

Učinak protuobraštajnih tvari na prihvat dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Kalaković, Nikola

Undergraduate thesis / Završni rad

2019

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Pula / Sveučilište Jurja Dobrile u Puli**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:137:191113>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Digital Repository Juraj Dobrila University of Pula](#)



SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI,
ODJEL ZA PRIRODNE I ZDRAVSTVENE STUDIJE

Nikola Kalaković

Učinak protuobraštajnih tvari na prihvat dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Završni rad

Pula, 2019.

SVEUČILIŠTE JURJA DOBRILE U PULI,
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ ZNANOST O MORU

Nikola Kalaković

Učinak protuobraštajnih tvari na prihvata dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Završni rad

JMBAG: 0303061005, redovan student

Studijski smjer: Preddiplomski studij Znanost o moru

Predmet: Molekularna toksikologija i ekotoksikologija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Interdisciplinarne prirodne znanosti

Znanstvena grana: Znanost o moru

Mentor: prof. dr. sc. Nevenka Bihari

Pula, 2019.



IZJAVA O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, dolje potpisan Nikola Kalaković, kandidat za prvostupnika Znanosti o moru ovime izjavljujem da je ovaj Završni rad rezultat isključivo mogega vlastitog rada, da se temelji na mojim istraživanjima te da se oslanja na objavljenu literaturu kao što to pokazuju korištene bilješke i bibliografija. Izjavljujem da niti jedan dio Završnog rada nije napisan na nedozvoljen način, odnosno da je prepisan iz kojega necitiranog rada, te da ikoji dio rada krši bilo čija autorska prava. Izjavljujem, također, da nijedan dio rada nije iskorišten za koji drugi rad pri bilo kojoj drugoj visokoškolskoj, znanstvenoj ili radnoj ustanovi.

Student: Nikola Kalaković

U Puli, _____ 2019. godine



IZJAVA

o korištenju autorskog djela

Ja, Nikola Kalaković dajem odobrenje Sveučilištu Jurja Dobrile u Puli, kao nositelju prava iskorištavanja, da moj završni rad pod nazivom „ Učinak protuobraštajnih tvari na prihvat dagnje *Mytilus galloprovincialis*“ koristi na način da gore navedeno autorsko djelo, kao cjeloviti tekst trajno objavi u javnoj internetskoj bazi Sveučilišne knjižnice Sveučilišta Jurja Dobrile u Puli te kopira u javnu internetsku bazu završnih radova Nacionalne i sveučilišne knjižnice (stavljanje na raspolaganje javnosti), sve u skladu s Zakonom o autorskom pravu i drugim srodnim pravima i dobrom akademskom praksom, a radi promicanja otvorenoga, slobodnoga pristupa znanstvenim informacijama.

Za korištenje autorskog djela na gore navedeni način ne potražujem naknadu.

U Puli, _____ 2019. godine

Potpis

ZAHVALA

Zahvaljujem mojoj mentorici prof. dr. sc. Nevenki Bihari na predloženoj temi te strpljenju, pomoći i svim savjetima tijekom izrade ovog završnog rada. Također zahvaljujem izv. prof. dr. sc. Maji Fafandžel i doc. dr. sc. Paolo Paliaga na kvalitetnim sugestijama u oblikovanju završne verzije rada.

Zahvaljujem se i Centru za istraživanje mora Institut Ruđer Bošković u Rovinju na ustupljenom prostoru i svoj laboratorijskoj opremi potrebnoj za izradu ovoga rada.

Najveću zahvalnost želim izraziti svojim roditeljima koji su mi bili velika podrška tijekom mog cjelokupnog školovanja.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1 Obraštaj	1
1.1.1 Stvaranje obraštaja	2
1.2 Dagnja kao obraštajni organizam	3
1.3 Protuobraštajna sredstva	4
1.3.1 Tributilni kositar (TBT)	4
1.3.2 Bakar	5
1.4 Testiranje protuobraštajne aktivnosti	5
2. CILJEVI RADA	7
3. MATERIJALI I METODE	8
3.1 Materijali	8
3.1.1 Kemikalije	8
3.1.2 Uzorkovanje dagnje <i>Mytilus galloprovincialis</i>	8
3.2 Metode	10
3.2.1. Priprema otopina CuSO_4	10
3.2.2 Priprema testnih ploča	10
3.2.3 Testiranje učinka CuSO_4 i Hempelovih boja	11
3.2.4 Prikaz i obrada podataka	12
4. REZULTATI	14
5. RASPRAVA	22
6. ZAKLJUČCI	24
7. LITERATURA	25
8. SAŽETAK	29
9. ABSTRACT	30

1. UVOD

1.1 Obraštaj

Površine raznih tijela u moru pa tako i onih antropogenog porijekla kao npr. cijevi, građevinske konstrukcije, olupine brodova, platforme i razni ribolovni alati predstavljaju pogodno mjesto za pričvršćivanje, rast i razmnožavanje brojnih sedentarnih vrsta morskih organizama. Na taj način dolazi do nakupljanja organizama i stvara se obraštaj. Obraštaj uglavnom čine male sedentarne vrste, ali ponekad se nađu i vagilne vrste, kao što su rakovi, zmijače i paraziti (Chambers i sur., 2006). Danas, najveći problem predstavlja obraštaj na brodovima (Slika 1.). Zbog nakupljanja organizama nastaje neravna površina koja povećava trenje te tako usporava plovidbu i uzrokuje veću potrošnju goriva i veću koncentraciju ispušnih štetnih plinova. Procjenjuje se da je nakon nekoliko mjeseci nakupljanja obraštaja potrebno 45% više goriva kako bi se održavala brzina plovidbe (Magin i sur., 2010). Osim toga, obraštaj na brodovima predstavlja jedan od načina prijenosa alohtonih vrsta na nova područja.

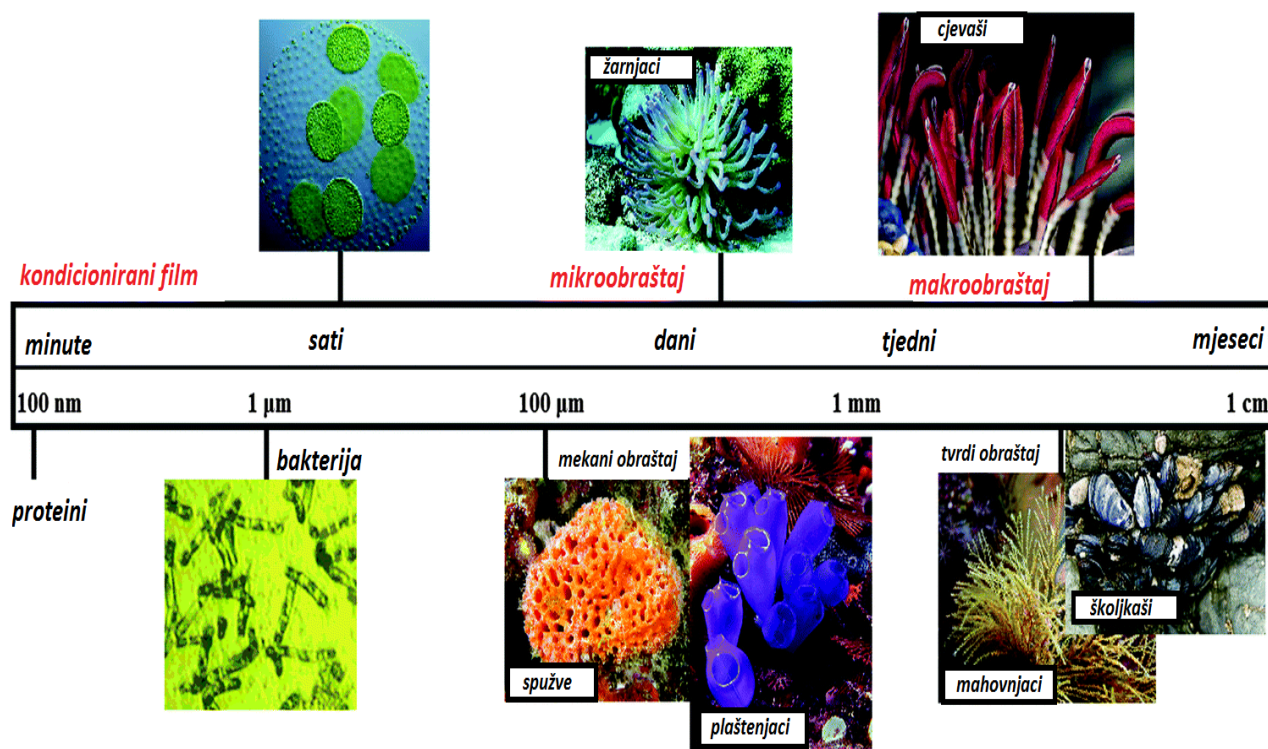


Slika 1. Obraštaj na brodu (izvor: <https://smallboater.com/biofouling-guide/>)

1.1.1 Stvaranje obraštaja

Obraštaj nastaje u četiri sloja. Već u svega nekoliko minuta u kontaktu s morskom vodom dolazi do akumuliranja organskih molekula (polisaharidi, proteini) i anorganskih spojeva na čvrstu površinu (Slika 2.). Tako se stvara temeljni sloj. Na tom sloju se već nakon nekoliko sati razvijaju bakterije i dijatomeje koje tvore mikrobn biofilm i izlučuju ljepljive mukopolisaharide, što omogućava hvatanje većih čestica i organizama kao što su spore alga, gljivice i praživotinje već nakon par dana. Na kraju slijedi pričvršćivanje i rast većih morskih beskralješnjaka kao što su rakovi, crvi, školjkaši i mahovnjaci (Juraga i sur., 2007). Procjenjuje se da je pronađeno više od 4000 vrsta morskih organizama koji stvaraju kolonije u obraštaju i koji su u stalnoj međusobnoj interakciji (Yebra i sur., 2004).

U Jadranu obraštajni proces pokazuje sezonski ritam i većina tipičnih obraštajnih organizama naseljava se od proljeća do zime (Bakran-Petricioli i sur., 2015). Proces naseljavanja nakratko prestaje u zimskim mjesecima.



Slika 2. Vremenski tijek stvaranja obraštaja

(izvor: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/tb/c5tb00232j>)

1.2 Dagnja kao obraštajni organizam

Jedan od glavnih organizama koji uzrokuje ozbiljne probleme nakupljanjem na raznim površinama uključujući brodove, cijevi za rashladnu vodu elektrana, objekte za marikulturu je dagnja (Slika 3.) (Bakran-Petricioli i sur., 2015). Dagnja traži prikladnu podlogu za pričvršćivanje uz pomoć bisusnih niti pretražujući i puzeći koristeći stopalo te tvori guste nakupine. Što je populacija dagnje gušća to se više sedimenta, fecesa i pseudofecesa ovih školjkaša akumulira u prostorima između njih. Na taj način stvaraju se brojne mikroniše koje pružaju zaštitu od otplavlivanja vagilnim organizmima. Mediteranska dagnja (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) je autohtona vrsta u Sredozemnom, Crnom i Jadranskom moru, a kroz obraštaj se proširila na ostala područja s umjerenom klimom, uglavnom u blizini marina gdje je učestali promet brodova. Mediteranska dagnja zamjenjuje autohtone vrste školjkaša na tim područjima zbog čega ima utjecaj na čitavu bentičku zajednicu.



Slika 3. Obraštaj dagnje *Mytilus galloprovincialis* na plinskoj platformi. (Bakran-Petricioli i sur., 2015).

1.3 Protuobraštajna sredstva

Kako bi se spriječila neželjena kolonizacija organizama, osmišljena su različita sredstva protiv njihovog nakupljanja koja djeluju spriječavajući već prve stadije nastanka obraštaja, odnosno adheziju bakterija i stvaranje biofilma. Protuobraštajna sredstva mogu djelovati i na organizme koji se kasnije vežu na biofilm. Mnoga protuobraštajna sredstva služe za direktno ubijanje organizama. Osim njih postoje i druga sredstva koja ne ubijaju organizme već mijenjaju strukturu površine te na taj način onemogućavaju pričvršćivanje mnogih organizama (Chambers i sur., 2006). Razne toksične tvari kao npr. bakrov oksid, tributilkositreni spojevi (TBT), trifenil-kositar (TPT) i drugi organski spojevi dugo su se koristili kao protuobraštajna sredstva.

Veliki problem nastaje ako se nanešena sredstva otpuštaju u morski ekosustav i na taj način negativno djeluju na brojne druge organizme izvan obraštaja. Kemikalije sa premazanih površina se mogu otopiti u morskoj vodi i na taj način se mogu prenijeti morskim strujama na područja udaljena od izvora. Osim toga, moguće je i otkidanje djelova premaza pri čemu dolazi do sedimentacije na morsko dno. Zbog prirodnih ili antropogenih utjecaja, kao što su bioturbacije i povlačenje mreža dolazi do remobilizacije iz sedimenta što dovodi do ponovnog oslobađanja toksičnih tvari u vodeni stupac. S obzirom da morski organizmi na nižim trofičkim razinama akumuliraju toksične tvari, one se preko hranidbenog lanca prenose na više trofičke razine te osim toga raste koncentracija toksičnih tvari na višim trofičkim razinama odnosno dolazi do biomagnifikacije. Ukoliko koncentracija toksičnih tvari unesenih u organizam premaši koncentraciju koju određena vrsta može detoksificirati i izlučiti, dolazi do redukcije metaboličkih funkcija što može dovesti i do smrti (Chambers i sur., 2006).

Obzirom na toksični potencijal protuobraštajnih sredstava i njihovu antropogenu korisnost važno je testirati njihovu aktivnost.

1.3.1 Tributilni kositar (TBT)

Tributilni kositar (TBT) spada među najtoksičnije organokositrene spojeve, a također se smatra jednim od najtoksičnijih zagađivala koja su namjerno unesena u more. TBT se primjenjivao kao biocid u protuobraštajnim bojama od 1970-ih godina. Među mnogim neželjenim učincima TBT-

a na morske organizme, jedna od najštetnijih posljedica bila je pojava imposeksa kod velikog broja vrsta Gastropoda. Pojava imposeksa uočena je već pri niskim koncentracijama TBT-a ($1-2 \text{ ngL}^{-1}$). Imposeks je pojava muških spolnih karakteristika na ženskim jedinkama Gastropoda. Zbog svoje velike toksičnosti, od 2003. godine zabranjena je upotreba protuobraštajnih boja na bazi TBT-a u većini europskih zemalja.

1.3.2 Bakar

Bakar se kao biocid u protuobraštajnim sredstvima koristio već u 18. i 19. stoljeću te se pokazao kao vrlo učinkovit. Nakon zabrane TBT-a, bakar se uz cink i organske spojeve počeo sve više upotrebljavati. Iako je esencijalan element u prirodi, otpuštanjem s brodova u morski okoliš i taloženjem u sedimentu povećava se njegova koncentracija iznad granice koju organizmi mogu podnijeti. Najveća akumulacija bakra je u marinama zbog puno brodova sa kojih se spojevi otpuštaju u more te zbog slabijih struja koje ne miješaju vodeni stupac. Uobičajene koncentracije bakra u morskom okolišu variraju između 0.5 i $3 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ morske vode, dok u onečišćenom području može porasti i do $21 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$. Studije su pokazale da se na područjima gdje je koncentracija bakra viša od $21 \text{ } \mu\text{gL}^{-1}$ javlja manji broj vrsta, odnosno manja raznolikost organizama (Neira i sur. 2014).

Negativan utjecaj bakrovih spojeva i protuobraštajnih sredstava na bazi bakra na morske organizme je dobro proučen (Katranitsas i sur., 2003; Hall i Anderson., 1999). Pri visokim koncentracijama bakrovog(II) sulfata (750 , 600 i 500 ppm) smanjena je produkcija bisuznih niti i dagnje ugibaju (Harada i sur., 1984). Najvjerojatniji uzrok je vezanje iona bakra na $-SH$ skupine enzima koji uzrokuju strukturne promjene i sprječavaju transport iona (Trieff, 1980).

1.4 Testiranje protuobraštajne aktivnosti

Brojne laboratorijske metode osmišljene za testiranje protuobraštajnih sredstava uključuju ličinke rakova vitičara (Rittschof i sur., 1986; Fusetani i sur., 1996) i ličinke mahovnjaka (Bryan i sur., 1997; Schmitt i sur., 1998). Također se koristi dagnja u studijama za određivanje aktivnosti protuobraštajnih tvari (Harada i sur., 1984; Kitajima i sur., 1995; Satuito i sur., 1993;

Hellio i sur., 2000). Nadalje testiranje na dagnjama koristi se i za određivanje protuobraštajne aktivnosti novih spojeva i prirodnih ekstrakata (Goto i sur., 1992; Shimidzu i sur., 1993; Dormon i sur., 1996). Metode uključuju testiranje odraslih jedinki, larvalne stadije ili juvenilne jedinke. Laboratorijska bisusno-nitna metoda koja uključuje odrasle jedinke dagnje (Harada i sur., 1984) provodi se fiksiranjem jedinki duž ruba tretirane zone, a ocjenjuje se promatranjem mjesta i broja bisusnih niti proizvedenih od dagnji prilikom prihvata. Unutar netretirane zone dagnje se prihvaćaju za podlogu s mnogo bisusnih niti (obično 10 do 30) za razliku od tretirane zone gdje dagnje uspijevaju razvući svoje bisusne niti izvan dometa tretirane zone. Metoda je nezadovoljavajuća zbog potrebe za velikim brojem uzoraka, cirkulirajućim protokom morske vode, veoma kontroliranim umjetnim uvjetima i problematičnim opažanjima.

Testiranje larvalnih stadija ima praktičnu vrijednost u smislu potrage za protuobraštajnim sredstvima, no potrebno je dvadesetak dana za kultiviranje larvi dagnje do pediveliger faze (Satuito i sur., 2005). Kao i larve pediveligera, juvenilne dagnje održavaju svoju aktivnost prihvata te su također korisne za testiranje protuobraštajnih tvari zbog njihove visoke pretraživačke aktivnosti za pričvršćivanje na odgovarajući supstrat. Juvenilne dagnje se testiraju na netretiranoj testnoj ploči i ploči tretiranoj sa različitim koncentracijama protuobraštajnog sredstva (Kitajima i sur., 1995). Ova metoda mjeri migraciju i prihvata dagnji tijekom 24 sata te se na taj način mjeri učinkovitost protuobraštajnih sredstava. Pri većim koncentracijama protuobraštajnog sredstva smanjena je migracija i prihvata dagnji. Na taj način se ispituje selektivnost dagnji prema supstratu. Dagnje reagiraju na četiri načina: a) uginu, b) ostaju na agaru, c) migriraju bez prihvata i d) prihvate se za podlogu. U slučaju a) protuobraštajno sredstvo smatra se toksičnim. Slučaj b) predstavlja veliku protuobraštajnu aktivnost, slučaj c) predstavlja dobru protuobraštajnu aktivnost, dok u slučaju d) nije vidljiva protuobraštajna aktivnost. Nakon svakog pokusa dagnje se prenesu na 24 sata u petrijeve zdjelice koje sadrže svježu morsku vodu kako bi se ispitalo jesu li zadržale sposobnost prihvata. Ako je polovica tretiranih dagnji (uključujući dagnje koje su uginule) izgubila svoju sposobnost prihvata, protuobraštajno sredstvo je proglašeno toksičnim. Ova metoda se pokazala korisnom za procjenu protuobraštajne aktivnosti prirodnih proizvoda, može se provesti u uvjetima koji su slični prirodnim u odnosu na prethodne metode te osim toga zahtjeva manji broj uzoraka. Zbog toga je ovaj rad napravljen vodeći se metodom prema Kitajima i sur. (1995).

2. CILJEVI RADA

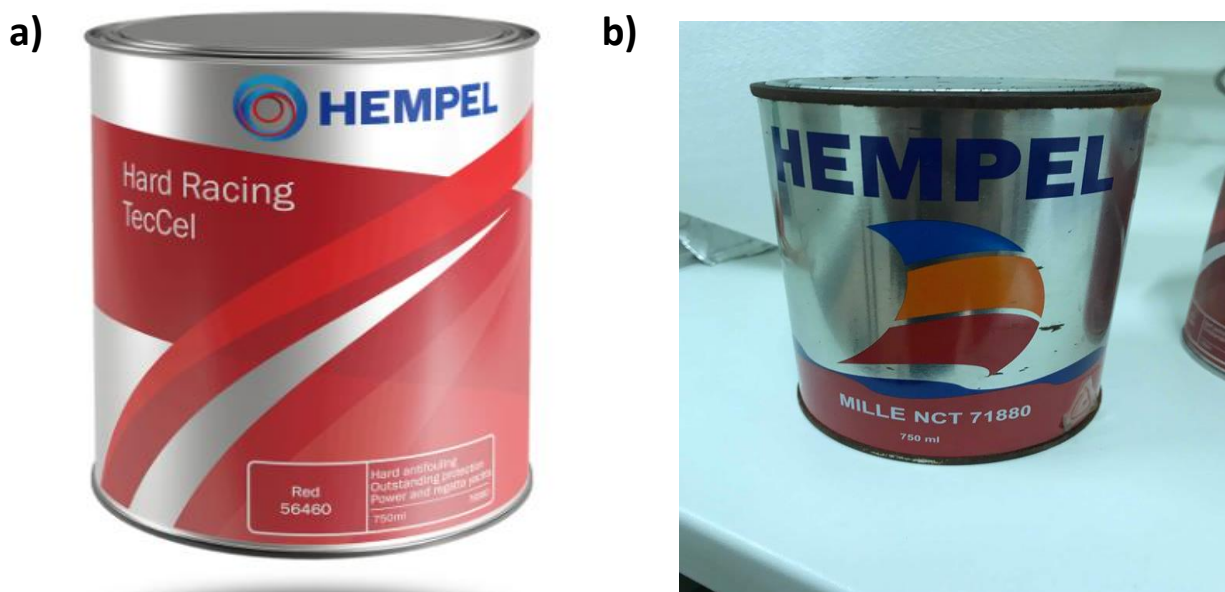
1. Utvrditi učinak CuSO_4 na prihvatač dagnje *Mytilus galloprovincialis* u ovisnosti o vremenu i koncentraciji.
2. Utvrditi učinak komercijalnih protuobraštajnih boja na prihvatač dagnje *Mytilus galloprovincialis* u ovisnosti o vremenu.
3. Definirati protuobraštajnu aktivnost različitih koncentracija CuSO_4 te komercijalnih protuobraštajnih boja.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Bakrov(II) sulfat i metanol bili su analitičke čistoće i nabavljeni od Kemike, Hrvatska, a Difco marine agar od Gorea Plus, Hrvatska. Crvena protuobraštajna Hempel Hard Racing TecCel i crna Hempel Mille NCT boja nabavljene su od tvrtke Hempel, Hrvatska (Slika 4.).



Slika 4. Korištene komercijalne protuobraštajne Hempelove boje: a) crvena Hempelova boja (Hard Racing TecCel), b) crna Hempelova boja (Mille NCT).

3.1.2 Uzorkovanje dagnje *Mytilus galloprovincialis*

Uzorkovanje dagnje *Mytilus galloprovincialis* provedeno je u području Limskog zaljeva (Slika 5.) koje je poznato uzgajalište riba i školjkaša. Uzorkovano je oko 200 juvenilnih jedinki dagnje veličinske kategorije do 3 cm direktno sa pergolara (Slika 6.) na način da su dagnje odvojene škaricama sa busena kako povlačenjem ne bi došlo do oštećenja bisusnih niti ili unutarnjih

organa. Dagnje su odmah nakon uzorkovanja prenesene u Centar za istraživanje mora (CIM) Instituta Ruđer Bošković u Rovinju gdje je u laboratoriju proveden eksperimentalni dio.



Slika 5. Područje uzorkovanja dagnje (*Mytilus galloprovincialis*, Lamarck 1819) u Limskom zaljevu.



Slika 6. Izdvajanje jedinki dagnje *M. galloprovincialis* s pergolara do 3 cm veličine uz pomoć škarica.

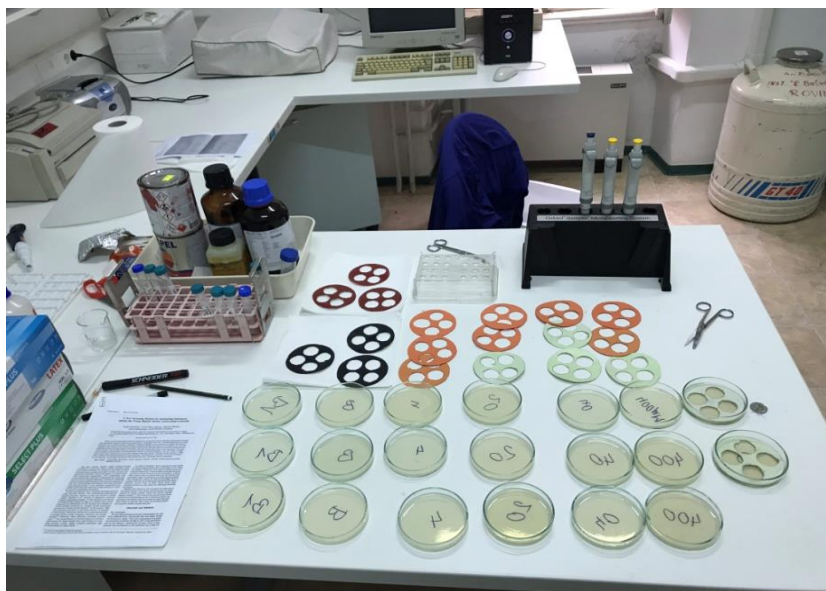
3.2 Metode

3.2.1. Priprema otopina CuSO_4

Izvagano je 0.013 g CuSO_4 i dodano 13 ml metanola. Na taj način je pripravljena stock otopina (1 mg/ml CuSO_4) koja predstavlja otopinu 1. Otopina 2 je pripravljena na način da je 1 ml stock otopine dodano u 9 ml metanola i promješano (0.1 mg/ml CuSO_4). I za kraj je pripravljena otopina 3 na način da je 1 ml otopine 2 dodano u 9 ml metanola i promješano (0.01 mg/ml CuSO_4). Ove tri otopine su služile za pripremu različitih koncentracija CuSO_4 i to 4, 20, 40 i 400 μM .

3.2.2 Priprema testnih ploča

Izrezani su krugovi od kartona koji su bili promjera kao i petrijeve zdjelice (10 cm). U svakom kartonskom krugu napravljena su četiri otvora promjera $\approx 2.5\text{cm}$. Zatim je pripremljen 3%-tni agar koji je izliven u petrijeve zdjelice. Taj agar je služio kako bi se izrezani krugovi lakše priljepili uz petrijevku. Na Slici 7. prikazani su izrezani kartonski krugovi te pripravljene petrijevke s agarom kao i svi potrebni materijali i pribor za testiranje protuobraštajne aktivnosti.

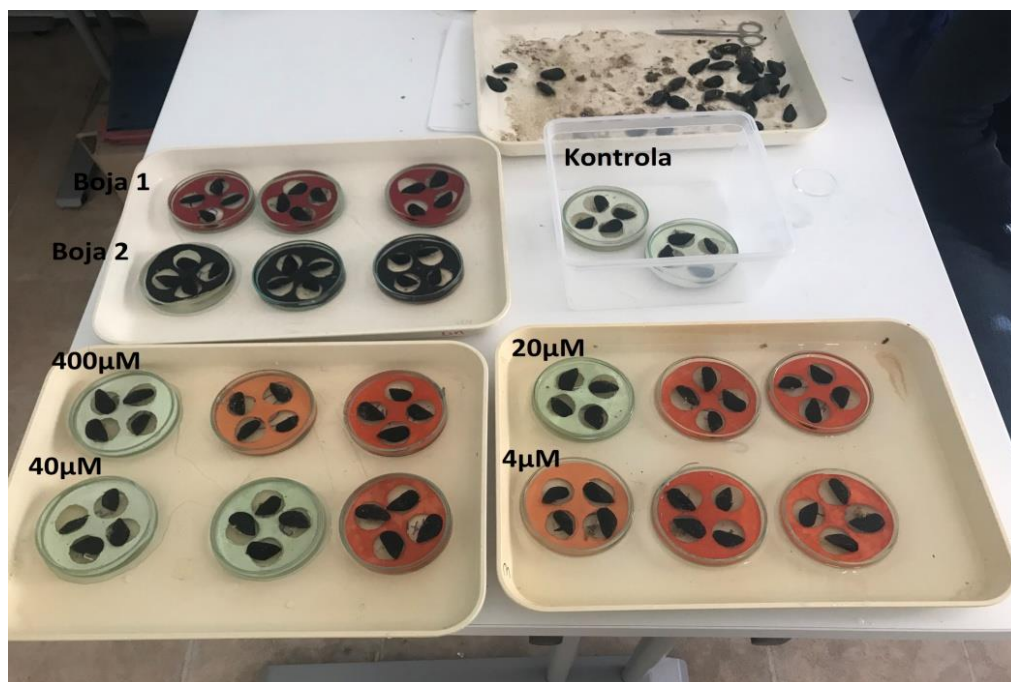


Slika 7. Eksperimentalni postav za testiranje protuobraštajne aktivnosti

Pripremljene su koncentracije od 4, 20, 40 i 400 μM CuSO_4 te je kistom nanijeto po 700 μl na karton. Također je nanijeto po 700 μl crvene (boja 1) i crne (boja 2) Hempelove boje. Obje boje su na bazi bakra, a jedina razlika je u tome što se crvena boja (Hempel Hard Racing TecCel) većinom koristi za glisere i brže brodove.

3.2.3 Testiranje učinka CuSO_4 i Hempelovih boja

Dagnje 2-3 cm veličine postavljene su u petrijevke u otvore kartonskih krugova. U svaku petrijevku su stavljene 4 dagnje u svoj otvor na agar. Za svaku koncentraciju CuSO_4 te za obje boje rađeni su triplikati, odnosno pokus u 3 petrijeve zdjelice radi bolje obrade rezultata. Osim toga testirana je i kontrolna skupina u kojoj je karton bio premazan samo s metanolom te je ona rađena u duplikatu (Slika 8).



Slika 8. Testiranje učinka CuSO_4 i Hempelovih boja

Paralelno rađen je i pokus s manjim veličinskim kategorijama dagnji (1-2 cm). Za njega je korištena samo crvena i crna Hempelova boja radi usporedbe prihvata dviju veličinskih kategorija dagnji te ispitivanja djelotvornosti boja. Cijeli postupak kod manjih dagnji je bio isti jedino su otvori na kartonskim krugovima bili manji (≈ 2 cm). Također je na kartone nanoseno po 700 μ l crvene i crne Hempelove boje i obje boje su rađene u triplikatima. Za pokus s manjim dagnjama također je testirana i kontrolna skupina u duplikatu kod koje je karton bio premazan s metanolom.

Nakon što su sve dagnje bile postavljene u odgovarajuće otvore, petrijevke su postavljene na pladnjeve te su petrijevke bile raspoređene po koncentracijama i bojama po tri u redu. Za sam kraj ulila se morska voda u svaku petrijevku do razine iznad organizama kako bi cijele dagnje bile pokrivene vodom te kako bi se mogle slobodno kretati po petrijevki. Na taj način se također dodatno sprječava njihov izlazak iz petrijevki. Osim toga petrijevke su bile dovoljno odvojene jedna od druge kako bi se spriječilo da dagnje prelaze iz jedne petrijevke u drugu. Pokus je trajao 24 sata.

3.2.4 Prikaz i obrada podataka

Aktivnost i ponašanje dagnji zabilježeno je kamerom nakon 2h, 4h, 6h, 8h, 10h i nakon 24h. Također je njihova aktivnost zabilježena neposredno nakon postavljanja na agar. Sve fotografije su snimljene mobitelom iPhone 7 (Apple, California). Prosječni udio migriranih i prihvaćenih dagnji izračunat je prema relaciji:

$$\frac{\text{broj migriranih/prihvaćenih}}{12} \times 100.$$

Za obradu podataka korištene su osnovne statističke metode u programu „Microsoft Office Excell 2007” (Windows 7). Za uređivanje i rezanje slika korišten je program Paint (Windows 7). Dio podataka, odnosno aktivnost protuobraštajne tvari obrađen je prema kriterijima iz literaturnih podataka (Kitajima i sur.,1995). Sustav ocjenjivanja protuobraštajne aktivnosti prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Sustav ocjenjivanja protuobraštajne aktivnosti (Kitajima i sur., 1995)

Aktivnost	Definicija	Tretman u petrijevkama
Izrazito velika (+ +)	$M < MS$	$M < 100\%$
velika (+)	$MS < M \text{ i } A < AS$	$100\% < M \text{ i } A < 75,3\%$
mala (±)	$AS < A < as$	$75,3\% < A < 83,7\%$
Bez aktivnosti (-)	$as < A$	$83,7\% < A$

M = Prosječni postotak migriranih dagnji u uvjetima tretiranja sa CuSO_4 , odnosno bojom.

$$MS = M_{\text{kont}} - 2S_{\text{mig}}$$

M_{kont} = Prosječni postotak migriranih dagnji u kontrolnim uvjetima

S_{mig} = Standardna pogreška prosječnog postotka migriranih dagnji u kontrolnim uvjetima

A = Prosječni postotak prihvaćenih dagnji u uvjetima tretiranja sa CuSO_4 , odnosno bojom

$$AS = A_{\text{kont}} - 2S_{\text{prihv}}$$

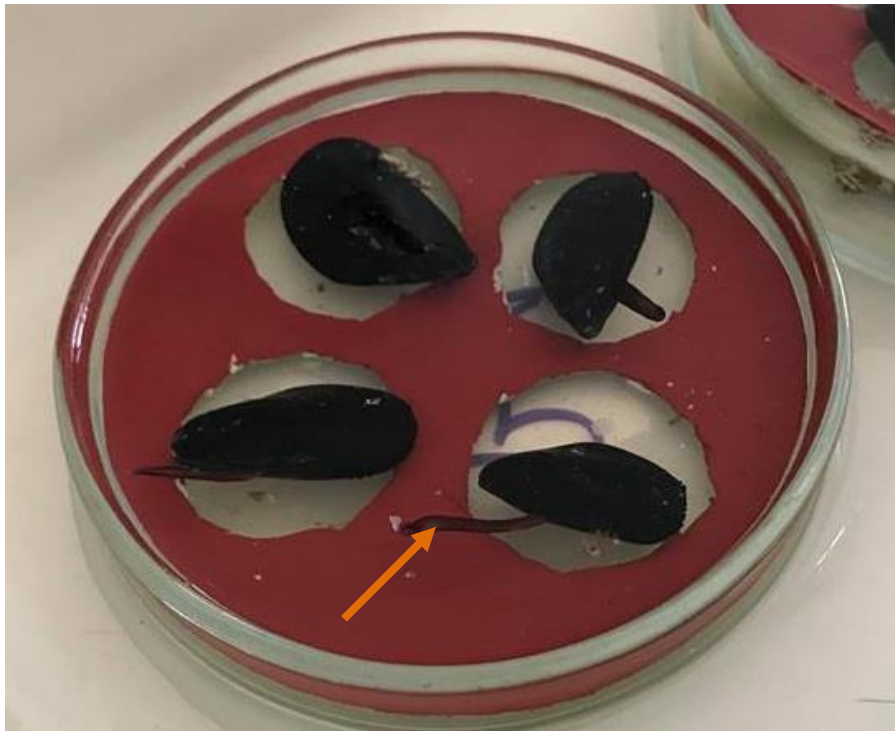
$$as = A_{\text{kont}} - S_{\text{prihv}}$$

A_{kont} = Prosječni postotak prihvaćenih dagnji u kontrolnim uvjetima

S_{prihv} = Standardna pogreška prosječnog postotka prihvaćenih dagnji u kontrolnim uvjetima

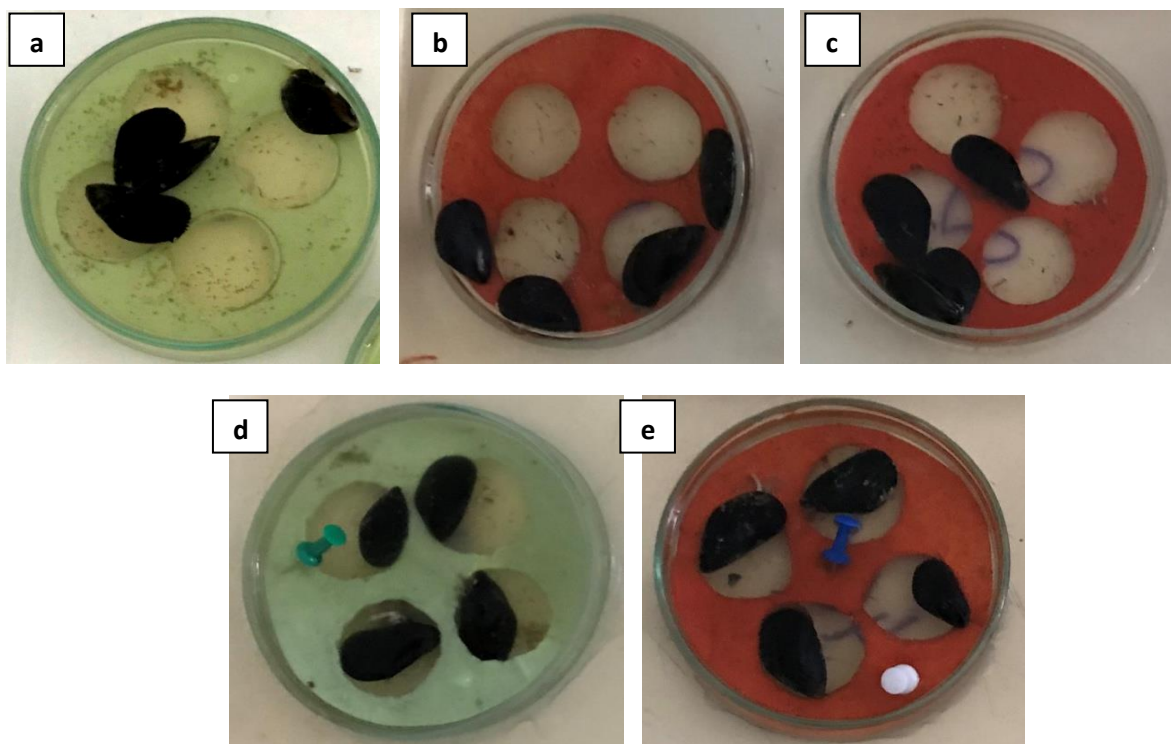
4. REZULTATI

U ovom radu testirani su učinci CuSO_4 i komercijalnih protuobraštajnih Hempelovih boja na prihvata i migraciju dagnje u vremenskom periodu od 24 sata. Aktivnost mnogih dagnji započela je neposredno nakon postavljanja na agar što se moglo uočiti iz izbacivanja njezinih stopala (Slika 9.).



Slika 9. Izbacivanje stopala pomoću kojeg dagnje istražuju mjesto gdje će se prihvatiti.

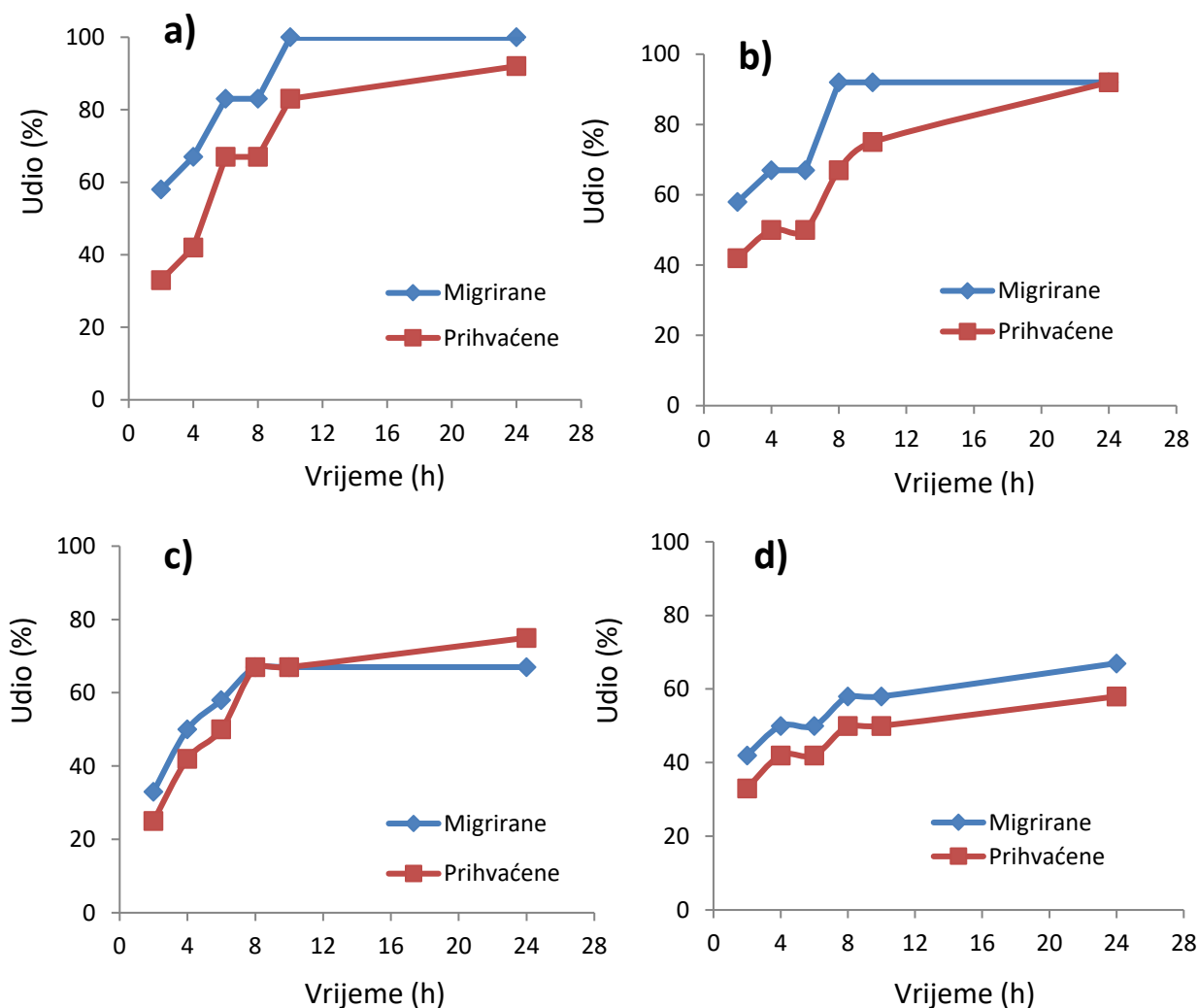
Neke dagnje iako su migrirale s agara, nisu se pričvrstile za podlogu odnosno karton. Migracija i prihvata nekih dagnji uočena je već nakon 2 sata, a većina aktivnosti završena je nakon 10 sati. Rezultati testiranja učinka CuSO_4 na prihvat dagnji (2-3 cm) nakon 24 h prikazani su na Slici 10.



Slika 10. Učinak CuSO_4 na prihvat dagnji (2-3 cm) nakon 24 sata, a) kontrola b) $4 \mu\text{M}$ CuSO_4 , c) $20 \mu\text{M}$ CuSO_4 , d) $40 \mu\text{M}$ CuSO_4 , e) $400 \mu\text{M}$ CuSO_4 .

Kod manjih koncentracija, $4 \mu\text{M}$ i $20 \mu\text{M}$ CuSO_4 gotovo sve dagnje su migrirale iz agara i bile prihvaćene za karton ili za rub petrijevke. Ista situacija desila se kod kontrolne skupine. Kod većih koncentracija, $40 \mu\text{M}$ i $400 \mu\text{M}$ CuSO_4 većina dagnji nije migrirala i nije bila prihvaćena.

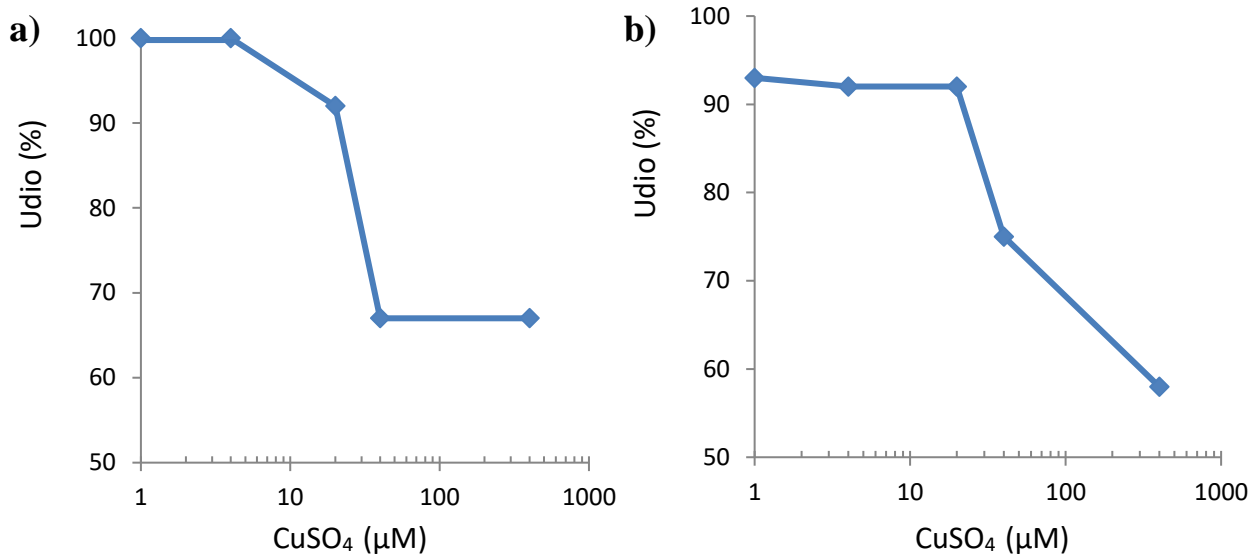
Testirana je vremenska ovisnost migracije i prijvata dagnji (2-3 cm) o različitim koncentracijama CuSO_4 i rezultati su prikazani na Slici 11.



Slika 11. Ovisnost migriranih i prihvaćenih dagnji (2-3 cm) o vremenu izloženosti CuSO_4 a) 4 μM , b) 20 μM c) 40 μM d) 400 μM .

Kod manjih koncentracija, 4 μM i 20 μM CuSO_4 veći je postotak migriranih i prihvaćenih dagnji u odnosu na veće koncentracije. Promatrajući određenu koncentraciju kroz vrijeme vidljivo je da je veći postotak migriranih dagnji od prihvaćenih iz razloga što su neke dagnje migrirale, ali nisu bile prihvaćene i mijenjale su svoj položaj. Kod najmanje koncentracije (4 μM) sve su dagnje migrirale tijekom 24 sata, osim jedne koja nije bila prihvaćena i koja je uginula. Kod većih koncentracija, 40 μM i 400 μM CuSO_4 također je veći postotak migriranih dagnji od prihvaćenih kroz vrijeme. Kod koncentracije od 40 μM veći je postotak prihvaćenih dagnji nakon 24 sata jer

jedna dagnja nije migrirala, ali se prihvatila odmah na karton. Osim toga neke su se dagnje uspjele prihvatiti jedna za drugu bez da migriraju iz razloga što je njihov međusobni razmak bio malen. Ovisnost migracije i prihvata dagnji (2-3 cm) o koncentraciji CuSO_4 prikazana je na Slici 12.



Slika 12. Ovisnost migracije (a) i prihvata (b) dagnji (2-3 cm) nakon 24 h o koncentraciji CuSO_4

Pri niskoj koncentraciji CuSO_4 (4 i 20 μM) visoki je postotak migracije pa čak i do 100% (Slika 12a). Prihvat je nešto manji pri niskim koncentracijama i iznosi oko 92% (Slika 12b). Povećanjem koncentracije CuSO_4 dolazi do smanjenja migracije i prihvata dagnji te njihova migracija i prihvat jasno ovise o koncentraciji CuSO_4 .

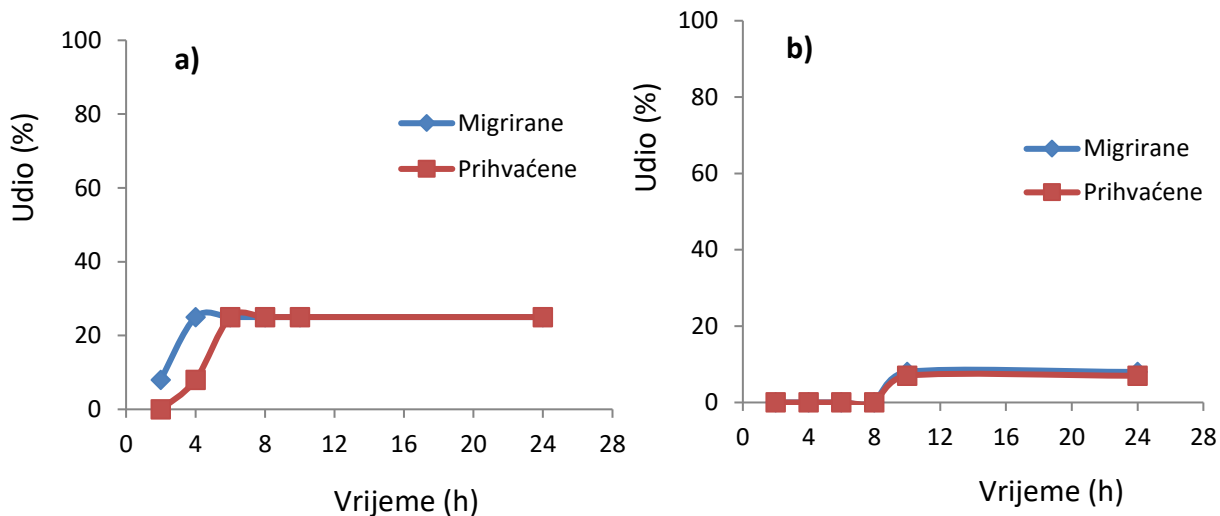
Također je testiran učinak dviju vrsta Hempelovih protuobraštajnih boja, crvene i crne (Hard Racing i Mille NCT) na prihvat dvije veličinske kategorije dagnji nakon 24 sata (Slika 13).



Slika 13. Ovisnost prihvata dagnji veličine a) 1-2 cm i b) 2-3 cm o vrsti komercijalne protuobraštajne boje nakon 24 sata

Nema značajne razlike u prihvatu dagnji različitih veličinskih kategorija. Gotovo sve dagnje nisu migrirale i nisu se prihvatile. Jedina mala razlika je u tome što je kod većih dagnji (2-3 cm), kod crvene boje jedna dagnja uspjela migrirati i prihvatiti se za rub petrijevke. Osim toga još su se dvije dagnje uspjele međusobno prihvatiti zbog njihovog malog međusobnog razmaka. Kod malih dagnji (1-2 cm) niti jedna dagnja nije migrirala te nije se prihvatila.

Nadalje, testirana je vremenska ovisnost migracije i prihvata dagnji (2-3 cm) o dvije komercijalne protuobraštajne boje (Slika 14.).



Slika 14. Ovisnost migriranih i prihvaćenih dagnji (2-3 cm) o vremenu izloženosti a) crvenoj Hempel boji b) crnoj Hempel boji.

Kod obje boje jako je mali postotak migriranih i prihvaćenih dagnji. Kod crvene je boje samo jedna dagnja uspjela migrirati do kraja petrijevke i prihvatiti se za rub. Osim toga još su dvije dagnje uspjele malo migrirati i prihvatiti se jedna za drugu. Crna boja je pokazala veću protuobraštajnu učinkovitost i onemogućava migraciju i prihvat dagnji 10 sati, a sam prihvat je iznosio 8 % od ukupno testiranih dagnji. Crvena boja onemogućava migraciju i prihvat dagnji 6 sati, a sam prihvat je iznosio 25 %.

Izračunat je prosječni postotak migracije i prihvata dagnji (2-3 cm) nakon 24 sata koje su bile pod utjecajem CuSO_4 i boje.

Rezultati su prikazani u Tablici 2.

Tablica 2. Učinak CuSO_4 i boja na migraciju i prihvat dagnji (2-3 cm) nakon 24 h.

	MIGRACIJA	PRIHVAT
Kontrola	100 %	92 %
4 μM CuSO_4	100 %	92 %
20 μM CuSO_4	92 %	92 %
40 μM CuSO_4	67 %	75 %
400 μM CuSO_4	67 %	58 %
Boja 1 (Crvena)	25%	25%
Boja 2 (Crna)	8%	8%

Pri većim koncentracijama CuSO_4 (40 i 400 μM) zamijećena je manja migracija i prihvat dagnji u odnosu na manje koncentracije i u odnosu na kontrolnu skupinu. Također je i kod obje boje velika razlika u migraciji i prihvatu dagnji u odnosu na kontrolnu skupinu. Osim toga kod boja je i najmanji postotak migracije i prihvata nakon 24 sata.

Rezultati ocjenjivanja protuobraštajne aktivnosti CuSO_4 i Hempelovih boja prikazani su u Tablici 3.

Tablica 3. Protuobraštajna aktivnost CuSO_4 pri određenim koncentracijama te protuobraštajna aktivnost Hempelovih boja kod dagnji 2-3 cm.

Testiranje	400 μM CuSO_4	40 μM CuSO_4	20 μM CuSO_4	4 μM CuSO_4	Boja 1	Boja 2
Ocijena aktivnosti	++	++	-	-	++	++
Opis protuobraštajne aktivnosti	Izrazito velika	Izrazito velika	Bez aktivnosti	Bez aktivnosti	Izrazito velika	Izrazito velika

Protuobraštajna aktivnost CuSO_4 pri 40 i 400 μM ocijenjena je sa ++. To znači da je pri tim koncentracijama dobra protuobraštajna aktivnost CuSO_4 i najčešće odgovara slučaju da dagnje nisu migrirale te da nisu bile prihvaćene. Također su obje boje ocijenjene sa ++ te je i njihova protuobraštajna aktivnost izrazito velika. Koncentracije CuSO_4 od 4 i 20 μM nisu iskazale učinak na prihvrat dagnji.

5. RASPRAVA

Brojna protuobraštajna sredstva koja su se pokazala djelotvornima imaju negativan utjecaj na morske organizme. Zbog toga se danas sve više pažnje posvećuje traženju novih učinkovitih metoda za testiranje protuobraštajnih sredstava koja istovremeno neće štetiti okolišu.

U ovom radu testirana je aktivnost protuobraštajnih tvari metodom po Kitajima i sur. (1995) koja uspoređuje migraciju dagnji iz agara i prihvata dagnji na podlogu premazanu protuobraštajnim sredstvom. Dagnja ne preferira agar i ima tendenciju migriranja iz njega, ovisno o susjednoj sredini. Dagnje su bile izložene djelovanju CuSO_4 i dviju protuobraštajnih boja. Testirane dagnje reagirale su na tri načina: a) ostale su na agaru, b) migrirale su bez prihvata i c) migrirale su i prihvatile se. Ako su dagnje ostale na agaru tijekom cijelog eksperimenta to znači da je protuobraštajno sredstvo učinkovito. Dagnje koje su tijekom vremena migrirale i mjenjale svoj položaj, tražile su prikladnu površinu gdje se mogu prihvatiti. Ako do prihvata nije došlo ni nakon 24 sata to znači da je protuobraštajno sredstvo bilo zadovoljavajuće. Kod dagnji koje su migrirale i prihvatile se za karton protuobraštajno sredstvo je veoma slabo i nije bilo zadovoljavajuće. U ovom slučaju to je bilo vidljivo kod manjih koncentracija CuSO_4 (4 i 20 μM).

Bakrov(II) sulfat je upotrebljen kao modelni spoj kako bi se dokazala njegova već poznata protuobraštajna aktivnost te se može usporediti sa rezultatima iz rada prema Kitajima i sur. (1995). Gledajući odnos između migracije i prihvata dagnji u ovisnosti o vremenu u oba rada je vidljivo kako je veći broj migriranih dagnji u odnosu na prihvaćene. Brojne dagnje su duže vrijeme migrirale kako bi pronašle prikladnu površinu za prihvata, no kod nekih dagnji niti nakon 24 sata nije došlo do prihvata. Rezultati ovog rada su u skladu s prijašnjim nalazima (Kitajima i sur., 1995). Koncentracije od 4 i 20 μM CuSO_4 nisu pokazale protuobraštajnu aktivnost dok u radu prema Kitajima i sur. (1995) samo najmanja koncentracija (0.1 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) CuSO_4 nije pokazala protuobraštajnu aktivnost. Najveća koncentracija CuSO_4 (10 $\mu\text{mol}/\text{cm}^2$) ocijenjena je toksičnom (Kitajima i sur., 1995), a 750 ppm CuSO_4 dovodi do smanjene produkcije bisusnih niti i dagnje ugibaju (Harada i sur., 1984).

U djelu eksperimenta u kojem je testiran utjecaj dviju komercijalnih protuobraštajnih Hempelovih boja, većina dagnji nije migrirala te se nije prihvatila. Također nije bilo velike razlike ni kod obje veličinske kategorije. Kod većih dagnji (2-3 cm) mala je razlika kod crvene u odnosu na crnu boju zbog toga što su neke dagnje uspjele migrirati i prihvatiti se. Rezultati su očekivani obzirom da se crna boja u praksi pokazala uspješnijom u odnosu na crvenu. Osim toga mala je razlika u volumnom udjelu suhe tvari te je veća kod crne boje. Protuobraštajna aktivnost obje Hempelove boje je također izrazito velika te se one već duže koriste kao protuobraštajno sredstvo na brodovima. Problem je u tome što su one na bazi bakra te se taj bakar s vremenom otpušta u morski ekosustav i negativno djeluje na morske organizme. Također je dokazano da su protuobraštajne boje na bazi bakra toksične za mnoge morske organizme kao npr. vrstu rakova *Artemia nauplii* (Katranitsas i sur., 2003). Zato treba istraživati protuobraštajnu aktivnost novih spojeva i prirodnih ekstrakata pogodnim, jednostavnim i brzim metodama.

6. ZAKLJUČCI

1. Veličina juvenilnih jedinki dagnje *Mytilus galloprovincialis* od 1-3 cm ne utječe na rezultate testiranja učinkovitosti protuobraštajnih sredstava.
2. Najveće testirane koncentracije CuSO₄ (40 i 400 μM) onemogućile su prihvrat dagnje dok manje koncentracije (4 i 20 μM) nisu iskazale protuobraštajni učinak
3. Testirane Hempelove boje onemogućile su prihvrat dagnje iskazujući izrazito veliku protuobraštajnu aktivnost.
4. Veću protuobraštajnu učinkovitost iskazala je crna boja koja onemogućava migraciju i prihvrat 10 sati, a sam prihvrat je 8 % od ukupno testiranih dagnji. Crvena boja onemogućava migraciju i prihvrat 6 sati, a sam prihvrat je 25 %.

7. LITERATURA

Bakran-Petricioli T, Petricioli D, Mlinarić D, Smital T (2015) Obraštaj na plinskim platformama u Jadranu kao pokazatelj stanja okoliša. *Nafta i plin* 142: 72-80

Bryan PJ, Rittschof D, Qian PY (1997) Settlement inhibition of bryozoan larvae by bacterial films and aqueous leachates. *Bull Mar Sci* 61: 849–857

Callow M (1990) Shipfouling: problems and solution. *Chem. Ind.*, 123-127.

Chambers LD, Stokes KR, Walsh FC, Wood RJK (2006) Modern approaches to marine antifouling coatings. *Surf & Coat Technol* 201: 3642-3652.

de Nys R and Guenther J (2009) The impact and control of biofouling in marine finfish aquaculture. In: Hellio C, Yebra D (eds) *Advances in marine antifouling coatings and technologies*. Cambridge (UK): Woodhead Publishing Ltd p: 177–221

Delort E, Watanabe N, Etoh H, Sakata K, Ceccaldi H J (2000) Analysis of initial fouling process in coastal environment: effects of settlement, attachment, and metamorphosis promoters. *Mar Biotechnol* 2: 224–230

Dormon JM, Cottrell M, Allen DG, Ackerman JD, Spelt JK (1996) Copper and copper–nickel alloys as zebra mussel antifoulants. *J Environ Eng (ASCE)* 122: 276–283

Fusetani N, Hiroto H, Okino T, Tomono Y, Yoshimura E (1996) Antifouling activity of isocyanoterpenoids and related compounds isolated from a marine sponge and nudibranchs. *J Nat Toxins* 5: 249–259

Goto R, Kado R, Muramoto K, Kamiya H (1992) Fatty acids as antifoulants in a marine sponge. *Biofouling* 6: 61–68

Hall Jr LW, Anderson, RD (1999) A deterministic ecological risk assessment for copper in European saltwater environments. *Mar Poll Bull* 38: 207–218

Harada A, Sakata K, Ina K (1984) A new screening method for antifouling substances using the blue mussel *Mytilus edulis* L. *Agric Biol Chem* 48: 641–644

Hellio C, Bourgougnon N, Le Gal Y (2000a) Phenoloxidase (EC1.14.18.1) from the byssus gland of *Mytilus edulis*: purification, partial characterization and application for screening products with potential antifouling activities. *Biofouling* 16: 235–244

Hellio C, Bremer G, Pons A, Le Gal Y, Bourgougnon N (2000b) Inhibition of the development of microorganisms (bacteria and fungi) by extracts of marine algae from Brittany (France). *J Appl Microbiol Biotechnol* 54: 543–549

Juraga, I, Stojanović I, Noršić T (2007) Zaštita brodskoga trupa od korozije i obraštanja. *Brodogradnja* 58: 278-283.

Katranitsas A, Castritsi-Catharios J, Persoone G (2003) The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Mar Poll Bull*, 46 (11): 1491–1494.

Kitajima F, Satuito CG, Hirota H, Katsuyama I, Fusetani N (1995) A new screening method for antifouling substances against the young mussels *Mytilus edulis galloprovincialis*. *Fish Sci (Tokyo)* 61: 578–583

Magin CM, Cooper SP, Brennan AB (2010) Non-toxic antifouling strategies. *Materials Today* 13: 36-44.

Neira C, Levin LA, Mendoza G, Zirino A (2014) Alteration of benthic communities associated with copper contamination linked to boat moorings. *Mar Ecol Evolution Persp* 35: 46-66.

Persoone G and Castritsi-Catharios J (1989) A simple bioassay with *Artemia* larvae to determine the acute toxicity of antifouling paints. *Water Res* 23: 893–897.

Richmond MD and Seed R (1991) A review of marine macrofouling communities with special reference to annual fouling. *Biofouling*, 3: 151-168

Rittschof D, Costlow JD (1989) Bryozoan and barnacle settlement in relation to initial surface wettability: a comparison of laboratory and field studies. In: Ros J D (ed) *Topics in Marine Biology*. Proc 22nd Eur Mar Biol Symp, Instituto de Cienciar del Mar, Barcelona, Spain p: 411–416

Rittschof D, Hooper IR, Costlow JD (1986) Barnacle settlement inhibitors from sea pansies (*Renilla reniformis*). *Bull Mar Sci* 39: 376–382

Satuito CG, Bao W, Yang J, Kitamura H (2005) Survival, growth, settlement and metamorphosis of refrigerated larvae of the mussel *Mytilus galloprovincialis* Lamarck and their use in settlement and antifouling bioassays. *Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research* 21(3-4): 217-225

Satuito CG, Katsuyama I, Kitajima F, Fusetani N (1993) A new “mussel test” for antifouling substances. *Oebalia* 19: 479–484

Schmitt TM, Lindquist N, Hay ME (1998) Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of Dictyota spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae. *Chemoecology* 8: 125–131

Shimidzu N, Katsuoka M, Mizobuchi S, Ina K, Miki W (1993) Isolation of (2)-beta-bisabolene as a repellent substance against blue mussel from an octocoral *Sinularia* sp. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 19–51

Takasawa R, Ogura C, Watanabe N, Etoh H, Sakata K, Ina K (1992) An efficient laboratory matching and screening method for antifouling substances using the blue mussel, *Mytilus edulis*, and an antimicrobial assay. *Biosci Biotech Biochem* 56: 1208–1211

Trieff NM (2009) Toxicity of heavy metals, oils and other organics on *Artemia*. In: Persoone, G., Sorgeloos, P., Roels, O., Jaspers, E. (Eds.), *The brine shrimp Artemia*. In: *Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology*, vol. 1. Universa Press, Welteren, Belgium p: 253–262.

Yebra DM, Kiil S, Dam-Johansen K, (2004) Antifouling technology – past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Prog Org Coat* 50, 75-104.

8. SAŽETAK

Protuobraštajna sredstva već dugo se koriste protiv nakupljanja morskih organizama na čvrstim podlogama te se zbog svoje potencijalne štetnosti za okoliš moraju testirati. Kao protuobraštajna sredstva testirani su bakrov(II) sulfat i dvije komercijalne boje na prihvatač dagnje *Mytilus galloprovincialis*. Protuobraštajna aktivnost je procijenjena temeljem dva kriterija i to migracijom dagnji iz agara i prihvatom dagnji na podlogu tretiranu protuobraštajnim sredstvom. Manje koncentracije bakrovog(II) sulfata (4 i 20 μM) nisu pokazale protuobraštajnu aktivnost jer je većina dagnji migrirala iz agara i prihvatila se na podlogu. Veće koncentracije bakrovog(II) sulfata (40 i 400 μM) onemogućile su prihvat dagnji. Protuobraštajna aktivnost većih koncentracija bakrovog(II) sulfata ocijenjena je izrazito velikom. Obje komercijalne boje su također iskazale izrazito veliku protuobraštajnu aktivnost. Crna boja je onemogućila migraciju tijekom 10 sati, a prihvat je iznosio samo 8 %. Crvena boja je onemogućila migraciju 6 sati i prihvat dagnji od 25 %.

Ključne riječi: dagnja, *Mytilus galloprovincialis*, bakrov(II) sulfat, protuobraštajne boje, protuobraštajna aktivnost

9. ABSTRACT

Antifouling substances have long been used against the accumulation of marine organisms on solid substrates. They should be tested for their potential environmental hazards. Copper(II) sulfate and two commercial paints as antifouling substances were tested for the attachment of mussel *Mytilus galloprovincialis*. The antifouling activity was evaluated by two criteria, migration of mussels from agar and their attachment on the substrate treated with antifouling substances. Low concentrations of copper(II) sulfate (4 and 20 μM) did not show antifouling activity because most mussels migrated from agar and attached to the substrate. Larger concentrations of copper(II) sulfate (40 and 400 μM) prevented mussel attachment. The antifouling activity of higher concentrations of copper(II) sulfate was estimated to be extremely high. Both commercial paints have also exhibited a remarkably large antifouling activity. Black paint did not allow migration for 10 hours and attachment was only 8 %. Red color has prevented migration for 6 hours and attachment of 25 % mussels.

Key words: mussel, *Mytilus galloprovincialis*, copper(II) sulfate, antifouling paints, antifouling activity