

PROF. DR. G. M. GHIDINI

Libero docente in Zoologia presso l'Università di Genova

Saggio biologico di insetticidi per contatto con il metodo degli attogrammi.

Ho pubblicato recentemente in questo « Bollettino » ⁽¹⁾ la descrizione di un piccolo attometro che si è rivelato utile nella tecnica di laboratorio per lo studio teorico ed applicato delle attività motorie degli Insetti.

Questo apparecchio è costituito, nella sua forma originaria, da un leggerissimo rullo il cui asse d'acciaio pesca, da un lato, in un bagno di mercurio; dall'altro lato, un po' prima dell'estremità, porta saldata una rosa metallica dentata di almeno 4-8 punte che, alternativamente, vengono a pescare, quando gli insetti fanno ruotare il rullo, entro una bacinella contenente mercurio.

I due bagni di mercurio sono collegati da un reoforo di corrente continua, cui è inserita una elettrocalamita. Così, ogniqualvolta i denti della rosa entrano nel mercurio della bacinella, il circuito si chiude e l'elettrocalamita entra in funzione per far muovere una penna scrivente amplificatrice.

Poichè, per far muovere il rullo, gli insetti, prescelti come testi, devono essere vincolati ad un supporto, avevo proposto alcune modalità per il loro parziale ancoraggio.

Tuttavia, insoddisfatto dal veder vincolati gli insetti a tali supporti che ne limitavano e ne alteravano le capacità motorie, ho pensato di modificare alquanto l'apparecchio in maniera da lasciar godere ai testi una larga libertà di movimento.

Per questo motivo ho sostituito al rullo rotante una cameretta cilindrica di leggerissima celluloida ampiamente forellata per permettere gli scambi gassosi. Tale camera (fig. I), solidale con il suo asse di acciaio è destinata a contenere gli insetti in esame, che, con i loro spostamenti e per il loro peso, la fanno ruotare in modo da occuparne sempre la parte più bassa.

⁽¹⁾ Ghidini G. M. - *L'impiego degli attogrammi nel saggio biologico degli insetticidi.* - Boll. Ist. Entom. Bologna, 1947, XVI, 279-290.

La costruzione di queste microcamere di celluloido è molto facile ⁽¹⁾, ma l'esecuzione deve esserne tanto più accurata quanto più leggero è il teste che si vuol usare per gli esperimenti.

Per dare subito un'idea della sensibilità cui si può giungere, dirò che, correntemente, uso come testi singoli individui operai di *Formica rufa pratensis* Retz., che costituiscono un ottimo materiale di laboratorio.

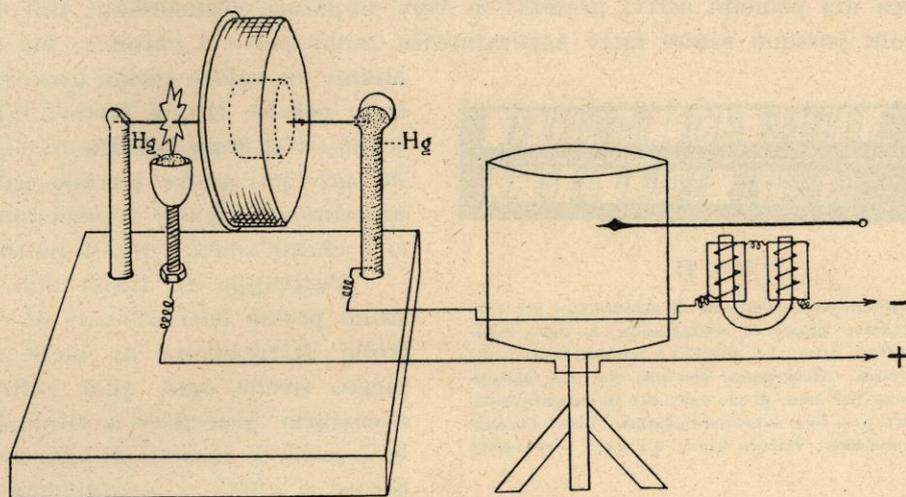


FIG. I.

Schema della disposizione dell'attometro a camera rotante.

Con l'impiego di microcamere rotanti la registrazione delle attività cinetiche degli insetti è assai più regolare, perchè gli esemplari in esame non

⁽¹⁾ Per costruire queste microcamere si possono seguire procedimenti diversi. Io mi comporto nel modo seguente: da un film cinematografico ripulito dalla gelatina ritaglio marginalmente una striscia larga un centimetro; tale striscia risulta così già regolarmente forata; attorno ad un tubo di ottone di cm. 3,5-4 di diametro, che serve da calibro, avvolgo la strisciolina e la saldo in modo da ottenere un anello; ritaglio poi da una lamina sottile di celluloido un disco di raggio uguale al raggio esterno del tubo di ottone; facendo poi sporgere di un mezzo millimetro l'anello di celluloido, preparato prima, dal margine del tubo di ottone, sistemo all'interno il disco di celluloido saldandolo all'anello per mezzo di quattro goccioline di adesivo poste a 90° l'una dall'altra.

Otengo così una prima scatola cilindrica la cui base viene infilata sull'asse di acciaio incollandola ad un piccolo sughero già centrato sull'asse. Ritaglio poi un altro disco di celluloido, ma di raggio leggermente più grande del precedente; esso viene a sua volta infilato sull'asse in modo da formare il coperchio della parte costruita prima alla quale è mantenuto aderente mediante un piccolo tappo di gomma. Per essere completo dirò che ho trovato opportuno costruire all'interno della scatola una parete sussidiaria coassiale con la parete esterna della scatola, in modo da delimitare un corridoio marginale nel quale gli insetti sono obbligati a spostarsi senza poter risalire lungo le pareti della scatola.

Una volta che la camera è montata, per introdurre gli insetti basta scostare lievemente il disco di celluloido di raggio maggiore ed introdurre nel corridoio il teste voluto.

subiscono eccitazioni di sorta e non sono sollecitati a liberarsi come quando vengono vincolati ad un supporto.

Indipendentemente dall'impiego per ricerche di fisiologia generale (influenza dell'umidità, di luci monocromatiche, di sostanze alimentari eccitanti od ipnotiche, di luminosità, ecc.) l'apparecchio si è dimostrato veramente utile per lo studio comparato di vari contatticidi e per la titolazione biologica dei principi attivi presenti in vari preparati commerciali; tali titolazioni possono essere fatte naturalmente anche per via chimica, ma esse



FIG. II.

Esempio di corrispondenza di attogrammi per concentrazione uguale di contatticida; la lieve differenza fra il primo e il secondo è dell'ordine di 1 minuto circa. Attogrammi ottenuti con una concentrazione per cmq. di gr. 0,000,010 di esaclorocicloesano t. p. al 13% di isomero gamma. (Teste: *Formica rufa pratensis*; camera diam. 3,5 cm.; 8 contatti).

hanno un valore spesso assai relativo perchè troppi fattori influiscono ad alterare l'azione biologica dei prodotti anche quando hanno un contenuto uguale di principio attivo chimicamente determinato (1).

Purtroppo in Italia non esistono presso enti ufficiali di controllo attrezzature di facile impiego, sicchè ogni qual volta è necessario procedere a titolazioni biologiche di insetticidi ogni ricercatore si affida a metodi empirici

a volte così lontani da ogni logico criterio da lasciare assolutamente scettici sul risultato finale dell'indagine.

Ma, anche conducendo le ricerche comparative con i metodi classici, l'andamento dei fenomeni intossicativi non può essere sempre seguito in tutte le sue fasi con la dovuta accuratezza.

Riesce soprattutto difficile, e ben lo sa chi si occupa di questi problemi, porre un termine fisso all'osservazione delle singole prove; alcuni scelgono il momento in cui gli insetti entrano in supinazione (per quanto a volte gli animali si riprendano ed abbiano ulteriori fasi cinetiche anche intense); altri scelgono il momento in cui cominciano ad insorgere turbe locomotorie, cioè l'inizio di quella fase intossicativa che ho proposto di chiamare «fase anomodromica» (2); altri il momento in cui l'animale entra in acinesi e così via. Nessuna di queste fasi del quadro intossicativo è tuttavia ben determinabile e spesso, anche per un ampio variare nella concentrazione dei principi attivi, risultano confuse, se paragonate fra loro, perchè l'errore probabile di osservazione è troppo grande.

Con l'impiego dell'attometro a camera rotante, sistemata convenientemente per ricerche di questo genere (cioè accollando una strisciolina di carta

(1) Musgrave A. J. — Nature, n. 4112, vol. 162, 1948, 196.

(2) Ghidini G. M. — *Eccezionale comportamento di Blaps gibba verso alcuni contatticidi.* — In corso di stampa nel Bollettino della Società Entomologica Italiana.

— di cui si conosce il coefficiente di assorbimento per un determinato solvente e trattata con soluzione nota di contatticida — nella parete interna del corridoio della camera in modo che gli insetti spostandosi sono obbligati a camminarvi sopra), cessa di aver interesse la scelta della fase finale di osservazione; basta attenersi al momento in cui l'attogramma non registra più alcun movimento durante un lasso di tempo relativamente lungo.

Non è da dire che l'animale in esperimento sia morto con il cessare della registrazione; la morte reale può sopravvenire anche molte ore dopo. Ciò



FIG. III.

Attogrammi ottenuti usando come testi esemplari isolati di operai di *Formica rufa pratensis*. — Camera diam. 3,5 cm. — 8 contatti - (ogni linea completa = un'ora di attività). — 1, con una concentrazione di gr. 0,000.001.8 per cmq di gammaesaclorocicloesano; 2, con una concentrazione di gr. 0,000.018 per cmq di DDT della ditta Sherwin-Williams, U. S. A.; 3, con una concentrazione di gr. 0,000.018 per cmq di DDT t. p. della ditta American Cyanamid Company U. S. A.. Si osservi la quasi identità fra le prime due ore degli attogrammi 2 e 3.

che interessa è il fatto che l'insetto in esame non sia più in grado, ad un certo punto, di compiere movimenti di tale ampiezza da riuscire a spostare la camera; il che corrisponde in genere ad una fase molto avanzata di supinazione in cui solo i tarsi e le antenne presentano tremori preagonici di modesta ampiezza.

Da numerosissime esperienze è risultato che per microcamere uguali e per testi della stessa specie (opportunamente scelta per evitare variazioni dovute all'età degli individui) i risultati sono costanti e le piccole differenze sono attribuibili a variazioni individuali del tutto trascurabili.

Se si osservano i due attogrammi della fig. II, relativi a due esemplari operai di *Formica rufa pratensis* Retz. trattati con dosi uguali di contatticida nelle stesse condizioni ambientali ed in cui la piccola differenza è dell'ordine di circa 1 minuto primo, apparirà evidente che la risposta dell'apparecchio è assolutamente paragonabile in entrambi i casi.

Non sarà inutile far presente che le diverse fasi cinetiche dei testi, una volta che siano state registrate da una serie di attogrammi, possono essere facilmente espresse anche in curve (curve cinetiche di intossicazione).

Il sistema da me usato è certo passibile di miglioramento, ma si è dimostrato abbastanza soddisfacente. Ottenuto l'attogramma di un'ora di attività, lo divido in quattro parti uguali, di cui ognuna corrisponde così a

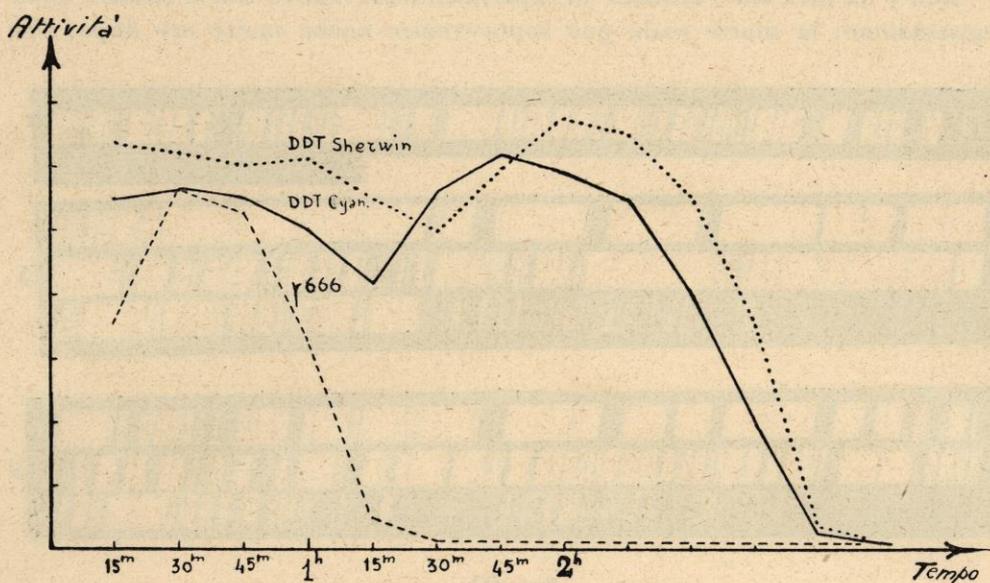


FIG. IV.

Curve cinetiche di intossicazione ricavate dagli attogrammi della figura precedente con il metodo descritto nel testo.

15 minuti di attività. Con l'uso di una carta millimetrata misuro, per ogni quarto i millimetri di inattività nel pezzo di attogramma considerato (spazi scuri) ed il valore ottenuto lo sottraggo dalla lunghezza totale del quarto di attogramma espressa in millimetri. Riporto poi il valore trovato come ordinata di due assi cartesiani in corrispondenza di ascisse di valore 15', 30', 45', 60', ecc.

Riunendo i punti così determinati ottengo curve cinetiche il cui studio rappresenta una possibilità di indagine fino ad oggi non realizzata in campo entomologico.

Da un accurato studio comparativo di queste curve, abbastanza caratteristiche per ogni singolo composto, è possibile indurre interessanti considerazioni sulla natura delle sostanze in esame e sulle loro concentrazioni relative.

Riporto, ad esempio, nella fig. III tre attogrammi e nella fig. IV le relative curve cinetiche ottenute sempre con il teste *Formica rufa pratensis*: la prima per una concentrazione di gammaesaclorocicloesano tecnicamente puro

di gr. 0,000.001.8 per cmq. (circa 2 γ); le altre due con una concentrazione di gr. 0,000.018 per cmq. (circa 20 γ) di DDT tecnicamente puro prodotto da due case americane diverse. La concentrazione delle prove con DDT è dunque 10 volte maggiore che nella prova con gammaesaclorocicloesano.

Nella fig. IV sono riportate le curve cinetiche ricavate da tali attogrammi. Appare da queste curve il diverso comportamento del teste di fronte ai due

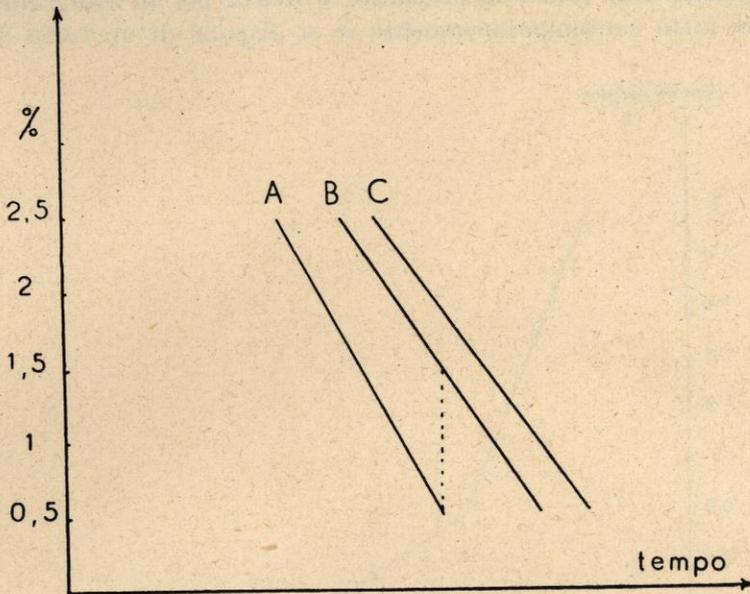


FIG. V.

Schema del sistema di titolazione di due campioni di contatticida a differente percentuale di principio attivo (cfr. il testo).

prodotti: una grande sensibilità di fronte all'esaclorocicloesano con precoce fase eccitativa, seguita da brusca e continua caduta di attività; in entrambe le prove con DDT si ha invece una fase eccitativa iniziale cui fa seguito una caduta di attività; dopo di questa si ha una nuova e più intensa fase di eccitazione (che corrisponde alla fase anomodromica) che porta gradualmente allo stato di supinazione. Da notare le lievi differenze fra la prima e la seconda curva ottenuta con DDT malgrado le quali la configurazione generale della curva non cambia di aspetto.

Non sarà fuori luogo precisare che queste curve valgono per singole specie e non si potrà generalizzare ad altre il loro significato fino a che l'analisi di laboratorio non lo giustifichi.

Ma oltre alle considerazioni di cui sopra è possibile, mediante l'impiego comparativo di attogrammi, la titolazione biologica del contenuto attivo di vari campioni di uno stesso prodotto.

Mi limiterò, per essere chiaro, ad un semplice esempio considerando due

soli campioni a diverso contenuto di principio attivo: siano contraddistinti dalle lettere A e B.

Per effettuare la titolazione si preparano due soluzioni diversamente diluite (ad es. una al 2,5 e l'altra allo 0,5%) tanto di A che di B; identiche soluzioni si preparano pure di un campione standard a percentuale nota di principio attivo.

Per ognuna delle soluzioni preparate si ricava poi un attogramma, il che può essere fatto contemporaneamente se si dispone di un certo numero di

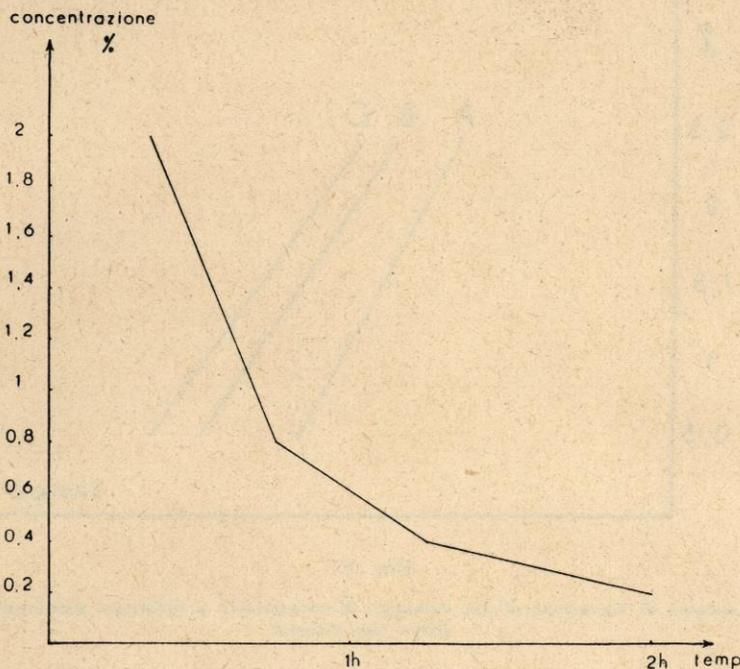


FIG. VI.

Curva di tossicità, ottenuta usando come teste *Formica rufa pratensis*, con un campione standard al 15% di gammaesaclorocicloesano t. p.

apparecchi. La durata in ore o in minuti degli attogrammi viene espressa come ascissa di due assi cartesiani le cui ordinate corrispondano alle concentrazioni.

Riunendo poi i punti corrispondenti alle due determinazioni di ogni campione si otterranno tre rette più o meno convergenti verso l'asse delle concentrazioni, in quanto con il crescere di queste i tempi tendono ad identificarsi.

Se gli estremi dei tre segmenti A, B, C (fig. V) corrispondono ai valori delle tre coppie di soluzioni preparate, essendo quelli di C relativi al campione standard, apparirà evidente che il campione A è biologicamente più attivo e che quello B lo è meno dello standard.

Poichè il segmento C rappresenta approssimativamente come variano,

con il variare delle concentrazioni di principio attivo, i tempi necessari ad ottenere un uguale stadio intossicativo, così ci si potrà riferire ad esso per ottenere, con un facile calcolo, un valore molto approssimato della concentrazione in principio attivo degli altri campioni.

Nel caso particolare del grafico di fig. V poichè una concentrazione allo 0,5% del campione A ha lo stesso effetto di una concentrazione all'1,5% di C che si sa essere al 2% in principio attivo, si potrà dire che la concentrazione di principio attivo in A è tre volte maggiore, cioè del 6%:

Applicando il calcolo si avrà:

$$1,5 \text{ (quant. \% di soluto)} : X \text{ (princ. att.)} = 100 : 2$$

da cui $X = 0,03$;

$$0,5 \text{ (quant. \% di soluto di A)} : 0,03 = 100 : X$$

da cui $X = 6$.

L'esattezza della titolazione potrà naturalmente essere assai maggiore se, invece di limitarsi a determinare i valori di efficacia biologica di due sole soluzioni per ogni campione, si determineranno serie decrescenti di soluzioni.

Si potranno così ottenere curve di tossicità (da non confondere con le curve di intossicazione o cinetiche di cui si è detto prima). Ne riporto una ottenuta con un campione standard al 15% di gammaesaclorocicloesano tecnicamente puro per *Formica r. pratensis*. Da notare che la curva raffigurata è quella ottenuta direttamente dai dati forniti dagli attogrammi.

Sono stato indotto a pubblicare questa nota perchè mi sembra estremamente utile unificare il più possibile i metodi di indagine e di controllo nel campo degli insetticidi per contatto, sia perchè i risultati delle indagini condotte in centri diversi possano essere il più possibile concordanti e sia perchè il frutto di tali indagini possa essere graficamente documentabile in modo che i risultati sperimentali siano suscettibili di comparazione, e non si disperdano invece e restino così difficilmente utilizzabili come purtroppo avviene ora.