

**VPLIV IMIDAKLOPRIDA NA RAST, PREHRANO TER AKTIVNOST
ENCIMOV ACHE IN GST PRI KOPENSKIH ENAKONOŽNIH RAKIH**Mateja BLAŽIČ¹, Polonca TREBŠE², Damjana DROBNE³¹Kmetijsko gozdarska zbornica Slovenije²Politehnika Nova Gorica, Laboratorij za raziskave v okolju,³Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo,**IZVLEČEK**

Neonikotinoidi so relativno novi sistemski insekticidi, ki so kemično podobni nikotinu – toksinu v tobaku. Podobno kot nikotin, tudi neonikotinoidi delujejo na živčni sistem. Namen študije je bil ugotoviti, kako imidakloprid kot predstavnik neonikotinoidov vpliva na rast, prehrano in aktivnost nekaterih encimov kot sta acetilholinesteraza in glutation-S-transferaza pri kopenskih enakonožnih raki in ali lahko predpostavimo, da so omenjeni učinki posledica onesnaženja z imidaklopridom ter tako predstavljajo biomarkerje v testih strupenosti s kopenskimi enakonožnimi raki (*Porcellio scaber*) pri testiranju neonikotinoidov. V ta namen smo v prvem eksperimentu ugotavljali spremembe aktivnosti encimov AChE (acetilholinesteraze) pri kopenskih enakonožnih raki (*Porcellio scaber*) po dveh tednih izpostavitve imidaklopridu v koncentracijah 1, 2.5, 5 in 10 µg imidakloprida na težo suhe hrane (µg/g). Rezultati poskusa so pokazali, da se aktivnost omenjenega encima ne spreminja glede na koncentracijo imidakloprida, dodanega v hrano. V drugi študiji, v kateri so bili odrasli osebk izpostavljeni koncentracijam 0, 10 in 25 µg imidakloprida/g suhe hrane, smo merili spreminjanje aktivnosti encima glutation-S-transferaze (GST) kot posledico izpostavitve imidaklopridu. Rezultati so pokazali povečano aktivnost encima GST pri koncentraciji 10 µg/g suhe hrane ter zmanjšano aktivnost GST pri koncentraciji 25 µg/g suhe hrane. Po dveh tednih izpostavitve imidaklopridu v hrani, smo opazili tudi učinke na izračunane parametre prehrane (privzem in asimilacijska učinkovitost) pri koncentracijah 10 in 25 µg imidakloprida/g suhe hrane. Na rast živali ter vsebnost proteinov in lipidov pa izpostavitve imidaklopridu ni imela učinka pri nobeni od izbranih koncentracij.

Ključne besede: energetske rezerve, glutation-S-transferaza, imidakloprid, *Porcellio scaber*, strupenost

ABSTRACT**EFFECT OF IMIDACLOPRID ON GROWTH, FEEDING RATE AND ACTIVITY OF
ACHE AND GST ENZYMES IN THE TERRESTRIAL ISOPODS *PORCELLIO
SCABER* (ISOPODA, CRUSTACEA).**

Neonicotinoids are relatively new systemic insecticides, which are chemically alike nicotine – toxin, preset in tobacco. Similarly as nicotine, neonicotinoids act on the nerve system. We want to find out, if the replacement of organophosphates with neonicotinoids is suitable and what kind of consequences it bring for non-target organisms and lifeless nature and also for the mankind. The aim of our study was to find out how do imidacloprid as a representative of neonicotinoids influence on growth, feeding rate and activity of some enzymes such as acetylcholinesterase and glutathion-S-transferase in terrestrial isopods. In addition we wanted to know if we are able to presume if the effects we have observed are the result of exposure to imidacloprid and from that reason they represent a biomarkers in toxicity tests with terrestrial isopods (*Porcellio scaber*) when testing neonicotinoids.

In the first experiment we wanted to assess the activity of acetylcholinesterase (AChE) after two weeks of exposure of terrestrial isopods *Porcellio scaber* to imidacloprid, added in food in concentrations of 1, 2.5, 5 and 10 µg imidacloprid/g dry food. No changes in the AChE activity were observed after the exposure to imidacloprid. In the second study glutathion-S-transferase (GST) activity was determined in the experiment with adults at concentrations

¹univ. dipl. inž. agr., Pri hrastu 18, SI-5000 Nova Gorica

²doc. dr., Vipavska 13, SI-5000 Nova Gorica

³prof. dr., Večna pot 11, SI-1000 Ljubljana

0,10 and 25 µg imidacloprid/g dry food as the consequence of exposure to imidacloprid. The results have shown that after 2 weeks of exposure the GST activity was increased in animals, exposed to 10 µg imidacloprid/g dry food and decreased in animals, exposed to 25 µg imidacloprid/g dry food. After two weeks of exposure to imidacloprid, added in food there were observable effects on feeding parameters (consumption rate, assimilation efficiency) at concentrations 10 and 25 µg imidacloprid/g dry food. No effect on growth rate, proteins and lipids content was observed.

Keywords: energy reserves, glutathion-S-transferase, imidacloprid, *Porcellio scaber*, toxicity,

1. UVOD

Raba fitofarmaceutskih sredstev v kmetijski pridelavi, ki so namenjeni zatiranju škodljivih organizmov, ima lahko resne posledice za neciljne organizme, med katere sodijo tudi kopenski enakonožni raki vrste *Porcello scaber*. Kopenski enakonožni raki so zelo pomembna komponenta talne faune in sodelujejo tudi pri tvorbi humusa (Fischer *et al.*, 1997). Naseljujejo zgornjo plast tal in površine odmrle s pokritim listjem tako v urbanih kot tudi v naravnih habitatih (Drobne, 1997). Ker se v okolju pogosto pojavljajo in imajo pomembno vlogo pri fizičnem razkroju materiala v manjše delce, so pomembni organizmi, ki lahko dajejo informacije o strupenosti spojin v okolju (Walker *et al.*, 2001). Ena izmed skupin insekticidov, ki potencialno lahko deluje na kopenske enakonožne rake, je tudi skupina neonicotinoidov, med katere sodi tudi imidakloprid.

Neonicotinoidi so relativno novi sistemski insekticidi, ki so kemično podobni nikotinu – toksinu v tobaku. Podobno kot nikotin, tudi neonicotinoidi delujejo na živčni sistem. Zaradi močno elektronprivlačnih skupin imajo delno pozitivni naboj in se tako vežejo na nikotinske acetilholinske receptorje, oziroma jih ireverzibilno blokirajo. Pri insektih je afiniteta za vezavo na nikotinske acetilholinske receptorje bistveno bolj izražena kot pri sesalcih. Glede na dejstvo, da so neonicotinoidi relativno novi insekticidi, je na področju raziskav razgradnje in sorbcije v zemlji, metod sledenja v okolju ter strupenostnih testov na različnih vodnih in kopenskih organizmih, bilo opravljenih malo raziskav.

Imidakloprid je sistemski insekticid s kontaktnim in želodčnim delovanjem. Uporablja se za zatiranje sesajočih in nekaterih grizočih žuželk. Insekticidi iz te skupine delujejo na centralni živčni sistem pri insektih, tako da se ireverzibilno vežejo na post sinaptične receptorje za acetilholin. Za sesalce so bistveno bolj selektivni kot za insekte. Kemično so podobni nikotinu, so polarne, nehlapljive snovi, stabilne v vodi in v tleh (Cox, 2001; Roberts in Huston, 1999).

Namen študije je bil ugotoviti, kako imidakloprid kot predstavnik neonicotinoidov vpliva na rast, prehrano in aktivnost nekaterih encimov kot sta acetilholinesteraza in glutation-S-transferaza pri kopenskih enakonožnih rakih in ali lahko predpostavimo, da so omenjeni učinki posledica onesnaženja z imidaklopridom ter tako predstavljajo biomarkerje v testih strupenosti s kopenskimi enakonožnimi raki (*Porcellio scaber*) pri testiranju neonicotinoidov. Namen naše študije je bil ugotoviti, v kolikšnem obsegu so neonicotinoidi ustrezna zamenjava za organske fosforne estre in kakšne posledice ima lahko uporaba omenjenih spojin za neciljne organizme in neživo naravo ter posledično za človeka.

2. MATERIALI IN METODE

Testni organizmi

Testne živali smo nabrali v neonesnaženem okolju in jih preselili v laboratorij v steklene posode - terarije. Dno posode smo prekrili s plastjo peska in zemlje, katero smo predhodno več ur segrevali, da smo uničili morebitne zajedalce. Plast zemlje smo prekrili s posušeniimi leskovimi listi, ki so bili živalim osnovna hrana, in jim dodajali koščke sadja in zelenjave ter hrano za ribe. Po potrebi smo gojišče vlažili z destilirano vodo.

Priprava hrane:

Odpadle liste leske smo nabrali v neonesnaženem okolju in jih posušili med dvema polama čistega papirja. Iz teh listov smo izrezali koščke z maso 100 ± 1 mg približno enake velikosti. Na spodnjo stran listov smo nanесли 150 μ L raztopine imidakloprida različnih koncentracij (0, 1, 5, 10 in 25 μ g /g suhe hrane). Kapljice smo nanесли po celotni površini in jih enakomerno razmazali po celotni površini lista. Do naslednjega dne, ko smo postavili poskus, smo liste shranili v temi, da so se posušili. Živali v kontroli smo hranili z listi, na katere smo nanесли le destilirano vodo.

Izvedba poskusov:

Odrasle živali smo vsako zase namestili v petrijevko in jim ponudili liste leske (2 – 3 koščke) v skupni količini od 40 – 60 mg, na katere smo nanесли različne koncentracije imidakloprida. Poskus je trajal 2 tedna, petrijevke smo dnevno pregledovali in jih škropili z vodo. V času trajanja poskusa smo vsake 2 do 3 dni čistili iztrebke, ki smo jih 48 ur kasneje stehtali. Živali smo stehtali prvi in zadnji dan poskusa ter vmes še dva do tri krat. Koščke listov smo tehtali prvi in zadnji dan poskusa. Na osnovi teh meritev smo izračunali privzem in asimilacijsko učinkovitost.

Biokemijske analize:

Po končanem dvotedenskem poskusu smo posamezno žival homogenizirali v fosfatnem pufru in jo 15 minut centrifugirali pri 3000 obratih na minuto. Količina uporabljenega fosfatnega pufra je znašala od 1,1 do 2 ml odvisno od parametrov, ki smo jih kasneje analizirali.

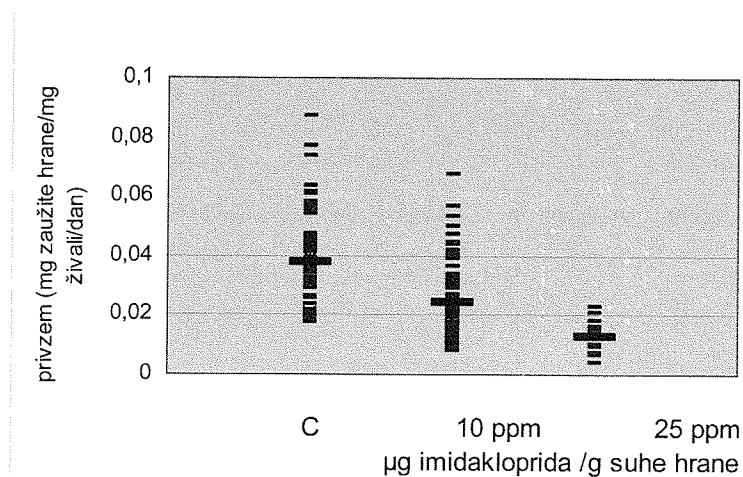
Aktivnost AChE smo določali s kolorimetrično metodo po Ellmanu (Ellman in sodelavci, 1961) s spektrofotometrom HP 8453 pri valovni dolžini 412 nm 6 minut. 500 μ l vzorca (supernatant homogenizirane živali) smo dodali 20 μ l acetilholin jodida (0,075 M), 100 μ l ditiotiobisnitrobenzojske kisline (DTNB, 0,01 M) in 2380 μ l fosfatnega pufra (pH = 7). Encimsko aktivnost smo izrazili glede na težo živali v enotah/g teže. Analize smo delali v dveh paralelkah.

Aktivnost GST smo določili s kolorimetrično metodo po Habigu (Habig in sodelavci, 1974) pri valovni dolžini 440 nm, 6 minut. Najprej smo merili absorbanco »praznemu vzorcu«, ki je vseboval le reagente: 900 2380 μ l fosfatnega pufra (pH 6,5), 25 μ l 1–kloro-2,4-dinitrobenzena (CDNB) in 50 μ l reduciranega glutationa. Meritev absorbance je trajala 3 minute. Po končani meritvi smo v kiveto dali še 25 μ l vzorca (supernatant homogenizirane živali) in merili absorbanco nadaljnjih 5 minut. Na osnovi razlik med absorbancama smo izračunali aktivnost GST. Encimsko aktivnost smo izrazili v nmol GSH, ki konjugirajo v minuti na mg proteinov. Ekstrakcijo lipidov smo izvedli po modificirani metodi Blight in Dyer (1959), povzeto iz literature Ribeiro *et al*, 2001. Vzorec (100 μ l homogenata homogenizirane živali) smo dodali 3 mL mešanice metanola in vode ter 1 mL kloroforma in zmes dobro premešali. Spodnjo plast, v kateri so bili lipidi smo previdno zbrali s pipeto. Postopek s kloroformom smo ponovili še dvakrat. Skupne lipide smo določali po sulfosfosfovanilinski metodi (Zollner in Kirsch, 1962). Zbrani vzorec smo uparili in suhemu ostanku dodali 0,5 mL koncentrirane žveplove (VI) kisline in segrevali na vodni kopeli pri 100 °C 10 min. Nato smo dodali 2,5 mL vanilin reagenta in merili absorbanco pri 540 nm s holesterolom kot standardom.

Proteine smo določili po Bradfordu (1976). 50 μ l homogenata smo dodali 1,5 mL reagenta Coomassie Brilliant Blue G-250 (Bradfordov reagent) in premešali. Absorbanco pri 595 nm smo merili najkasneje po dveh urah. Kot standard smo uporabili goveji serum albumin. Delali smo v 2 paralelkah.

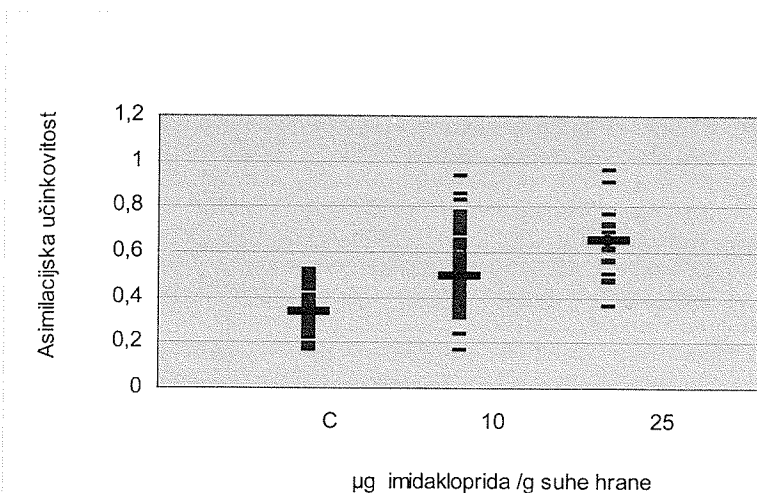
3. REZULTATI IN DISKUSIJA

Rezultati dvotedenskega poskusa z odraslimi osebkami kopenskega enakonožnega raka (*Porcellio scaber*), hranjenimi z imidaklopridom v dveh različnih koncentracijah (10 in 25 μ g imidakloprida /g suhe hrane), so pokazali da so uporabljene koncentracije vplivale na privzem hrane in asimilacijsko učinkovitost v primerjavi s kontrolno skupino živali, ki ni bila izpostavljena imidaklopridu.



Slika 1: Privzem hrane pri kopenskih enakonožnih rakih *Porcellio scaber* po dvotedenski izpostavitvi imidaklopridu v hrani v koncentracijah 10 in 25 μg imidakloprida /g suhe hrane (C – kontrolna skupina).

Privzem hrane je bil zmanjšan že pri izpostavitvi 10 μg imidakloprida /g suhe hrane in se je še zmanjšal pri izpostavitvi 25 μg imidakloprida /g suhe hrane. Rezultati izvedenih poskusov so v skladu z rezultati poskusov izvedenih na vrsti *Porcellio dilatatus* (začetna teža živali 15 do 55 mg) po tri tedenski izpostavitvi kloriranemu ogljikovodilku endosulfanu. Pri uporabljenih koncentracijah 100, 250 in 500 μg endosulfana /g suhe hrane je bil privzem hrane značilno nižji v primerjavi s kontrolo (Ribeiro *et al.*, 2001).

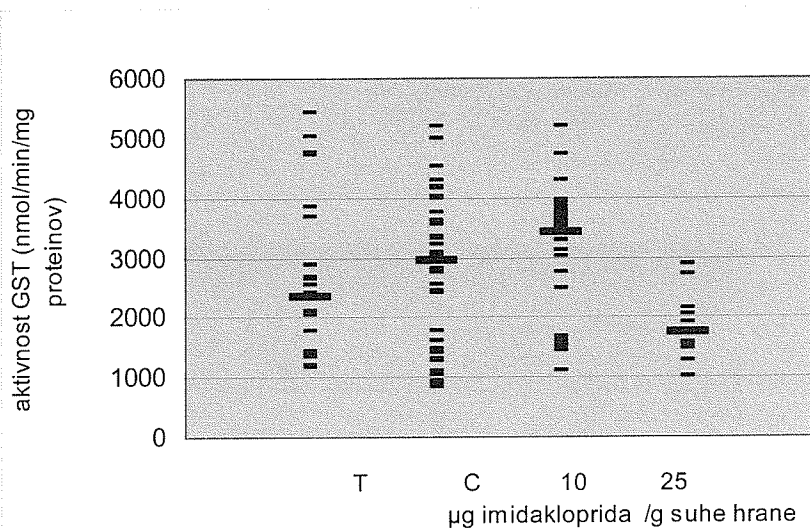


Slika 2: Asimilacijska učinkovitost (AE) pri kopenskih enakonožnih rakih *Porcellio scaber* po dvotedenski izpostavitvi imidaklopridu v hrani v koncentracijah 10 in 25 μg imidakloprida /g suhe hrane (C – kontrolna skupina).

Asimilacijska učinkovitost (AE) nam pove, kako živali izkoriščajo hrano. Povišana je bila že pri izpostavitvi 10 μg imidakloprida /g suhe hrane in se je še povišala po izpostavitvi 25 μg imidakloprida /g suhe hrane. Iz slik 1 in 2 je razvidno, da so izpostavljene živali pojedle manj v primerjavi s kontrolno skupino, vendar so pojedeno hrano bistveno boljše izkoristile. Razpon vrednosti za AE pri živalih izpostavljenih imidaklopridu je zelo širok v primerjavi s kontrolo (slika 2), kar dokazuje, da so bile te živali izpostavljene stresu, ki ga predstavlja imidaklopid v hrani.

Kljub temu, da AChE ni tarčni encim za imidaklopid, smo želeli ugotoviti, ali bi omenjeni encim lahko uporabili kot biomarker za stres. Pod vplivom imidakloprida je namreč ireverzibilno blokiran nikotinski receptor za acetilholin, pri razgradnji slednjega pa sodeluje encim AChE. Na podlagi izvedenih poskusov pa smo ugotovili, da izpostavljenost imidaklopridu v hrani pri koncentracijah 1, 2,5, 5 in 10 μg imidakloprida /g suhe hrane ni vplivala na aktivnost tega encima.

Glutation-S-transferaze so encimi, ki katalizirajo konjugacijo reduciranega glutationa s številnimi ksenobiotiki in na ta način sodelujejo pri njihovi detoksifikaciji. Imajo tudi pomembno vlogo pri preprečevanju oksidativnega stresa in sodelujejo pri nastanku rezistence na fitofarmacevtska sredstva (Walker *et al.*, 2001, Hodge *et al.*, 2000). Po podatkih iz literature (Hodge, 2000) številne kemikalije vključno s pesticidi, kot so npr. lindan, paraquat in oksadiazolon ter rastlinski fitotoksini povzročijo induciranje encima GST. Isti vir tudi navaja, da različne vrste pesticidov različno vplivajo na aktivnost GST pri vrsti *Micromys tasmaniae*. Tako npr. metilparathion in azinfos-metil ter rastna regulatorja diflubenzuron in tebufenozid nimata vpliva na aktivnost omenjenega encima za razliko od cipermetrina ki njegovo aktivnost poviša ter fenoksikarba, ki njegovo aktivnost zniža. Za imidaklopid zazdaj podatkov o tem, kako se spreminja aktivnost omenjenega encima v literaturi ne zasledimo.



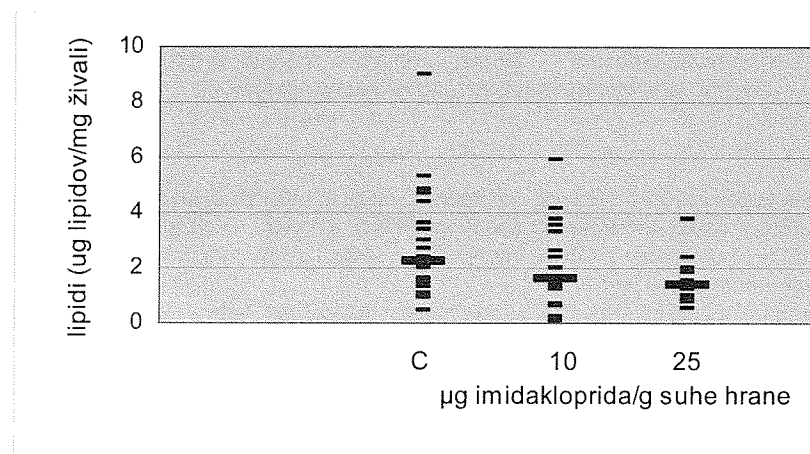
Slika 3.: Aktivnost encima glutation-S-transferaza pri kopenskih enakonožnih rakih *Porcellio scaber* po dvotedenski izpostavitvi imidaklopridu v hrani v koncentracijah 10 in 25 μg imidakloprida /g suhe hrane (T – terarij, C - kontrola).

Rezultati naših raziskav so pokazali, da že preselitev živali iz terarija v petrijevko (slika 3, C - kontrola), v kateri so imele na razpolago samo liste leske brez dodanega imidakloprida, predstavlja za živali določen stres. V tem primeru je prišlo do povišane aktivnosti encima, ki pa ni bila bistveno povišana v primerjavi s skupino živali, vzeti iz terarija tik pred analizo

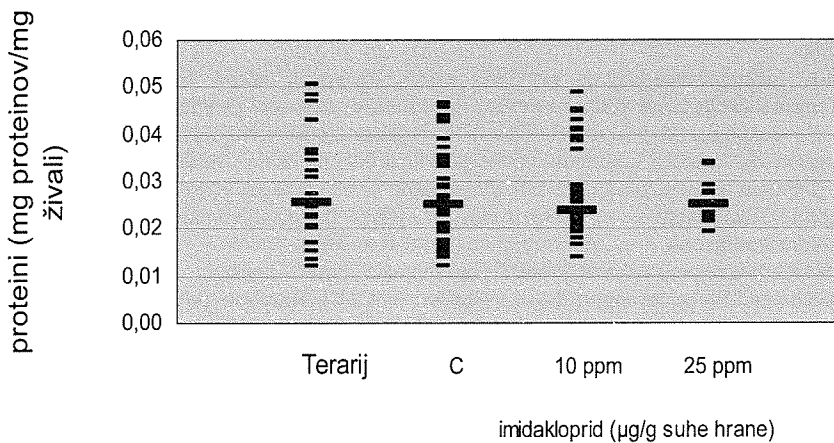
aktivnosti omenjenega encima (slika 3, T-terarij). Izpostavitve živali 10 μg imidakloprida /g suhe hrane je povzročila nadaljnje povišanje aktivnosti encima, medtem ko je izpostavitve 25 μg imidakloprida /g suhe hrane povzročila bistveno znižanje aktivnosti encima GST. Iz rezultatov lahko sklepamo, da pri izpostavitvi kopenskih rakov koncentraciji 10 μg imidakloprida/g suhe hrane pride do povečanja aktivnosti omenjenega encima, kar pomeni, da encim še sodeluje pri procesu detoksifikaciji. V primeru izpostavitve najvišji koncentraciji, to je 25 μg imidakloprida/g suhe hrane pa se aktivnost encima znatno zmanjša. Predvidevamo, da je v slednjem primeru zaradi prevelike koncentracije toksične snovi v organizmov prišlo še do drugih toksičnih učinkov, ki so povzročili zmanjšanje aktivnosti encimov, ki sodelujejo pri procesih detoksifikacije, med njimi tudi glutation-S-transferaze.

Po dveh tednih izpostavitve imidaklopridu se vsebnost lipidov ni značilno zmanjšala, nakazan je le rahel trend zmanjševanja njihove vsebnosti (slika 4). Rezultati poskusa so v skladu z rezultati poskusov, v katerih so bile testne živali vrste *Porcellio scaber* (odrasli in mladiči) izpostavljene različnim koncentracijam diazinona v hrani (5, 10, 50, 100 μg /g suhe hrane). V teh poskusih ni bilo razlik v vsebnosti lipidov med živalmi v kontroli in živalmi, ki so bile izpostavljene diazinonu v hrani (Stanek, 2004).

V primerih, ko so bile testne živali izpostavljene različnim vrstam pesticidov za daljše obdobje pa je prišlo do razlik v vsebnosti lipidov. Po šestih tednih izpostavitve (Vink *et al.*, 1995) vrste *Porcellionides pruinosus* diazinonu v hrani (8,71, 18,73, 40,73, 86,50, 186,18, 400,2 μg diazinona/g suhe hrane) je prišlo do sprememb v vsebnosti lipidov pri živalih pri vseh uporabljenih koncentracijah. Podobne rezultate so dali tudi poskusi (Ribeiro *et al.*, 2001) v katerih so bile živali vrste *Porcellio dilatatus* tri tedne izpostavljene parationu in endosulfanu. V tem poskusu je prišlo do statistično značilnih razlik med kontrolno skupino živali in vsemi skupinami izpostavljenimi različnim koncentracijam parationa in endosulfana. Razlike v rezultatih gre najverjetneje pripisati tudi dolžini poskusov, ki so trajali od 3 do 6 tednov (Ribeiro *et al.*, 2001, Vink *et al.*, 1995).



Slika 4: Vsebnost lipidov pri kopenskih enakonožnih rakih *Porcellio scaber* po dvotedenski izpostavitvi imidaklopridu v hrani v koncentracijah 10 in 25 μg imidakloprida /g suhe hrane (C - kontrola).



Slika 5: Vsebnost proteinov pri kopenskih enakonožnih rakih *Porcellio scaber* po dvotedenski izpostavitvi imidaklopridu v hrani v koncentracijah 10 in 25 µg imidakloprida /g suhe hrane (C - kontrola).

Izpostavitve živali dvema koncentracijama imidakloprida v hrani (10, 25 µg /g suhe hrane) ni imela nobenega učinka na vsebnost proteinov (slika 5). Omeniti je potrebno, da ni bilo razlik v vsebnosti proteinov niti med živalmi iz terarija in kontrolno skupino. Rezultati teh poskusov so v skladu z rezultati v katerih je bil preizkušen vpliv diazinona (Stanek, 2004) in endosulfana (Ribeiro *et al.*, 2001) na vsebnost proteinov. Prvi poskus je bil izveden na mladičih vrste *Porcellio scaber* in je trajal 2 tedna, drugi poskus je trajal tri tedne in je bil izveden na vrsti *Porcellio dilatatus*. V nobenem primeru ni prišlo do sprememb v vsebnosti proteinov med živalmi, ki so bile izpostavljene omenjenim pesticidom.

4. SKLEPI

- Privzem hrane se je z višanjem odmerkov imidakloprida zmanjševal, hkrati se je asimilacijska učinkovitost poviševala v primerjavi s kontrolno skupino živali. To pomeni, da izpostavljene živali v obdobju dveh tednov izpostavitve imidaklopridu bolje izkoriščajo hrano, ki jo pojedjo.
- Imidakloprid ni vplival na aktivnost encima AChE pri nobeni od uporabljenih koncentracij, iz česar sledi, da ta parameter ne moremo uporabiti kot biomarker za ugotavljanje izpostavljenosti testnih živali imidaklopridu.
- Aktivnost encima GST je bila pri živalih izpostavljenih koncentraciji 10 ppm višja v primerjavi s kontrolo, pri koncentraciji 25 ppm pa je aktivnost encima v primerjavi s kontrolo močno padla, kar pomeni, da je verjetno prišlo tudi do drugih toksičnih učinkov, ki so vodili do zmanjšanja aktivnosti omenjenega encima.
- Izpostavljenost imidaklopridu se ni odražala na vsebnosti proteinov pri živalih pri nobeni od uporabljenih koncentracij. V primeru vsebnosti lipidov pa je nakazana rahla tendenca zniževanja njihove vsebnosti z višanjem koncentracije imidakloprida v hrani.
- Pri testiranju omenjenih parametrov smo ugotovili, da imidakloprid vpliva na presnavljanje organizmov, vendar je tak parameter v naravi težko merljiv. Vsekakor pa bi aktivnost encima glutation-S-transferaze lahko uporabili kot biomarker pri izpostavitvi neciljnih organizmov imidaklopridu v večjih koncentracijah.

5. LITERATURA

- Blight, E.G., Dyer, W.J. 1959. a rapid method for lipid extraction for use in determining vitamin E – lipid ratios. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911-917.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein – dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Cox, C., 2001 Imidacloprid, Insecticide fact sheet. *Journal of pesticide reform.* Vol. 21, No.1; 15-21.
- Drobne, D. 1997. Terrestrial isopods – a good choice for toxicity testing of pollutants in the terrestrial environment. *Environ. Toxicol. Chem.*; 6; 1159-1164.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7; 88-95..
- Fischer, E., Farkas, S., Hornung, E., Past, T. 1997. Sublethal Effects of Organophosphorus Insecticide, Dimethoate, on the Isopod *Porcellio scaber* Latr.. *Comp. Biochem. Physiol.* 116C, No. 2; 161-166.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B., 1974. Glutathione-S-Transferases, The first Enzymatic step on Mercapturic Acid Formation, *The Journal of Biological Chemistry*, 249: 7130-7131.
- Hodge, S., Longley, M., Booth, L., Heppelthwaite, V., O' Halloran, K. 2000. An evaluation of Glutathione -S-Transferase activity in the Tasmanian Lacewing (*Micromus tasmaniae*) as biomarker of organophosphate contamination. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65: 8-15.
- Ribeiro S., Sousa J.P., Nogueira A.J.A., Soares A.M.V.M. 2001. Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol. Environ. Safety*: 49; 131-138.
- Roberts T., Huston D. 1999. Metabolic Pathways of Agrochemicals, Insecticides and fungicides, part two. The royal society of chemistry, Cambridge, UK; 105-106, 111
- Stanek, K., 2004. Sensitivity and specificity of acetylcholinesterase activity in *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) as a biomarker of diazinon exposure. Master's thesis. Nova Gorica: Polytechnic, School of environmental sciences.
- Vink, K., Dewi, L., Bedaux, J., Tompot, A., Hermans, M., Van Straalen, N.M. 1995. The importance of the exposure route when testing the toxicity of pesticides to saprotrophic isopods. *Environ. Toxicol. Chem.*; 14; 1225-1232.
- Walker C.H., Hopkin S.P., Sibly, R.M., Peakall D.B. (2001) Principles of ecotoxicology. Taylor & Francis, London; 75, 102.
- Zöllner, N., Kirsch, K. 1962. Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulfophosphovanilin – Reaktion. *Z. Ges. Exp. Med.* 135. 545-561.