

O. FARAPONOVA, M.A. TODARO\*, F. ONORATI, M.G. FINOIA

I.C.R.A.M., Via di Casalotti, 300 - 00166 Roma, Italia.

\*Dipartimento di Biologia Animale, Università di Modena e Reggio Emilia.

## SENSIBILITÀ SESSO ED ETÀ SPECIFICA DI *TIGRIOPUS FULVUS* (COPEPODA, HARPACTICOIDA) NEI CONFRONTI DI DUE METALLI PESANTI (CADMIO E RAME)

### *SEX AND AGE SENSITIVITY OF TIGRIOPUS FULVUS (COPEPODA, HAR- PACTICOIDA) TOWARDS TWO HEAVY METAL (CD AND CU)*

#### **Abstract**

*The paper reports the results of preliminary toxicity tests monitoring adult and larval stages of T. fulvus survival in presence of two heavy metals (Cu and Cd). Data indicate males as more sensitive than females to presence of both contaminants and nauplii as the most sensitive of all. The ease of culturing and the values of LC<sub>50</sub> comparable to those of other test-species suggest the possible use of this meiobenthic crustacean in ecotoxicology studies.*

**Key-words:** *Tigriopus fulvus, experimental culture, toxicity test, heavy metals.*

#### **Introduzione**

L'inserimento di specie autoctone all'interno di una batteria di saggi biologici attribuisce alla valenza predittiva sul rischio ambientale, propria dei test ecotossicologici, una maggior verosimiglianza (Hill *et al.*, 1993). Uno studio preliminare, volto all'implementazione della batteria di saggi biologici impiegata dal nostro gruppo (cf. Pellegrini *et al.*, 2001) per la valutazione della biodisponibilità dei contaminanti presenti negli ecosistemi marini e salmastri del Mediterraneo, aveva individuato nel copepode arpacticoide *Tigriopus fulvus* (Fisher) una possibile specie-test (Todaro *et al.*, 2001).

In questa occasione vengono descritte le modalità di coltura e la sensibilità specifica degli adulti e degli stadi naupliari di questo microcrostaceo nei confronti del Rame e del Cadmio.

#### **Materiali e metodi**

La popolazione originaria, proveniente dalla costa livornese, viene mantenuta in laboratorio dal febbraio 2000. La coltura massiva si riproduce con successo in acqua di mare sintetica Instant Ocean<sup>®</sup>, con salinità variabile da 17 a 50‰, all'interno di cristallizzatori in vetro da 2 lt e/o in fiasche per coltura da 0,5 l con tappo ventilato dotato di membrana da 0,22 µm. I contenitori sono alloggiati in una cella termostatica a 18±1 °C con fotoperiodo 16L/8B. L'alimentazione viene effettuata settimanalmente *ad libitum* con mangime per pesci Tetramarin<sup>®</sup>.

Sono state testate le sensibilità specifiche al Cd<sup>++</sup> e al Cu<sup>++</sup> utilizzando soluzioni standard per AAS in HCl e HNO<sub>3</sub> nei confronti di maschi, femmine e naupli, questi ultimi derivanti da una coltura sincronizzata. I test di tossicità sono stati eseguiti in piastre da 6/12 pozzetti (5/3 ml) utilizzando acqua di mare sintetica al 33‰ Instant Ocean<sup>®</sup> o prodotta secondo norme EPA (Peltier e Weber, 1985). I test sugli adulti sono stati eseguiti in acqua marina sintetica EPA, utilizzando standard acidificati in HCl, mentre quelli sui naupli sono stati eseguiti sia in acqua EPA che Instant Ocean<sup>®</sup> (I.O.), utilizzando

standard acidificati in HCl e HNO<sub>3</sub>. Si è scelto di utilizzare anche acqua I.O. per i test sui naupli poiché in tale medium gli stadi larvali risultano sempre più attivi rispetto a quando allevati nella meno completa acqua EPA. Ogni test ha previsto 5 concentrazioni (4 diluizioni più il controllo) con 3 repliche e 7 individui ciascuna (ISO/FDIS, 1998).

La sensibilità specifica è stata espressa mediante LC<sub>50</sub>, (Lethal Concentration del 50% di individui), calcolata con il metodo proposto da Horning e Weber (1985), mentre le differenze tra i risultati dei test sono state valutate mediante test-t di Student per dati appaiati (Glantz, 1988).

## Risultati

I risultati dei test di tossicità applicati agli individui adulti e ai naupli sono illustrati rispettivamente nelle Tab. 1 e 2.

Tab. 1 – Risultati dei test di tossicità con adulti di *T. fulvus* rispetto a Cd<sup>++</sup> e Cu<sup>++</sup> in acqua di mare sintetica EPA e con standard di riferimento acidificato in HCl.

*Effects of Cd<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup> on adults of T. fulvus; tests were carried out in synthetic EPA water using as xenobiotic standards in HCl.*

Sensibilità al Rame									
Sex	24 ore		48 ore		72 ore		96 ore		
	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95% (mg l <sup>-1</sup> )	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	
	♀♀	6,89	6,29 – 8,31	5,76	5,31 – 6,34	5,28	4,81 – 5,75	4,91	
♂♂	< 4,00	n.d.	< 4,00	n.d.	< 4,00	n.d.	< 4,00	n.d.	
Sensibilità al Cadmio									
Sex	24 ore		48 ore		72 ore		96 ore		
	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95% (mg l <sup>-1</sup> )	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	
	♀♀	12,48	10,30 – 25,78	7,04	6,31 – 7,83	6,18	1,75 – 6,84	3,10	
♂♂	7,48	3,44 – 11,81	6,98	6,64 – 7,17	6,08	n.d.	1,13	n.d.	

n.d.: non determinabile

Tab. 2 – Risultati dei test di tossicità con naupli di *T. fulvus* rispetto a Cd<sup>++</sup> e Cu<sup>++</sup> su due tipi di acqua di mare sintetica (EPA e Instant Ocean®) e due diverse soluzioni standard di riferimento.

*Effects of Cd<sup>++</sup> and Cu<sup>++</sup> on larvae of T. fulvus; tests were carried out in both synthetic EPA water using as xenobiotic standards in HCl, and in synthetic Instant Ocean® water using standards in HNO<sub>3</sub>.*

Sensibilità al Rame									
H <sub>2</sub> O	Std	24 ore		48 ore		72 ore		96 ore	
		LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95% (mg l <sup>-1</sup> )	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%
EPA	HCl	0,39	0,33 – 0,46	0,09	0,00 – 0,17	< 0,08	n.d.	< 0,08	n.d.
EPA	HNO <sub>3</sub>	0,21	0,16 – 0,30	0,09	0,06 – 0,12	0,05	0,02 – 0,07	0,03	0,00 – 0,05
I.O.	HCl	0,33	0,23 – 20,03	0,15	0,08 – 0,21	0,09	0,00 – 0,13	0,07	0,01 – 0,10
I.O.	HNO <sub>3</sub>	> 0,05	n.d.	> 0,05	n.d.	> 0,05	n.d.	0,04	0,03 – 0,05
Sensibilità al Cadmio									
H <sub>2</sub> O	Std	24 ore		48 ore		72 ore		96 ore	
		LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95% (mg l <sup>-1</sup> )	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%	LC50 (mg l <sup>-1</sup> )	Limiti fiduciali al 95%
EPA	HCl	1,52	1,10 – 2,64	0,76	0,58 – 1,02	0,41	0,29 – 0,54	0,24	0,16 – 0,31
EPA	HNO <sub>3</sub>	> 1,00	n.d.	0,50	0,28 – 1,07	0,31	0,22 – 0,38	0,18	0,10 – 0,23
I.O.	HCl	> 2,00	n.d.	> 2,00	n.d.	1,00	0,75 – 1,26	0,41	0,13 – 0,61
I.O.	HNO <sub>3</sub>	> 0,30	n.d.	> 0,30	n.d.	0,30	n.d.	0,25	0,18 – 0,49

I dati indicano una sensibilità significativamente maggiore dei maschi rispetto alle femmine per il Rame (con 3 g.l.,  $t=3,976$ ;  $p=0,028$ ), ma non per il Cadmio (con 3 g.l. e  $t=1,535$ ;  $p=0,222$ ) e che i naupli possiedono, come atteso, una rilevante sensibilità rispetto agli adulti per entrambe i metalli testati (per Cu  $t=15,759$  con 4 g.l.,  $p<0,001$ ; per Cd  $t=3,036$  con 4 g.l.  $p=0,039$ ). Gli stadi naupliari costituirebbero pertanto gli elementi del ciclo vitale più idonei per lo sviluppo di un protocollo esecutivo specifico.

I valori di  $LC_{50}$  riscontrati sono del tutto paragonabili con quelli riferiti ad altri copepodi quali *Acartia clausi* (Calanoida), la cui  $LC_{50}$  per popolazioni selvatiche nei confronti del Rame ( $CuSO_4$ ) è risultata pari a  $0,034\text{ mg/l}^{-1}$  a 48 ore (Verriopoulos, 1992) e *Tigriopus brevicornis*, la cui  $LC_{50}$  per popolazioni selvatiche nei confronti del Cadmio ( $CdCl_2$ ) per i naupli è risultata pari a  $0,017\text{ mg/l}^{-1}$  a 96 ore (Forget *et al.*, 1998).

## Conclusioni

Allo stato attuale della ricerca le indicazioni raccolte per la coltura e la sensibilità specifica di *T. fulvus* sono certamente favorevoli al suo impiego come specie-test per matrici ambientali liquide marine e salmastre, in quanto soddisfano la maggior parte dei requisiti richiesti per l'attendibilità di un saggio biologico, tra i quali:

1. semplicità di allestimento e mantenimento della coltura;
2. tollerabilità alle condizioni di laboratorio;
3. ridotti volumi necessari per test e/o saggi biologici (<50 ml);
4. facilità di esecuzione del test e di interpretazione dell'end-point;
5. buona sensibilità specifica, soprattutto degli stadi naupliari;
6. economicità.

## Bibliografia

- FORGET J., PAVILLON J.F., MENASRIA M.R., BOCQUENÉ G. (1998) - Mortality and  $LC_{50}$  values for several stages of marine Copepod *Tigriopus brevicornis* (Müller) exposed to the metals Arsenic and Cadmium and the pesticides Atrazine, Carbofuran, Dichlorvos, and Malathion. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **40**: 239-244.
- GLANTZ S.A. (1988) - *Statistica per discipline bio-mediche*. Mc Graw-Hill, ed. Libri Italia s.r.l.
- HILL I.R., MATTHIESSEN P., HEIMBACH F. (1993) - Sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environment. Workshop on sediment toxicity assessment, Renesse, The Netherlands, 8-10 November 1993 SETAC Europe.
- HORNING W.B., WEBER C.I. (1985) - Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. *Env. Monitoring & Support Lab.*, ESEPA, Cincinnati, Ohio 45268: 173 pp.
- ISO/FDIS (1998) - Water quality: determination of acute lethal toxicity to marine copepods (*Copepoda*, *Crustacea*), ISO/FDIS 14669: 16 pp.
- PELLEGRINI D., ENNAS C., BERTOLOTTO R.M., BIGONGIARI N. (2001) - Utilizzo di una batteria di saggi biologici sui sedimenti marini e valutazione dei risultati: un caso di studio. *Biol. Mar. Medit.*, **8** (2): 123-135.
- PELTIER W.H., WEBER C.I. (1985) - Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organism. *EPA/600/4-85/013*.
- TODARO M.A., FARAPONOVA O., ONORATI F., PELLEGRINI D., TONGIORGI P. (2001) - *Tigriopus fulvus* (Copepoda, Harpacticoida) una possibile specie-target nella valutazione della tossicità dei fanghi portuali: ciclo vitale e prove tossicologiche preliminari. *Biol. Mar. Medit.*, **8**: 869-872.
- VERRIOPOULOS G. (1992) - Effects of sublethal concentrations of Zinc, Chromium and Copper on the marine Copepods *Tisbe holothuriae* and *Acartia clausi*. UNEP, MAP Technical Reports Series, **69**: 265-275.