

DETERMINAREA UNOR COMPUȘI TOXICI PRIN METODE ENZIMATICE

A. Ciucu*, Carmela Negulescu**

REZUMAT

Determinarea pesticidelor necesită metode rapide și precise de analiză dată fiind importanța acestor compuși pentru mediu și sănătatea umană. În acest sens, funcție de metoda selectată pentru determinarea activității enzimatică au fost realizate diferite procedee spectrometrice, fluorimetrice, piezoelectrice, potențiometrice și voltametrice, în ultimul timp atenția fiind îndreptată spre realizarea biosensibilor amperometrici.

Cuvinte cheie: Pesticide, poluanți, metode enzimatică

ABSTRACT

Enzymatic methods for detection of some selected toxic compounds

Sensitive, rapid and reliable detection and determination of pesticides are important for protection of the environment and human health. According to the method selected for measurement of enzyme activity, a variety of spectrophotometric, fluorometric, piezoelectric, potentiometric and voltammetric devices were developed, but recently attention has been directed especially to amperometric biosensors.

Key Words: Pesticides, pollutants, enzymatic methods

INTRODUCERE

Determinarea în urme a poluanților din probe biologice și de mediu (apă, aer, sol) este deosebit de importantă. Una dintre clasele de poluanți este reprezentată de pesticidele organofosforice și carbamate, des folosite în agricultură. Pesticidele inhibă acțiunea acetilcolinesterazei (AChE), care hidrolizează neurotransmițătorul acetilcolina (ACh) la colină și acid acetic în scopul de a restabili starea inițială a membranei post-sinaptice. Când enzima este inhibată, impulsurile nervoase sunt întrerupte atâta timp cât ACh rămâne prezentă în regiunea sinaptică. Ca o consecință a acestui fapt se pot instala anumite boli neurologice (ex. șocul tetanic cu o eventuală paralizie musculară).

METODE FIZICO-CHIMICE DE DETERMINARE A PESTICIDELOR

Toxicitatea acută a pesticidelor necesită existența unor sisteme rapide de detecție care sunt necesare protecției sănătății umane și deci, elaborarea unor metode analitice de determinare a pesticidelor organofosforice și carbamate precum și a altor compuși cu efecte similare (ex. gazele toxice și/sau paralizante) este strict necesară.

Dintre aceste metode se pot enumera: utilizarea tehnicilor spectrometrice de detecție (spectrometria de masă sau UV-VIS), detecția amperometrică, potențiometrică, etc [1].

La ora actuală cele mai utilizate tehnici de determinare a pesticidelor sunt: cromatografia de gaze (GC), cromatografia de lichide de înaltă performanță (HPLC) și cromatografia de gaze cuplată cu spectrometria de masă (GC-MS), tehnici care permit determinarea unor cantități de ordinul nanogramelor de pesticide organofosforice și carbamate [2].

Dozarea derivaților organofosforici din probe de mediu

poate fi realizată prin metode spectrofotometrice (în vizibil sau fluorimetrice) care sunt mai puțin utilizate decât metodele electrochimice descrise mai jos. Drept cromogen se poate utiliza 4-para nitrobenzil piridina; aceasta interacționează specific cu compușii organofosforici, rezultând un compus colorat cu un maxim de absorbție la 560 nm. Dezavantajul metodei este reprezentat de faptul că proba necesită mai multe etape de extracție și concentrare. Sensibilitatea este de ordinul mg/ml pentru probele de apă reziduală și de 10 ppm pentru cele de sol.

Cea mai folosită și totodată extrem de sensibilă metodă spectrometrică pentru determinarea insecticidelor care inhibă acetilcolinesteraza este metoda Ellman bazată pe detecția tiocolinei formată în urma reacției de hidroliză a acetiltiocolinei. Drept reactiv de culoare se folosește acidul 5,5'-ditiobis 2-nitrobenzoic (DTNB) care prin reacție cu tiocolina conduce la formarea unui compus de culoare galbenă (acidul 5-mercapto 2-nitrobenzoic), ce prezintă un maxim de absorbție la 405 nm. Această metodă este uzual folosită pentru verificarea rezultatelor obținute în urma inhibiției acetilcolinesterazei cu derivați organofosforici prin metode amperometrice.

Dintre toate tehnicile cromatografice, GC și HPLC sunt cele mai utilizate în scopul determinării pesticidelor. Derivații carbamați nu pot fi analizați direct prin metodele curente aplicate pesticidelor datorită mării lor instabilități termice, motiv pentru care este necesară transformarea prealabilă în derivați stabili.

Analizele reziduurilor de pesticide prin GC necesită o extracție lichid-lichid, o separare (prin adsorbție pe gel de hidroxid de magneziu, florisil sau silicați) și o purificare. Limitele de detecție sunt de ordinul 0,01 până la 0,08 ppm. Determinarea insecticidelor organofosforice și carbamate este mai simplă prin cromatografie de lichide (CL). Această metodă se aplică pentru determinarea derivaților

* Prof. dr. A. Ciucu, Catedra de Chimie Analitică, Facultatea de Chimie, Universitatea din București;

** Carmela Negulescu, Biochemist, Wyeth Whitehall, București.

organofosforici din apă, detecția realizându-se în UV la 220 nm. Limitele de detecție sunt de ordinul 400 pg/ml.

Rezumând, se constată că tehnicile fizico-chimice ce nu implică sisteme biologice sunt dificil de aplicat în dozarea insecticidelor organofosforice și carbamate. Pe de o parte, selectivitatea scăzută a măsurătorilor necesită, în marea majoritate a cazurilor, un pretratament al probei pentru separarea compușilor, iar pe de altă parte sensibilitatea dispozitivelor de măsură nu este suficientă pentru dozarea directă a pesticidelor și a produșilor lor de degradare în limitele impuse de normele internaționale.

Tehnicile descrise anterior sunt tehnici performante, dar consumul de reactivi și costul acestora este foarte ridicat, iar etapele de pregătire a probelor sunt de lungă durată și minuțioase, timpul de analiză este în general mare, ele necesitând deasemenea un personal calificat.

Pesticidele pot fi determinate utilizând diferite metode biochimice, cum sunt cele bazate pe inhibiție enzimatică, tehnicile imunologice sau blocarea activității fotosintetice. Metodele diferă din punctul de vedere al specificității în funcție de componentul biologic utilizat: imunoagenții interacționează cu un număr mic de analiți, enzimele pot fi inhibate de clase întregi de compuși, pe când fotosinteza poate fi blocată de substanțe cu structură chimică diferită.

Datorită sensibilității, specificității și timpului de răspuns relativ scurt, tehnicile imunologice sunt de un real interes pentru aplicații analitice, nu numai pentru determinarea antigenilor care sunt substanțe cu o masă moleculară mai mare decât 2000 daltoni, ci și a unor molecule mici, haptenele, ce nu prezintă răspuns imunologic ca atare. În ultimii ani, metodele imunologice au fost adaptate cu succes la analizele în urme, de exemplu în determinarea pesticidelor și a metaboliților acestora din probe reale; în prezent sunt disponibile comercial "kituri-test" pentru imunodeterminarea unor astfel de compuși [3].

Aceste metode sunt indirecte, detecția interacțiilor moleculare necesitând utilizarea unui marker, cum ar fi o enzimă, un fluorofor sau un izotop radioactiv. Utilizând astfel de metode este posibilă determinarea a 0,02 până la 2 ppb pesticide din apă; în funcție și de anticorpusul utilizat.

Dezavantajele imunodeterminărilor sunt: un timp lung de stabilire al echilibrului și formarea unei legături covalente ireversibile între antigen și anticorp, ceea ce face imposibilă reutilizarea sau determinările în sisteme continue.

În ultimii ani, se observă o creștere a utilizării metodelor immuno-analitice pentru determinarea pesticidelor; o metodă promițătoare pentru detecția contaminanților din mediu este reprezentată de cromatografia de immunoafinitate sau folosirea immunosenzorilor. Metodele cromatografice nu pot fi folosite în analiza continuă "in situ" deoarece aparatura necesară este greoaie.

Pe de altă parte, pesticidele pot fi determinate prin metode selective enzimatică bazate pe capacitatea de inhibiție a activității catalitice a unor enzime cum ar fi: lipaza, fosfataza acidă și alcalină, acilaza sau cel mai adesea colinesterazele (acetil- și butirilcolinesteraza). Ultimile două enzime sunt mai puțin selective față de pesticide, dar sunt inhibate mai puternic. În general selectivitatea inhibiției acetilcolinesterazelor de către pesticide este mică, astfel încât se recomandă folosirea unor tehnici cromatografice pentru separarea pesticidelor înainte de a fi determinate enzimatic.

Relativ la insuficiența selectivitate față de pesticidele individuale a colinesterazelor, în scopul realizării unor metode

rapide de detecție, se recomandă determinarea așa numitului "echivalent paraoxonic" sau a "gradului de inhibiție enzimatică" care poate fi folosit ca indice al cantității de pesticide anticolinesterazice prezente în probele reale. Metodele enzimatică bazate pe inhibiția activității enzimatică a colinesterazelor fac obiectul unor cercetări intense datorită sensibilității și simplității metodelor, a prețului de cost scăzut al echipamentului, ceea ce fac aceste metode foarte atractive pentru laborator [4].

METODE ENZIMATICE

Testele bazate pe inhibiție enzimatică sunt de un real și mare interes în analiza poluării mediului, deoarece toxicitatea acestor poluanți cum ar fi pesticidele conduce la inhibiția enzimelor "in vivo", iar testele biologice implicând inhibiția enzimatică folosite pentru determinarea toxinelor sunt mult mai de "încredere" comparativ cu metodele fizico-chimice. Aceste metode pot fi cuplate cu diferite alte tehnici analitice prin folosirea a diferite substraturi cum ar fi acetil- și butirilcolina sau acetil- și butiril- tiocolina, sau acetatul de indoxil. Reacția de inhibiție poate avea loc în soluție, metodă care are aplicații limitate dat fiind faptul că enzima nu poate fi refolosită [5].

În general enzimele sunt imobilizate în reactoare sau pe suprafața senzorilor. Bazat pe aceasta, pe lângă tehnicile menționate mai sus s-au dezvoltat în ultima vreme și alte metode mai rapide și mai puțin costisitoare de determinare a pesticidelor organofosforice și carbamate bazate pe utilizarea biosenzorilor, a metodelor electrochimice de analiză, a analizei în flux; metode care tind să atingă performanțele celor mai sus menționate, fiind în același timp mai economice și mai rapide.

Colinesterazele pot fi inhibate mai mult sau mai puțin specific, funcție de sursa enzimei. Măsurarea semnalului analitic se poate realiza fie după un timp definit obținut după o anumită perioadă de incubare a enzimei cu inhibitorul (pesticidul), semnal care este proporțional cu concentrația de substrat sau produs format și este funcție de tipul de pesticid determinat și de concentrația acestuia, fie prin metoda vitezei de modificare a concentrației de substrat sau produs format în perioada inițială a reacției enzimatică. Compararea acestor valori cu cele obținute în condiții similare dar în absența inhibitorului conduce la obținerea așa numitului "grad de inhibiție" care este proporțional cu concentrația de inhibitor. Cel mai des determinările se efectuează în condiții statice, însă în ultimii ani metodele de analiză în flux sunt din ce în ce mai utilizate.

Inhibiția colinesterazelor poate fi reversibilă (în cazul pesticidelor carbamate) sau ireversibilă (în cazul celor organofosforice). Regenerarea activității enzimei se face prin adăugare de soluție de substrat sau tampon (cazul inhibiției reversibile) ceea ce indică un mecanism competitiv. Aceasta poate fi reactivată utilizând o serie de agenți nucleofili, ca de exemplu 2-PAM-ul, TMB-4, obidoxima. Reactivarea dificilă a enzimei se datorează unui proces implicând detașarea unei grupări alchil din derivatul organofosforic legat covalent, cu generarea concomitentă a unei sarcini negative la unul din atomii de oxigen al grupării fosfat ce previne reactivarea cu agenți nucleofili.

Avantajul utilizării metodelor enzimatică în controlul poluării mediului este legat de faptul că aceste metode nu implică o tratare prealabilă a probelor, fiind teste "in situ"

cea ce reflectă compoziția reală, existentă la un moment dat în mediu. Rezultatele obținute pe această cale nu se referă la un component individual, ci la totalitatea compușilor ce au o acțiune nocivă asupra organismelor vii, putând fi puse astfel în evidență efectele de sinergism sau antagonism. Inhibarea enzimelor "in vitro" este foarte apropiată de cea "in vivo", în general, sensibilitatea dozărilor enzimatică ale substanțelor nocive fiind direct proporțională cu toxicitatea acestora. Pe această cale se poate estima efectul toxic al unei probe de compoziție necunoscută într-un timp suficient de scurt pentru a se lua măsurile necesare de preîntâmpinare a efectelor nedorite.

Guilbault [6] evidențiază mai multe sisteme de reacție utilizabile în detecția pesticidelor, diferențiate după natura enzimei respective: colinesteraze, lipaza, fosfataza alcalină, anhidraza carbonică, tirozinaza, aldehyd dehidrogenaza, etc. Dintre acestea cele mai utilizate sunt cele implicând acțiunea catalitică a colinesterazelor.

Sisteme bazate pe folosirea colinesterazelor

Prima metodă de detecție a compușilor organofosforici s-a bazat pe inhibarea reacției enzimatică dintre acetilcolină și acetilcolinesteraza, determinarea substratului remanent

efectuându-se prin reacția cu hidroxilamina. Ca substrat în dozările enzimatică cu colinesteraze se utilizează acetilcolina, acetiltiocolina, propioniltiocolina, butiriltiocolina, indoxilacetatul, n-metil indoxilacetatul și rezofurinbutiratul.

Deși foarte sensibile și caracterizate printr-o acuratețe remarcabilă, procesele descrise sunt limitate la compuși de tipul sarinului, sistoxului și paraoxonului, clasa generală de compuși tiono-sau ditiiofosfați neputând să fie determinată prin inhibiția colinesterazelor "in vitro" decât la concentrații mari, fapt ce constituie un dezavantaj important, dată fiind utilizarea pe scară largă în ultimul timp a acestor tipuri de pesticide.

Pentru depășirea acestui inconvenient, s-a studiat posibilitatea de convertire a unor compuși tiono sau ditiiofosforici în derivați ce inhibă "in vitro" colinesterazele. Aceasta constă într-o oxidare, fie cu apa de brom diluată, fie cu acid azotic, amestec de H_2O_2 și acid acetic sau acid perbenzoic în cazul compușilor organofosforici mai greu oxidabili.

În tabelul 1, sunt prezentate comparativ limitele de detecție ale câtorva pesticide organofosforice utilizând o aceeași enzimă (acetilcolinesteraza din țipar electric).

Tab. 1

Limitele de detecție în cazul câtorva pesticide uzuale

Pesticid	AChE	BuChE
Carbaril	19 ppb	250 ppb
Heptenofos	1800 ppb	8.4 ppb
Malation	500 ppb	300 ppb
Paraoxon	12 ppb	1.5 ppb
Paraoxon – metil	25 ppb	250 ppb
Triclorfon	24 ppb	240 ppb

Alte sisteme enzimatică utilizate în determinarea pesticidelor

Întrucât reacțiile enzimatică bazate pe utilizarea colinesterazelor nu permit în general detecția pesticidelor organoclorurate, o serie de autori au utilizat sistemele implicând participarea lipazei. Astfel, în acest mod, lindanul, DDT-ul, heptaclorul, aldrinul și altele au fost determinate în concentrații de ordinul mg/ml. Ca substrat în reacțiile enzimatică având la bază lipaza, se folosesc derivații umbeliferonici sau cei ai fluoresceinei. Alături de sensibilitățile remarcabile obținute în detecția pesticidelor organoclorurate cu lipază, sistemele de acest tip prezintă și avantajul neapariției unui efect sesizabil al inhibitorului asupra substratului [7].

Determinarea microcantităților de DDT se bazează pe inhibarea selectivă a anhidrazei carbonice la concentrații de insecticid la care alți inhibitori sunt practic inactivi. Prin măsurarea descreșterii vitezei de producere a bioxidului de carbon în sistem se poate determina cantitativ DDT-ul, concentrații de ordinul 10^5 g/l putând fi determinate pe această cale.

Guilbault [6] a stabilit că fosfataza alcalină este inhibată de aldrin și heptaclor în concentrații cuprinse între limitele 1-100 mg/l. Drept substrat s-a folosit fosfatul de umbeliferonă, care în prezența enzimei este convertit în umbeliferonă, caracterizată printr-o fluorescență marcantă. Din măsurarea descreșterii fluorescenței, ca urmare a

acțiunii inhibitoare a parationului, se poate determina concentrația de pesticid. De precizat, că nici un alt pesticid clorurat, organofosforic sau carbatat nu inhibă fosfataza, neinterferând în determinări. Fosfatazele sunt însă afectate de prezența ionilor de Bi^{3+} și Be^{2+} la concentrații de 10 ng/l, respectiv 1 mg/l, cât și de Al^{3+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ag^+ , Hg^{2+} și Cd^{2+} la concentrații de 20 mg/l.

S-a studiat deasemenea detecția pesticidelor prin inhibiția tirozinazei, care catalizează oxidarea a diferite substrat (catecol, dopamina ș.a.) la chinonă urmată de urmărirea curentului rezultat prin oxidarea chinonei la suprafața unui electrod de cărbune sticlos modificat cu polipirol, sau a unui electrod de Au-grafit modificat cu polipirol la un potențial aplicat de -200 mV față de SCE. S-a realizat un electrod enzimatic amperometric sensibil față de atrazină, sistemul permițând detecția a 2 ppm din acest compus, sensibilitatea fiind chiar mai bună decât cea obținută prin imunodeterminări.

Biosenzorul bazat pe aldehyd-dehidrogenază (ALDH) este utilizat în detecția fungicidelor ditiocarbamate, deoarece s-a dovedit că acești compuși sunt potențiali inhibitori ai ALDH. Sărurile etilenbisditiocarbamate cum ar fi maneb, zineb și mancozeb sunt componenți majori ai fungicidelor ditiocarbamate. În ciuda toxicității lor scăzute acești compuși sunt potențiali agenți cancerigeni și mutageni. Maneb, zineb și mancozeb sunt incluse într-o listă de priorități a Comisiei Europene pentru pesticidele care sunt folosite într-o cantitate

mai mare de 50 tone pe an în lume și care pot fi regăsite în apa din sol. Metoda clasică de determinare a acestor compuși este bazată pe o hidroliză preliminară a compusului în urma căreia rezultă disulfura de carbon. Acest compus poate apoi fi detectat folosind metode spectrometrice sau cromatografice [8].

Pentru detecția funcigidelor ditiocarbamate s-a realizat un biosenzor bazat pe asocierea aldehyd dehidrogenazei și

diaforazei. Diaforaza reoxidează NADH-ul la NAD⁺ cu reducerea concomitentă a fericianurei la ferocianură. Ferocianura produsă este apoi oxidată la un potențial scăzut (250 mV vs SCE) la suprafața unui electrod de platină. Când în mediu este prezent un inhibitor al aldehyd dehidrogenazei, activitatea ALDH descrește, conducând la o scădere a răspunsului senzorialului.

Metoda de măsurare a ditiocarbamaților este redată în figura 1.

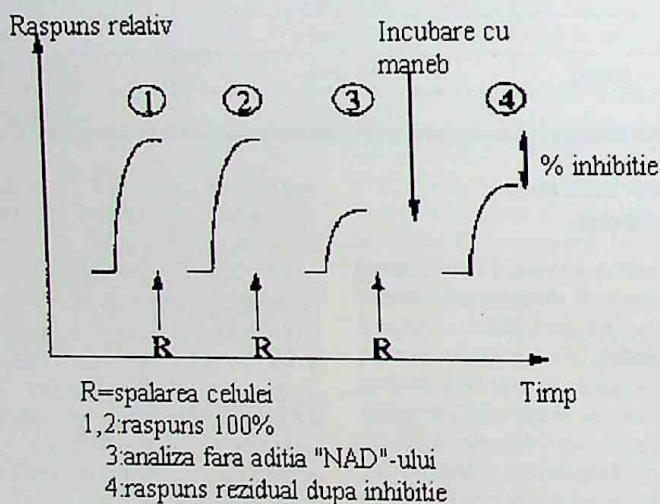
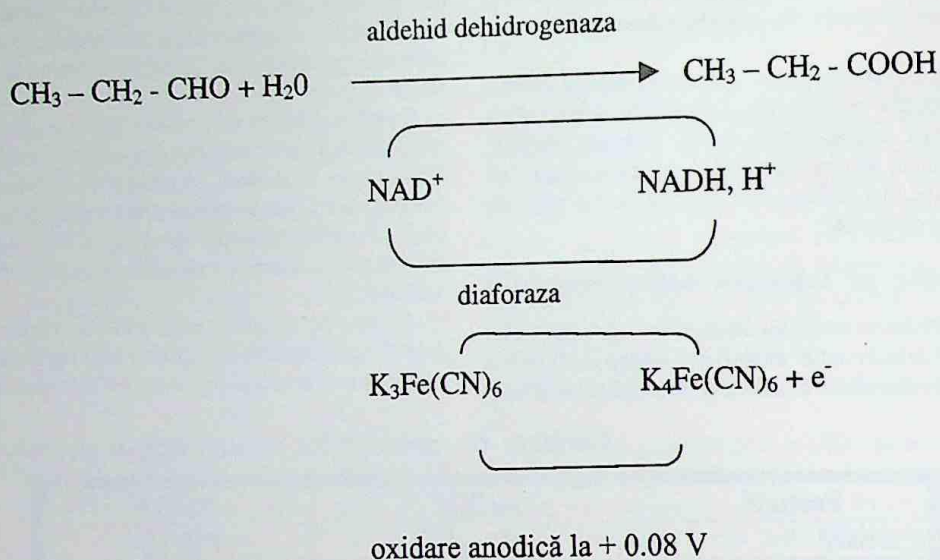


Fig. 1. Metoda de măsurare a ditiocarbamaților

După stabilizarea curentului de bază, reacția este inițiată prin adăugare de NAD⁺ și aldehydă propionică. În scopul eliminării influenței NAD⁺ existent în stratul sensibil se realizează o determinare ulterioară, efectuată în absența NAD⁺. Incubarea cu inhibitor se efectuează pe o perioadă definită de timp, reacția fiind inițiată prin adăugarea de NAD⁺ și aldehydă propionică. Procentul de inhibiție este determinat prin compararea răspunsului senzorialului înainte și după inhibiție.

Sensibilitatea senzorialului a fost optimizată prin descreșterea cantității de enzimă imobilizată și prin creșterea

timpului de incubație cu pesticid. În figura 2 se poate observa că pe măsură ce cantitatea de enzimă este redusă, viteza inhibiției crește. De exemplu, pentru o concentrație de 13 ppb maneb se obține 20% inhibiție, pentru un senzor care conține 80 mUI de enzimă și 65% pentru un senzor conținând 16 mUI.

Pe de altă parte, mărind timpul de contact între pesticid și senzor se poate mări sensibilitatea. De exemplu, folosind 16 mUI de enzimă, la o concentrație de 7 ppb maneb se obține 20% inhibiție, pentru un timp de incubare de 2 minute și 55 % pentru un timp de incubare de 10 minute [9].

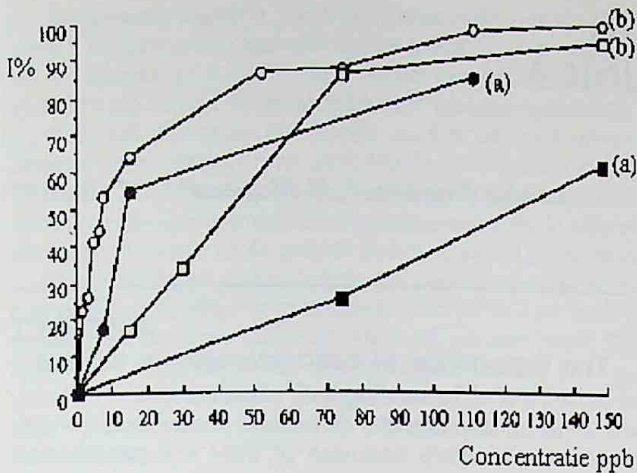


Fig. 2 - Influența concentrației de enzimă și a timpului de incubare asupra sensibilității biosezorului față de maneb; (a) timpul de incubare 2 min. 0,016 UI, 0,080 UI timpul de incubare 10 minute 0,016 UI, 0,080 UI

Concentrația cea mai mică de maneb detectată cu ajutorul senzorului a fost de 1,5 ppb. Prin comparație, metoda gaz-cromatografică permite detectarea a 20 ppb, iar cromatografia de lichide de înaltă performanță a 200 ppb, în timp ce metodele standard spectrometrice permit detectarea numai a 400 ppb.

Metoda bazată pe biosenzori este mult mai sensibilă și simplă comparativ cu alte metode. Unul dintre dezavantajele metodei constă în faptul că inhibiția aldehyd dehidrogenazei este ireversibilă. Acest neajuns poate fi înlăturat prin folosirea electrozilor pe bază de pastă de carbune, care sunt de unică folosință și au un preț de cost scăzut.

Un alt inconvenient al metodei este legat de solubilitatea scăzută a acestor compuși în apă și în solvenți organici, ceea ce face dificilă atât extracția cât și detecția acestora. S-a sugerat mărirea solubilității fungicidelor etilenbis-ditiocarbamate prin transformarea pesticidelor într-o formă disodică foarte solubilă. Aceasta se poate realiza prin pretratarea lor cu o sare disodică a acidului etilendiaminotetraacetic în condiții slab bazice (figura 3).

În afara obținerii unei solubilități mari, această formă disodică corespunde compusului nabam, care este un alt fungicid etilenbis-ditiocarbamat cunoscut ca inhibitor al aldehyd dehidrogenazei. Deoarece nabamul este un pesticid disponibil comercial, este posibilă folosirea acestui compus ca pesticid de referință.

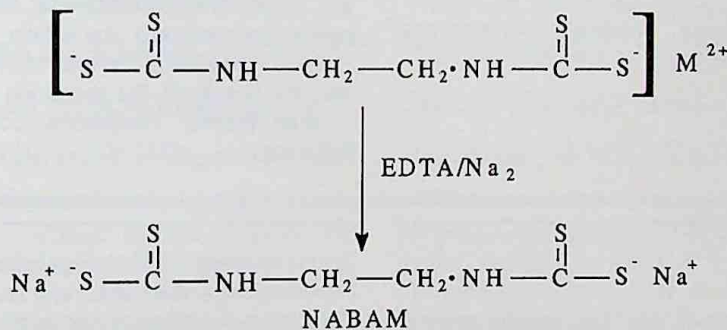


Fig. 3. Transformarea etilenbis-ditiocarbamaților în sărurile sodice (nabam) prin intermediul EDTA

Metodele clasice de analiză (de exemplu HPLC), utilizate pentru detecția reziduurilor din sol ale acestor substanțe prezintă două dezavantaje: măsurătorile sunt posibile doar dacă structura erbicidelor sau a produșilor de degradare sunt cunoscute și dacă reziduurile sunt în concentrații reduse este necesară o pre-concentrare a probei, care însă determină și o concentrare a contaminanților. Din aceste motive a fost necesară dezvoltarea unei metode complementare HPLC, bazată pe inhibiție enzimatică. Ținta acestor erbicide în organismele vii este o enzimă acetolactat sintaza (ALS) implicată în biosinteza aminoacizilor valina, leucina și izoleucina. Deși ALS din surse bacteriene este mai stabilă, este utilizată enzima extrasă din plante datorită înaltei sale sensibilități la inhibiția cu erbicide [10]. Această enzimă a fost inclusă drept element bioactiv în senzori sensibili față de astfel de compuși.

pesticides with a choline and acetylcholine electrochemical biosensor Anal. Lett., **24(8)** (1991) 1317-1331.

3. Ciucu A.: "Aplicațiile analitice ale biosenzorilor în controlul poluării mediului", Ed. Ars Docendi, 2001.

4. Ciucu A.: "Biosensors for Environmental Monitoring", Ed. Niculescu, 2000.

5. Guilbault G.G.: "Enzymatic Methods of Analysis", Marcel Dekker Inc, 1970.

6. Guilbault G.G.: "Analytical Uses of Immobilized Enzymes", Marcel Dekker Inc, 1980.

7. Marty J.L.; Noguer T.; Gradinaru A.; Ciucu A.: "A New Disposable Biosensor for the Accurate and Sensitive Detection of Ethylenbis(dithiocarbamate) Fungicide", Anal. Lett., **32**, 1723-1738 (1999).

8. Schomburg D.; Saltzmann M.: "Enzyme handbook-hydrolases", Springer-Verlag, Berlin, (1991).

9. Their H.P.; Zeumer H.: eds., "Manual of pesticide residue analysis", DFG Pesticides Commission, VCH Weinheim, (1978).

10. Wilson I.B.: "Acetylcholinesterase", în "The enzymes", P.D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, eds., Academic Press, London, (1960).

BIBLIOGRAFIE

1. Banki L.: "Bioassay of pesticides in the laboratory", Akademiai Kiado, Budapest, 1978.

2. Bernabei M.; Cremisini C.; Mascini M.; Paleschi G.: "Determination of organophosphorus and carbamic