



О сроках выведения трифенилметановых красителей после обработки рыбы

А.А. Вишторская,
канд. биол. наук **Н.Н. Романова,**
канд. биол. наук **П.П. Головин** –
Филиал по пресноводному
рыбному хозяйству
ФГБНУ «ВНИРО» («ВНИИПРХ»)

@ vniiprh@vniiprh.ru;
lab.ihitopat@mail.ru

Ключевые слова:

аквакультура; заболевания рыб; иммуноферментный анализ; малахитовый зеленый; органические красители; профилактика; терапия; фиолетовый «К»

Keywords:

aquaculture, fish diseases, ELISA, malachite green, organic dyes, prevention, treatment, crystal violet

ON THE PERIODS OF TRIPHENYLMETHANE DYES REMOVAL AFTER FISH PROCESSING

Vishtorskaya A.A., Romanova N.N., PhD, Golovin N.N., PhD -
Branch on Freshwater Fisheries of the Russian Research Institute of Fisheries and Oceanography,
vniiprh@vniiprh.ru; lab.ihitopat@mail.ru

In the article, the period of triphenylmethane dyes (for example, malachite green and crystal violet) removal from the fish's tissues after treatment is examined. In the Russian Federation, their use in aquaculture was discontinued. No alternative replacement for these drugs was found which led to a worsening of the epizootic situation in fish farms. The established terms for malachite green excretion for rainbow trout are 282 days (10 months), for purple "K" during summer carp breeding - 40 days (1.5 months). The use of these dyes during incubation period and in the first year of fish rearing in compliance with these terms will allow one to get fish products without a residual amount of triphenylmethane dyes.

Работа посвящена определению сроков выведения трифенилметановых красителей (например, малахитового зеленого и фиолетового «К») из организма рыб после лечебно-профилактических обработок. На территории Российской Федерации их использование в аквакультуре было прекращено. Альтернативной замены этим препаратам не найдено, что привело к ухудшению эпизоотической ситуации на рыбноводных хозяйствах. Установленные сроки выведения малахитового зеленого для радужной форели составляют 282 суток (10 месяцев), фиолетового «К» в период летнего выращивания карпа – 40 суток (1,5 месяца). Использование красителей во время инкубации и на первом году выращивания рыб, при соблюдении этих сроков, позволит получить рыбную продукцию без остаточного количества трифенилметановых красителей.

ВВЕДЕНИЕ

Ухудшение условий обитания привело к снижению численности рыб в естественных водоемах, что повлияло на сокращение рыбных запасов. Для полноценного обеспечения населения рыбой необходимо резкое увеличение объемов продукции аквакультуры. Однако одним из сдерживающих факторов развития этого направления являются болезни культивируемых гидробионтов. Первостепенное место в борьбе с заболеваниями отводится профилактическим мероприятиям, направленным на предупреждение их возникновения, в число которых входит противопаразитарная обработка икры и молоди.

Профилактическая обработка во время инкубации икры позволяет избежать возникновения грибкового заболевания – сапролегниоза, который может привести к 100% гибели эмбрионов. Она также направлена на предотвращение эктопаразитарных инвазий (костиоза, ихтиофтириоза, триходиниоза, хилоденеллеза) у молоди, которые наносят существенный экономический ущерб рыболовным предприятиям. В мировом рыболовстве для борьбы с этими заболеваниями одним из первых препаратов стал использоваться органический краситель трифенилметанового ряда – малахитовый зеленый. В 1933 г. его опробовали на форели против сапролегнии, когда остальные препараты были неэффективны. В дальнейшем был проведен ряд исследований по его фунгицидному и антисептическому действию, что расширило его применение в аквакультуре [21]. Сведения о физических и химических свойствах малахитового зеленого, характере его действия, токсичности, накоплении в организме и устойчивости во внешней среде были обобщены в обзоре Альдермана [16]. Однако позднее, по мере использования, были установлены его побочные действия на организм рыбы и теплокровных животных [18; 19; 22; 23; 25; 30].

Гидробионты интенсивно поглощают препарат из воды, и он накапливается в большей степени в виде основания – лейкомалахитового зеленого [20], который, обладая липофильной природой, продолжительное время сохраняется в жировой ткани, в связи с чем скорость его элиминации зависит от количества жира в организме [18; 32; 34]. Некоторые исследователи отмечают, что основание малахитового зеленого обладает канцерогенными свойствами [22; 31], но его токсичность в несколько раз меньше, чем самого красителя [17; 24; 26; 33].

В России, кроме малахитового зеленого, широкое применение получили фиолетовый «К» и бриллиантовый зеленый (основной ярко-зеленый) как лечебно-профилактические средства против эктопаразитозов рыб. Их успешно использовали для разных видов и возрастных групп рыб.

Однако в 2011 г. был принят технический регламент на пищевую продукцию, в соответствии с которым остаточное количество трифенилметановых красителей в товарной рыбе не допускается [12].

Список лекарственных препаратов в области ветеринарии в настоящее время на территории

Российской Федерации ограничен, в особенности для выращивания товарной рыбной продукции [6; 11; 13]. Прошедших регистрацию лекарственных средств недостаточно для результативного контроля эпизоотических ситуаций на рыболовных предприятиях.

Альтернативной замены трифенилметановым красителя пока не найдено, но существуют препараты со схожим действием на возбудителей, которые не имеют лицензии на территории РФ или недостаточно эффективны по сравнению с красителями. Например, Русеце vet. для обработки рыб и икры против сапролегнии в странах ЕС, в основе которого 2-бром-2-нитро-пропан-1,3-диол (торговое название – бронопол) [29]. В российский ветеринарный реестр лекарственных средств включен «Девастин» (МНН – повидон йод) для борьбы с простейшими (хилодонеллами и триходинами) и моногенейми (гирадактилюсами и дактилогирусами) у карповых рыб, но не установлено его влияние на сапролегнию и ихтиофтириус, которые вызывают заболевания и гибель рыбы в рыболовных хозяйствах.

В экстренных случаях, когда неэффективны зарегистрированные препараты, для предупреждения развития сапролегниоза икры и вспышек протозойных заболеваний у молоди рыб, использование проверенных на практике трифенилметановых красителей позволило бы снизить ущерб предприятиям аквакультуры, наносимый болезнями.

Целью работы являлось определить остаточное количество в рыбе малахитового зеленого и фиолетового «К» и установление сроков их выведения из организма после лечебно-профилактических обработок.



МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа проведена в экспериментальных и производственных условиях на трех видах основных объектов товарной аквакультуры – бестере, радужной форели и карпе. Обработку рыбы трифенилметановыми красителями (малахитовым зеленым и фиолетовым «К») проводили согласно нормативным документам и наставлениям по применению органических красителей для лечебно-профилактических обработок рыбы и инкубируемой икры на рыбоводных хозяйствах [1; 2; 3; 7; 8; 9; 10; 14].

Определение в рыбе остаточного количества трифенилметановых красителей (суммарное содержание красителей и их лейко-оснований) осуществляли в соответствии с нормативной документацией [5].

В целях скрининга использовали непрямой твердофазный конкурентный иммуноферментный анализ (ИФА), который проводили с помощью тест-систем (Malachite Green/Leucomalachite Green plate kit, Abraxis и Malachite Green/



Leucomalachite Green EIA, EuroProxima). Предел обнаружения составлял 0,125-25 мкг/кг. При предполагаемом высоком количестве красителя (материал отбирали сразу после обработок), пробы разводили 10 или 100 раз. Отрицательными считали результаты, показавшие значение содержания трифенилметановых красителей ниже предела количественного определения – 2 мкг/кг, который указан с учетом номинального содержания малахитового зеленого в тест-системе.

Эксперименты осуществляли следующим образом:

1. Экспериментальная работа с малахитовым зеленым на бестере и радужной форели.

Бестер. Для опыта молодь средней массой 12 г была рассажена в 5-ти аквариумах (объемом по 30 л) с аэрацией. В одном аквариуме рыбу адаптировали и содержали в теплой воде (18°C), в трех – в холодной воде (7°C), и один аквариум с холодной водой, с не обработанной красителем рыбой, был контрольным. После адаптации провели однократную обработку малахитовым зеленым рыбы на теплой воде в течение 4 часов, на холодной – в течение 3 суток (табл. 1).

Отбор проб для определения остаточного количества малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого осуществляли после завершения обработки рыбы на теплой воде через час (вариант 1), на холодной – на следующие сутки. Для анализа брали целые тушки, а также отдельно – мышцы и внутренние органы. Оценивали суммарное количество малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого, кроме того в варианте 1 в тушке бестера дополнительно определили количество красителя без его лейко-основания.

Радужная форель. Опытную группу икры, для профилактики поражения сапролегнией в период инкубации, обработали малахитовым зеленым 8 раз (концентрация 10 г/м³ в течение 10-30 мин) при температуре воды 5-9°C. Контрольная группа оставалась необработанной. После вылупления личинки форели были рассажены в рыбоводные лотки с нормативной плотностью посадки для дальнейшего выращивания.

На 2-ом месяце выращивания (76-й день), в результате спонтанного возникновения в контрольной и опытной группах ихтиофтириоза, вся молодь форели была обработана малахитовым зеленым, согласно инструкции по его применению (трехкратно через день с концентрацией 0,5 г/м³ и экспозицией – 3 ч). Через сутки после каждой

Таблица 1. Схема обработки малахитовым зеленым молоди бестера /
Table 1. Malachite green treatment scheme for juvenile bester

Но варианта	Температура воды в аквариуме, °С	Концентрация малахитового зеленого, г/м ³	Экспозиция
1	18	0,2	4 часа
2	7	0,5	3 суток
3	7	0,2	3 суток
4	7	0,02	3 суток
5	7	контроль	-

Таблица 2. Сроки отбора проб для определения остаточного количества малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого в опыте на радужной форели / **Table 2.** Timing of sampling to determine the residual amount of malachite green and leukomalachite green in the experiment on rainbow trout

№ п/п	Обработка малахитовым зеленым	Срок отбора проб после обработки, сутки
1	инкубируемой икры	76*
		6**
		21
		33
		42
		44
2	молоди в возрасте 2-х месяцев	92
		204
		282
		356
		380

Примечание:

* – отбор проб молоди рыб после обработки инкубируемой икры перед обработкой от ихтиофтириоза;

** – отбор проб молоди рыб после обработки от ихтиофтириоза.

Таблица 3. Схема обработки фиолетовым «К» карпа в осенне-весенний период в рыбоводных хозяйствах / **Table 3.** Purple "K" treatment scheme for carp in the autumn-spring period in fish farms

Эксперимент	Возраст рыбы	Схема обработки
Вариант 1	Сеголетки-годовики	1) Осенью в выростных прудах (0,2 г/м ³); 2) Весной в зимовальных прудах перед обловом рыбы (0,2 г/м ³); 3) В транспортной таре перед пересадкой в нагульные пруды (1,1 г/м ³ 30-40 мин)
	Двухлетки-двухгодовики	
Вариант 2	Сеголетки-годовики	1) Осенью в транспортной таре при пересадке на зимовку (5,6 г/м ³ 20 мин); 2) В бассейнах зимовального комплекса (1 г/м ³ 2 часа); 3) Весной в транспортной таре перед пересадкой в нагульные пруды (5,6 г/м ³ 20 мин)

обработки оценивали зараженность форели ихтиофтириусами.

Общая продолжительность опыта составила 1 год, в течение которого производили отбор проб для определения суммарного остаточного количества малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого (табл. 2).

2. Экспериментальная работа с фиолетовым «К» на карпе.

В экспериментально-производственных условиях в двух рыбоводных хозяйствах (вариант 1 и 2) две возрастные группы карпа (сеголетки и двухлетки) обрабатывали фиолетовым «К», согласно нижеприведенной схеме (табл. 3).

В 1-ом варианте у обеих возрастных групп рыбы отбирали в летний период через 40 дней после последней обработки, во 2-ом варианте – в период летнего выращивания (70 дней после последней обработки) и дополнительно – осенью (145 суток после обработки).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Малахитовый зелёный

Бестер. На следующие сутки, после завершения обработки рыбы малахитовым зеленым в кон-

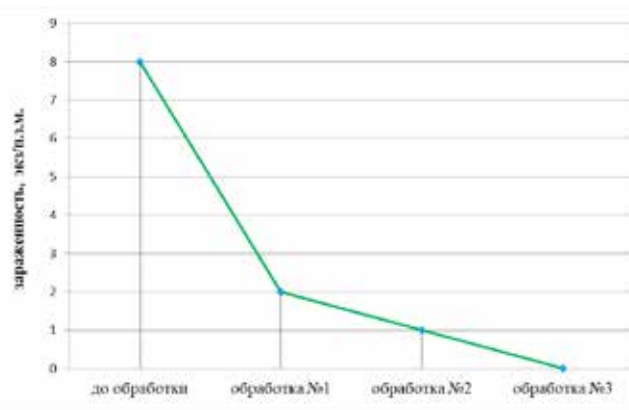


Рисунок 1. Динамика зараженности молоди форели ихтиофтириусами после обработки малахитовым зеленым

Figure 1. Dynamics of juvenile trout infection with ichthyophthirius after treatment with green malachite

центрации 0,2 и 0,5 г/м³, было выявлено его высокое накопление в организме – более 2500 мкг/кг (табл. 4). При обработке рыбы в более низкой концентрации (0,02 г/м³) его содержание в орга-

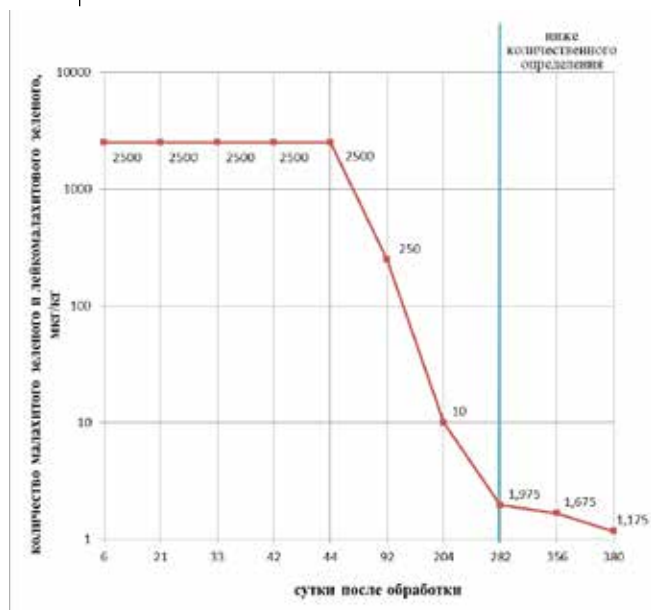


Рисунок 2. Динамика снижения суммарного остаточного количества малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого у радужной форели

Figure 2. Dynamics of juvenile trout infection with ichthyophthyrus after treatment with green malachite

низме оказалось меньше в 4 раза, но данная обработка не является рекомендованной при лечебно-профилактических мероприятиях.

При обработке рыбы в концентрации 0,2 г/м³ при температуре 7⁰С (3 суток) и 18⁰С (4 часа) было выявлено, что краситель накапливался в организме рыб на одном уровне – в пределах 2500 мкг/кг (табл. 4 и 5). При этом большую его часть – более 2400 мкг/кг (~96%) составлял лейкомалахитовый зеленый.

Сравнительный анализ содержания малахитового зеленого и его основания в мышцах и внутренних органах рыб показал, что эти вещества равно-

мерно распределялись в организме (табл. 5).

Радужная форель. У молоди в возрасте 2-х месяцев через 76 суток после обработки малахитовым зеленым, проведенной на стадии икры, суммарное остаточное количество красителя и лейкомалахитового зеленого составило 25 мкг/кг.

При содержании рыб, для дальнейшего отслеживания снижения красителя в их организме, произошло спонтанное заражение паразитическими простейшими (*Ichthyophthirius multifiliis*), в связи с чем была проведена 3-х-кратная лечебная обработка рыбы малахитовым зеленым. После обработок у молоди форели при паразитологическом анализе простейших не обнаружили, что ещё раз продемонстрировало высокую эффективность этого препарата при эктопаразитозах. Динамика снижения зараженности рыбы ихтиофтириусами представлена на рисунке 1.

Остаточное количество малахитового зеленого и лейкомалахитового зеленого определяли в рыбе в течение 380 дней с периодичностью согласно приведенной ранее схеме отбора проб.

Результаты анализа показали, что снижение содержания красителя в организме радужной форели происходит медленно: в течение первых трех месяцев его количество составляло 2500 мкг/кг, через шесть месяцев снижалось до 250 мкг/кг, через семь месяцев – до 10 мкг/кг и только через десять месяцев – до 1,975 мкг/кг, что является ниже предела количественного определения и считается отрицательным результатом (рис. 2).

В течение эксперимента при отборе проб у радужной форели проводили клинический осмотр, патологоанатомическое вскрытие и обследование внутренних органов. В целом отклонений от нормы не выявляли, но у 20% рыб в конце эксперимента отметили гипертрофию печени, но при этом, по результатам гистологического анализа печени, изменений гепатоцитов не выявлено¹.

Фиолетовый «К»

Остаточное количество фиолетового «К» определяли у карпа в период летнего выращивания в

Таблица 4. Остаточное суммарное количество малахитового зеленого и лейко-малахитового зеленого в организме бестера после обработки в холодной воде (7⁰С) / **Table 4.** The residual total amount of malachite green and leukomalachite green in the body of the bester after treatment in cold water (7⁰С)

Концентрация красителя при обработке	0,5 г/м ³	0,2 г/м ³	0,02 г/м ³
Количество красителя в рыбе, мкг/кг	~2500,00	~2500,00	594,85

Таблица 5. Остаточное количество малахитового зеленого (МЗ) и лейкомалахитового зеленого (ЛМЗ) после обработки красителем при концентрации 0,2 г/м³ в теплой воде (18⁰С) / **Table 5.** The residual amount of malachite green and leukomalachite green after dye treatment at a concentration of 0.2 g / m³ in warm water (18⁰С)

Проба	Рыба		Мышцы МЗ+ЛМЗ	Органы МЗ+ЛМЗ
	МЗ	МЗ+ЛМЗ		
Количество красителя в рыбе, мкг/кг	104,96	~2500,00	~2500,00	~2500,00

¹ Авторы выражают признательность за проведенный гистологический анализ доктору биологических наук В.А.Илясовой

Таблица 6. Данные по остаточному количеству красителя у карпа (из нагульных прудов) после обработки фиолетовым «К» в осенне-весенний период / **Table 6.** Data on the residual amount of dye in carp (from feeding ponds) after treatment with purple “K” in the autumn-spring period

Эксперимент	Возраст рыбы при отборе проб на анализ	Срок отбора проб после обработки, сут	Результат, мкг/кг
Вариант 1	Двухлетки	40	~0,825
	Трехлетки		~1,025
Вариант 2	Двухлетки	70	~0,975
		145	~0,950

рыбоводных хозяйствах (вариант 1 и 2). В варианте 1 у двухлеток и трехлеток остаточное количество красителя на 40 сутки находилось на уровне ниже предела количественного определения (2 мкг/кг), что является отрицательным результатом (табл. 6). В другом рыбоводном хозяйстве (вариант 2) у двухлеток карпа через 70 суток и 145 суток после обработки анализ показал аналогичные результаты. Таким образом, срок выведения фиолетового «К» из организма карпа в период летнего выращивания можно принять 40 дней.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Впервые в отечественных научных исследованиях получены данные по срокам выведения трифенилметановых красителей из рыбы.

Результаты иммуноферментного анализа показали, что непосредственно после обработок малахитовым зеленым в рекомендованных для аквакультуры дозировках первоначально количество его в организме превышает 2500 мкг/кг.

Остаточное количество малахитового зеленого после обработки молоди форели в возрасте 2-х месяцев снижается медленно и достигает отрицательного результата через 282 дня (10 месяцев).

Срок выведения фиолетового «К» после профилактических обработок карпа в осенне-весенний период в прудовых хозяйствах при летнем выращивании составляет 40 суток (1,5 месяца).

Полученные результаты по срокам выведения малахитового зеленого из организма рыб сопоставимы с данными из зарубежных источников, в которых указано, что краситель выводится от нескольких месяцев до 1 года [27; 28]. Подобная информация по фиолетовому «К» отсутствует.

Для подтверждения полного выведения красителей из организма рыб образцы были переданы в лабораторию испытательного центра ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» («ВГНКИ») на анализ остаточного количества красителей методом сверхэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (СВЭЖХ-МС/МС). Анализы были выполнены в соответствии с методической документацией количественного определения трифенилметановых красителей в продукции аквакультуры [4; 15]. Результаты, полученные при проведении арбитражного метода, оказались сопоставимы с нашими данными.

Кроме этого в ходе проведения исследования получены некоторые дополнительные данные. Температура воды при обработке (опыт на бестере) не оказала значимого влияния на остаточное количество малахитового зеленого в рыбе.

Различие в содержании препарата в мышцах и комплексе внутренних органов не было выявлено.

После обработки малахитовым зеленым (согласно нормативным документам по его применению) рыб большую его часть (96%) составляет его основание – лейкомалахитовый зеленый.

ВЫВОДЫ

Таким образом, соблюдение установленных сроков выведения малахитового зеленого и фиолетового «К» из организма рыбы позволяет получить рыбную продукцию без остаточного количества трифенилметановых красителей.

Высокая эффективность трифенилметановых красителей для борьбы с сапролегниозом и многими эктопаразитами объектов аквакультуры, с учетом установленных сроков их выведения из организма рыбы, позволяют рекомендовать их с лечебно-профилактической целью: для обработки икры в период инкубации и молоди на первом году выращивания (малахитовым зеленым – в первые 3 месяца, фиолетовым «К» – в течение первого года).

ЛИТЕРАТУРА И ИСТОЧНИКИ:

1. Ветеринарно-санитарные правила для лососевых рыбоводных заводов – утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 21 мая 1985 г.
1. Veterinarno-sanitarnye pravila dlya lososevykh rybovodnykh zavodov – utv. Glavnym upravleniem veterinarii Ministerstva sel'skogo hozyajstva SSSR 21 May 1985.
2. Временное наставление по применению основного фиолетового «К» для борьбы с сапролегниозом икры осетровых рыб – утв. Главным управлением ветеринарии Государственного агропромышленного комитета СССР 3 февраля 1987 г.
2. Vremennoe nastavlenie po primeneniyu osnovnogo fioletovogo «K» dlya bor'by s saprolegniozom ikry osetrovyykh ryb – utv. Glavnym upravleniem veterinarii Gosudarstvennogo agropromyshlennogo komiteta SSSR 3 February 1987.
3. Головин П.П., Головина Н.А., Романова Н.Н. Кадастр лечебных препаратов, используемых и апробированных в аквакультуре России и за рубежом. М.: ФГНУ «Росинформагротех», 2005. – 56 с.
3. Golovin P.P., Golovina N.A., Romanova N.N. Kadastr lechebnykh preparatov, ispol'zuemykh i aprobirannykh v akvakul'ture Rossii i za rubezhom. M.: FGNU «Rosinformagrotekh», 2005. – 56 p.
4. ГОСТ Р 56962-2016 «Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей с помощью сверхвысокоэффективной жидкостной хрома-

- тографии с времяпролетным масс-спектрометрическим детектором высокого разрешения». – М.: Стандартинформ, 2016. – 12 с.
4. GOST R 56962-2016 «*Ryba, nerybnye ob'ekty i produkciya iz nih. Metod opredeleniya ostatocnogo soderzhaniya trifenilmetanovyh krasitelej s pomoshch'yu sverhvysokoefektivnoj zhidkostnoj hromatografii s vremyaproletnym mass-spektrometricheskim detektorom vysokogo razresheniya*». – М.: Стандартинформ, 2016. – 12 p.
5. ГОСТ 57025-2016 «*Рыба, нерыбные объекты и продукция из них. Иммуноферментный метод определения остаточного содержания трифенилметановых красителей*». – М.: Стандартинформ, 2016. – 19 с.
5. GOST 57025-2016 «*Ryba, nerybnye ob'ekty i produkciya iz nih. Immunofermentnyj metod opredeleniya ostatocnogo soderzhaniya trifenilmetanovyh krasitelej*». – М.: Стандартинформ, 2016. – 19 p.
6. Государственный реестр лекарственных средств для ветеринарного применения [Электронный ресурс]. – URL: https://irena.vetr.ru/irena/operatorui?_action=clearRegListMedicine (дата обращения 29.08.2019).
6. Gosudarstvennyj reestr lekarstvennyh sredstv dlya veterinarnogo primeneniya [Web resource]. – URL: https://irena.vetr.ru/irena/operatorui?_action=clearRegListMedicine.
7. Наставление по применению малахитового зеленого при ихтиофтириозе карпов – утв. утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 14 марта 1969 г.
7. Nastavlenie po primeneniyu malahitovogo zelenogo pri ihtioftirioze karpov – utv. utv. Glavnym upravleniem veterinarii Ministerstva sel'skogo hoz'yajstva SSSR 14 March 1969.
8. Наставление по применению основного ярко-зеленого (бриллиантового зеленого) для лечебно-профилактической обработки рыбы в тепловодных бассейновых рыбных хозяйствах - утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 18 октября 1983 г.
8. Nastavlenie po primeneniyu osnovnogo yarko-zelenogo (brilliantovogo zelenogo) dlya lechebno-profilakticheskoj obrabotki ryby v teplovodnyh bassejnovykh rybnykh hoz'yajstvah - utv. Glavnym upravleniem veterinarii Ministerstva sel'skogo hoz'yajstva SSSR 18 October 1983.
9. Наставление по борьбе с сапролегниозом икры карпа при заводском способе получения потомства – утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 5 марта 1979 г.
9. Nastavlenie po bor'be s saprolegniozom ikry karpa pri zavodskom sposobе polucheniya potomstva – utv. Glavnym upravleniem veterinarii Ministerstva sel'skogo hoz'yajstva SSSR 5 March 1979.
10. Наставление по применению технических и органических красителей (основного ярко-зеленого и фиолетового «К») для профилактической обработки рыб в зимовальных прудах - утв. Главным управлением ветеринарии Министерства сельского хозяйства СССР 19 апреля 1971 г.
10. Nastavlenie po primeneniyu tekhnicheskikh i organicheskikh krasitelej (osnovnogo yarko-zelenogo i fioletoovogo «K») dlya profilakticheskoj obrabotki ryb v zimoval'nykh prudah - utv. Glavnym upravleniem veterinarii Ministerstva sel'skogo hoz'yajstva SSSR 19 April 1971.
11. Технический регламент Евразийского экономического союза "О безопасности рыбы и рыбной продукции" № ТР ЕАЭС 040/2016. Принят Решением Совета Евразийской экономической комиссии № 162 от 18 октября 2016 года.
11. Tekhnicheskij reglament Evrazijskogo ekonomicheskogo soyuza "O bezopasnosti ryby i rybnoj produkcii" № TR EAES 040/2016. Prinyat Resheniem Soveta Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii № 162 from 18 October 2016.
12. Технический регламент Таможенного союза "О безопасности пищевой продукции" № ТР ТС 021/2011. Утвержден Решением Комиссии Таможенного союза № 880 от 9 декабря 2011 года.
12. Tekhnicheskij reglament Tamozhennogo soyuza "O bezopasnosti pishchevoj produkcii" № TR TS 021/2011. Utverzhdzen Resheniem Komissii Tamozhennogo soyuza № 880 from 9 December 2011.
13. Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 13.02.2018 N 28 "О максимально допустимых уровнях остатков ветеринарных лекарственных средств (фармакологически активных веществ), которые могут содержаться в переработанной пищевой продукции животного происхождения, в том числе в сырье, и методиках их определения".
13. Reshenie Kollegii Evrazijskoj ekonomicheskoy komissii ot 13.02.2018 N 28 "O maksimal'no dopustimyh urovnyah ostatkov veterinarnykh lekarstvennyh sredstv (farmakologicheski aktivnyh veshchestv), kotorye mogut sodержat'sya v nepererabotannoj pishchevoj produkcii zhivotnogo proiskhozhdeniya, v tom chisle v syr'e, i metodikah ih opredeleniya".
14. Сборник инструкций по борьбе с болезнями рыб / М.: Отдел маркетинга АМБ-агро, 1998. - Ч. 1. – 310 с.
14. Sbornik instrukcij po bor'be s boleznyami ryb / M.: Otdel marketinga AMB-agro, 1998. - Part 1. – 310 p.
15. Сорокин А.В., Нестеренко И.С., Комаров А.А. Методика количественного определения трифенилметановых красителей в продукции аквакультуры // Ветеринария, 2019. – №3. – С. 57-64.
15. Sorokin A.V., Nesterenko I.S., Komarov A.A. Metodika kolichestvennogo opredeleniya trifenilmetanovyh krasitelej v produkcii akvakul'tury // Veterinariya, 2019. – №3. – pp. 57-64.
16. Alderman D.J. Malachite green: a review // Journal of Fish Diseases, 1985. – № 8. – P. 289-298.
17. Analysis of mutations and bone marrow micronuclei in Big Blue rats fed leucomalachite green/ M.G. Manjanatha, S.D. Shelton, M. Bishop, J.G. Shaddock, V.N. Dobrovolsky, R.H. Heflich, P.J. Webb, L.R. Blankenship, F.A. Beland, K.J. Greenlees, S.J. Culp // Mutation Research, 2004. – № 547. – P. 5-18.
18. Carcinogenicity of malachite green chloride and leucomalachite green in B6C3F1 mice and F344 rats / S.J. Culp, P.W. Mellick, R.W. Trotter, K.J. Greenlees, R.L. Kodell, F.A. Beland // Food and Chemical Toxicology, 2006. – № 44. – P. 1204-1212.
19. Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress of malachite green on the kidney and gill cell lines of freshwater air breathing fish *Channa striata*/S.A. Majeed, K.S. Nambi, G. Taju, S. Vimal, C. Venkatesan, A.S. Hameed // Environ. Sci. Pollut. Res., 2014. – № 21. – P. 13539-13550.
20. Development and validation of a fast monoclonal based disequilibrium enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of triphenylmethane dyes and their metabolites in fish / M. Opatowska, L. Connolly, P. Stevenson, S. Stead, C. T. Elliott // Analytica Chimica Acta, 2011. – № 698. – P. 51-60.
21. Foster F.J., Woodbury L. The Use of Malachite Green as a Fish Fungicide and Antiseptic // The Progressive Fish-Culturist, 1936. – №18. – P. 7-9.
22. Genotoxicity of malachite green and leucomalachite green in female Big Blue B6C3F1 mice/R.A. Mittelstaedt, N. Mei, P.J. Webb, J.G. Shaddock, J.G. Dobrovolsky, L.J. McGarrity, S.M. Morris, T. Chen, F.A. Beland, K.J. Greenlees, R.H. Heflich // Mutation Research, 2004. – № 561. – P. 127-138.
23. Host-tailored sensors for leucomalachite green potentiometric measurements/ F. T. C. Moreira, R. B. Queiroz, L. A. A. Truta, T. I. Silva, R. M. Castro, L. R. Amorim, M. G. Sales // Journal of Chemistry, 2013. – 13 pp.
24. In vitro interactions of malachite green and leucomalachite green with hepatic drug-metabolizing enzyme systems in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)/ C. Nebbia, F. Girolami, M. Carletti, L. Gasco, I. Zoccarato, A. Giuliano Albo // Toxicology Letters, 2017.
25. Mever F.P., Jorgenson T.A. Teratological and Other Effects of Malachite Green on Development of Rainbow Trout and Rabbits // Transactions of the American fisheries society, 1989. – V. 112. – P. 818-824.
26. Minta M., Wilk-Zasadna I. Effects of malachite green and its major metabolite, leucomalachite green, in micromass cultures of rat embryonic cells // Bull. Vet. Isnt. Pulawy., 2007. – №51. – P. 695-700.
27. Mitrowska K., Posyniak A. Determination of malachite green and its metabolite, leucomalachite green, in fish muscle by liquid chromatography // Bull Vet Inst Pulawy, 2004. – №48. – P. 173-176.
28. Persistence of malachite green in tissues of rainbow trout after a long-term therapeutic bath / J. Machova, Z. Svobodova, J. Svobodnik, V. Piacka, B. Vykusova, A. Kocova // Acta Veterinaria Brno, 1996. – № 65. – P. 151–59.
29. Pottinger T.G., Day J.G. A Saprolegnia parasitica challenge system for rainbow trout: Assessment of Pyceze as an anti-fungal agent for both fish and ova // Diseases of Aquatic Organisms, 1999. – №36 (2). – P. 129-141.
30. Radko I., Minta M., Stypula-Trebas S. Cellular toxicity of malachite green and leucomalachite green evaluated on two rat cell lines by MTT, NRU, LDH and protein assays // Bull Vet Inst Pulawy, 2011. – № 55. – P. 347-353.
31. Synthesis and characterization of N-demethylated metabolites of malachite green and leucomalachite green/ B.P. Cho, T. Yang, L. R. Blankenship, J. D. Moody, M. Churchwell, F. A. Beland, S. J. Culp // Chem. Res. Toxicol., 2003. – № 16. – P. 285-294.
32. The persistence of malachite green in the edible tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) / L. Alborali, E. Sangiorgi, M. Leali, P.F. Guadagnini, S. Sicura // Rivista Italiana di Acquacoltura, 1997. – № 32 (2). – P. 45-60.
33. Toxicity evaluation with *Vibrio fischeri* test of organic chemicals used in aquaculture/ M.D. Hernando, S. De Vettori, M.J. Martirnez Bueno, A.R. Fernandez-Alba // Chemosphere, 2007. – № 68. – P. 724-730.
34. Uptake and elimination of malachite green in rainbow trout (in German) / K. Bauer, H. Dangschat, H.O. Knoppler, J. Neudegger // Archiv fur Lebensmittel-hygiene, 1988. – № 39. – P. 97-102.