

**Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem  
Vegyészmérnöki Kar**

**Enzimjelzéses immunanalitikai (ELISA) rendszerek  
fejlesztése és alkalmazása**

Doktori értekezés tézisei

Hegedűs Gyöngyvér

**Témavezető:** Dr. Székács András  
tud. tanácsadó

**Konzulens:** Dr. Horváth Viola  
tud. főmunkatárs

**MTA Növényvédelmi Kutatóintézete**

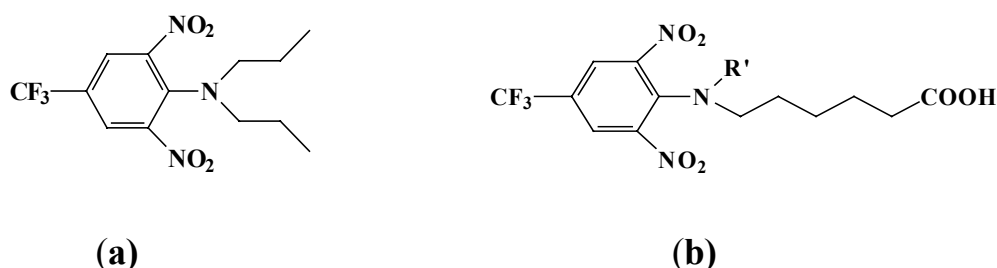
Budapest  
2003



## 1. ELISA rendszer fejlesztése trifluralin herbicid kimutatására

**A célvegyület:** A hazai forgalmazású gyomirtó szerek között fontos szerepet töltenek be a növényi sejtosztódás- és növekedésgátló hatású dinitroanilinszármazék herbicidek, s köztük is elsősorban a trifluralin. Bár az alapvegyület akut humán toxicitást nem mutat, hosszútávú szubakut kitétség mellett különféle egészségkárosító hatásokat (egyebek között vese- és májpanaszokat) hoztak összefüggésbe vele, s emellett lassú lebomlása miatt a környezetben perzisztens anyagnak minősül. Így indokoltnak látszott, hogy a vegyület kimutatására ELISA rendszert fejlesszünk ki.

**Hapténszintézis:** A trifluralin molekula alapszerkezetét első lépésben, annak érdekében, hogy az alapmolekula szerkezete minél kevésbé változzon, karboxilcsoport bevitelével módosítottuk – hapténszintézis –, három karboxiszármazékot állítottak elő, melyek a trifluralin *N*-propil-csoportja helyett 5-karboxi-pentil funkciós csoportot tartalmaztak, s emellett az alapmolekula másik *N*-propil-csoportja helyén H, metil- vagy propilcsoport található. Az **immunogén**ben a trifluralin *N*-propil-*N*-(5-karboxi-pentil)-származékát alkalmaztuk, a **felületi antigének**ben használt hapténekben pedig mind a karboxialkylcsoport, mind pedig a másik *N*-alkylcsoport hosszát változtattuk (1. ábra).



1. ábra A trifluralin herbicid (a) és a hapténmolekulák (b) kémiai szerkezete.  
R': H, Me, Pr,

**Konjugálás, a konjugálás határfoka:** A hapténszintézist követően az előállított hapténeket különböző hordozófehérjékhez (BSA, KLH) rögzítettük, majd meghatároztuk a konjugálási reakciók határfokát (azaz a beépült hapténmolekulák fajlagos mennyiségét) **UV-spektroszkópiás** és mátrixvezérelt lézerdeszorpciós/ionizációs repülési idő tömegspektrometriás (**MALDI ToF**) módszerrel. Az UV-spektroszkópiás számításokban a hapténmolekulák 380-420 nm hullámhossztartományban észlelt elnyelési maximumainál meghatározott moláris extinkciós koefficienseket ( $\epsilon = 1900 - 5300 \text{ l/mol/cm}$ ) alkalmaztuk, a MALDI ToF

vizsgálatokban pedig közvetlenül a módosított fehérjék átlagos molekulatömegéről nyertünk információt. A két egymástól független mérési módszer – UV spektroszkópia és MALDI-ToF – által kiszámított haptén/fehérje arány jó egyezést mutat, bár a spektroszkópiai mérés során szisztematikusan magasabb értékek voltak mérhetőek. Ezen jelenség egy lehetséges magyarázata, hogy a konjugálás után végzett dialízis során nem távozott el a nem kötődött haptének teljes mennyisége, s ennek következtében a spektroszkópián mérhető viszonylag magas értékeket a konjugátumban kis mennyiségben még megtalálható kötetlen haptének elnyelése okozta. A számított haptén/fehérje molarány konzekvensen arányos a konjugálási reakció során adagolt reagensarányal (az elméleti haptén–fehérje molarányok rendre 1,0, 0,2, 0,039  $\mu\text{mol}$  haptén / mg fehérje): magasabb reagensarány, magasabb haptén beépülési arányt eredményezett, bár az UV spektroszkópiás és MALDI-ToF mérések segítségével meghatározott haptén/fehérje molarány alacsonyabb reagensarány mellett jobban megközelítette az elméletileg számítható értéket.

**Immunizálás, optimalizálás:** Az *N*-(2,6-dinitro-4-trifluor-metil)-fenil-*N*-propil-6-amino-hexánsav haptén KLH-konjugátuma segítségével nyulakat immunizáltunk és többszöri véreztetés mellett szérumot nyertünk. A kapott szérumok segítségével szilárd fázison rögzített immunogén-alapú, versengő gátlási ELISA rendszert dolgoztunk ki, amely rendszert a szérum titerértékek (titer), az alkalmazott érzékenyítő antigén koncentrációja, valamint a trifluralinnal mért gátlási középértékek ( $\text{IC}_{50}$ ) és kimutatási határa (LOD) szerint optimalizáltunk. Az ELISA módszer a harmadik immunizálást követően 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  érzékenyítő antigénkoncentráció és 1:3000 szérumhígítás mellett bizonyult optimálisnak, mely körülmények között a célvegyület trifluralint 0,1 és 100 ng/ml között detektálta, s az  $\text{IC}_{50}$  érték 2,56 – 3,55 ng/ml közöttinek adódott. A kimutatást pufferben 0 - 25 ng/ml koncentráció tartományban gázkromatográfiás-tömegspektrometriás (GC-MS) módszerrel is igazoltuk, a gázkromatográfiás vizsgálathoz szilárd fázisú mikroextrakciós (SPME) mintaelőkészítést alkalmazva. Kimutattuk, hogy az ELISA és GC-MS módszerek az 1 – 10 ng/ml koncentráció tartományban közel azonos koncentrációt mérnek (a regressziós egyenes meredeksége 0,96,  $r^2 = 0,988$ ).

**Módszerstabilitás, kereszteakció:** A trifluralin kimutatására optimalizált ELISA rendszerben vizsgáltuk a módszerparaméterek (a puffer pH-ja, szerves oldószerek jelenléte, kereszteakció) hatását. Vízzel elegyedő **oldószerek** (etanol, acetonitril, aceton, dimetil-szulfoxid (DMSO), dimetil-formamid (DMF)) 2 tf% oldószertartalom alatt nem zavarták a kimutatás érzékenységét, ugyanakkor a metanoltartalom érzékenyebbnek bizonyult a rendszer: az  $\text{IC}_{50}$  érték már enyhe (0,5 tf%) metanoltartalom esetén is több mint kétszeresére növekedett, 1 – 5 tf% metanoltartalom

között nem változott, s csupán 10 tf% metanoltartalom fölött romlott tovább. A közeg pH értékét 4,65 és 9,38 között változtatva a gátlási középértékre nézve 6,4-es pH adódott optimálisnak. Az optimalizált ELISA rendszerben vizsgáltuk számos, a trifluralinnal rokon szerkezetű vegyület (köztük egyéb dinitroanilin herbicidek, hapténvegyületek és szintetikus intermedierek) **keresztreakcióját**, s a módszert a trifluralinra specifikusnak találtuk: csupán a rokon hapténszármazékok mutattak számottevő (10 – 28 %) keresztreakciót, míg **a közeli analóg herbicidek mindegyikének keresztreaktivitása 5,2 % alatti maradt**. Az antitest érzékenynek mutatkozott az anilin nitrogénatom alkilezettségére, míg az önmagában erős immunogén hatásúnak ismert aromás nitrocsoporthoz pusztán jelenléte keresztreakcióhoz nem volt elégséges.

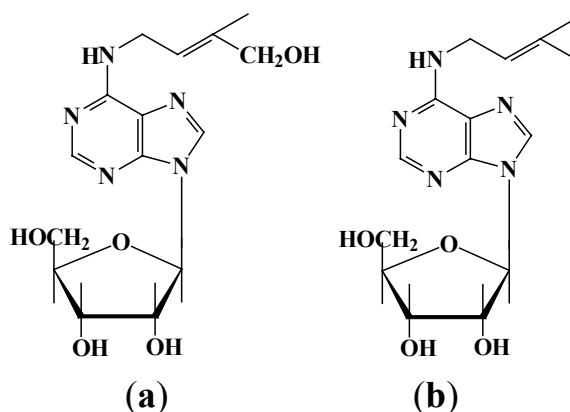
**Gyakorlati alkalmazás:** A módszert felszíni vizekben valamint zöldség ivólevelekben (sárgarépalé, sütőtöklé, paradicsomlé) is alkalmaztuk. Felszíni vizekben (a pH beállítása után) a módszer detektálásra alkalmazható, a kimutatási határ 0,85 ng/ml értéknek mutatkozott. Ez ugyan nem éri el az európai ivóvízszabvány által megkívánt érzékenységet, ám környezeti monitorozás céljaira megfelel. Szennyvizekben a jelenlévő komponensek mátrixhatása miatt a módszer – jelenlegi formájában – nem alkalmazható, a tök- valamint a paradicsomlévek esetén 10-szeres, míg sárgarépalé esetén 5-szörös hígítás szükséges az egyébként fellépő mátrixhatás kiküszöböléséhez.

## Új tudományos eredmények:

- 1.1. A hapténszintéziseket követően előállítottam a BSA, illetve KLH hordozófehérjéhez kapcsolt, különböző haptén/fehérje molarányú haptén-fehérjekonjugátumokat, UV- és tömeg spektrometriás (MALDI ToF) úton igazoltam, hogy a konjugátumokban a hapténsűrűség a számított értékeket jól megközelítő 1,02, 0.16 valamint 0,10  $\mu\text{mol}$  haptén/mg fehérje.
- 1.2. A KLH-konjugátum ellen nyert szérum segítségével érzékeny, ppb tartományba eső trifluralinkoncentráció meghatározására alkalmas ELISA rendszert fejlesztettünk ki (LOD: 0,85 ng/ml), melyet a legfőbb módszerparaméterekre (pH, oldószerek hatása) optimalizáltam, s a célvegyületre mutatott specifitását ellenőriztem. Az optimalizált rendszer előnyeként, pozitív tulajdonságaként említhető meg, hogy a dinitroanilin herbicid családon belül is nagyfokú specifitást mutat, a pH változtatást, változást széles, 4,6 – 9,4 pH tartományban képes tolerálni, a szerves oldószerek tekintetében a minta metanoltartalmát 5, etanol-, acetonitril-, aceton-, DMSO-, DMF-tartalmát 2 (V/V) %-ig jól tolerálja.
- 1.3. A rendszert SPME GC-MS technikával folytatott mérések során 1 – 10 ng/ml koncentrációtartományban validáltuk, valamint alkalmazhatóságát vizsgáltuk különböző felszíni víz- és zöldség lé mintákon, amely vizsgálatok pozitív eredményeket mutatnak.

## 2. ELISA rendszer növényi citokinin hormonok kimutatására

**A célvegyületek:** A növényeket érő környezeti stressz egyik – közvetett – indikátora a növények citokinin hormontartalma. Egyes biogén és abiogén stressztényezők hatására a növényi juvenil hormonok melyeknek legfőbb képviselői a zeatin-ribozid (ZR) és az izopentenil-adenozin (IPA) (2. ábra) szintje megemelkedik, így a hormonszint jelezheti – egyebek között – a növény fiziológiás (fiatal illetve öregedési) állapotát, patogénekkal szembeni ellenállóképességét, valamint klimatikus és környezeti körülményekhez mutatott alkalmazkodóképességét. A citokinin hormonszint műszeres mérése rendkívül körülményes feladat, amely a minta komplex volta miatt szükséges előtisztításnak köszönhetően idő- és költségigényes. A lehetséges mintaelőkészítést tovább korlátozza, hogy e hormonok hőérzékeny, könnyen bomló vegyületek. Emiatt célszerűnek látszott, hogy ELISA rendszert dolgozzunk ki e hormoncsalád kimutatására.



2. ábra A zeatin-ribozid (a) és az izopentenil-adenozin (b) képlete

**Hapténszintézis, konjugálás:** A citokinin hormonokat – irodalmi módszerek alapján – kétféle kémiai úton hordozófehérjékhez kapcsoltuk. Az egyik úton a ZR és az IPA kapcsolása során a ribozidgyűrű kémiai (nátrium-perjodátos) hasításával a molekulákon aldehidcsoportokat hoztunk létre, mely funkciós csoportokat kondenzáció és redukció útján *in situ* kötöttünk a fehérje (BSA, OVA) aminocsoportjaihoz. A másik úton a ZR vegyületet izopentenil oldalláncán elhelyezkedő hidroxilcsoportján keresztül kötöttük a hordozófehérjéhez. A hapténbeépülést a konjugátumok izoelektromos fókuszálásával követtük nyomon, nagyobb beépülési arányt észleltünk a ribozidcsoport oxidatív hasításával történő kapcsolás során.

**Immunizálás, optimalizálás** Az ovalbuminhoz kötött konjugátumokkal a trifluralin ELISA-hoz hasonló módon nyulakat immunizáltunk, s a nyulak véréből antitesteket tartalmazó szérumot nyertünk. A BSA-konjugátumokat érzékenyítő antigénként alkalmazva haptén-homológ és -heterológ felépítésű, immobilizált antigén-alapú kompetitív ELISA rendszert dolgoztunk ki. A módszert a legfőbb paraméterekre (az érzékenyítő antigén koncentrációja, szérumhígítás (titer), inkubálási idők) optimalizáltuk. Az optimalizált haptén-homológ ZR ELISA rendszer (érezkenyítő antigén: 1 µg/ml, szérumhígítás: 1:800) illetve IPA ELISA rendszer (érezkenyítő antigén: 5 µg/ml, szérumhígítás: 1:1100) érzékenysége rendre 19 ng/ml és 18 ng/ml. Az ezen értékekhez tartozó kimutatási határértékek rendre 0,4 illetve 0,7 ng/ml voltak. Ezzel szemben a haptén-heterológ ZR ELISA rendszert – amelyben gyenge szérumtitert ugyan meg tudunk állapítani, kompetitív gátlási görbét azonban ZR-ra nem adott – nem találtuk működőképesnek.

**Módszerstabilitás, keresztreakció:** Mindkét citokininre optimalizált haptén-homológ ELISA rendszer, tág határok között (pH 4,6 – 9,2 tartományban) jól tolerálja a pH változását. Számos – a hormonextrakciós mintaelőkészítésekhez használható – vízzel elegyedő szerves **oldószer** (metanol, etanol, acetonitril, acetone, DMSO, DMF) hatását is vizsgáltuk a hormonkimutatás érzékenységére, és megállapítottuk, hogy az IC<sub>50</sub> érték 8 tf% metanol- illetve etanoltartalomig egyik optimalizált ELISA rendszerben sem emelkedett szignifikánsan. A többi oldószer azonban már 2 tf% koncentráción is jelentős mértékű jelintenzitás-csökkenést okoz. Különböző – természetes és szintetikus – citokininek (zeatin, 2-izopentenil-adenin (2-iP), benzil-adenin, kinetin) **keresztreakcióját** vizsgálva megállapítottuk, hogy mindkét ELISA rendszer meglehetősen szelektív: a ZR ELISA rendszer csak a ZR és a zeatin, míg az IPA ELISA rendszer csak az IPA és a 2-iP hormonokat mutatta ki számottevő érzékenységgel. E megfigyelés mind elméleti, mind gyakorlati szempontból jelentős: egyrészt azt mutatja, hogy egyetlen hidroxilcsoport jelenléte vagy hiánya az immunogénben (v.ö. ZR – IPA) döntő mértékben megváltoztatja a szérum specifikációs tulajdonságait, másrészt pedig azt, hogy a két ELISA módszer segítségével a citokinin hormoncsaládon belüli a két hormontípust egymás mellett is meg tudjuk határozni.

**Gyakorlati alkalmazás:** A citokininek kimutatását célzó ELISA rendszerek optimalizálását kezdetben hidrogén-peroxidáz jelzőenzim felhasználásával végeztük, remélve, hogy a sorozatos mosási lépéseknek köszönhetően a teszt utolsó lépésében alkalmazott jelzőenzim aktivitását nem befolyásolja a minta peroxidáz aktivitása. Azonban a várakozásoktól eltérően az ELISA rendszereket növényi mintákon alkalmazva azt tapasztaltuk, hogy jelentős zavaró hatást gyakorol a módszerre, emiatt az immunanalitikai jelzőenzimet peroxidázról alkalikus foszfatázra cseréltük. Az

enzimcserével sikerült a korábban fellépő mátrixhatást kiküszöbölni. A metanolos növényi extraktum-mintákat az ELISA kimutatáshoz pufferrel hígítani kellett, ami miatt az IPA hormon – melynek fiziológiás szintje alacsonyabb – szintjét natív növényekben nem minden esetben tudtuk meghatározni, a ZR szintje azonban minden esetben mérhetőnek bizonyult. ZR ELISA-val minden egyes vizsgált minta esetében kimutatható hormonszint-emelkedést detektáltunk a natív növények, valamint ezek genetikailag módosított, citokiningéneket magasabban expresszáló változatai között, míg emelkedett IPA koncentráció a genetikailag módosított növények közül csak a CTKm mutánsban volt mérhető.

### **Új tudományos eredmények:**

- 2.1. A citokinin kimutatására szolgáló ELISA-fejlesztés során a két célhormont (zeatin-ribozid, IPA) BSA, OVA hordozófehérjéhez konjugáltam, s a kapcsolás határfokát SDS-PAGE módszerrel igazoltuk.
- 2.2. A KLH-konjugátum ellen nyert szérum segítségével kétféle, a citokinin hormonok két alcsoportjának kimutatására alkalmas, érzékeny, – s az inkubációs idő rövidítését célzó kísérletek eredményeképpen – gyors rendszereket sikerült kifejleszteni; a zeatin-ribozid rendszerben  $IC_{50}$  érték optimális rendszerparaméterek mellett 19 ng/ml, az IPA rendszerben 18 ng/ml. A két ELISA rendszert a főbb módszerparaméterekre (pH, szerves oldószertűrés, inkubációs idők) optimalizáltam, és megállapítottam, hogy a rendszerek pH (pH 4,6 – 9,2 tartományban) és vízdoldható szerves oldószer toleranciája ( a metanolt és az etanol mindkét rendszer 8 (V/V) % -ig, az acetont, acetonitrilt, DMF-et és DMSO-t 2 (V/V) % -ig képes az  $IC_{50}$  érték növekedése nélkül elviselni), valamint hormoncsaládon belüli specifikussága (a két citokinin egymás mellett, keresztreakció nélkül, kvantitatív módon meghatározható) igen kedvező. A kiindulási torma peroxidáz jelzőenzim alkalikus foszfatázra való cserélésével növényi mintákban a – korábban fellépő – mátrixhatást sikeresen kiküszöböltük, s így vizsgálataimban igazoltam, hogy a módszer alkalmas valódi növényi minták citokininkoncentrációjának meghatározására.



## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

ELISA – enzimjelzések immunanalitika	lézerdeszorpciós/ ionizációs
BSA – marha szérum albumin	repülési idő tömegspektrometria
KLH – hemocianin (kürtöcsigából)	GC-MS – gázkromatográfia- tömegspektrometria
OVA – ovalbumin	SPME – szilárd fázisú mikroextrakció
IC <sub>50</sub> – gátlási középérték (az immunoassay maximális jelintenzitásához képest 50%-os csökkenést okozó gátlószer- koncentráció)	DMSO – dimetil-szulfoxid
MALDI ToF MS – mátrixvezérelt	DMF – dimetil-formamid
	IPA – izopentenil-adenozin
	ZR – zeatin-ribozid

## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom a Varga József Alapítványnak, hogy számomra doktori ösztöndíjat biztosított.

Köszönöm témavezetőmnek, **Dr. Székács Andrásnak** szakmai irányítását, a dolgozat végső formájának eléréséhez nyújtott segítségét.

Szeretnék köszönetet mondani az MTA Növényvédelmi Kutatóintézet mindazon dolgozójának, akik segítettek doktori dolgozatom elkészülését.

## A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. **Hegedűs, Gy.**; Béla, I. and Székács, A. (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Anal. Chim. Acta*, **421**, 121-133.
2. Székács, A.; **Hegedűs, Gy.**; Tóbiás, I.; Pogány, M. and Barna, B. (2000) Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. *Anal. Chim. Acta*, **421**, 135-146.

## A PÁLYÁZÓ TELJES PUBLIKÁCIÓS LISTÁJA

Szakkikkek tudományos folyóiratokban:

1. H.M. Le; **Gy. Hegedűs** and A. Székács (1998) Differential detection of *N*-heterocyclic compounds and their *N*-methylated derivatives by immunoanalysis. *Acta Biologica Hungarica*, **49**, 455-462. [IF 0,219]
2. **Gy. Hegedűs**; I. Bélaï and A. Székács (2000) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. *Anal. Chim. Acta*, **421**, 121-133. [IF 1,894]
3. A. Székács; **Gy. Hegedűs**; I. Tóbiás; M. Pogány and B. Barna (2000) Rapid immunoassays for plant cytokinins as tools for environmental stress and disease resistance. *Anal. Chim. Acta*, **421**, 135-146. [IF 1,894]
4. V. Krikunova; **Gy. Hegedűs**; H.M. Le; L. Jouravleva; S. Eremin; M. Natangelo; E. Benfenati and A. Székács (2002) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide propanil. *Int. J. Envir. Anal. Chem.*, **82**, 865-878. [IF 0,797]
5. **Gy. Hegedűs**; V. Krikunova; I. Bélaï; S. Eremin and A. Székács (2002) An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of acetochlor. *Int. J. Envir. Anal. Chem.*, **82**, 879-891. [IF 0,797]

[Σ IF 5,585]

Konferenciaelőadások és poszterek:

1. H.M. Le, **Gy. Hegedűs** and A. Székács (1998) Immunodetection of *N*-heterocyclic compounds. Poster presented at the *4th International Conference on the Role of Formaldehyde in Biological Systems - Methylation and Demethylation Processes* (Budapest, Hungary, July 1-4, 1998)
2. A. Székács, **Gy. Hegedűs**, D. Knopp and R. Niessner (1998) A modified enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for polyaromatic hydrocarbons. Poster presented at *The Immunochemistry Summit VII and the 3rd Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis* (Las Vegas, Dec. 1-3, 1998)
3. **Gy. Hegedűs**, H.M. Le, A. Székács, A. Krasnova, S. Eremin, M.-C. Hennion, M. Natangelo and E. Benfenati (1999) Inter-laboratory trials of GC-MS versus immunoanalytical detection of environmental pollutants. Poster presented at *The 9th Symposium on Handling of Environmental and Biological Samples in Chromatography* (Porto, Portugal, Oct. 10-13, 1999)
4. **Gy. Hegedűs**, I. Bélaï and A. Székács (1999) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the herbicide trifluralin. Lecture presented at *The 4th Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis* (Mao, Spain, Dec. 1-3, 1999)

5. **Gy. Hegedűs**, A. Székács, I. Tóbiás and B. Barna (1999) Immunoassays for plant cytokinins: rapid monitoring methods of environmental stress. Poster presented at *The 4th Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis* (Mao, Spain, Dec. 1-3, 1999)
6. **Gy. Hegedűs**, A. Székács, I. Tóbiás and B. Barna (2000) Immunanalitikai rendszerek kifejlesztése növényi hormonok meghatározására. Előadás a *46. Növényvédelmi Napokon* (Budapest, Feb. 22-23, 2000), Összefoglalók, 99. old.
7. **Gy. Hegedűs**, I. Béla és A. Székács (2000) Enzim-jelzéses immunoassay (ELISA) fejlesztése trifluralin kimutatására. Előadás a *Vegyészkonferencia 2000* rendezvényen (Debrecen, Jul. 5-7, 2000)
8. **Gy. Hegedűs**, Székács, A., Le, H.M., Krikunova, V., Eremin, S., Natangelo, M. and Benfenati, E. (2000) Development of an propanil. Poster presented at *The 4th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry* (Visegrád, Sep. 14-19, 2000)
9. **Gy. Hegedűs**, I. Béla and A. Székács (2000) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for monitoring the herbicide trifluralin. Poster presented at *The 4th Euroconference on Environmental Analytical Chemistry* (Visegrád, Sep. 14-19, 2000)
10. A. Székács és **Gy. Hegedűs** (2001) Növényvédő szer-maradékok meghatározása műszeres és immunanalitikai módszerekkel. Előadás a *47. Növényvédelmi Tudományos Napok* rendezvényen (Budapest, Feb. 27-28, 2001).
11. A. Székács, G. Novák és **Gy. Hegedűs** (2001) Növényvédő szer hatóanyagok meghatározása műszeres és immunanalitikai módszerekkel. Előadás a *XV. Országos Környezetvédelmi Konferencia* rendezvényen (Siófok, Sep. 11-13, 2001)