

## METODI BIOLOGICI PER LA RILEVAZIONE DI RESIDUI DI ANTIPARASSITARI

Nell'ambito dello studio e della messa a punto delle analisi per i residui di antiparassitari presenti nelle sostanze alimentari, soprattutto di origine vegetale, oltre ai numerosi metodi chimici, stanno destando sempre maggiore interesse i metodi biologici; quei metodi, cioè, che si basano sulla sensibilità verso dosi anche molto ridotte di antiparassitari, di organismi viventi o di enzimi dell'uomo o di animali superiori.

Senza entrare nel merito della convenienza di impiego dell'uno o dell'altro gruppo di metodi diremo solo che quelli biologici sono generalmente caratterizzati da relativa facilità di impiego, perché non richiedono l'uso di apparecchiature particolarmente complesse, dalla possibilità di mettere in evidenza la presenza oltre che dei principi attivi degli antiparassitari anche dei derivati o metaboliti di questi ultimi, dalla relativamente semplice utilizzazione anche per un ampio programma di saggi e dalla notevole economia nella realizzazione di questi ultimi.

L'analisi biologica può, però, essere influenzata da numerosi fattori che possono modificare la sensibilità degli organismi «tests». Tali fattori possono riguardare sia le caratteristiche intrinseche dei tests stessi, correlate soprattutto al loro allevamento o conservazione, sia le condizioni e le tecniche adottate per la realizzazione del saggio. Ciò obbliga ad osservare una perfetta, standardizzazione del metodo di analisi affinché i risultati siano attendibili e di buona ripetibilità.

La gamma degli organismi tests fino ad

oggi utilizzati per la ricerca degli antiparassitari sulle derrate vegetali comprende microrganismi fungini, protozoi, batteri, alghe, microcrostacei, pesci ed insetti. Vengono, inoltre, utilizzate tecniche basate su reazioni enzimatiche con le quali sono riprodotti i più semplici meccanismi biochimici su cui possono interferire i fitofarmaci.

Presso l'Istituto di Patologia Vegetale dell'Università di Bologna da qualche tempo si studiano alcuni metodi di analisi biologica e biochimica, anche in indagini di routine per accertare, appunto, l'eventuale presenza di residui di fitofarmaci nelle sostanze alimentari di origine vegetale.

Nella scelta dei tests si è cercato di creare un sistema di organismi a sensibilità differenziata, sufficientemente ampio per consentire la identificazioni del gruppo di appartenenza dei principali fitofarmaci e sufficientemente sensibile per poter rilevare quantità anche molto ridotte di residui, inferiori o, quanto meno, uguali ai valori dei «limiti di tolleranza» indicati dalle principali organizzazioni sanitarie mondiali.

I tests già adottati ed ampiamente sperimentati sono:

a) per il rilievo di residui di insetticidi e di acaricidi, fra gli insetti, *Drosophila melanogaster* Meig, *Tribolium confusum* Duv., e *Calandra oryzae* L., fra i microcrostacei *Daphnia magna* Strauss, *Daphnia pulex* De Geer e *Artemia salina* Leach, oltre ad alcune tecniche in cui la rivelazione del prodotto avviene a seguito di reazioni enzimatiche

(cromatografia su carta con rivelazione colinesterasica e metodo potenziometrico).

b) per il rilievo di residui di fungicidi, fra i miceti, *Alternaria tenuis* Nees, *Alternaria solani* Ell. e Mart., *Aspergillus niger* Van Tiegh, *Botrytis cinerea* Pers., *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen, e *Torulopsis pulcherrima* (Lindn) Sacc., adottando il metodo della «diffusione in agar» e «cromatografia su carta con rivelazione fungina» e fra i protozoi *Tetrahymena pyriformis* Ehren.

#### Metodi per la rivelazione degli insetticidi

L'analisi dei residui di fitofarmaci mediante insetti tests è, senza dubbio, quella più ampiamente utilizzata nell'ambito dei metodi biologici. Una delle prime indagini in questo senso realizzata è quella di Laug (1946) che utilizzò la *Musca domestica* L. per l'analisi del DDT e del BHC ottenendo dei soddisfacenti risultati. In seguito per questo tipo di indagine furono utilizzati altri insetti quali *Macrocentrus ancylivorus* Rohw. (Fleming et al. 1951, Pielow et al. 1951) la *Popillia japonica* Newm. (Fleming et al. 1951), la *Blattella germanica* L., il *Pogonomyrmex barbatus* F. Smith, *L'Oncopeltus fasciatus* Dall. (Sun e Pankaskie, 1954) l'*Ephestia kühnieta* Zeit. (Negherbon, 1959), il *Limonius canus* Lec. (Lange e Carlson, 1956) la *Calandra granaria* L. (Riemschneider, 1950, Skerret et al., 1950), il *Tribolium confusum* Duv. (Sun e Pankaskie, 1954), il *Tribolium castaneum* Hbst (Simmons, 1945, Wasserburger, 1952 e Ward e Burt, 1956), numerose larve di zanzara e la *Drosophila melanogaster* Meig.

Le tecniche che possono essere utilizzate per questo tipo di analisi sono le seguenti:

a) metodo dell'«esposizione diretta» che consiste nel mettere a contatto l'organismo test con un omogenato secco della matrice vegetale contenente residui. Questo metodo fu inizialmente utilizzato con la *Drosophila melanogaster* (Pankaskie 1950, Gyrisco et al. 1955, Olson 1954, Fisher e Smallman 1954, Dewey 1952-1955, Sun e Pankaskie, 1954) e con la *Musca domestica* L. per l'analisi dei residui nel latte (Prescott et al., 1956). I vantaggi che questa tecnica presenta sono la notevole semplicità ed econo-

mia e, soprattutto, il fatto di evitare processi di estrazione più o meno complessi e imprecisi. Tuttavia essa presenta il notevole inconveniente di una sensibilità del test quasi sempre inferiore a quella dei metodi per i quali viene messa in atto un'estrazione ed il pericolo di un'eventuale tossicità o interferenza da parte delle sostanze vegetali.

b) Metodo del contatto dell'organismo test col residuo secco previa estrazione dell'antiparassitario dalla matrice vegetale. Questo metodo fu utilizzato con la *Musca domestica* L. da Laug (1946) ed in seguito numerosi altri autori misero a punto diverse metodiche sia per il saggio con *Musca domestica* L. (Richardson 1961, Sun e Sun 1952) che per quello con *Drosophila melanogaster* Meig (De Petri-Tonelli 1956, Bombosch 1956, Weinmann 1958, Sun e Pankaskie, 1954). Questa tecnica può essere considerata più soddisfacente sia per quanto concerne la sensibilità del test sia perché elimina ogni pericolo di interferenze da parte della matrice vegetale. Essa presenta però la difficoltà di rendere difficile il recupero completo del prodotto durante la fase di estrazione.

c) Metodo dell'«alimentazione orale» del test che consiste nel fare evaporare su un substrato zuccherino un estratto in etere, quindi nel dissolvere il substrato stesso in acqua somministrandolo ai tests per 24 ore (Frawley et al. 1952). Questo metodo non sembra, però, offrire risultati soddisfacenti e per tale motivo viene usato raramente e solo per la *Musca domestica* L.

d) Metodo delle «soluzioni acquose» che viene usato nell'analisi con larve di zanzara e che consiste nell'immergere il test nella soluzione indicata contenente estratti od omogenati di matrice con prodotto antiparassitario.

Fra questi metodi di analisi si possono citare quello di Starnes (1950) e quello di Bushland (1951) nei quali larve di *Aedes aegypti* L. venivano messe a contatto con soluzioni contenenti foglie macerate od omogeneizzati di materiale vegetale; la validità di questi metodi relativamente semplici veniva però infirmata dall'azione interferente dei materiali vegetali.

I saggi più utilizzati sono stati, perciò, quelli basati sulla messa a contatto dei tests

con soluzioni acquose di estratti (Burchfield et al. 1952-1954, Hartzell, 1950, Newman 1954). A tale scopo furono utilizzati *Aedes aegypti* L., *Culex quinquefasciatus* Say, *Aedes vexans* Meig, *Aedes sticticus* Meig. Con questa tecnica si sono potute rilevare quantità anche molto piccole di fitofarmaco. Tuttavia essa presenta il pericolo di eventuali azioni interferenti esercitate dal solvente.

\* \* \*

La *Drosophila melanogaster* Meig è fra gli insetti, quello che presenta i maggiori vantaggi nelle analisi dei residui sia perché è facilmente allevabile, sia per la sua elevata sensibilità a numerosi prodotti sia, infine, perché presenta raramente dei casi di resistenza agli antiparassitari. Come si è detto con questo organismo si possono usare due diverse tecniche: quella della messa a contatto degli omogenati o «metodo diretto» e quella della messa a contatto «su residuo secco». Fra gli autori che hanno adottato quest'ultima tecnica ricordiamo Siggers (1961) che, sull'estratto evaporato depone gli insetti coprendoli con un piccolo cilindro le cui pareti sono state asperse con talco al fine di costringerli a rimanere a contatto col residuo; Wheatley (1961) che appende nella parte superiore di un tubo di vetro un batuffolo di cotone grezzo, in cui è presente il residuo evaporato, che viene quindi impregnato di sciroppo in modo tale che le drosofile assumono il fitofarmaco per ingestione; Sun e Pankaskie (1954) e Glosser et al. (1955) che aggiungono all'estratto una certa aliquota di sostanze oleose per ottenere una perfetta distribuzione del prodotto e diminuirne la volatilità e De Pietri-Tonelli (1956) al cui metodo si è uniformata la tecnica da noi adottata e di seguito descritta.

\* \* \*

Vengono introdotti 0,5 cc dell'estratto disciolto in apposito solvente (generalmente cloroformio o benzene) entro una scatola Petri avendo cura di ottenere una distribuzione uniforme. Dopo l'evaporazione del solvente un certo numero di adulti (25 nel nostro caso) di età compresa tra 1 o 2 giorni vengono introdotti in ogni scatola, previa anestesia con anidride carbonica; affinché il contatto con l'insetticida avvenga per tutti contemporaneamente, gli insetti anestetiz-

zati vengono fatti cadere su di un foglietto di carta oleata poggiata sui bordi di una metà di ciascuna scatola. Si sovrappone quindi l'altra metà e, cessato l'effetto dell'anestetico, la carta viene sfilata lentamente. Durante l'analisi gli insetti vengono nutriti interponendo tra le due metà della scatola un batuffolo di cotone imbevuto di una soluzione acquosa di miele (De Pietri-Tonelli e Barontini 1961).

Dopo 24 ore si procede al conteggio della mortalità, considerando morti tutti gli individui incapaci di volare.

Per le nostre analisi viene frequentemente utilizzato anche il *Tribolium confusum* Duv. Le prime indagini con insetti di questo genere furono svolte da Simmons (1945) e da Wasserburger (1952) che utilizzarono il *Tribolium castaneum* Hbst. che non rivelò la stessa sensibilità della drosfila agli insetticidi. Successivamente Ward e Burt (1956) misero a punto una tecnica sempre con il *Tribolium castaneum* Hbst per l'analisi dei residui di DDT sulle foglie nel corso della quale gli insetti venivano depositi in scatole di vetro con residuo secco di antiparassitari o su dischetti di foglie. Il metodo di analisi con *Tribolium confusum* Duv. fu adottato da Sun (1947) che sottopose un certo numero di insetti alle esalazioni di alcune sostanze fumiganti provenienti da una bottiglia di fumigazione, e di queste valutò la tossicità controllando il numero di individui che presentavano paralisi motoria.

Successivamente Saunders e Bay (1958) misero a punto un metodo particolarmente interessante per il controllo della mortalità nel *Tribolium confusum* Duv. Il nostro metodo di analisi consiste nel deporre 0,5 cc di una soluzione del fitofarmaco, estratto con apposito solvente, sul fondo di una microscatola Petri di cm. 5,5 di diametro. Lasciato evaporare il solvente si introducono nella scatola 25 insetti adulti di 10-20 giorni di età. Dopo 24 ore viene effettuato il rilievo secondo il metodo di Saunders e Bay (1958) che consiste nel deporre gli insetti al centro di un cerchio del diametro di cm. 18 disegnato su di un foglio di carta bianca; poiché si è osservato che tutti gli individui ancora vitali tendono ad uscire da detto cerchio entro 100 secondi, quelli che non si allontanano da tale superficie vengono con-

siderati morti o, per lo meno, fortemente intossicati. Questo metodo presenta il grande vantaggio di evitare ogni errore derivante da fenomeni di simulazione di morte che spesso si verificano in questi insetti.

Frequente è, pure, l'impiego da parte nostra di *Calandra oryzae* L. per le analisi di cui si parla. Nel 1950 alcuni ricercatori (Riemschneider 1950 e Skerret e Woodcock 1950) utilizzarono la *Calandra granaria* L. per la analisi dell'attività del DDT e dei suoi derivati. Questi sperimentatori mettevano a contatto un certo numero di adulti con dei dischi di carta da filtro imbevuti di diverse quantità di antiparassitario posti sul fondo di scatole Petri. Tuttavia non rilevarono una sensibilità molto soddisfacente del test per i prodotti esaminati. Il metodo di analisi da noi adottato per questo test è simile a quello descritto per il *Tribolium* e consiste nel deporre l'insetto a contatto con il deposito secco dell'estratto su vetro in quanto si è visto che l'uso della carta da filtro può provocare dei fenomeni di mascheramento della tossicità del prodotto in esame.

\* \* \*

Negli ultimi tempi hanno destato sempre maggior interesse i microcrostacei usati come organismi tests, per l'alta sensibilità da essi dimostrata anche a dosi sensibilmente inferiori alle 0,1 ppm sia nei confronti di insetticidi fosfororganici che di cloroderivati.

Le specie che sono state scelte per tali saggi sono numerose e tra di esse ricordiamo il *Gammarus pulex* De Geer (Callaway et al. 1952) che si è mostrato sensibile a 2,5  $\gamma$  di parathion; il *Cambarus affinis* Say, il *Cyclops strenuus* Fischer, il *Carinogammarus roeselii* Gerlais e l'*Asellus aquaticus* L. (Lüdemann e Neumann 1962) per mezzo dei quali sembrerebbe possibile mettere in evidenza anche 0,001 ppm di cloroderivati e fosfororganici. Ma soprattutto l'*Artemia salina* Leach, la *Daphnia pulex* De Geer e la *Daphnia magna* Strauss hanno dato origine alle ricerche più raffinate del settore.

La *Daphnia magna* Strauss è stato il primo microcrostaceo ad essere utilizzato nelle analisi sulla tossicità dei residui di insetticidi; infatti Anderson fin dal 1944 segnalò i suoi innegabili vantaggi e la sua relativa facilità di allevamento e notò la sua altis-

sima sensibilità sia al DDT (0,001 ppm) che al cloruro di rame, cloruro cuproammoniacale, nitrato di argento, cloruro di mercurio e di cadmio. Successivamente Wasserburger (1952) utilizzò questo test per l'analisi di DDT, BHC e Parathion rilevandone nuovamente l'alta sensibilità ed indicando la possibilità, col suo impiego, di una identificazione qualitativa di prodotti sconosciuti in base al diverso comportamento da esso assunto a seguito di intossicazioni con cloroderivati o con fosforati organici.

L'alta sensibilità di questo microcrostaceo a molti insetticidi fu in seguito confermata da altri ricercatori (Kämpfe 1951-1953; Pfaff 1955; Fhrese 1963) che misero a punto diverse tecniche di analisi con questo organismo e studiarono le condizioni che influivano sia sul suo allevamento in laboratorio, sia sull'andamento delle indagini.

In particolare Pfaff (1955) notò l'influenza esercitata dalla temperatura e dal ciclo stagionale sulla sensibilità della *Daphnia magna* e riconfermò l'osservazione di Wasserburger sui diversi sintomi derivanti dall'intossicazione con cloroderivati e con fosfororganici. Anche la *Daphnia pulex* De Geer si è dimostrata notevolmente sensibile agli insetticidi più disparati come viene indicato da Kocher (1953) che la ritiene più sensibile della *Daphnia magna* Strauss e da Wyniger (1961) anche se questo ultimo autore non la considera completamente soddisfacente essendo troppo sensibile alle variazioni ambientali.

La prima indagine con *Artemia salina* L. è ricordata in una comunicazione anonima del 1955. Successivamente Michael et al. (1956) misero a punto un metodo di analisi col quale questo test veniva utilizzato allo stato larvale; esso si dimostrò particolarmente interessante sia per la sua elevata sensibilità ai cloroderivati sia perché poteva facilmente essere allevato in laboratorio essendo le sue uova vitali anche per lungo tempo in condizioni di assoluta disidratazione. Queste indagini furono riprese e perfezionate da Tarpley (1958) che confermò l'alta sensibilità di questo crostaceo, soprattutto nei primi stadi larvali, non solo ai cloroderivati, ma anche ad alcuni fosforati organici.

\* \* \*

La *Daphnia magna* e la *D. pulex* sono

piccoli crostacei branchiopodi, dell'ordine dei cladoceri, che vivono liberi in acqua dolce e si riproducono normalmente per via partenogenetica mentre la riproduzione sessuata interviene soltanto in condizioni ambientali sfavorevoli. Ciò permette di mantenere soggetti assolutamente costanti geneticamente ed essendo la popolazione costituita prevalentemente da individui di sesso femminile, viene eliminata o, per lo meno, molto ridotta ogni eventuale disformità della sensibilità del test dovuta alla eterogeneità genetica e sessuale.

Esse vengono allevate alla temperatura di 20°-21° C in acqua piovana preferibile all'acqua di fonte, che contenendo spesso tracce di cloro si è rivelata, come già fu osservato da Pfaff (1955), poco favorevole per la vita di questi organismi. L'allevamento viene fatto in vasche di plastica o di vetro in cui è stato depositato un substrato di ghiaia, infatti si è osservato come la mancanza totale di un substrato sia svantaggiosa per la vitalità del crostaceo, ed alcune piante acquatiche per garantire una certa ossigenazione. L'alimento è costituito da soluzioni di alghe del genere *Chlorella*.

Le analisi vengono effettuate deponendo 1 cc di estratto da sottoporre ad analisi (i solventi generalmente usati sono il benzene o il cloroformio che garantiscono una distribuzione uniforme del prodotto) in cristallizzatori di 60 mm. di diametro e quindi facendo evaporare il solvente. Ciò permette di evitare le interferenze che possono derivare da un'eventuale tossicità per il test esercitata dai solventi. Successivamente vengono immersi nel cristallizzatore 25 individui di 6-7 giorni di età in 10 cc di acqua. Dopo 16 ore si procede al conteggio della mortalità utilizzando un visore luminoso.

\* \* \*

L'*Artemia salina* Leach è un crostaceo branchiopode dell'ordine degli anostraci che vive in natura nelle acque soprassalate; esso viene utilizzato nelle nostre indagini allo stadio larvale. Il grande vantaggio che questo organismo presenta è quello di non dover essere allevato in quanto le sue uova possono rimanere vitali in ambiente disidratato anche per molto tempo. Per provocarne la schiusa è necessario che le uova vengano depositate in vasche contenenti una solu-

zione salina costituita dall'1,25% di cloruro di sodio, dello 0,6% di solfato di sodio e dello 0,6% di solfato di magnesio in acqua di fonte. Tale soluzione viene portata a pH 9-9,5 mediante carbonato sodico, è necessario inoltre che sia mantenuta ad una temperatura di circa 25° C e sia sottoposta ad aereazione.

Le analisi vengono effettuate immettendo 30 larve di *Artemia salina* Leach in provette contenenti 9 cc. della soluzione salina utilizzata per la schiusa delle uova più 1 cc. dell'estratto. I risultati da noi ottenuti con questo metodo non sono però stati molto uniformi e ripetibili per cui esso non sembra soddisfare pienamente le esigenze delle nostre indagini.

\* \* \*

Nello studio dei metodi di analisi dei residui di insetticidi, a fianco delle tecniche di natura prettamente chimica e biologica, sono state messe a punto anche tecniche biochimiche basate specialmente sulla peculiarità di molti antiparassitari di inibire la azione di numerosi enzimi quali carbossilasi, ossido-reduttasi ed in particolare idrolasi del gruppo delle esterasi. Fra queste ultime lo enzima che ha dato origine ai più interessanti metodi di analisi è la cosiddetta «colinesterasi».

Questo enzima, la cui esistenza fu suggerita da Dale nel 1914, ha la proprietà di catalizzare l'idrolisi dell'acetilcolina in acido acetico e colina; tuttavia è stato osservato che esso può provocare la stessa reazione anche su altre sostanze che non siano esteri della colina, per cui Augustinsson (1957) distinse due reazioni enzimatiche che chiamò: «colinesterasi specifica» e «colinesterasi aspecifica».

Il primo di questi due enzimi è localizzato nel sistema nervoso e negli eritrociti ed è caratterizzato, da una specificità d'azione e da una stretta interdipendenza dalla concentrazione del substrato che, qualora superi un valore ottimale di  $3 \times 10^{-3}M$ , anziché aumentare l'attività dell'enzima la deprime fino ad inibirla completamente. La colinesterasi aspecifica, viceversa, presenta un'attività sempre maggiore mano mano che la concentrazione del substrato aumenta ed è localizzata nel plasma sanguigno.

Come è stato precedentemente detto, molti insetticidi hanno la capacità di bloccare l'azione della colinesterasi poiché formano con essa dei composti più o meno stabili neutralizzando i radicali mediante i quali l'enzima si lega, normalmente, all'acetilcolina.

A tal proposito, secondo le più recenti indagini, vengono suggeriti due diversi schemi di inibizione che corrisponderebbero alle modalità di azione rispettivamente dei carbammati e dei fosforati organici (Fukuto 1957). I carbammati provocherebbero una inibizione reversibile basata su una tipica azione competitiva dovuta alla somiglianza fra la loro struttura molecolare e quella dell'acetilcolina. Essi si legherebbero ad un particolare centro enzimatico mediante il loro gruppo carbamico, formando un tipico legame polare fra il radicale enzimatico, dotato di carica positiva, ed uno dei due ossigeni uniti al carbonio del gruppo carbammico stesso. La grande affinità che la colinesterasi dimostra per questi fitofarmaci, sembra sia dovuta alla presenza nella loro molecola di radicali dotati di un'elevata capacità di cedere elettroni, che verrebbero così a creare, a livello di uno dei due ossigeni del gruppo carbammico, un forte addensamento elettronico, quindi una carica negativa molto più intensa di quella del radicale carbossilico dell'acetilcolina, in grado di determinare tra fitofarmaco ed enzima un legame molto più stabile.

L'inibizione provocata dai fosforati organici è, viceversa, irreversibile e basata su un principio completamente diverso dal precedente. È stato supposto, ed in parte confermato, che fra insetticida ed enzima avvenga una reazione chimica affatto simile al processo di idrolisi che i fosfororganici subiscono in ambiente alcalino. Si ritiene, infatti, che l'enzima scinda l'insetticida in un radicale di natura diversa, a cui cederebbe un idrogeno neutralizzandolo, ed in un gruppo fosforato che si unirebbe all'enzima formando un composto altamente stabile. Si è osservato, inoltre, che la capacità di reazione del fitofarmaco è condizionata dalla labilità del legame P-O e con ciò viene spiegato il fenomeno per cui mentre i derivati dell'acido fosforico e fosfonico (Fosdrin, Fosfamidone, Dibrom, Dipterex, ecc.) sono dei potenti inibitori della colinesterasi «in vitro», i deri-

vati dall'acido tio e ditiofosforico (Parathion, Metil-parathion, Diazinone, Systox, Metasystox, Malathion, Rogor, ecc.) in cui il legame P-O è sostituito dal più stabile P-S, necessitano di una ossidazione per poter provocare il blocco della colinesterasi.

La reazione colinesterasica costituisce la base per una numerosa serie di metodi di analisi biochimici e biofisici, fra i quali si possono citare il metodo potenziometrico (Giang & Hall, 1951) basato sulla misura mediante pHmetro delle variazioni di pH conseguenti alla scissione dell'acetilcolina; il metodo manometrico (Casida 1955), in cui viene misurata l'anidride carbonica svolta con un microrespirometro di Warburg, il metodo colorimetrico (Hestrin 1949), in cui si utilizza il colorimetro per misurare l'intensità di colore di composti originati dalla reazione fra l'acido acetico liberato ed opportuni indicatori, ed il metodo che associa la tecnica della cromatografia su carta, con cui si può ottenere la separazione di miscele di composti diversi e la loro identificazione in base allo R<sub>f</sub>, con la reazione colinesterasica che permette la messa in evidenza dei prodotti in esame ed, in certi casi, la valutazione della loro entità.

Quest'ultimo tipo di analisi venne inizialmente studiato ed utilizzato per controllare l'attività di numerosi enzimi, soprattutto di origine vegetale, ed a tal proposito furono messe a punto le tecniche più svariate quali quelle di Synge (1949), Auclair (1950) e Bonetti (1954) nelle quali l'enzima veniva spruzzato direttamente sul cromatogramma su cui era stato depositato il substrato o quella di Reid (1950) in cui la reazione veniva provocata mettendo a contatto i cromatogrammi, contenenti l'enzima, con piastre di agar mescolato al substrato.

Il primo di questi metodi, utilizzato per l'analisi degli antiparassitari, fu messo a punto da Cook (1955); questo autore provocava la reazione colinesterasica deponendo il cromatogramma, una volta terminata la fase di sviluppo, sopra un foglio di carta cromatografica intriso di acqua al fine di mantenere un substrato umido, e successivamente deponendovi sopra un foglio imbevuto di plasma umano e soluzione di indicatore (blu di bromotimolo in NaOH 0,1 N) ed uno imbevuto di soluzione di acetilcolina. Il contatto fra tutti questi componenti

provocava la reazione enzimatica in seguito alla quale il campo mutava colore dal blu al giallo, tranne che nei punti ove si trovavano i prodotti, in cui si evidenziavano delle macchie di inibizione. Sostanzialmente simile e derivato da questo fu il metodo proposto da Getz e Friedmann (1963) con cui venivano messi a contatto, per un certo tempo in un ambiente umido, il cromatogramma ed un foglio imbevuto di una soluzione di enzima e di indicatore. Separati i due fogli dopo un certo periodo, quello contenente l'enzima veniva irrorato con acetilcolina al fine di provocare la reazione cromatica. Mc Kinley e Read (1962), infine, utilizzarono un metodo in base al quale si spruzzava sul cromatogramma un omogeneato di fegato di coniglio e successivamente una soluzione di acetilcolina e di indicatore.

Kovacs e coll. (1963) ripresero e perfezionarono un metodo citato da Sandi (1962) basato sulla «diffusione in agar» del fitofarmaco in cui dei dischetti di carta da filtro imbevuti di soluzione di antiparassitario venivano deposti su lastre di agar contenenti plasma sanguigno ed una soluzione di indicatore; dopo una incubazione di 24 ore, per consentire al prodotto di diffondersi nell'agar, la lastra veniva irrorata con una soluzione di acetilcolina; in tal modo in seguito alla reazione enzimatica il campo virava di colore tranne che attorno ai dischetti ove apparivano degli aloni con diametro variabile in rapporto alla quantità di antiparassitario presente.

Successivamente lo stesso autore modificò questa tecnica applicando ad essa l'analisi cromatografica su carta e mise a punto un metodo da noi in seguito ripreso e parzialmente modificato per poterlo adattare più specificatamente alle esigenze ed ai fini delle nostre indagini.

\* \* \*

La prima fase del metodo da noi utilizzato è basata sulla tecnica cromatografica su carta di tipo discendente e consiste nel deporre delle gocce di soluzione di antiparassitario e di estratto vegetale su fogli di carta cromatografica che, successivamente, vengono immessi in apposite vasche di sviluppo contenenti un solvente che per capillarità discende lungo il cromatogramma trascinando con sé i prodotti da esaminare.

Questa tecnica ha una funzione, soprattutto, qualitativa in quanto con essa si può identificare un prodotto in base alla determinazione dell'Rf che è tipico per ogni sostanza in esame (esso rappresenta il rapporto fra la distanza del centro della macchia dal punto di deposizione del prodotto e la distanza del fronte del solvente dal punto di deposizione stesso) e dipende sia dalla natura del prodotto, sia dal tipo di solvente adottato per lo sviluppo, sia dalla natura della cosiddetta «fase stazionaria» rappresentata dalla carta sottoposta a vari trattamenti. Nelle nostre analisi abbiamo ottenuto buoni risultati sia nella differenziazione degli Rf che nella separazione dei componenti una miscela utilizzando come eluente l'isottano e come «fase stazionaria» la carta di tipo Wathman n. 1 impregnata con una delle seguenti miscele (Mitchell, 1960):

100 cc. di N, N-dimetilformamide aggiunta a  
500 cc. di etere etilico;

50 cc. di formamide con 450 cc. di acetone.

La fase di rivelazione è basata come è stato detto, sulla reazione colinesterasica. Poiché la maggior parte dei fosforati organici non sono normalmente inibitori della colinesterasi, si procede alla loro ossidazione, che viene effettuata mediante il metodo descritto da Patchett e Batchelder (1960). Esso consiste nell'aggiungere alla soluzione in esame una miscela di 1 volume di acqua ossigenata 30% e di 5 volumi di acido acetico glaciale, quindi nell'immergere i tubi contenenti detta miscela in un bagno di acqua a 75° C per circa 20' minuti e successivamente in un bagno di ghiaccio per 10' minuti. Posta in seguito la soluzione in un imbuto separatore si procede a lavaggi successivi con una soluzione satura di solfato di sodio e con acqua distillata ed infine si disidrata mediante solfato di sodio anidro.

Il metodo di rivelazione consiste nel preparare delle lastre di agar mescolato a plasma di sangue di cavallo ed a una soluzione di bromotimolo che serve come indicatore; il sangue viene centrifugato per 12' minuti a 4000 giri in modo da separare la sua parte globulare dal plasma che contiene soltanto la «colinesterasi aspecifica» da noi preferita a quella «specifico» degli eritrociti a causa della sua assoluta indipendenza dalla concentrazione del substrato, indi 1 cc. di plasma viene aggiunto a 130 cc. di una solu-

zione acquosa contenente lo 0,25% di soluzione alcoolica di bromotimolo all'1%, questa soluzione viene poi conseguentemente portata a pH 7-7,7 con l'aggiunta di idrossido di sodio (Na-OH). Nella preparazione delle lastre vengono mescolate parti uguali della soluzione sopraindicata e di una soluzione di agar-agar al 2% e di blu di bromotimolo allo 0,25% che è stata previamente sterilizzata in autoclave a 121° C per 15' minuti. Le lastre così preparate mostrano una colorazione verde-blu dovuta alla presenza dell'indicatore in ambiente basico, esse successivamente vengono lasciate ad incubare per qualche ora quindi vi si depone sopra il cromatogramma e dopo ciò si lasciano ancora in incubazione per un minimo di 6 ore alla temperatura di 25° C. Terminata questa fase si irrorà sopra le lastre 25 cc. di una soluzione di cloruro di acetilcolina al 5% con aggiunta di bromotimolo; in seguito all'azione idrolitica esplicata sull'acetilcolina dall'enzima presente nella lastra si ha la liberazione di acido acetico e quindi la diminuzione del pH verso valori di acidità, per cui il colore del campo vira dal verde al giallo-aranciato tranne che nei punti ove non avviene la reazione enzimatica a causa della presenza di insetticida che inibisce la colinesterasi.

Oltre alla misura dello Rf, abbiamo effettuato anche la valutazione dell'area mediante un planimetro, area che ci consente di valutare con buona approssimazione la quantità di residuo presente nell'estratto in esame. Il principio che viene utilizzato per la valutazione quantitativa dei residui è quello del «dosaggio biologico» che consiste nel mettere a confronto diverse diluizioni di un estratto a quantità sconosciuta con diverse dosi di uno standard noto espresse in p.p.m. e quindi nel sottoporre i risultati ottenuti ad adeguate elaborazioni statistiche. I metodi statistici da noi utilizzati sono quelli del «dosaggio a 4 punti» e del «dosaggio a 6 punti» (Lison 1961) mediante i quali viene controllata l'entità dell'errore sperimentale di cui sono affette le misure e l'omogeneità

dei risultati ottenuti dallo standard e dal campione in esame ed, infine, dosata la quantità di residuo non noto.

\* \* \*

Accanto al metodo di tipo cromatografico fin qui descritto abbiamo utilizzato, nelle nostre indagini, anche un metodo di tipo potenziometrico. Il principio su cui questo tipo di analisi è fondato è quello della misura delle variazioni di pH e quindi di potenziale di una soluzione, a seguito della liberazione di acido acetico, prodotto dalla scissione enzimatica dell'acetilcolina. Questa metodica fu inizialmente messa a punto da Michel nel 1949 per lo studio dell'attività enzimatica e successivamente ripresa e modificata da diversi autori fra i quali Giang & Hall (1951) che per primi la applicarono all'analisi dei residui di fosfororganici. La tecnica da noi usata si ispira a quella descritta da Archer et. al. (1963) per l'analisi dello Ethion consistente nella preparazione delle soluzioni di plasma equino fresco mescolato ad una soluzione di cloruro di sodio allo 0,9% e ad un tampone barbiturico che ha la funzione di mantenere costante il pH sul livello di 8. L'antiparassitario prima di essere messo a contatto col sangue viene ossidato (Patchett e Batchelder 1960) e mescolato a glicerolo al fine di impedire la sua volatilizzazione durante la fase di evaporazione del solvente in cui era stato diluito o con cui era stato estratto. Mescolato quindi il fitofarmaco al sangue si sottopone la miscela ad una fase di agitazione quindi ad una preincubazione per 29 minuti a 25° C e si effettua una prima lettura di pH con un apposito pHmetro. A questa si fa seguire una ulteriore incubazione a 25° C per circa 1 ora e si procede alla seconda lettura potenziometrica.

In base ai risultati ottenuti si può calcolare l'azione inibitrice del fitofarmaco che viene espressa dalla seguente formula (Giang & Hall 1951):

$$\% \text{ di inibizione} = \left[ 1 - \frac{\Delta \text{ pH (campione)}}{\Delta \text{ pH (testimone)}} \right] \times 100$$

nella quale si confronta la variazione di pH in campioni contenenti antiparassitario con

quella di un testimone libero da sostanze tossiche.

## Metodi per la rivelazione dei fungicidi

L'analisi biologica dei residui di fungicidi è basata prevalentemente sull'uso di tecniche e di tests microbiologici fra i quali prevalgono nettamente gli organismi fungini.

I vantaggi che queste tecniche riservano sono di natura analoga a quelle ricordate per gli altri biotests; pur tuttavia una certa difficoltà deriva particolarmente dalla scarsa conoscenza dei meccanismi d'azione dei diversi fungicidi e, quindi, dei prodotti di trasformazione di questi ultimi. Piuttosto frequenti sarebbero i casi di anticrittogamici — come d'altronde anche di altri fitofarmaci — non attivi in quanto tali ma che diverrebbero tossici in seguito a fenomeni di decomposizione dovuti all'ambiente od al fungo stesso. La maggiore parte dei fungicidi sarebbe favorita nelle sue azioni da un pH basico dell'ambiente, mentre per i composti ionizzabili in cui il componente tossico è un catione sarebbe più vantaggioso un pH tendenzialmente acido. (Ludwig e Thorn 1960, Thornberry 1950).

Tutto questo poi è complicato dalla molteplicità d'azione dei fungicidi: alcuni di essi, come è noto, agirebbero direttamente sulla cellula sia provocando lesioni o modificazioni della membrana e quindi influenzando sulle sue capacità di scambio, sia penetrando all'interno di essa e determinando degli squilibri sui suoi normali fenomeni metabolici. Altri agirebbero invece in senso direttamente o indirettamente antagonistico alla cellula fungina sottraendo ad essa le sostanze nutritive e soprattutto gli ioni minerali necessari alla vita cellulare.

Fra i metodi utilizzati per l'analisi dei residui di fungicidi il più comune è quello della «diffusione in agar», che si basa sul principio secondo cui una sostanza tossica in soluzione avrebbe la capacità di diffondersi nell'agar e di inibire la crescita di uno specifico test in maniera proporzionale alla sua concentrazione (Cooper e Woodman 1946, Masuyama 1947).

Questo metodo fu descritto ancora da Beijerinck (1889) che deponeva una goccia di sostanza direttamente sull'agar; successivamente furono messe a punto molte tecniche particolarmente utilizzate per lo studio dell'attività di numerosi antibiotici; fra di esse possiamo citare quella in cui la sostanza veniva depositata in pozzetti scavati nel-

l'agar contenente il microrganismo test (Reddish 1928-29), quella in cui venivano deposti sull'agar dei cilindretti entro i quali veniva successivamente versata la soluzione in esame (Abraham et al. 1941) quella basata sulla deposizione in agar di dischetti di carta bibula su cui veniva gocciolata la sostanza tossica (Epstein et al. 1944, Sherwood et al. 1944) ed infine il metodo derivato da questo ultimo in cui, però, i dischetti erano sostituiti da parti di foglie o da semi (Leben e Keitt 1949).

L'analisi dei residui di fungicidi mediante questo metodo è stata svolta utilizzando i più svariati tests sia fungini che batterici. Whiffen nel 1948 mise a punto un metodo per l'analisi dei residui di Actidione con il *Saccharomyces pasteurianus* Hans. e la *Rhodotorula glutinis* Harrison che dimostrano una sensibilità vicina alle 0,2 p.p.m., successivamente Leben e Keitt (1950) condussero delle interessanti indagini sul TMTD con la *Glomerella cingulata* (Ston.) Spauld & Schrenk riuscendo a mettere in evidenza fino a 2,5 p.p.m.; Thornberry (1950) saggiò numerosi fungicidi con il *Bacillus subtilis* (Cohn) Prazmowsky, Arny e Leben (1956) utilizzarono la *Glomerella cingulata*, Kovacs (1958) impiegò *Saccharomyces carlsbergensis* Hansen *Aspergillus niger* Van Tiegh. e *Botrytis cinerea* Pers. mentre Prescott et al. (1956) ripresero e perfezionarono il metodo di Whiffen per i residui di Actidione.

\* \* \*

Il metodo da noi usato è quello dei «dischetti di carta» e consiste nel preparare delle lastre di agar malto al 2% o di agar Czapek mescolato ad una soluzione conidica la cui concentrazione stia fra i 120.000 e 160.000 conidi per cc. al fine di ottenere una buona crescita del test, ma non una troppo abbondante vegetazione microorganica che maschererebbe l'azione della sostanza in esame.

Successivamente sulle lastre vengono deposti a distanze regolari dei dischetti di 17 mm. di diametro e sopra di essi vengono gocciolati 0,04 cc. di soluzione da esaminare, si fa seguire quindi un periodo di incubazione di 36-48 ore a 25° C durante il quale il fungo si sviluppa tranne che attorno ai dischetti ove si formano degli aloni di inibizione il cui diametro è con buona appros-

simolazione proporzionale alla quantità di sostanza tossica presente.

Per mettere in maggiore evidenza e per fissare ad un determinato momento gli aloni suddetti le lastre vengono poi colorate col metodo del «Cotton bleu acetico» (Langeron e Van Breuseghem 1952).

Gli organismi tests che sono stati da noi utilizzati per questo metodo sono: *Aspergillus niger* Van Tiegh, *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jon & Grout, *Alternaria tenuis* Nees, *Botrytis cinerea* Pers. *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen e *Torulopsis pulcherrima* (Lindn) Sacc.

\* \* \*

Dal metodo della diffusione in agar è stato estrapolato da parte di alcuni ricercatori un nuovo metodo di analisi in cui viene associata alla rivelazione con tests microbiologici la tecnica della cromatografia su carta; i primi metodi consistevano nel deporre i cromatogrammi su lastre d'agar contenenti i tests e nel rilevare, dopo un apposito periodo di incubazione, le macchie di inibizione provocate dalla presenza della sostanza tossica (Winsten e Eigen 1948-1949, Goodban, 1953). Successivamente Schiffer e Kovacs (1959) misero a punto un metodo analogo per l'analisi dell'antibiotico Tetragonina, che utilizzava come test il *Saccharomyces carlsbergensis* (Hansen). Lo stesso Kovacs modificò in seguito questa tecnica sostituendola con un'altra in cui veniva spruzzata direttamente sui cromatogrammi una soluzione conidica in acqua sterile contenente succo di frutta come substrato nutritivo.

\* \* \*

Il metodo da noi utilizzato è basato sulla tecnica descritta da Kovacs a cui sono state portate alcune modificazioni.

Esso consiste di un'analisi cromatografica su carta di tipo discendente secondo il metodo già descritto per l'analisi degli insetticidi con rivelazione enzimatica. Terminata la fase di sviluppo in cui viene usato come eluente una miscela di acqua ed acetone al 50%, si depone il cromatogramma su di una lastra di vetro e su di esso si irrorà una soluzione di acqua e succo di frutta in cui sono sospesi i conidi di un organismo test (*Alternaria tenuis* Nees) in una concentrazione non

superiore ai 175.000 per cc., indi si fa seguire una fase di incubazione a 25° C di circa 48 ore, durante la quale il fungo si sviluppa diffondendosi su tutta la superficie del cromatogramma tranne che nei punti ove è presente il prodotto in cui si evidenziano delle macchie di inibizione. Al termine di questa fase i cromatogrammi vengono posti a disseccare in stufa a 60° C per qualche tempo, quindi si rileva lo Rf del prodotto e mediante un planimetro l'area della macchia da cui si può risalire alla quantità del fitofarmaco presente.

\* \* \*

Fra i vari tests di tipo microbiologico da noi utilizzati ricordiamo anche un protozoo del gruppo dei ciliati, la *Tetrahymena pyriformis* Ehren. che ha dimostrato una buona sensibilità almeno per alcuni gruppi di fungicidi organici quali i derivati dello stagno ed i ftalimidici.

Tale protozoo viene da tempo impiegato come organismo test, nei più svariati tipi di saggi sia di carattere prettamente zoologico e fisiologico sia di carattere tossicologico e farmacologico.

Il pregio di questo test è fondato prevalentemente sulla sua capacità di svilupparsi in mezzi di allevamento sintetici di costituzione chimica conosciuta, sulla disinvoltura con cui può essere maneggiato e sul suo relativamente alto potenziale riproduttivo.

L'organismo viene da tempo utilizzato per lo studio dell'attività tossica di uno svariatissimo numero di sostanze chimiche e farmaceutiche. Già nel 1927 Chatton e coll., fecero delle ricerche sull'azione che l'acido arsenico provocava sulla *T. pyriformis*, rilevando l'elevata inibizione che detta sostanza determinava. In seguito, questo test ha avuto un impiego quasi costante nell'industria farmaceutica per il rilievo della tossicità di quasi tutti gli antibiotici. Si possono, a tal fine, ricordare, le ricerche di Strain, Nelson e Cooley (1954) con aureomicina, polimixina, bacitracina, cloranfenicolo e neomicina e quelle successive di Gross (1955) sulla cloromicetina, aureomicina e terramicina, che hanno messo in evidenza come il test fosse in grado di reagire anche a quantità molto piccole dei suddetti prodotti.

Le ricerche di carattere tossicologico sono state estese anche ad una gamma più

svariata di sostanze e di ciò fanno testo le ricerche di Edward e coll. (1954) sull'azione tossica dell'arseniato sodico, semicarbazide, citrato sodico e acido cloridrico e quelle di Conner e coll. (1957, 1961) sull'azione tossica del 2,4-Dinitrofenolo.

Nell'ambito di queste indagini, nel 1954, Angelotti, Fletcher, Brown e Weiser introdussero la *T. pyriformis* nelle ricerche dei residui tossici di antiparassitari. Le indagini di questi Autori furono fatte esclusivamente, per gli insetticidi fosforati organici, con il Parathion e, per i cloroderivati, con DDT e Lindano. Essi utilizzarono due diversi metodi di rilievo e cioè l'analisi microscopica e la misura delle variazioni di torbidità mediante un colorimetro Evelyn. Gli Autori osservarono che gli insetticidi non provocavano una inibizione dello sviluppo delle colonie del test rilevabile colometricamente neppure a dosi altissime.

Malgrado tali risultanze abbiamo ripreso in esame il problema estendendo le analisi con questo test anche ad altri fitofarmaci e, soprattutto, ai fungicidi. E, se da una parte, abbiamo confermato i risultati di Angelotti ed altri per gli insetticidi, dall'altra abbiamo messo in evidenza una buona sensibilità della *T. pyriformis*, ai prodotti stannorganici e ftalimidici ed anche ad alcuni ditiocarbammati fungicidi.

\* \* \*

La *Tetrahymena pyriformis* Ehren., è un protozoo della classe dei ciliati, ordine olotrichi, famiglia frontonidi, di 40-60 micron di lunghezza, fornito di numerose ciglia disposte lungo file longitudinali, con un solo vacuolo contrattile, un macronucleo ovoidale, mentre il micronucleo può essere a volte assente. Esso vive libero in acqua dolce e può essere allevato facilmente in colture pure o contenenti batteri di cui si nutre. La sua temperatura ottimale di vita è di circa 26° C e si può riprodurre agamicamente e sessualmente.

Il ceppo da noi utilizzato è un clone ottenuto per selezione, che ha la caratteristica di riprodursi esclusivamente per via agamica, il che consente di mantenere un'assoluta costanza genetica, e quindi una sensibilità costante, unita ad un alto potenziale riproduttivo.

L'allevamento di *T. pyriformis*, viene ef-

fettuato in mezzo liquido costituito da una soluzione acquosa di peptone al 2%, di glucosio allo 0,2%, di cloruro di sodio allo 0,1%, di bifosfato di sodio allo 0,08% e di estratto di lievito batteriologico allo 0,08%. Questo mezzo, al fine di evitare inquinamenti fungini e batterici, viene sterilizzato mediante candela filtrante e sterilizzante di Chamberland e mediante sterilizzazione in autoclave a 121° C per 20 minuti; indi viene addizionato con solfato di streptomina allo 0,2% e di penicillina G. allo 0,05% al fine di mantenere le colonie nella più assoluta sterilità.

I metodi di analisi con i quali è possibile rivelare i valori di mortalità o di inibizione di sviluppo esercitata dai preparati di tipo diverso sulla *T. pyriformis*, sono molteplici. Quelli a cui noi ci siamo affidati sono stati due ed esattamente il rilievo «microscopico» e quello «turbidimetrico» dello sviluppo delle colonie mediante nefelometro.

Tali rilievi sono, naturalmente, preceduti dalla preparazione dei campioni effettuata in ambiente sterile e con materiale debitamente sterilizzato. Questa fase consiste nel mettere a contatto un cc. di soluzione di prodotto antiparassitario puro o di estratto vegetale con 10 cc. di mezzo di coltura al quale vengono aggiunti 0,2 cc. di soluzione contenente protozoi a concentrazione nota.

I rilievi vengono effettuati due volte, ed esattamente subito dopo la preparazione dei campioni e dopo una fase di incubazione in termostato a 25° C per circa 48 ore; quindi dal confronto fra i dati ottenuti con questi due rilievi si può valutare la tossicità del prodotto ed eventualmente dosare quantità non note di fitofarmaco presente nell'estratto vegetale in esame.

Il «rilievo microscopico» consiste nell'esaminare la coltura di protozoi e nell'effettuare un conteggio delle cellule vitali mediante «cella Thoma». Per poter ottenere la assoluta immobilità delle cellule da esaminare, senza lederne e modificarne le strutture fondamentali, il prelievo delle gocce di coltura viene effettuato mediante pipette Pasteur, preventivamente lavate con aldeide formica che provoca la morte istantanea e la fissazione delle cellule.

Col «rilievo nefelometrico» invece, si ottiene l'indice di rifrazione dei campioni rispetto ad uno standard di perspex ad indice di rifrazione noto (1,5).

Per tale calcolo ci si avvale della scala galvanometrica dell'apparecchio, che fornisce un numero indicante la percentuale dell'indice di rifrazione dello Standard da noi usato. Le variazioni in più o in meno rispetto a tale indice di rifrazione vengono, poi, trasformate mediante un'apposita formula, che

$$\text{inibizione percentuale} = \left[ 1 - \frac{\text{variazione ind. rifr. campione}}{\text{variazione ind. rifr. testimone}} \right] \times 100$$

I dati ottenuti da questo tipo di analisi vengono elaborati statisticamente con due diversi metodi; ed esattamente, nelle prove con prodotti puri, con il metodo della «varia-

si basa sul confronto fra i dati rilevati per i campioni contenenti antiparassitari ed un testimone senza prodotto, in valori di inibizione percentuale di sviluppo della colonia in esame.

La formula adottata è la seguente:

bile indipendente» mentre, in quelle con estratti contenenti quantità di fitofarmaco sconosciute con il metodo del «dosaggio a 4 punti» (Lison 1961).

#### BIBLIOGRAFIA

- 1) ABRAHAM E. P., CHAIN E., FLETCHER C. M., GARDNER A. D., HEATLEY N. G., JENNINGS H. A. e FLOREY H. W. (1941), «Lancet», 241, 177-188.
- 2) ANDERSON B. G. (1944), «Sewage Works, J.», 16, 1156.
- 3) ANGELOTTI R., FLETCHER J. A., BROWN H. D., WEISER H. H. (1954), «Proceeding American Society of Horticultural Science», 3, 285, 288.
- 4) ANONIMO (1955), «Form Chemicals», 118 (9): 26.
- 5) ARCHER T. E. (1963), *Enzymatic Methods*, in «Pesticides, Plants growth regulators and food additives», 1, 373, 397.
- 6) ARCHER T. E., ZWEIG G., WINTERLIN W. L. e FRANCIS E. K. (1963), «J. Agr. Food Chem.», 9, 469-477.
- 7) ARNY D. C. e LEBEN C. (1956), «Phytopathology», 46, 342.
- 8) AUCLAIR J. L. e PATTON R. L. (1950), «Rev. Canad. Biol.», 9, 3-8.
- 9) AUGUSTINSON K. B. (1957), in «Methods of Biochemical Analysis», 1, 1-63, Interscience, N. Y.
- 10) BELJERINCK M. W. (1889), «Arch. néerl. Sci.», 23, 367 citato da Köhler H., «Wissenschaft. Abhan.» (1956), 13. Ak. Verl. B.
- 11) BOMBOSCH S. (1956), «Mitt. Biol. Bundesanst. Berlin-Dahlem», 35, 113.
- 12) BONETTI E. e DENT C. E. (1954), «Biochem. Journ.», 57, 77-81.
- 13) BURCHFIELD H. P., HILCHEY J. D. e STORRS E. E. (1952), «Contribs. Boyce Thompson Inst.», 17, 57.
- 14) BURCHFIELD H. P. e STORRS E. E. (1954), «Contribs. Boyce Thompson Inst.», 17, 439.
- 15) BUSHLAND R. C. (1951), «J. Econ. Entomol.», 44, 421.
- 16) CALLAWAY S., DIRNHUBER P. e WILSON K. M. (1952), «Nature», 170, 843.
- 17) CASIDA J. E. (1955), «Biochem. Journ.», 60, 487-496.
- 18) CHATTON E., TELLIER L. (1927), «Compt. Rend. Soc. Biol.», 116, 457-477.
- 19) CONNER R. L. (1957), «Science», 126, 699.
- 20) CONNER R. L., KORNACKER M. S., GOLDBERG R. (1961), «J. Gen. Microbiol.», 26, 437-462.
- 21) COOK J. W. (1955), «J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.», 38, 150-153.
- 22) COOPER K. E. e WOODMAN D. (1946), «J. Path. Bact.», 58, 75.
- 23) DALE H. H. (1914), «J. Pharmacol. Exptl. Therap.», 6, 147-150.
- 24) DE PIETRI TONELLI P. (1956), «Ist. Ricerche Agr. Soc. Montecatini, Milano, Contributi», 1, 3.
- 25) DE PIETRI TONELLI P. e BARONTINI A. (1961), «Ist. Ric. Agr. Montecatini Contributi», 4, 29-38.
- 26) DEWEY J. E. (1952), «N. Y. State Insecticide and Fungicide Conference».
- 27) DEWEY J. E. (1955), «48th Annual Convention, Nat. Canner's Assoc.».
- 28) DEWEY J. E. (1958), «J. Agr. Food. Chem.», 6, 274-281.
- 29) EDWARD W., DEGENHARDT F., FENNEL R. A. (1954), «J. of Protozoology», 1, 3.
- 30) EPSTEIN J. A., FOLEY E. J. e LEE S. W. (1944), «J. Bact.», 47, 573.
- 31) FISHER R. W., SMALLMAN B. N. (1954), «Can. Entomologist», 86, 562.
- 32) FLEMING W. E., COLES L. W., MAINES W. W. (1951), «J. Econ. Entomol.», 44, 310.
- 33) FRAWLEY J. P., LAUG E. P., FITZHUGH O. G. (1952), «J.A.O.A.C.», 35, 741.
- 34) FREHSE J. P. e NIESSEN H. (1963), «Z. Analyt. Chem.», 192, 94-136.
- 35) FUKUTO T. R. (1957), in Metcalf, R. L. «Advances in Pest. Control Research», 1, 147-192.
- 36) GETZ M. E. e FRIEDMAN S. J. (1963), «J. Assoc. Offic. Agr. Chemists.», 46, 707-710.
- 37) GIANG e HALL (1951), «Anal. Chem.», 23, 1830-1834.

- 38) GLOSSER R. F., BLENK R. G., DEWEY J. E., HILTON B. D., WEIDEN M. H. J. (1955), «Eastern Branch Meeting, Entomol. Soc. Am.».
- 39) GOODAN A. E. et AL. (1953), «Journ. Agr. Food Chem.», 1, 261-264.
- 40) GROSS J. A. (1955), «J. of Protozoology», 11, 2.
- 41) GYRISCO G. G., EVANS W. G., BARRAGE R. H. e BRIANT A. M. (1955), «J. Econ. Entomol.», 48, 700.
- 42) HARTZELL A. (1950), «Advances in Chem. Ser.», 1, 99.
- 43) HARTZELL A., STORRS E. E. (1950), «Contribs. Boyce Thompson Inst.», 16, 47.
- 44) HESTRIN S. (1949), «J. Biol. Chem.», 180, 249-261.
- 45) KAEMPFE L. (1951), «Anz. f. Schaedlingskunde», 24, 179-180.
- 46) KAEMPFE L. (1953), «Die Pharmazie», 8, 575-582.
- 47) KOCHER C., ROTH W. e TREBOUX J. (1953), «Mitt. d. Schwz. Entomol. Ges.», 26, 47.
- 48) KOEHLER H. (1956), «Wissenschaftliche Abhandlungen», 13, Akademie Verlag, Berlin.
- 49) KOVACS (1958), «Progresso Agricolo», n. 5, 662-664.
- 50) KOVACS A. e RIGHI R. (1963), «Atti delle Giornate Fitopatologiche», 185-189.
- 51) LANGE W. H. e CARLSON E. C. (1956), presentato allo «Entomological Club of Southern California».
- 52) LANGERON M. e VAN BREUSEGHEM R. (1952), «Precis de Micologie», ed. Masson, Paris.
- 53) LAUG E. P. (1946), «J. Pharmacol. Exptl. Therap.», 86, 324.
- 54) LEBEN C. e KEITT G. W. (1949), «Phytopathology», 39, 529.
- 55) LEBEN C. e KEITT G. W. (1950), «Phytopathology», 40, 950.
- 56) LISON (1961), «Statistica Applicata alla Biologia Sperimentale».
- 57) LUEDEMAN D. e NEUMANN M. (1962), «Anz. f. Schaedlingskunde», 35, 5-9.
- 58) LUDWIG R. A. e THORN G. D. (1960), in Metcalf, R. L. «Advances in Pest Control Research», 3, 219-252.
- 59) MATER-BODE H. (1965), «Pflanzenschutzmittel Rueckstaende», Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- 60) MASUYAMA M. (1947), «Journ. Jap. Penicillin Ass.», 1, 209 citato da Koehler H, «Wissenschaftl. Abhand.» (1956), n. 13.
- 61) Mc KINLEY W. P. (1963), in «Pesticide, Plant Growth Regulators and Food Additives», 1, 227-252.
- 62) Mc KINLEY W. P. e READ S. I. (1962), «J. Assoc. Offic. Agr. Chem.», 5, 601-602.
- 63) MICHAEL A. S., THOMPSON C. G. e ABRAMOVITZ M. (1956), «Science», 123, 464.
- 63 bis) MICHEL H. (1949), «J. Lab. Clin. Med.», 34, 1564-1568.
- 64) MITCHELL (1960), «J. Agr. Food Chem.», 8, 54, 57.
- 65) NEEDAM P. H. (1961), «Insecticide Newsletter», 10, 9, 345-363.
- 66) NEGHERBON W. O. (1959), «Handbook of Toxicology. Vol. III: Insecticides», W. B. Saunders, Philadelphia.
- 67) NEWMAN J. F. (1954), «Chem. & Ind.» (London) 617.
- 68) OLSON R. E. (1954), «Dissert. Abstr.», 14, 1876.
- 69) PANKASKIE J. E. e SUN Y. P. (1950), «3<sup>o</sup> Congr. Intern. Phytopharmacie», Paris, 52, 55.
- 70) PATCHETT e BATCHELDER (1960), «J. Agr. Food Chem.», 8, 54-57.
- 71) PFAFF W. (1955), «Z. Pflkrankh.», 62, 361.
- 72) PLELOW D. P. e GLASSER R. F. (1951), «Can. J. Zool.», 29, 90.
- 73) PRESCOTT G. C., EMERSON H. e FORD J. H. (1956), «J. Agr. Food Chem.», 4, 343-345.
- 74) REDDISH G. F. (1928, 1929), «Journ. Lab. Clin. Med.», 14, 649, 658.
- 75) REID E. (1950), «Nature», 166, 569.
- 76) RICHARDSON A. (1961), citato da NEEDAM P. H., «Insecticide Newsletter», 10, 9, 345-363.
- 77) RIEMSCHEIDER R. (1950), «Pharmazie», Erg. Bd. 1, 690.
- 78) RIEMSCHEIDER R. (1958), in Metcalf R. L. «Advances in Pest. Control. Research», 2, 307-350.
- 79) SAGGERS D. T. (1961), citato da NEEDAM P. H., «Insecticide newsletter», 10, 9, 345-363.
- 80) SANDI E. (1962), «Elelmiszer Vizsgalati Közlemenyek», 8, 27.
- 81) SAUNDERS J. e BAY E. C. (1958), «J. Econ. Entomol.», 51, 3, 299-302.
- 82) SHERWOOD M. B., FALCO E. A. e DE BEER E. J. (1944), «Science», 99, 247-248.
- 83) SHIFFER A. P. e KOVACS A. (1959), «Nature», 183, 988-989.
- 84) SIMMONS S. W. (1945), «U.S. Public Health Serv. Public Health Repts. Supplement», 186, 3.
- 85) SKERRET E. J. e WOODCOCK D. (1950), «Nature», 185, 853.
- 86) STARNES O. (1950), «J. Econ. Entomol.», 43, 338.
- 87) STRAIN W., NELSON, COOLEY R. (1954), «J. of. Protozoology», 1, 3.
- 88) SUN Y. P. (1947), «Minn. Agr. Expt. Sta. Tech. Bull.», 177.
- 89) SUN Y. P. (1957), in Metcalf, R. L. «Advances in Pest. Control. Research», 1, 449-496.
- 90) SUN Y. P. e PANKASKIE J. E. (1954), «J. Econ. Entomol.», 47, 180.
- 91) SUN Y. P. e SUN J. Y. TUNG (1952), «J. Econ. Entomol.», 45, 26.
- 92) SYNGE (1949), «Biochem. Soc. Symp.», 3, 90-96.
- 93) TARPLEY W. A. (1958), «J. Econ. Entomol.», 51, 780.
- 94) THORNBERRY H. H. (1950), «Phytopathology», 40, 419-429.

- 95) WARD J. e BURT P. E. (1956), «Bull. Entomol. Research», 46, 849.
- 96) WASSERBURGER H. J. (1952), «Die Pharmacie», 7, 731-734.
- 97) WEINMANN W. Z. (1958), «Lebensmitt. Untersuch», 107, 504.
- 98) WHEATLEY G. A. (1961), citato da NEEDHAM P. H. «Insecticide Newsletter», 10, 9, 345-363.
- 99) WHIFFEN A. J. (1948), «Journ. Bact.», 56, 283-291.
- 100) WINSTEN W. A. e EIGEN E. (1948), «Journ. Amer. Chem. Soc.», 70, 3333-3339.
- 101) WINSTEN W. A. e EIGEN E. (1949), «Journ. Biol. Chem.», 177, 989-990.
- 102) WYNIGER R. (1961), citato da NEEDHAM P. H., «Insecticide Newsletter», 10, 9, 345-363.

#### RIASSUNTO

Gli autori, nell'ambito dello studio e della messa a punto di metodi di analisi per il reperimento di antiparassitari presenti su prodotti vegetali, hanno descritto le tecniche per l'utilizzazione di: *Drosophila melanogaster* Meig, *Tribolium confusum* Duv., *T. castaneum* Hbst, *Calandra Oryzae* L., *Daphnia magna* Straus, *D. pulex* De Geer, *Artemia salina* Leach, *Tetrahymena pyriformis* Ehren, fra gli organismi animali e di *Aspergillus niger* Van Tiegh, *Alternaria solani* (Ell. & Mart) Jon & Grout, *A. tenuis* Nees, *Botrytis cinerea* Pers., *Rhodotorula glutinis* (Fresenius) Harrison, *Saccharomyces cerevisiae* Meyen e *Torulopsis pulcherrima* (Lind) Sacc. fra gli organismi vegetali.

Vengono inoltre indicate due tecniche per l'utilizzazione dell'enzima colinesterasico «in vitro». Infine sono fornite indicazioni sui metodi statistici per l'elaborazione dei risultati conseguiti con la applicazione delle tecniche sovraindicate.