

29. Felice VEROLINI. — Sul meccanismo di azione del DDT sulle larve di Culicidi.

Riassunto. — Ricorrendo ad una tecnica particolare, che impediva l'alimentazione delle larve di *Culex*, l'A. ha studiato il meccanismo di azione del DDT come larvicida mettendo in evidenza che:

- 1) Il DDT agisce sulle larve di Culicidi non solo per contatto ma anche, e principalmente, per ingestione;
- 2) Le ninfe di *Culex* non risentono affatto l'azione tossica del DDT dimostrandosi del tutto refrattarie;
- 3) Mentre l'insetto alato della specie *Culex pipiens autogenicus* della regione di Latina è naturalmente resistente all'azione del DDT, le larve della stessa specie presentano invece una elevata mortalità.

Résumé. — Par l'emploi d'une technique particulière qui empêchait l'alimentation des larves de *Culex*, l'A. a étudié le mécanisme d'action du DDT comme larvicide, mettant en évidence que:

- 1) le DDT agit sur les larves des Culicidés non seulement par contact mais aussi, et principalement, par ingestion;
- 2) les nymphes de *Culex* ne ressentent point l'action toxique du DDT, se montrant complètement réfractaires;
- 3) tandis que l'insecte ailé de l'espèce de *Culex pipiens autogenicus* de la région de Latina est naturellement résistant à l'action du DDT, les larves de la même espèce présentent par contre une mortalité élevée.

Summary. — The A., employing a particular technique that prevented the nourishment of the larvae of *Culex*, has studied the mechanism of the action of DDT as larvicide, making evident that:

- 1) the DDT acts on the larvae of Culicidae not only by contact but also and especially by ingestion;
- 2) the pupae of the *Culex* do not feel the poisoning effect of DDT at all, appearing completely refractory to it;
- 3) while the winged insect of the species *Culex pipiens autogenicus* from the region of Latina is obviously resistant to the action of DDT, the larvae of the same species show instead a high mortality.

Zusammenfassung. — Der V. hat den Mechanismus der Wirkung des DDT als Larventoeter durch Anwendung einer besonderen Technik, welche die Ernährung der Culexlarven verhinderte, studiert und stellt uns vor Augen dass:

1) das DDT auf die Larven der Culiciden nicht nur durch Beruehrung wirkt, sondern hauptsaechlich auch durch Saugeinfuehrung.

2) die Puppen der Culex keineswegs die giftige Wirkung des DDT verspueren, da sie sich diesem vollkommen entziehen.

3) waehrend das gefluegelte Insekt der Art *Culex pipiens autogenicus* aus der Gegend von Latina von Natur aus gegen die Wirkung des DDT widerstandsfähig ist, zeigen die Larven der gleichen Art dagegen eine hohe Sterblichkeit.

L'uso del DDT è stato esteso con successo anche alla fase antilarvale della lotta contro gli anofeli. Le concentrazioni e le modalità di uso sono già state definite ed applicate alla pratica. Ma il nuovo ambiente nel quale il DDT viene ad agire pone un nuovo quesito. Nel mezzo acquatico in cui si trova disperso, il DDT non solo giunge a contatto della cuticola della larva, ma, dato che essa non esercita alcuna selezione sul materiale di cui si nutre, viene introdotto nell'intestino. Si presenta quindi il problema di distinguere se l'attività larvicida del DDT sui Culicidi sia legata alla sua nota azione di contatto, o se invece, dato che esso viene ingerito, non sia da riferire ad una vera e propria azione tossica che esso esplica nell'interno dell'intestino come un qualsiasi altro veleno. Se il DDT, usato come larvicida, agisce solo per contatto o solo per ingestione o in tutti e due i modi costituisce l'oggetto di studio di questa nota.

Per risolvere sperimentalmente il problema se l'insetticida agisca solo per contatto occorreva perciò disporre di un certo numero di individui i quali, introdotti in un ambiente trattato con DDT, fossero posti in condizione di non ingerire cibo nè altro materiale nell'interno dell'intestino, in modo da poter escludere sicuramente l'assorbimento intestinale come responsabile in toto od in parte della mortalità delle larve.

Per realizzare questa condizione ci si è serviti di una tecnica che già Wigglesworth aveva adoperato nel 1933 per alcuni suoi studi sulle funzioni delle branchiotrachee dei Culicidi. La tecnica consiste nell'effettuare

una legatura tra testa e torace della larva in corrispondenza del collo (vedi fig. 1), in modo tale da chiudere definitivamente il transito del cibo.

Raggiungere questa condizione costituiva un problema delicato in quanto oltre ad evitare i traumi durante la legatura, occorreva stringere in modo tale da impedire l'ingresso del cibo senza d'altra parte uccidere la larva. Mediante sottilissimi fili di seta si è riusciti ad effettuare una legatura di grado tale da permettere alla larva di sopravvivere per oltre 24 ore senza poter in alcun modo alimentarsi. Per avere la sicurezza che questa ultima condizione fosse stata raggiunta si è introdotto un certo

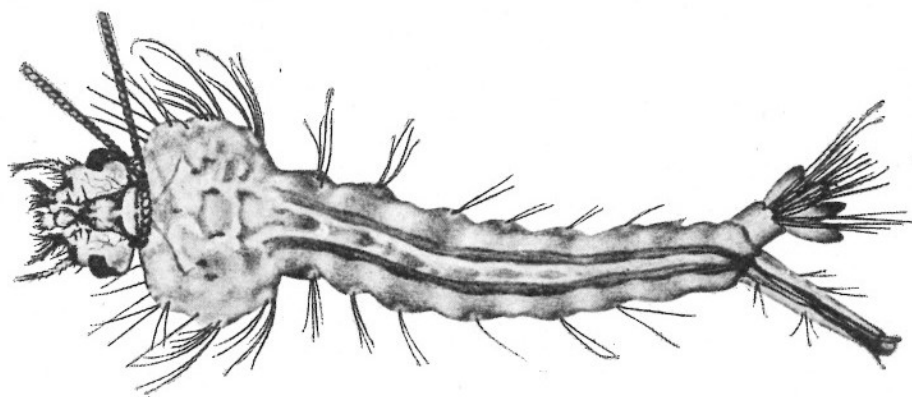


FIG. 1.

numero di larve legate secondo la tecnica ricordata, in un piccolo recipiente trattato con verde di Parigi, veleno che agisce per ingestione. Mentre i controlli liberi di alimentarsi morivano dopo circa un'ora, le larve legate sopravvivevano senza risentire alcun danno e la dissezione non rivelava tracce di verde di Parigi nel lume intestinale.

Risolto questo problema tecnico, si è iniziato l'esperimento. Le larve su cui si è studiato appartenevano alla specie *Culex pipiens autogenicus*. Venivano scelti individui appena entrati nel iv stadio di vita larvale per poter eliminare la probabilità di sperimentare su larve che trovandosi molto vicine alla ninfosi erano in condizioni di alimentazione ridotta o che si trasformassero in ninfe durante il corso dell'osservazione.

Per ogni esperimento si sono adoperati contemporaneamente tre gruppi di larve. Un primo gruppo comprendeva individui con la legatura e quindi in condizioni di non introdurre materiale nell'intestino; queste larve si ponevano in un recipiente trattato con DDT. Un secondo gruppo era costituito da individui non legati e perciò liberi di alimentarsi, posti in recipiente ugualmente trattato con DDT. Il terzo gruppo costituiva

il controllo e comprendeva larve legate e poste in acqua semplice, allo scopo di stabilire quanto incidesse nella mortalità la condizione sperimentale determinata dalla legatura.

I recipienti adoperati erano vasi di terracotta del diametro di 15 cm simili a quelli che comunemente si adoperano in laboratorio per l'allevamento dei Culicidi. Si è adoperato DDT puro, finemente polverizzato e ridotto in minutissimi cristallini, per eliminare i solventi che potevano, agendo per proprio conto, modificare i risultati. La fine polvere di DDT, posta nei recipienti descritti nella quantità di un grammo in 250 cm³ di acqua, si situava parte al fondo e parte alla superficie dell'acqua. In queste condizioni ed alla temperatura ambientale di 20-22° si è condotto l'esperimento. Nella tabella seguente sono riportati i risultati ottenuti, tenendo presente che essi rappresentano la somma di osservazioni parziali e successive in modo da condurre l'osservazione su larve che erano state sottoposte alla legatura quasi contemporaneamente.

	larve legate in acqua + DDT	larve libere in acqua + DDT	larve legate in acqua
N. larve adoperate	116	116	116
N. larve morte	70	86	28
Larve morte con DDT nell'intestino	11	86	
Larve trasformate in ninfe (*) . . .		8	
percentuale di mortalità	60 %	74 %	24 %

(*) Le ninfe lasciate in DDT hanno proseguito il loro sviluppo completo fino all'insetto alato.

La dissezione delle larve morte ha mostrato costante il reperto di DDT nell'intestino degli individui non legati mentre solamente in undici di quelli legati si è ritrovato DDT nell'intestino; non essendo stata praticata, evidentemente una legatura sufficientemente stretta.

L'osservazione della tabella mette in evidenza, come fatto principale, che dei tre gruppi in esperimento, la mortalità più elevata, del 74%, è quella riscontrata nelle larve libere e poste in DDT, mentre la mortalità delle larve legate e poste in DDT è del 60%. La mortalità delle larve legate e poste in acqua non trattata con DDT ed usate come controllo è del 24%.

Considerando che una parte della mortalità delle larve legate e poste in DDT sia perciò attribuibile al trauma ed alle condizioni di sofferenza

determinate dalla legatura e che undici delle larve legate e morte contenevano DDT nell'intestino a causa della legatura non sufficientemente stretta, si deve ritenere probabile che la differenza tra le percentuali di mortalità in gruppi di larve legate e non legate, sottoposti al trattamento con DDT, debba essere più elevata.

Da queste constatazioni si può desumere che, per le larve, all'azione di contatto il DDT aggiunge quella per ingestione che si dimostra anche più intensa.

Per il gruppo di larve legate, poichè la legatura ha impedito l'introduzione della sostanza tossica nel canale alimentare (e di ciò se ne è avuta conferma con la dissezione che ha rilevato l'assenza di cristallini di DDT nell'intestino), si deve ammettere che il DDT abbia esercitato la sua azione penetrando nell'interno dell'organismo attraverso la superficie esterna della larva, con un meccanismo del tutto simile a quello che si ammette per l'insetto adulto. Anche in queste condizioni è presumibile che il DDT agisca come un veleno neurotroppo ad azione paralizzante: la sostanza dopo aver attraversato la cuticola, disciolta dai lipoidi, si fisserebbe sull'apparato nervoso periferico intossicando l'organismo: infatti i sintomi manifestati dalle larve sotto l'azione del DDT sono rappresentati principalmente da una perdita progressiva della loro vivacità e dei rapidi movimenti sinuosi fino a che cadono al fondo senza essere più capaci di tornare alla superficie del liquido.

Per il gruppo di larve non legate, che hanno ingerito il DDT, data la più elevata mortalità, si deve necessariamente ammettere che contemporaneamente all'azione di contatto la sostanza tossica abbia esplicato la sua azione anche nell'interno dell'intestino. Ora a questo proposito sorge il problema del meccanismo di azione esercitato dal DDT sull'epitelio intestinale. E' noto che nell'interno del tubo digerente delle larve di *Cu-*licidi esiste una delicata membrana, composta di chitina unita forse ad alcune proteine, e che viene denominata membrana peritrofica. La membrana peritrofica separa il contenuto intestinale dall'epitelio della mucosa. La membrana è permeabile agli enzimi digestivi ed ai prodotti della digestione ed attraverso di essa si svolgono i processi dell'assorbimento intestinale. Data la costituzione chitinoso della membrana si può supporre che i cristallini di DDT, dopo essere stati introdotti nell'intestino, vengano disciolti dalle sostanze costituenti la membrana ed in tal modo

vengono a contatto con l'epitelio della mucosa esercitando la loro azione dannosa. Il meccanismo intimo di questa azione a livello dell'intestino non è dato poterlo ancora definire con esattezza. Se il DDT agisce indifferentemente su tutti gli elementi con cui viene a contatto, o se eserciti un'azione dannosa selettiva particolarmente verso un determinato tessuto rappresenta un problema non ancora conosciuto e per la cui soluzione si sono iniziate già osservazioni i cui risultati verranno successivamente resi noti.

Il problema del DDT come larvicida appare perciò più complesso di quello già studiato come insetticida in quanto l'assorbimento intestinale costituisce un elemento indiscutibile di mortalità e pone nuovamente allo studio se anche nelle nuove condizioni la sostanza tossica sia da considerarsi o no squisitamente neurotrofa.

Gli esperimenti su riferiti conducono inoltre al confronto tra l'effetto praticamente nullo prodotto sulle larve dei *Culex* dal verde di Parigi, e quello non trascurabile prodotto sulle larve della medesima specie dal DDT. Ciò è da riferirsi alla nota posizione che assume la larva dei *Culex* rispetto alla superficie dell'acqua, formando un angolo di ampiezza variabile con quest'ultima e mantenendo la testa costantemente negli strati profondi così che l'alimentazione non è mai superficiale. Mentre il verde di Parigi è una polvere che ha la caratteristica tendenza a rimanere alla superficie dei liquidi, e per conseguenza è rara l'evenienza che particelle di essa vengano ingerite dalle larve di *Culex*, il reperto costante del DDT nell'intestino delle larve di *Culex* ci indica una più uniforme distribuzione del DDT in polvere negli strati liquidi di differenti profondità e quindi la maggiore possibilità che esso venga ingerito. Ciò costituisce un carattere di superiorità del DDT, usato come larvicida, rispetto al verde di Parigi.

Un altro fatto messo in evidenza dalla tabella è rappresentato dalla resistenza al DDT dimostrata dalle ninfe: 8 individui che avevano raggiunto la ninfosi durante gli esperimenti eseguiti sulle larve hanno seguito il loro sviluppo regolare fino alla formazione dell'insetto alato. A confermare questa constatazione sono state introdotte 60 ninfe in un recipiente trattato con DDT: tutte le ninfe hanno avuto sviluppo regolare, senza alcuna mortalità. Poichè durante la ninfosi l'individuo non si alimenta, la constatazione avvalorla la supposizione che, nelle larve, la

sostanza tossica agisca essenzialmente per via intestinale. Ci si sarebbe però aspettati una mortalità, se pur limitata, riferibile all'azione di contatto. La spiegazione di questa mancata mortalità potrebbe essere trovata in una struttura della cuticola ninfale diversa da quella della larva e tale da non permettere la diffusione della sostanza tossica, oppure potrebbe anche supporre che nella ninfa, date le profonde trasformazioni caratteristiche di questo stadio, non si siano stabiliti ancora tra cuticola esterna e sistema nervoso periferico, quei rapporti definitivi che sono ammessi per l'adulto.

Le larve su cui si è studiato appartenevano alla specie *Culex pipiens autogenicus* della regione di Latina. Ora l'insetto adulto di questa specie offre una resistenza naturale all'azione del DDT, rimanendo insensibile all'azione di contatto. Abbiamo visto invece che le larve della stessa specie hanno dimostrato, come risulta dagli esperimenti, una larga mortalità. Questo fatto è molto interessante: in primo luogo il differente comportamento che uno stesso individuo offre di fronte ad una stessa sostanza, nelle sue varie fasi di sviluppo può far supporre che la costituzione chimica o la presenza di particolari organi chemiorecettori possa essere molto differente da uno stadio all'altro, in secondo luogo si può stabilire che nella lotta contro gli insetti, se in un determinato periodo l'insetto si dimostra refrattario si può polarizzare la lotta sopra un'altra fase del suo sviluppo.

Ringrazio la professoressa L. La Face per i preziosi consigli che mi ha dato durante lo svolgimento del lavoro.

Roma. — Istituto Superiore di Sanità - Laboratorio di malariologia. 20 genn. 1948.

BIBLIOGRAFIA

- DUMBLETON L. J., « "666", and DDT as mosquito larvicide », N. Z. J. Sci, Tech., 27, 133 (1945).
- EIDE P. M., DEONIER C. C. e BURREL, « DDT as Culicine larvicide », J. Econ. Ent., 5, 537-541 (1945).
- FERGUSON F. F., « Control of anopheline mosquito larvae by use of DDT oil mists », Publ. Health Rep., Wash., 9, 296-302 (1947).
- LEPNOLT W. M., « The inactivation of DDT used in Anopheline mosquito larvicide », Publ. Health Rep., Wash., 62, 302-309 (1947).
- MAYHIS W. V., FERGUSON F. F. e SIMMONS, « Comparative studies of DDT dusts

- DDT sprays and Paris-green dusts routinely in Anopheline larvae control », Publ. halth Rep., Wash., 62, 95-1 2 (1947).
- MISSIROLI A., « Riduzione od eradicazione degli anofeli? », Rivista di Parassitologia, 8, 141-169 (1947).
- MOSNA E., « Su una caratteristica biologica del *Culex pipiens autognicus* di Latina », Rivista di Parassitologia, 8, 125 (1945).
- ODUM E. P. e SUMMERFORD W. T., « Comparative toxicity of DDT and four analogues to Golfish, *Gambusia* and *Culex* larvae », Science, nov., 22, 480 (1946).
- RIBBANDS C. R., « The use of DDT as mosquito larvicide on still water », Bull. of Entomological Research, 36, 253 (1945).
- RIBBANDS C. R., « The use of DDT as mosquito larvicide on flowing water », Bull. of Entomological Research, 37, 105 (1946).
- SERRA A., « Azione del DDT sulle larve degli Anofelini », Rivista di Malariologia, 26, 31-33 (1947).
- SHANAHAN C. J., « DDT and "666" as larvicide. Experiment with the primary sheep blowfly » (*Lucilia cuprina*), Agric. Gaz. N. S. W., 57, 7 (1946).
- WIGGLESWORTH V. B., « The function of the anal gills of the mosquito larvae », Jour. of Experimental Biology, 10, 1-15 (1933).
- WIGGLESWORTH V. B., « The effect of salt on the anal gills of the mosquito larva », Journ. of Experimental Biology, 10, 1-15 (1933).
- WU C. C., CHOSH S. M., McClymont A. G. e Roy D. N., « A preliminary report on some laboratory and field experiments to determine the relative effectiveness of pyrethrum, DDT and Gammexane D 919 as insecticides and larvicides », J. Malaria Inst. of India, 6, 285-295 (1946).
-