexov, $CuX_2.H_2O$ a CuX_2L_y (kde X = flufenamát, mefenamát, niflumát, naproxenát; L = nikotínamid, N,N-dietyl-nikotínamid, ronikol, kafeín, metyl-3-pyridylkarbamát; y = 1 alebo 2), keď predpokladá, že za rast a produkciu chlorofylu v riase *Chlorella vulgaris* sú zodpovedné predovšetkým Cu(II) ióny.



Graf 1: IC_{50} hodnoty a ich 95% CI (μg Cu/l) pre inhibíciu rastu rias *D. quadricauda* a produkciu chlorofylov

Vysvetlivky: Chla – chlorofyl *a*; Chlb – chlorofyl *b*; * – preukazné rozdiely medzi všetkými látkami; **A** – $Cu(NO_3)_2.4H_2O$; **B** – $Cu(NCO)_2(iz)_2$; **C** – $Cu(NCO)_2(Meiz)_2$; **D** – $Cu(NCO)_2(Me_2iz)_2$; **E** – $Cu(NCO)_2(Mebz)_2$

Na základe našich výsledkov sa dá usudzovať, že spomalenie rastu riasovej suspenzie a zníženie produkcia chlorofylov v prítomnosti testovaných Cu(II) komplexov môže súvisieť so zmenami v biosyntéze chlorofylu spôsobenej nahradením iónov Mg^{2+} iónmi Cu^{2+} (Kowalewska et al. 1987), zmenami štruktúry lipidových membrane v dôsledku peroxidácie (Sandmann, Böger 1980) a zabrzdením syntézy D_1 proteínu v PS2 (Vavilin et al. 1995). Najsilnejší inhibičný účinok ako na rast rias tak aj na produkciu chlorofylov mala v testoch porovnávacia anorganická látka $Cu(NO_3)_2$.

Tab. 1: Akumulácia medi z Cu(II) komplexov s imidazolovými ligandmi a $Cu(NO_3)_2$ v bunkách rias *D. quadricauda*

Látka	**A**	**B**	**C**	**D**	**E**
μg Cu/mg DW	98,70*	105,50	61,20*	34,30*	24,60*

Vysvetlivky: * – preukazné rozdiely medzi všetkými látkami; smerodajná odchýlka 6 % a menej; DW – suchá hmotnosť; **A** – $Cu(NO_3)_2.4H_2O$; **B** – $Cu(NCO)_2(iz)_2$; **C** – $Cu(NCO)_2(Meiz)_2$; **D** – $Cu(NCO)_2(Me_2iz)_2$; **E** – $Cu(NCO)_2(Mebz)_2$

Pri porovnaní intenzity inhibičného účinku pre rast rias a obsah Chl*b* s molekulovou hmotnosťou a lipofilitou testovaných látok sa potvrdila nepriama korelácia, t.j. so zvyšovaním molekulovej hmotnosti a lipofility látok sa znižoval ich inhibičný účinok. Vysvetlenie pre tieto zistenia poskytujú výsledky zo stanovení obsahu Cu naakumulovanej v bunkách rias po 15 dňoch kultivácie (Tab. 1.), ktoré potvrdili, že čím vyššia bola molekulová hmotnosť a lipofilita látok tým slabšia bola penetrácia a následne aj akumulácia Cu v bunkách *D. quadricauda*. Poradie testovaných látok v závislosti od množstva prijatej Cu v bunkách rias bolo $Cu(NCO)_2(iz)_2 \geq Cu(NO_3)_2 > Cu(NCO)_2(Meiz)_2 > Cu(Me_2iz)_2 > Cu(Mebz)_2$ a obsah Cu(II) v riasach sa pohyboval v rozpätí od 24,6 [$Cu(Mebz)_2$] do 105,5 μg Cu/mg DW [$Cu(NCO)_2(iz)_2$] (tab. 1). Rozdiely v molekulovej hmotnosti $Cu(NCO)_2(iz)_2$ a $Cu(NO_3)_2$ sú veľmi malé, čo poukazuje aj na takmer rovnaké množstvo Cu, ktoré sa z týchto dvoch látok akumulovalo v bunkách rias. Podobná závislosť medzi molekulovou hmotnosťou, toxicitou, penetráciou a akumuláciou bola pri riasach potvrdená aj pre iné Cu(II) komplexy a Fe(III) a Cd(II) komplexy (Kráľová et al. 1998; Ondrejkovičová et al. 2000; Fargašová, Ondrejkovičová 2002). Akumuláciu medi z testovaných Cu(II) komplexov ovplyvňuje sférická štruktúra komplexu a rozdiely v aktívnych absorpčných centrách na povrchu bunkovej steny. Na základe vyššie uvádzaných výsledkov sa dá konštatovať, že charakter ligandov v Cu(II) komplexoch výrazne ovplyvňuje nielen ich inhibičný účinok na rast a produkciu fotosyntetických pigmentov ale aj penetráciu a kumuláciu medi v bunkách rias. Testy potvrdili, že väzba medi na biologicky aktívne ligandy znižuje jej dostupnosť, čo sa následne odráža v zvýšení jej IC_{50} alebo LC_{50} hodnoty (U.S. EPA 2003). Biodostupnosť kovov môže byť modifikovaná aj kompetitívnymi interakciami s biologickým ligandom.

V posledných desaťročiach sa venuje značná pozornosť sledovaniu a

hodnoteniu účinkov toxických a potenciálne toxických kovov v rozpustnej fáze sledovaním zmeny ich chemickej podstaty alebo štruktúry. Mnohé stopové prvky, napr. Cd, Cu, Zn, Fe, Se a iné, sú schopné vytvárať s anorganickými a organickými ligandmi alebo komplexačnými činidlami komplexy, ktoré sú často prítomné v prírodných vodách (Allen 2002). Mnohé komplexy kovov sa dostávajú do životného prostredia z antropogénnej činnosti. K takýmto patria aj v práci testované Cu(II) komplexy s imidazolovými ligandmi. To ako budú biologické ligandy ovplyvňovať toxicitu kovov v prírodných vodách závisí nielen od kvality vody a množstva anorganických a organických ligandov alebo komplexačných činidiel, ktoré vchádzajú s kovmi do interakcií, ale aj od prítomnej bioty, jej druhového zloženia a abundancie. Aj keď biologický účinok závisí od samotného kovu a štruktúry v akej je viazaný, jeho biodostupnosť ovplyvňujú ako fyzikálno-chemické vlastnosti prostredia, tak aj intenzita biologickej aktivity, ktorá prostredie výrazne ovplyvňuje. Pokiaľ ide o hodnotenie a stanovenie biodostupnosti komplexov kovov, najmä v prírodných podmienkach, neexistujú jednoznačné závery. V USA bol nedávno do regulačného rámca zahrnutý aj Biotic Ligand Model (BLM). BLM je efektívnym nástrojom na odhad toxicity rozpustených kovov pomocou matematicky začlenených interakcií kovov s rozpustnou fázou ligandov. Model sa využíva na predpovedanie špeciácie komplexov a ich následných interakcií s receptorovým miestom organizmu (Allen 2002; U.S. EPA 2003; De Schamphelaere, Janssen 2004).

POĎAKOVANIE

Príspevok vznikol vďaka podpore v rámci operačného programu Výskum a vývoj pre projekt: Centrum excelentnosti pre ochranu a využívanie krajiny a biodiverzitu, ITMS 26240120014 spolufinancovaný zo zdrojov Európskeho fondu regionálneho rozvoja (100 %).

LITERATÚRA

Allen H. E. 2002. The biotic ligand model addresses effects of water chemistry on metal toxicity. International Council on Mining and Metals. Fact Sheet on Environmental Risk Assessment, No. 7. ICMM, London UK, 5 p.

Allen H. E., Hansen D. J. 1996. The importance of trace metal speciation to water quality criteria. Water Environ. Res. 68, pp. 42-54.

Bolier G., Donze M. 1989. On the accuracy and interpretation of growth curves of planktonic algae. Hydrobiologia 188/189, pp. 175-179.

Bruland K. W., Donat J. R., Hutchins D. A. 1991. Interactive influences of bioactive trace metals on biological production in oceanic waters. Limnol. Oceanog. 36, pp. 1555-1577.

De Schamphelaere K. A. C., Janssen C. R. 2004. Effects of dissolved organic carbon concentration and source, pH, and water hardness on chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 23, pp. 1115-1122.

Drever J. I. 1997. The Geochemistry of Natural Waters: Surface and Groundwater Environments. Englewood Cliffs, New Jersey: Prentice Hall.

Fargašová A., Ondrejkovičová I., Bumbálová A. 1999. Biological activity of Fe(III) complexes with heterocyclic N-donor ligand – test subject freshwater alga *Scenedesmus quadricauda*. In: Ondrejovič G., Sirota A. (eds.): Coordination Chemistry at the Turn of the Century. STU Press, Bratislava, pp. 359-365.

Fargašová A., Ondrejkovičová I. 2002. Ecotoxicological effects of Cd(II) complexes with heterocyclic N-donor ligand nicotinamide (nia) on alga *Scenedesmus quadricauda*. Chem. listy 96, pp. 498.

ISO 8692, 2004. Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatum* and *Selenastrum capricornutum*. International Organization for Standardization. Case portale 56, Switzerland, 15 p.

Klaine S. J., Lewis M. A. 1995. Handbook of Ecotoxicology. Lewis Publisher, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 163 p.

Kowalewska G., Falkowski L., Hoffmannand S., Szczepaniak L. S. 1987. Replacement of magnesium by copper (II) in the chlorophyll porphyrin ring of planktonic algae. Acta Physiol. Plant. 9, pp. 43-52.

Kráľová K., Šeršeň F., Melník M. 1998. Inhibition of photosynthesis in *Chlorella vulgaris* by Cu(II) complexes with biologically active ligands. J. Trace Microprobe Tech. 16, pp. 491-500.

Langer V., Scholtzová E., Gyepesová D., Kohútová M., Valent A. 2004. (*N*-salicylidene-D,L-glutamato)(2-methylimidazole)copper(II). Acta Crystallog. E60, m129-m132.

Lüderitz V., Nicklisch A., Kohl J.-G. 1989. Kupfer als algizid. Acta Hydrochim. Hydrobiol. 17, pp. 61-73.

Mašlejová A., Kirmse R., Stach J. 1980. Beiträge zur Struktur und den Bindungsverhältnissen von Cyanato-Kupfer(II)- Komplexverbindungen des Typs $Cu(NCO)_2L_2$. Eine ESR – Untersuchung. Z. anorg. allg. Chem. 461, pp. 61-66.

Moffett J. W., Brand L. E. 1996. Production of strong extracellular Cu chelators by marine cyanobacteria in response to Cu stress. Limnol. Oceanogr. 41, pp. 388-395.

OECD 2002. Guidelines for the Testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test 201, Paris, 21 p.

Ondrejkovičová I., Fargašová A., Havránek E. 2000. Detection of biological efficiency of Fe(III) complexes with heterocyclic N-donor ligand nicotinamide (nia) using algal assay. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 65, pp. 451-458.

Pastierová J., Kramárová Z., Molnárová M., Fargašová A. 2009. Comparison of the sensitivity of four freshwater microalgae to selenate and selenite. Fresenius Environ. Bull. 18, pp. 2029-2033.

Sandmann G., Bõger P. 1980. Copper-mediated lipid peroxidation processes in photosynthetic membranes. Plant Physiol. 66, pp. 797-800.

Stumm W., Morgan J. T. 1981. An introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. John Wiley and Sons Inc., New York, NY.

U.S. EPA 2003. Update of Ambient Water Quality Criteria for Copper. CAS Registry Number 7440-50-8, Washington, DC, 71 p.

Vavilin D. V., Polynov V. A., Matorin D. N., Venediktov P. S. 1995. Sublethal concentrations of copper stimulate photosystem II photoinhibition in *Chlorella pyrenoidosa*. J. Plant Physiol. 146, pp. 609-614.