

M.A. TODARO^{1,3}, O. FARAPANOVA², F. ONORATI², D. PELLEGRINI², P. TONGIORGI³

¹C.I.B.M., Ple Mascagni, 1 - 57127 Livorno, Italia.

²I.C.R.A.M., Roma, Italia.

³Dip.di Biologia Animale, Università di Modena e Reggio Emilia, Italia.

**TIGRIOPUS FULVUS (COPEPODA, HARPACTICOIDA) UNA
POSSIBILE SPECIE-TARGET NELLA VALUTAZIONE DELLA
TOSSICITÀ DEI FANGHI PORTUALI: CICLO VITALE E PROVE
TOSSICOLOGICHE PRELIMINARI**

**TIGRIOPUS FULVUS (COPEPODA, HARPACTICOIDA) A POSSIBLE
TEST-SPECIES IN HARBOUR SEDIMENT TOXICITY BIOASSESSMENT:
LIFE CYCLE AND PRELIMINARY BIOASSAYS**

Abstract

The paper reports on the successful attempt of keeping at low-cost massive laboratory cultures of the Mediterranean splash-pool harpacticoid copepod Tigriopus fulvus. The life history traits of the Tuscanian strain, and the results of two preliminary bioassays monitoring T. fulvus survival in presence of compounds generally found in harbor dredged material (i.e. petroleum hydrocarbons and heavy metals), both suggest the possible use of this meiobenthic species in ecotoxicology studies.

Key-words: Tigriopus fulvus, Harpacticoida, life cycle, bioassay, dredging operations.

Introduzione

Da diversi anni il nostro gruppo di ricerca è impegnato nell'individuazione di specie animali utilizzabili nei saggi biologici tesi a valutare la tossicità dei fanghi portuali (Onorati *et al.*, 1999); nel presente studio viene preso in esame il copepode meiobentonico *Tigriopus fulvus* (Fisher). La specie vive nelle pozze di scogliera del piano sopralitorale di tutta l'area mediterranea dove, grazie alle discrete dimensioni ($\cong 1$ mm di lunghezza), all'elevata abbondanza (fino a 5-6000 ind./l) e alla sua distintiva colorazione rossastra, può essere riconosciuta ed isolata con relativa facilità (Pane *et al.*, 1996)

In questa prima fase della ricerca sono state messe a punto le metodiche per ottenere in laboratorio, e a basso costo, allevamenti di esemplari provenienti dal litorale livornese. Questa è stata l'occasione per delucidare le caratteristiche del ciclo vitale della popolazione toscana e per saggiarne la sensibilità nei confronti di alcune sostanze tossiche comunemente presenti negli elutriati dei fanghi portuali, come ad esempio idrocarburi e metalli pesanti (cfr. Bona *et al.*, 1997).

Materiali e metodi

Dodici colture di massa di *Trigriopus fulvus* sono state avviate a partire da alcune migliaia di individui, adulti e copepoditi raccolti in località Calafuria, a sud di Livorno, nel novembre 1998. Gli animali sono stati allevati in cella termostatica alla temperatura di 20° C e fotoperiodo 12L/12B, in acqua marina artificiale (S = 35‰) non areata, rinnovata quindicinalmente per circa due terzi. I copepoditi sono stati alimentati ogni sette giorni *ad libitum* con una miscela

di mangime per pesci polverizzato (1,0 g Tetramin: 0,5 g Granumarin: 0,5 g JBL Gold Perls: 0,25 g Tetra Plecomin: 0,25 g Sera Micron). Il protocollo di mantenimento compreso il tipo di cibo scaturiscono da nostre positive esperienze relative l'allevamento di altre specie di harpacticoidi, tra le quali *Tisbe holothuriae* e *T. battagliai*. Per l'allevamento di *Tigriopus fulvus* sono stati utilizzati diversi tipi di contenitori con capacità compresa tra i 0,250 l dei cristallizzatori di vetro ai 10 l degli acquari di plastica. Per ridurre l'inbreeding, si è provveduto periodicamente allo scambio di esemplari tra i diversi contenitori.

Le informazioni sui tratti del ciclo vitale sono state ottenute allevando singolarmente, in capsule boveri di vetro di 20 ml di capacità, esemplari provenienti dalle colture di massa secondo il protocollo suggerito da Gaudy e Guerin (1977) con lievi modifiche.

La sensibilità di *T. fulvus* nei confronti degli idrocarburi è stata valutata come tasso di sopravvivenza dopo 96 h in presenza del contaminante. A tal fine è stata allestita una serie di boveri, in 4 repliche, contenenti frazioni (100%, 75%, 50%, 25%, 0% = controllo) di una sospensione madre ottenuta con il metodo OWD (Oil in Water Dispersion) a partire da olio minerale e acqua marina. In ciascuna capsula sono stati introdotti 20 naupli o 20 copepoditi; durante l'esperimento non è stato somministrato cibo.

La sensibilità della specie nei confronti di un tossico inorganico di riferimento è stata valutata utilizzando Cloruro di Cadmio. Gli esemplari (10 esemplari adulti, di cui 5 maschi e 5 femmine x 2 repliche) sono stati mantenuti, per 48h a 20 °C, in presenza di concentrazioni crescenti di CdCl₂ (1, 2, 4, 8 mg l⁻¹), in piastre multi pozzetti riempiti con acqua di mare sintetica priva di EDTA. La tossicità specifica è stata espressa mediante LC50 calcolata mediante il metodo Litchfield-Wilcoxon (Newman, 1995).

Le significatività delle differenze osservate sono state valutate per mezzo dell'analisi della varianza (one-way ANOVA) o del t-test.

Risultati e discussione

Per quanto concerne il mantenimento in laboratorio, dopo tre mesi dall'avvio degli allevamenti nei contenitori utilizzati sono state raggiunte densità sostanzialmente simili (comprese tra 1000 ind./l degli acquari di 10 l e 8000 ind./l dei cristallizzatori da 0,5 l); ne deriva che i diversi tipi di contenitori usati risultano tutti idonei all'allevamento intensivo di *T. fulvus* per scopi tossicologici; le beute di vetro di 1 l a nostro avviso si sono tuttavia dimostrate di più facile ispezione e gestione. I parametri demografici testimoniano una longevità media nettamente differente nei due sessi: questa è infatti di $77,5 \pm 22$ gg ($n = 15$) nelle femmine e di $116,8 \pm 19,6$ gg ($n = 15$) nei maschi. Limitatamente al ciclo biologico delle femmine, esso risulta costituito da una fase pre-riproduttiva (nascita - prima deposizione) della durata media di $12,3 \pm 2,7$ gg, seguita da una fase riproduttiva (intesa come periodo intercorrente tra la schiusa del primo e quella dell'ultimo sacco ovigero prodotto) della durata di $33,6 \pm 9,4$ gg, e da una fase di senescenza della durata di $21,6 \pm 20,2$ gg.

Durante la fase pre-riproduttiva si susseguono diversi stadi larvali, dei quali i sei naupliari si completano in $3,8 \pm 0,8$ gg ($n = 30$). Il protocollo sperimentale adottato non ha consentito di stabilire con precisione la durata delle fasi di copepodite, è stato comunque possibile accertare che le prime coppie si for-

mano in media $8,1 \pm 0,8$ gg dalla schiusa, e che già a distanza di 1-2 gg compaiono le prime femmine gravide. Il tempo che intercorre tra la comparsa di un sacco ovigero e la schiusa dei naupli è di $2,2 \pm 0,4$ gg ($n = 30$).

A seguito di una sola copula le femmine di *T. fulvus* ($n = 10$) hanno prodotto in media $13,7 \pm 4,5$ sacchi ovigeri, da cui sono derivati, al termine delle fasi larvali, 513 ± 256 adulti ($43,1 \pm 13,1$ adulti/sacco, $n = 120$), dei quali $170,3 \pm 120,5$ erano maschi e $354,0 \pm 208,5$ femmine. Il rapporto tra numero di femmine ed adulti totali è risultato in media pari a $0,65 \pm 0,22$.

Nel complesso, i parametri del ciclo biologico della popolazione livornese di *T. fulvus* rispecchiano sostanzialmente quanto noto per la popolazione di Genova Nervi (Carli *et al.*, 1995). Nella popolazione livornese tuttavia, 1) la fecondità risulta di gran lunga maggiore (43 adulti /sacco vs 15-18 naupli/sacco), 2) il tempo di generazione, da nauplio a nauplio, più breve (12 gg vs 20-22 gg), e 3) il periodo post-riproduttivo più lungo (21 gg vs 7-8 gg). Qualunque siano i fattori causali delle differenze riscontrate, la cui discussione esula dagli scopi di questo lavoro, risulta evidente che i protocolli colturali da noi adottati sembrano più idonei ai fini di un'indagine tossicologica, dove la disponibilità di un maggior numero di organismi e la velocizzazione dei tempi di esecuzione risultano di cruciale importanza.

Gli esperimenti volti a valutare la sensibilità di *T. fulvus* nei confronti di composti potenzialmente tossici evidenziano un significativo decremento della sopravvivenza larvale, soprattutto naupliare, (ANOVA: naupli, $p < 0,001$; copepoditi, $p < 0,048$) nei contenitori a più alto tenore di idrocarburi (100% e 75%), rispetto al controllo, mentre la LC50 a 48h con Cadmio Cloruro è risultato pari a circa 4 (3 - 5) mg l⁻¹ di Cd⁺⁺. Entrambi i risultati suggerirebbero una buona sensibilità della popolazione testata, soprattutto in considerazione del fatto che nel secondo caso è stato utilizzato lo stadio adulto del ciclo vitale, presumibilmente più resistente. E' anche per tale motivo che la sensibilità di *T. fulvus* nei confronti del Cadmio risulta del tutto paragonabile a quella di altri copepodi marini utilizzati in ecotossicologia, come ad esempio *Acartia tonsa* per la quale viene indicata una LC50 di 2,9 mg l⁻¹ (2,4 - 3,4) alle stesse condizioni di laboratorio (ISO/FDIS, 1998).

L'utilizzo di specie del genere *Tigriopus* quali organismi-test nelle ricerche ecotossicologiche non è nuovo. Barnett e Kontogiannis (1975) e O'Brien *et al.* (1988), ad esempio, hanno valutato rispettivamente gli effetti di frazioni di petrolio greggio e di alcuni metalli pesanti sulla sopravvivenza età-specifica nel copepode nord americano *T. californicus*, mentre D'Agostino e Finney (1974) hanno studiato gli effetti del rame e del cadmio sullo sviluppo della specie giapponese *T. japonicus*. In tutti i casi è stato possibile rilevare rapidamente l'effetto negativo delle sostanze saggiate nei confronti dei parametri biologici presi in esame, sottolineando pertanto l'idoneità dei soggetti per gli scopi proposti. I risultati dei nostri esperimenti, per quanto preliminari, suggeriscono il possibile impiego in campo ecotossicologico anche della specie mediterranea.

Bibliografia

- BARNETT C.J., KONGOIANNIS J.E. (1975) - The effect of crude oil fractions on the survival of a tidepool copepod, *Tigriopus californicus*. *Environ. Pollut.*, **8**: 45-54.
BONA F., MAFFIOTTI A., VOLTERRA L. (1997) - *Analisi e recupero dei sedimenti marini*. Pitagora Editrice, Bologna: 139 pp.

- CARLI A.M., MARIOTTINI G.L., PANE L. (1995) - Influence of nutrition on fecundity and survival in *Tigriopus fulvus* Fisher (Copepoda: Harpacticoida). *Aquaculture*, **134**: 113-120.
- D'AGOSTINO A., FINNEY C. (1974) - The effects of copper and cadmium on the development of *Tigriopus japonicus*. In: Vernberg F.J., Vernberg W.B. (eds), *Pollution and Physiology of Marine Organisms*, Academic Press: 445-463.
- GAUDY R., GUERIN, J.P. (1977) - Population dynamics of *Tisbe holothuriae* (Crustacea: Copepoda) reared on three different artificial diets. *Mar. Biol.*, **39**: 137-145.
- ISO/FDIS (1998) - Water quality – Determination of acute lethal toxicity to marine copepods (Copepoda, Crustacea). ISO/FDIS International Standard n. 14669.
- NEWMAN M.C. (1995) - *Quantitative methods in aquatic ecotoxicology* (Advances in Trace Substances Research), Lewis Publisher, CRC Press, New York.
- O'BRIEN P., FELDMAN H., GRILL E.V., LEWIS A.G. (1988) - Copper tolerance of the life history stages of the splashpool copepod *Tigriopus californicus* (Copepoda, Harpacticoida). *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **44**: 59-64.
- ONORATI F., BIGONGIARI N., PELLEGRINI D., GIULIANI S. (1999) - The suitability of *Corophium orientale* (Crustacea, Amphipoda) in harbour sediment toxicity bioassessment. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.*, **2**: 465-473.
- PANE L., FELETTI M., CARLI A.M. (1996) - Fattori ambientali e fluttuazioni della popolazione del copepode *Tigriopus fulvus* delle pozze di scogliera di Genova-Nervi (Mar Ligure). *Atti S. IT. E.*, **17**: 317-320.