

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ivanka DRAGIĆ

**PROTIVEGETATIVNA AKTIVNOST SINTETIČNIH
ANALOGOVI POLIMERNIH 3-ALKILIPIRIDINIJEVIH
SOLI IZ MORSKE SPUŽVE *Reniera sarai***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Ivanka DRAGIĆ

**PROTIVEGETATIVNA AKTIVNOST SINTETIČNIH ANALOGO
POLIMERNIH 3-ALKILPIRIDINIJEVIH SOLI IZ MORSKE SPUŽVE
*Reniera sarai***

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

ANTIFOULING ACTIVITY OF SYNTHETIC ANALOGUES OF POLYMERIC 3-
ALKYLPYRIDINIUM SALTS FROM THE MARINE SPONGE *Reniera sarai*

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2010

Za vsak naravni problem obstaja naravna rešitev, zato bodimo potrpežljivi pri odkrivanju in reševanju problemov. Samo tako bomo lahko zaščitili in ohranili mati Naravo za bodoče generacije.

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za raziskave morja ISMAR, podružnici italijanskega nacionalnega inštituta CNR (Genova, Italija), v okviru programa študentske izmenjave Erasmus/Socrates.

Komisija za študijske zadeve univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je dne 23.5.2008 za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorja pa dr. Marca Faimali-ja z Inštituta za raziskave morja ISMAR, podružnice italijanskega nacionalnega inštituta CNR (Genova, Italija).

Mentorica: prof.dr. Kristina Sepčič

Somentor: dr. Marco Faimali

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Damjana Drobne

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Tom Turk

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof.dr. Kristina Sepčič

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: dr. Marco Faimali

ISMAR, CNR, Genova (Italija)

Datum zagovora: 24.09.2010

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem besedilu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Ivanka Dragić

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- UD 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- KG spužve / Porifera / *Reniera sarai* / 3-alkilpiridinijeve soli / protivegetativna aktivnost / *Balanus amphitrite* / toksičnost / naravni produkti
- AV DRAGIĆ, Ivanka
- SA SEPČIĆ Kristina (mentor)/ FAIMALI, Marco (somentor)
- KZ SI- 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2010
- IN PROTIVEGETATIVNA AKTIVNOST SINTETIČNIH ANALOGO
POLIMERNIH 3-ALKILPIRIDINIJEVIH SOLI IZ MORSKE SPUŽVE *Reniera sarai*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP X, 43 str., 1 pregl., 30 sl., 41 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so spojine, izolirane iz morske spužve *Reniera sarai*. Omenjene spojine kažejo širok spekter bioloških aktivnosti: delujejo protitumorsko, hemolitično, citotoksično, protimikrobno, inhibirajo encim acetilholinesterazo ter preprečujejo pritrjanje organizmov na potopljene površine. Pred kratkim so na osnovi strukture izvirne poli-APS spojine sintetizirali analoge, ki posnemajo naravno spojino in bi bili prav tako primerni za izdelavo zaščitnih premazov. Z izbranimi sintetičnimi analogi smo ugotavljali učinkovitost inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) rakov vitičnjakov vrste *Balanus amphitrite* in prav tako preverili toksičnost istih sintetičnih analogov na ličinke (navplije) že omenjenih rakov. Na podlagi dobljenih rezultatov bi za nadaljnje raziskave in kasnejšo izdelavo netoksičnih aditivov oz. protivegetativnih premazov lahko uporabili analoga APS 8Br in APS 12Cl. Oba analoga sta pokazala učinkovito inhibicijo pritrjanja in zelo nizko toksičnost proti larvam *B. amphitrite*.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- UD 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- CX sponges / Porifera / *Reniera sarai* / 3-alkylpyridinium compounds / antifouling activity / *Balanus amphitrite* / toxicity / natural products
- AU DRAGIĆ, Ivanka
- AA SEPČIĆ Kristina (supervisor)/ FAIMALI, Marco (co-supervisor)
- PP SI- 1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical fakulty, Department of biology
- PY 2010
- TI ANTIFOULING ACTIVITY OF SYNTHETIC ANALOGUES OF POLYMERIC 3-ALKYLPYRIDINIUM SALTS FROM THE MARINE SPONGE *Reniera sarai*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO X, 43 str., 1 pregl., 30 sl., 41 vir.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Polymeric 3-alkylpyridinium salts (poly-APS) are compounds isolated from the marine sponge *Reniera sarai*. They exert a broad spectrum of biological activities: antitumoral, hemolytic, cytotoxic, antimicrobial, inhibition of acetylcholinesterase and antifouling activity. Recently, analogues of poly-APS were synthesized, which mimic the natural ones and make them suitable for commercial production of protective coatings. With selected synthetic analogues, we observed antifouling activity and settlement inhibition efficiency of *Balanus amphitrite* cyprids larvae. We also checked toxicity of some synthetic analogues towards nauplii larvae of above-mentioned organisms. Based on the results of our research we suggest the use of analogues APS 8Br and APS 12Cl for further research and production of non-toxic additives and antifouling coatings. Both analogues showed a good inhibition of settlement and very low toxicity towards *B. amphitrite* larvae.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	X
1 UVOD	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ZNAČILNOSTI SPUŽEV.....	3
2.1.1 Biološko aktivne snovi morskih spužev	3
2.1.2 Protivegetativne snovi morskih spužev	4
2.1.3 <i>Reniera sarai</i>	4
2.2 PROBLEM PRERAŠČANJA POTOPLJENIH POVRŠIN IN PROTIVEGETATIVNI PREMAZI	5
2.2.1 Sintetični protivegetativni premazi.....	6
2.2.2 Naravne protivegetativne snovi.....	7
2.2.3 Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) iz morske spužve <i>Reniera sarai</i> kot naravna protivegetativna sredstva	8
2.3 ZNAČILNOSTI RAKOV	9
2.3.1 Vitičnjaki.....	10
3 MATERIALI IN METODE	14
3.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE PROTIVEGETATIVNE AKTIVNOSTI ..	14
3.2 GOJENJE ODRASLIH RAKOV VRSTE <i>Balanus amphitrite</i>	15
3.3 ZBIRANJE IN GOJENJE LIČINK (NAVPLIJEV) <i>B. amphitrite</i>	16
3.4 BIOLOŠKI TESTI.....	17
3.4.1 Test inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) <i>B. amphitrite</i>	17

3.4.2 Test akutne toksičnosti sintetičnih polimernih analogov na ličinke (stadij navplija) <i>B. amphitrite</i>	19
3.4.3 Test inhibicije plavanja ličink (stadij navplija) <i>B. amphitrite</i> (SSA test)	19
3.4.4. Ovrednotenje zaviranja nastajanja biofilma s pomočjo izbranih sintetičnih analogov alkilpiridinijevih polimerov.....	21
4. STATISTIČNE ANALIZE	21
5. REZULTATI.....	22
5.1 TEST INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK (CIPRISOV) <i>B. amphitrite</i>	22
5.2 DOLOČANJE VREDNOSTI EC ₅₀ INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK <i>B. amphitrite</i>	24
5.2.1 Določanje vrednosti EC ₅₀ inhibicije pritrjanja ličink <i>B. amphitrite</i> s sintetičnim analogom APS 12Cl	25
5.2.2 Določanje vrednosti EC ₅₀ inhibicije pritrjanja ličink <i>B. amphitrite</i> s sintetičnim analogom APS 7Cl	25
5.2.3 Določanje vrednosti EC ₅₀ inhibicije pritrjanja ličink <i>B. amphitrite</i> s sintetičnim analogom APS 8Br.....	26
5.3 TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI SINTETIČNIH POLIMERNIH ANALOGOEV NA LIČINKE (STADIJ NAVPLIJA) <i>B. amphitrite</i>	27
5.4 TEST INHIBICIJE PLAVANJA LIČINK (STADIJ NAVPLIJA) <i>B. amphitrite</i> (SSA test)	29
5.5 OVREDNOTENJE ZAVIRANJA NASTAJANJA BIOFILMA S POMOČJO IZBRANIH SINTETIČNIH ANALOGOEV ALKILPIRIDINIJEVIH POLIMEROV ...	30
6 RAZPRAVA.....	31
7 ZAKLJUČEK	37
8 POVZETEK.....	38
9 LITERATURA	40
ZAHVALA	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Primerjava vrednosti EC_{50} , LC_{50} in IC_{50} poli-APS, cinkovega in bakrovega piritiona (Faimali in sod., 2003; Garaventa in sod., 2003) ter sintetičnih alkilpiridinijevih polimerov (ta diplomska naloga) v različnih testih.	32
---	----

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Reniera sarai</i> (kruhasta spužva).....	5
Slika 2: Delež protivegetativnih snovi, izoliranih iz morskih organizmov..	8
Slika 3: Poli-APS.....	9
Slika 4: Pritrjanje ciprisa na podlago z izločanjem cementa iz parnih cementnih žlez.....	12
Slika 5: Faze razvoja <i>B. amphitrite</i>	13
Slika 6: APS 3Cl.....	14
Slika 7: APS 7Cl.....	14
Slika 8: APS 8Br.....	14
Slika 9: APS 12-1	14
Slika 10: APS 12-2.....	15
Slika 11: APS 12Cl.....	15
Slika 12: Odrasli raki vitičnjaki (<i>B. amphitrite</i>), gojeni v laboratorijskih pogojih.....	16
Slika 13: Kulture navplijev v termostahirani omari.....	17
Slika 14: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 3Cl.....	22
Slika 15: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl.....	23
Slika 16: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br.....	23
Slika 17: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-1.	23
Slika 18: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-2.	24
Slika 19: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl.....	24
Slika 20: Test določanja EC ₅₀ : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl.....	25

Slika 21: Test določanja EC ₅₀ : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl.....	26
Slika 22: Test določanja EC ₅₀ : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br.....	26
Slika 23: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 3Cl.....	27
Slika 24: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl.....	28
Slika 25: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br.....	28
Slika 26: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-1.	28
Slika 27: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-2.	29
Slika 28: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl.....	29
Slika 29: Delež mrtvih (rumeni stolpci) in negibljivih (sivi stolpci) ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 24 urah.....	30
Slika 30: Delež mrtvih (rumeni stolpci) in negibljivih (sivi stolpci) ličink (navplijev) raka vitičnjaka <i>Balanus amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 48 urah.....	30

SEZNAM OKRAJŠAV

ANOVA	enosmerna analiza variance
<i>B. amphitrite</i>	rak vitičnjak <i>Balanus amphitrite</i> , modelni organizem, ki smo ga uporabili pri testih protivegetativne učinkovitosti in toksičnosti
CDP	barve z nadzorovanim odvajanjem aktivnih molekul brez kositra (<i>ang. tin-free controlled depletion paints</i>)
DAPI	4-6-diamidino-2-fenilindol
DMSO	dimetil sulfoksid
EC ₅₀	polovična efektivna koncentracija, oz. koncentracija, pri kateri je delež pritrjenih poskusnih živali 50 odstotkov manjši kot pri kontrolni raztopini
LC ₅₀	polovična letalna koncentracija, oz. koncentracija, ki povzroči smrt 50 odstotkov poskusnih živali glede na kontrolno raztopino
LOEC	najnižji določeni učinek koncentracije
IC ₅₀	polovična inhibitorna koncentracija, oz. koncentracija, ki povzroči inhibicijo plavanja 50 odstotkov poskusnih živali
MW	molekulska masa (<i>ang. molecular weight</i>)
Poli-APS	polimerne alkilpiridinijeve soli
PBS	slani fosfatni pufer pH 7,4
SNK	Student–Newman–Keulsov test
TBT	tributiltin
TF-SPC	samočistilne barve brez kositra (<i>ang. tin-free biocide-containing self-polishing paints</i>)

1 UVOD

Morje predstavlja življenjski prostor številnih organizmov, ki so v dolgi zemeljski zgodovini z evolucijskimi procesi spreminjali svoje oblike in lastnosti. Mnoge prilagoditve so jim omogočile življenje v pestrem okolju, ki se je neprestano spreminjalo, tako na fizikalni, kot na kemijski in biološki ravni.

Največja biološka raznolikost je v priobalnem pasu, kjer intenzivni in spreminjajoči se življenjski dejavniki in viri določajo rast in razvoj različnih organizmov v številnih ekoloških nišah.

Z naraščanjem števila organizmov nastaja med- in znotrajvrstna kompeticija za iste vire (Fusetani in Clare, 2006; Sepčić, 2008), kar pospeši dodatna prilagajanja, nastajanje vrst in razvoj novih lastnosti (Tarman, 1992).

Veliko priobalnih morskih nevretenčarjev ima v svojem življenjskem ciklu planktonske ličinke, ki sprva prosto plavajo, nato pa si poiščejo primerno podlago za pritrditev in preobrazbo. Faza iskanja in izbire primerne prostora za pritrditev je ključna za preživetje organizma in je odvisna od različnih okoljskih dejavnikov (svetloba, temperatura, slanost, tip podlage, starost organizma,...), med katerimi izstopajo kemijski signali, ki jih lahko oddajajo že naseljeni istovrstni organizmi ali tudi simbionti, plenilci, plen in gostitelji ter drugi primerni substrati (skale, različne potopljene konstrukcije). Včasih so idealna podlaga lahko tudi že pritrjeni organizmi, katerim preraščanje z drugimi organizmi lahko ogrozi preživetje, zato se pred tem zavarujejo z različnimi mehanizmi, med katerimi izstopa kemijska obramba (Fusetani, 2004).

Skupina organizmov, ki se pred preraščanjem učinkovito zavaruje s pomočjo kemijske obrambe, so morske spužve (Porifera) (Tsoukatou, 2002; Sepčić, 2008). Predstavljajo bogat vir različnih spojin, ki kažejo zanimive biološke učinke in so potencialno uporabne v medicini (Faulkner, 2000) in različnih industrijskih panogah (Fusetani, 2004). Te snovi spužve uporabljajo za zaščito pred plenilci, teritorialno kompeticijo ali protivegetativno obrambo, ki

prepreči naselitev organizmov na njihovo površino (Fusetani, 2004; Blunt in sod., 2006; Fusetani in Clare, 2006; Sepčić, 2008).

Človeštvo se že stoletja spopada z motečim in ekonomsko obremenjujočim preraščanjem potopljenih delov plovil in drugih konstrukcij v stiku z morjem (Almeida in sod., 2007). Za zaščito teh konstrukcij so v uporabi klasični, vendar toksični zaščitni premazi na podlagi cinka, bakra in kositra. Ker pa se bioakumulirajo in koncentrirajo v prehranjevalnih verigah morskih organizmov, za katere so bolj ali manj toksični, se v zadnjem času njihova uporaba opušča ali je celo prepovedana (Faimali in sod., 2003b; Omae, 2003b; Hellio, 2005; Almeida, 2007). Zaradi znanih negativnih učinkov obstoječih protivegetativnih premazov je vedno pomembnejše odkrivanje in razvoj do okolja prijaznejših, naravnih protivegetativnih snovi (Fusetani, 2004; Almeida in sod., 2007). Nekatere naravne snovi so že pokazale učinkovito netoksično delovanje proti preraščanju, zato bi jih lahko uporabljali v industriji protivegetativnih premazov (Tsoukatou, 2002; Faimali in sod., 2003b).

Namen tega diplomskega dela je bil ugotoviti potencialno protivegetativno aktivnost (inhibicijo pritrjanja rakov vitičnjakov) in toksičnost izbranih sintetičnih analogov polimernih 3-alkilpiridinijevih (poli-APS) soli iz morske spužve *Reniera sarai*. Ker so se omenjeni polimeri v preteklih poskusih že izkazali za protivegetativno aktivne in nizko toksične (Faimali in sod., 2003; Garaventa in sod., 2003), smo postavili **delovno hipotezo**, da bomo med sintetičnimi analogi tudi našli lastnosti netoksičnega protivegetativnega delovanja, kar bomo lahko v prihodnje uporabili za izdelavo zaščitnih premazov.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ZNAČILNOSTI SPUŽEV

Spužve (Porifera) so najbolj primitivne mnogocelične živali. Nimajo pravih organov, čeprav imajo dobro razvita vezivna tkiva, v katerih celice opravljajo najrazličnejše funkcije. So sesilne in imajo nenavadno zgradbo telesa, zato so jih v preteklosti naravoslovci (Aristotel, Plinij) uvrščali med rastline (Garaventa in sod., 2003).

So slepa razvojna veja, saj se iz njih ni razvila nova življenjska oblika. Odrasle spužve so skoraj vedno pritrjene na podlago, njihova rast in oblika pa sta odvisni od njihovih lastnosti ter vodnih tokov v njihovi neposredni okolici. Njihova glavna lastnost so odprtine na površini, ki se delijo na maloštevilne odtekalke in manjše ter številnejše dotekalke. Skoznje filtrirajo vodo in se tako prehranjujejo. Živijo vse od obrežnega pasu pa do največjih globin. Ker jih večina živi samo v čisti vodi, bogati s kisikom in z malo anorganskih delcev, jih lahko pojmujeemo kot bioindikatorje čiste vode (Turk, 2007).

2.1.1 Biološko aktivne snovi morskih spužev

Spužve so zaradi svoje zanimive zgradbe in kemizma že nekaj desetletij objekt intenzivnega raziskovanja, saj vsebujejo širok razpon sekundarnih metabolitov, med katerimi je veliko takih z nenavadnim kemizmom, ki se pogosto pojavljajo v visokih koncentracijah z močno biološko aktivnostjo. Zato ni presenetljivo, da ravno iz te skupine izhaja več kot 50% vseh izoliranih protivegetativnih učinkovin (Raveendran, 2009). Produkti spužev delujejo protivnetno, protitumorsko, hemolitično, protivirusno, citotoksično, protiglivno, protibakterijsko in celo antimalarično (Scott in sod., 2000; Oku in sod., 2004; Sepčić, 2008). Uporabljajo jih tudi v kozmetiki, industriji ali celo kot molekularna orodja v medicini (genska terapija) in celični biologiji (Sepčić, 2008). Po drugi strani pa še vedno predstavljajo eno najmanj raziskanih skupin organizmov, saj je od deset tisoč opisanih vrst raziskanih le nekaj več kot sto.

Zaradi svoje mehke zgradbe in sesilnega načina življenja se spužve ne morejo fizično braniti pred plenilci in kompetitorji, zato za obrambo proizvajajo različne metabolite. Eden od možnih načinov, kako pridobijo potrebne snovi za zaščito je ta, da s filtracijo preko hranil vsrkajo vase toksične komponente, ki jih izločajo alge in korale ter jih nato preoblikujejo in uporabijo za svojo zaščito (Raveendran, 2009).

2.1.2 Protivegetativne snovi morskih spužev

Proces preraščanja površin v morju ima več stopenj. Na začetku se nanje naberejo organski delci (proteini, proteoglikani, polisaharidi idr.), nato ga začnejo preraščati biofilmi bakterij, alg in drugih mikroorganizmov ter nazadnje še makroskopski organizmi. Med razvojem bentoške združbe se vzpostavijo kompleksni mehanizmi, ki uravnavajo interakcije med organizmi in potopljenim substratom ter vplivajo tudi na specifično sestavo združbe (Abarzua in Yakubowski, 1995). Spužve so med sesilnimi organizmi ene tistih, ki se uspešno branijo pred preraščanjem s sintezo protivegetativnih snovi. Industrijsko in ekološko pomembnejše protivegetativne molekule spadajo med terpene, steroide, saponine, snovi, sorodne maščobnim kislinam, bromirane aminokislinske ter heterociklične produkte (Fusetani, 2004).

2.1.3 *Reniera sarai*

Spužva *Reniera sarai* ali kruhasta spužva (slika 1) spada med kremenaste spužve, ki jih uvrščamo v razred Demospongia in družino Haliclonidae. Je umazano bele, sivo bele ali rumenkaste barve z bolj ali manj nepravilno obliko, ki skorjasto prerašča podlago. Iz skorjaste osnove navadno izraščajo do 5 cm visoki cevasti izrastki, ki se na vrhu odpirajo z dobro vidno izmetalko. Spužva ima mastno površino, je krhke zgradbe in se drobi kot star kruh. Njeno ogrodje sestavlja preplet dokaj velikih, povsem enakih iglic. Je značilen predstavnik organizmov, ki jih najdemo ob vhodih v podmorske votline in v notranjosti poltemnih votlin, vendar ne daleč od vhoda. V Jadranu je najpogostejša v globini med 15 in 50 m (Turk, 2006).



Slika 1: *Reniera sarai* (kruhasta spužva) (foto: prof. dr. Tom Turk).

Vsebuje 3-alkilpiridinijeve soli (Sepčić in sod., 1997; Scott in sod., 2000), ki jih proizvaja v večjih količinah (iz 50 g spužvinega tkiva so izolirali 40-50 mg spojine (Faimali in sod., 2003). Omenjene polimerne soli kažejo širok spekter bioloških aktivnosti (Scott in sod., 2000; Sepčić, 2008). Že na površini spužve je vidno, da ni nobenih pritrjenih organizmov, kar kaže na potencialno zaščitno vlogo alkilpiridinijevih soli in morebitnih drugih metabolitov, ki preprečujejo pritrjanje organizmov (Turk in sod., 2007).

2.2 PROBLEM PRERAŠČANJA POTOPLJENIH POVRŠIN IN PROTIVEGETATIVNI PREMAZI

Plovila in druge v morju potopljene konstrukcije ponujajo veliko površino, na katero se lahko naselijo združbe tam živečih organizmov, zato morajo biti zaščitene pred preraščanjem in tudi pred rjavenjem. Pomorstvo se s temi težavami srečuje že od vsega začetka in zaščitni premazi te težave poskušajo bolj ali manj uspešno odpravljati (Almeida in sod., 2007).

2.2.1 Sintetični protivegetativni premazi

Pred devetnajstim stoletjem so za zaščito plovil uporabljali loj, katran, vosek ali smolo, ki so jih nanесли prek lesenih ladijskih trupov. Feničani so uporabljali baker, Grki in Rimljani tudi svinec. V osemnajstem stoletju so v lesene površine zabijali žebličke iz cinka in bakra ter preizkušali učinkovitost premazov s svincem, nikljem, galvaniziranim jeklom, bakrom in cinkom. Uporaba naravnih materialov, kot so guma, vulkanit in pluta, je bila omejena zaradi oteženega nanosa. V sredini devetnajstega stoletja so začeli v premazih z lanenim oljem uporabljati arzenik in živo srebro. Nato so zaradi težav z rjavenjem začeli razvijati polimere z vključenimi toksičnimi snovmi. V drugi polovici dvajsetega stoletja so zaščitni sloji vsebovali različne polimere s toksikanti (baker, cink, titan itd.), ki so se iz prebarvane površine postopoma sproščali v okolje. Pred kratkim so prepovedali uporabo snovi z organskimi ostanki in težkimi kovinami, kot so živo srebro, svinec, arzenik in kositer. Slednji je sestavina zelo strupenih (Antizar-Ladislao, 2008) premazov s tributilkositrom (*ang. tributyltin*, TBT) (Omae, 2003a). Danes so še vedno v uporabi inhibitorji fotosinteze Irgarol, Diuron in nekateri nespecifični biocidi (Kathon) ter bakrov in cinkov piriton, ki naj bi bila po nekaterih raziskavah do okolja bolj prijazna (Voulvoulis in sod., 1999; Omae, 2003b; Almeida in sod., 2007). Razvitih ali v razvoju je nekaj do okolja prijaznejših alternativnih premazov, kot so barve z nadzorovanim odvajanjem aktivnih molekul brez kositra (*ang. tin-free controlled depletion paints*, CDP), samočistilne barve brez kositra (*ang. tin-free biocide-containing self-polishing paints*, TF-SPC) in hibridi med obema (Almeida in sod., 2007).

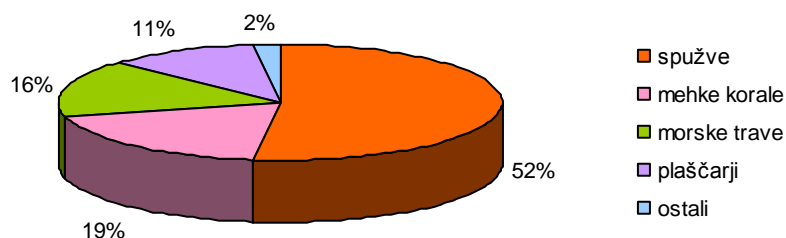
Kljub temu, da imajo nekatere nove industrijske protivegetativne snovi nekoliko manjši vpliv na morski ekosistem (Voulvoulis in sod., 1999) in s tem tudi na človeka, še vedno temeljijo na sproščanju nenaravnih toksičnih molekul (Almeida in sod., 2007). Zato je neizogibno, da nadaljnji razvoj zaščitnih premazov vključuje proučevanje naravnih, do okolja prijaznih in netoksičnih organskih snovi (Tsoukatou, 2002; Faimali in sod., 2003b; Fusetani, 2004; Almeida in sod., 2007).

2.2.2 Naravne protivegetativne snovi

Uporaba naravnih protivegetativnih snovi (slika 2) bi lahko bila uspešna rešitev in nadomestilo za trenutno najbolj učinkovit, vendar zelo toksičen umetni premaz, ki vsebuje tributiltin (TBT). Za tega so ugotovili, da povzroča odebelitve lupine pri populacijah ostrig in spremembo spolnih organov pri polžih. Poleg tega se bioakumulira v organizmih in vpliva na prehransko verigo (Raveendran, 2009).

Raziskovalci iščejo tak premaz, ki bi bil okoljsko sprejemljiv in obstojen dlje časa. Idealna rešitev za to so naravne protivegetativne snovi, saj se je v prejšnjih raziskavah izkazalo, da so pretežno manj toksične, učinkovite v manjših koncentracijah, biorazgradljive, in imajo reverzibilne protivegetativne učinke (preprečujejo pritrnanje tarčnih organizmov), a jih ne ubijajo. Poleg vseh teh lastnosti pa bi bile za proizvodnjo premazov najbolj zaželene tiste naravne snovi, ki delujejo kot repelenti in za organizme niso smrtonosne (Raveendran, 2009).

Do sedaj imajo te lastnosti protivegetativne molekule, ki spadajo med terpenoide, steroide, karotenoide, fenole, furanone, alkaloide, peptide in laktone. Te so izolirali iz široke palete organizmov, katerih največjo skupino predstavljajo spužve in mehke korale. Druge skupine vključujejo morske alge, morske trave, plaščarje, mahovnjake, mangrove in mikroorganizme (slika 2). V novejših raziskavah so protivegetativne lastnosti našli tudi med raki, kot sta jastog in obrežna rakovica, ter morskimi zvezdami. Tako so do danes iz različnih laboratorijev po svetu iz morskih virov uspešno izolirali več kot 145 naravnih protivegetativnih snovi (Raveendran, 2009).



Slika 2: Delež protivegetativnih snovi, izoliranih iz morskih organizmov. Povzeto po Natural product antifoulants, Review article, Raveendran, 2009.

2.2.3 Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) iz morske spužve *Reniera sarai* kot naravna protivegetativna sredstva

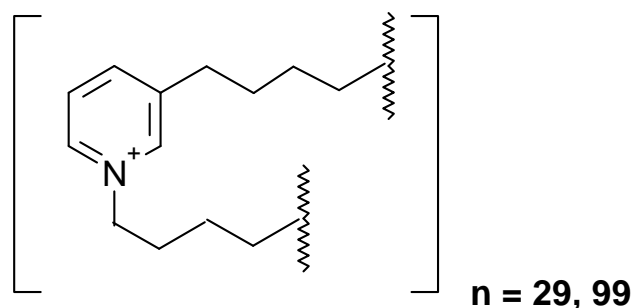
Čeprav so odkrili že veliko snovi s protivegetativnim učinkom, pa je le nekaj med njimi takih, ki bi lahko potencialno nadomestile toksične umetne protivegetativne premaze (Raveendran, 2009).

Ene od teh snovi so polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS, slika 3), izolirane iz morske spužve *Reniera sarai* (Sepčić in sod., 1997), z molsko maso okrog 5500 Da. Vsebujejo enega ali več pozitivnih delokaliziranih nabojev in hidrofobne alkilne verige. Ti strukturni elementi so verjetno odgovorni za toksičnost in povzročanje membranskih lezij. Poleg tega, da 3-alkilpiridinijeve soli preprečujejo pritrjanje organizmov predvsem preko procesa inhibicije acetilholinesteraze, so tudi hemolitične in citotoksične za različne celične linije ter v višjih koncentracijah letalne za glodalce (Faimali in sod., 2003, Sepčić in Turk, 2006).

Njihovi vplivi na pritrjanje organizmov so prav tako reverzibilni. Poskus je pokazal, da so se ličinke stadija cipris raka vitičnjaka *B. amphitrite*, ki so bile 96 ur izpostavljene raztopini s koncentracijo 10 µg/mL poli-APS (delež pritrjenih ličink = 0%), po prenosu v svežo naravno morsko vodo brez težav pritrldile. Polovična efektivna koncentracija (EC₅₀) za inhibicijo

pritrjanja ličink *B. amphitrite* je $0,27 \mu\text{g/mL}$, polovična letalna koncentracija (LC_{50}) za iste organizme pa $30 \mu\text{g/mL}$. Standard oz. merilo, da neko snov lahko smatramo kot protivegetativno, so postavili na osnovi ameriške mornarice (US Navy), njena vrednost EC_{50} pa mora biti $25 \mu\text{g/mL}$ ali manj (Raveendran, 2009).

Zaradi nizke toksičnosti, topnosti, reverzibilnosti protivegetativnega delovanja (Faimali in sod., 2003) in možnosti relativno enostavne kemijske sinteze (Mancini in sod., 2004, Housen in sod., 2010), lahko poli-APS uvrstimo med potencialne netoksične protivegetativne snovi, uporabne za izdelavo zaščitnih premazov (Raveendran, 2009).



Slika 3: Poli-APS.

2.3 ZNAČILNOSTI RAKOV

Raki (Crustacea) so edina skupina členonožcev, ki je vezana skoraj samo na vodo. Večina vrst živi v morju. Telo imajo sestavljeno iz velikega števila členov, ki je lahko pri nekaterih parazitskih in sesilnih vrstah močno zmanjšano. Posamezni členi trupa in glave so lahko pri določenih skupinah združeni v glavoprsje, ki ga pri številnih vrstah prekriva iz hrbta izraščajoča kožna guba – koš ali karapaks. Ta guba se pri vitičnjakih preoblikuje v trdno hišico. Živčevje pri raki imenujemo lestvičasta trebušnjača, ki ima v vsakem členu par živčnih vozlov. Čutila so pri večini dobro razvita. Višji raki dihajo s škrgami, nižji pa pline izmenjujejo skozi celotno telesno površino, saj nimajo posebnih dihalnih organov. Krvožilje je pri večini odprto, pri nekaterih pa močno zakrnelo. Izločala so parni cevasti organi, ki se pri višjih raki v vodo odpirajo na bazi anten, pri nižjih pa na bazi maksil (ustne okončine).

Njihov glavni izloček je amoniak. Razvoj pri večini poteka prek prosto plavajoče ličinke, pri nižjih raki imenovane navplij, pri višjih pa zoea. Raki živijo v različnih biotopih od plitve vode do velikih globin, v jamah in podzemnih vodah. Veliko jih je v simbiozi z drugimi organizmi, so komenzali ali zajedalci (Turk, 2007).

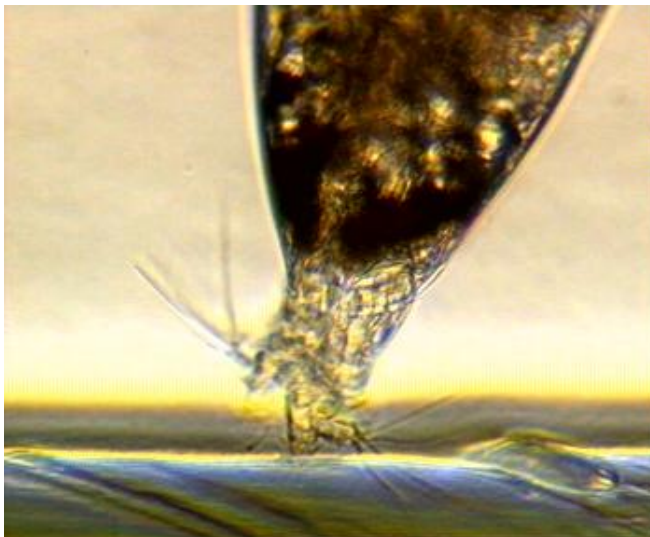
2.3.1 Vitičnjaki

Vitičnjaki (Cirripedia) spadajo med nižje rake. Odrasli so močno spremenjeni, živijo sesilno ali parazitsko. Členjenost telesa je slabo izražena. Odprtina na vrhu telesa se zapira s pokrovčkom, ki je povezan s posebno zapiralno mišico. Kadar je odprta, skozi njo moli šest parov vitičastih nog, ki so poraščene z drobnimi dlačicami. Z nogami ustvarjajo vodni tok, ki jim prinaša kisik in hrano. Ustne okončine in drugi par anten so popolnoma zakrneli, prvi par anten pa delno. V nasprotju z drugimi raki je večina vitičnjakov dvospolnikov. Pritrjajo se na kamnito podlago, drevesa (mangrove), lupine, oklepe in telesa drugih organizmov ter na različne druge plavajoče in potopljene umetne ali naravne predmete. Tesno zaprta lupina jim omogoča, da nekaj časa preživijo tudi na suhem (Turk, 2007). Kljub temu, da se pritrjajo tudi na plavajoče predmete in organizme, jih večina živi v mediolitoralnem, nekaj pa tudi v supralitoralnem pasu morske obale (Tarman, 1992).

Čeprav odrasli organizmi (slika 4a) ob prvem pogledu niso videti kot raki, začnejo vitičnjaki svoj življenjski cikel kot navpliji, ki so tipične račje ličinke. Navplij se preobrazi v ličinko imenovano cipris, ki se ne prehranjuje in je podobna ostrakodnemu raku vrste *Cypris* (od tod ime ličinke). Ta v morju poišče ustrezen substrat, se nanj pritrdi ter preoblikuje v odraslega raka. Odrasli raki so na podlago pritrjeni s povečano preoralno regijo glave, na kateri so cementne žleze in kratke prve antene. Posteriorno na toraksu izrašča dolg raztegljiv penis. Lateralno iz glave na obe strani izrašča velik mesnat koš, ki ga v literaturi imenujejo »plašč« (*angl. mantle*). Ta telo ventralno oboka in ga popolnoma obda. Epidermis »plašča« izloča apnenčaste plošče, ki obdajajo vitičnjaka. Noge (ciri) ležijo v »plaščevi votlini« (*angl. mantle cavity*), usta, anus in gonopor ovidukta pa se vanj odpirajo. Do leta 1830 so mislili, da

vitičnjaki spadajo med mehkužce, leta 1851 pa je Darwin z natančnimi raziskavami postavil temelje sodobnim študijam te zanimive skupine morskih živali. Razred Cirripedia vključuje redove Thoracica (največja skupina), Acrothoracica in Rhizocephala, ki je parazitska skupina (Ruppert in sod., 2004).

Testni organizem v naši raziskavi je bil rak vitičnjak (*Balanus amphitrite*) iz družine Balanidae. Je lahko dostopna in za gojenje nezahtevna kozmopolitska vrsta, ki igra pomembno vlogo v obalnih ekosistemih, saj je ena glavnih komponent združbe, ki prerašča potopljene površine. Ličinke neprestano plavajo in so zato primeren organizem za toksikološke in druge raziskave. Embriji se razvijajo v votlini plašča do navplijev druge faze, nato jih vitičnjaki sprostijo v okolje, kjer se prehranjujejo kot planktonski organizmi. Meroplanktonska ličinka se razvija skozi nadaljnje štiri faze navplijev in razvoj zaključi s fazo cipris, ki se ne prehranjuje, temveč uporablja zaloge iz maščobnih celic in proteine iz hemocela. Ciprisi preiščejo podlago, se nanjo najprej reverzibilno, nato ireverzibilno pritrdijo z izločanjem cementa iz parnih cementnih žlez (slika 4) in preoblikujejo v sesilne juvenilne osebkke (slika 5) (Faimali in sod., 2003a, 2003b; Faimali in sod., 2006). Prve antene imajo kemoreceptorje, ki so namenjene prepoznavanju primerne substrata. Sprva izločijo diske, nato pa cement, ki ličinko ireverzibilno pritrdi. Kutikula, ki prekriva mehke dele, se periodično levi, rast lupine pa je kontinuirana in neodvisna od rasti telesa in levitve. Smrtnost juvenilnih osebkov je zelo velika zaradi intra- in interspecifične kompeticije (Ruppert in sod., 2004).



Slika 4: Pritrjanje ciprisa na podlago z izločanjem cementa iz parnih cementnih žlez (foto: dr. Marco Faimali).

Ličinke imajo različno afiniteto do različnih naravnih in umetnih substratov v vodi. Ključni trenutek za njihovo preživetje in razvoj je iskanje podlage in pritrditve, na katero vplivajo različni biotski in abiotski dejavniki substrata in njegovega okolja, ki so lahko umetni ali naravni (Andersen in Underwood, 1994; Faimali in sod., 2003b). Odkrili so veliko snovi, ki delujejo na preživetje in razvoj vitičnjakov. Mednje spadajo tudi molekule, ki povečajo ali zmanjšajo uspeh prepoznavanja substrata, pritrjanja s cementnimi žlezami in metamorfoze, pri katerih sodelujejo mehanizmi kemorecepcije in signaliziranja ter prenosa živčnih impulzov.

Uspeh pri izbiri substrata, pritrditvi in metamorfozi pripisujejo tudi fiziološkemu stanju ciprisov, ki energijo pridobivajo iz zalog (se ne hranijo). Te določajo trajanje raziskovanja podlage in tako tudi verjetnost, da larva najde primeren substrat za svoje življenje. Larve s starostjo izgubijo selektivnost pri prepoznavanju primerne podlage. To stanje v literaturi opisujejo s hipotezo obupane larve (Tremblay in sod., 2007).



Slika 5: Faze razvoja *B. amphitrite*: a) odrasla žival; b) navpliji v fazi I; c) navplij v fazi II; d) navplij v fazi III; e) navplij v fazi IV; f) navplij v fazi V; g) navplij v fazi VI; h) cipris; povečava 100µm (foto: dr. Marco Faimali)

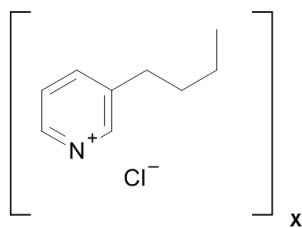
3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA VZORCEV ZA TESTIRANJE PROTIVEGETATIVNE AKTIVNOSTI

Testne snovi (sintetične analoge polimernih 3-alkilpiridinijevih soli iz morske spužve *Reniera sarai*) so sintetizirali raziskovalci s Fakultete za kemijo Univerze v Aberdeenu, Škotska.

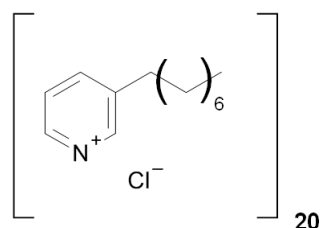
Njihove raztopine smo pripravili tako, da smo jih raztopili v sveži naravni morski vodi, prefiltrirani skozi 0.22 μm filter, v koncentraciji 100 mg/L.

Sintetični analogi, katerih protivegetativne lastnosti smo v naših poskusih preverjali na ličinkah rakov vitičnjakov, vrste *B. amphitrite*, imajo različno dolge alkilne verige (od 3 do 12 C-atomov), različno stopnjo polimerizacije in posledično različne molekulske mase (ang. molecular weight, MW) – od 3.5 do 14.7 kDa, ter različne nasprotne ione (kloridni ali bromidni ion). Te spojine so:



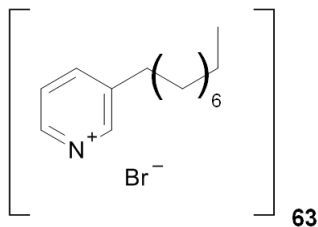
MW = ?

Slika 6: APS 3Cl



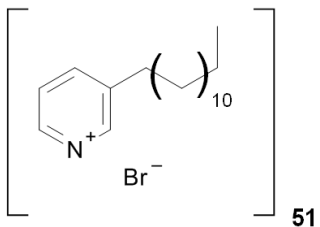
MW ~ 3.5 kDa

Slika 7: APS 7Cl



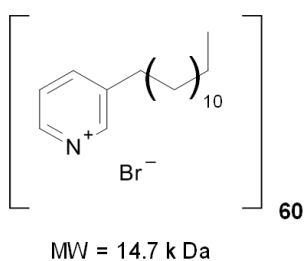
MW = 11.9 kDa

Slika 8: APS 8Br

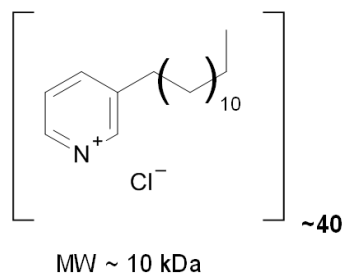


MW = 12.5 kDa

Slika 9: APS 12-1



Slika 10: APS 12-2



Slika 11: APS 12Cl

3.2 GOJENJE ODRASLIH RAKOV VRSTE *Balanus amphitrite*

Odrasle vitičnjake vrste *B. amphitrite* smo pobrali s trupov plovil v genovski marini v Italiji (lokacija: Lega navale italiana di Sestri Ponente, Genova).

V laboratoriju smo najprej odstranili poškodovane in mrtve organizme, ostale smo očistili z zobno ščetko, zložili v petrijevke in nato v čaše. Gojili smo jih pri temperaturi 20 ± 1 °C in nežni stalni svetlobi (300 luks) v litrskih čašah s svežo naravno morskovo vodo (slanost 37 promilov), ki jo pet kilometrov od obale zbira in dobavlja Costa Edutainment, S. p. a., Acquario di Genova. Pred uporabo smo jo prefiltrirali skozi celulozni filter (<0.45 μm).

V vsaki čaši smo na petrijevkah gojili trideset do štirideset odraslih organizmov ter vodo neprestano prezračevali. Trikrat na teden (ponedeljek, sredo, petek) smo jih dopoldne vzeli iz posod, jih nežno splahnili pod hladno tekočo vodo in za 30-40 minut položili na mizo pod namizno svetilko, nato pa jih dali nazaj v čaše, ki smo jih napolnili s 700 mL sveže filtrirane morske vode (<0.45 μm). Tako smo ustvarili stresne razmere, po katerih so vitičnjaki sprostili ličinke (navplije), ki smo jih uporabljali v nadaljnjih testih. Popoldne smo rake nahranili s 50-100 mL solinskih rakcev (*Artemia salina*) (Salt Creek, ZDA) v koncentraciji 200 larv/mL in 100-200 mL alg *Tetraselmis suecica* v koncentraciji 2×10^6 celic/mL, jih postavili nazaj na 20 ± 1 °C in v čaše spet potopili cevke za prezračevanje. Tako lahko v laboratorijskih razmerah vse leto pridobivamo navplije (slika 12) (Rittshof in sod., 1992; Faimali in sod., 2002).

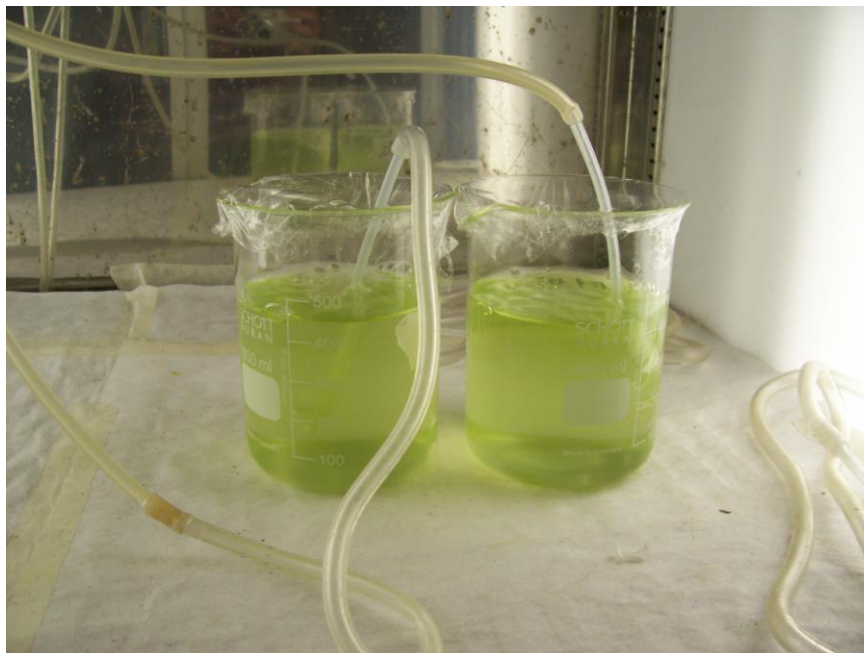


Slika 12: Odrasli raki vitičnjaki (*B. amphitrite*), gojeni v laboratorijskih razmerah (foto: Ivanka Dragić).

3.3 ZBIRANJE IN GOJENJE LIČINK (NAVPLIJEV) *B. amphitrite*

Navpliji, ki so jih sprostil odrasli vitičnjaki, so pozitivno fototaktični. V čašo smo usmerili svetilko in jih s pipeto posrkali ter prenesli v manjšo čašo z morskovo vodo. Vanjo smo prav tako vstavili cevko z dovodom zraka. Po končanem zbiranju smo jih precedili skozi fino mrežico in splaknili v pollitrsko čašo s svežo morskovo vodo, ki smo jo prej prefiltrirali skozi celulozni filter (Whatman, VB) s porami, manjšimi od $0,22 \mu\text{m}$ in ji dodali kloramfenikol (Farmochimica, Italija) s koncentracijo 10 mg/L . Prav tako kot odraslim, smo jim trikrat na teden menjali vodo (jih precedili in splaknili s filtrirano morskovo vodo ($<0,22 \mu\text{m}$)) in nahranili z algami *T. suecica* v koncentraciji 5×10^6 celic/mL. Te smo pred vsakim hranjenjem mikroskopsko pregledali, da ne bi vsebovale praživali, ki so za navplije patogene. Kulture navplijev smo nežno prezračevali in gojili v termostahirani omari (KW Aparecchi Scientifici, Italija) pri $28 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in svetlobnem ciklu 16 ur svetlobe (1400 lux) in 8 ur teme (slika 13). Po štirih do šestih dneh so se navpliji razvili do ciprisa. Ličinke v tem stadiju smo s filtriranjem

ločili od preostalih, še nediferenciranih navplijev in jih shranili v hladilniku pri 4 °C. Po štirih dneh smo jih lahko uporabili v poskusih (Rittdhof in sod., 1992).



Slika 13: Kulture navplijev v termostatirani omari (foto: Ivanka Dragić).

3.4 BIOLOŠKI TESTI

3.4.1 Test inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) *B. amphitrite*

Ciprise, ki smo jih 4 dni hranili pri 4 °C, smo najprej ločili od odmrlega materiala (ostanki navplijev) in jih prenesli v petrijevko (Greiner Bio-One International AG, Avstrija). Aktivnost sintetičnih analogov smo testirali v treh ponovitvah. Na mikrotirnih ploščah (Greiner Bio-One International AG, Avstrija) s 24 razdelki smo pripravili raztopine sintetičnih analogov v filtrirani morski vodi. Protivegetativno aktivnost sintetičnih analogov smo testirali v koncentracijskem območju 0, 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 in 100 mg/L. Delovne raztopine smo pripravili z redčenjem matične raztopine (100 mg/ml) tik pred izvedbo testa. Vsako vdolbino smo napolnili z 2 mL različnih raztopin sintetičnih analogov ter dodali od 20 do 25 testnih organizmov (ciprisov). Plošče smo najprej previdno prekrili s prozorno folijo, nato pa še zavili

v aluminijasto folijo in jih 3 dni inkubirali pri 28 ± 1 °C. Po 24, 48 in 72 urah smo z lupo preverili število pritrjenih rakov in zapisali tudi morebitne posebnosti (metamorfozirani, mrtvi organizmi).

Test smo zaključili z dodatkom 3 kapljic formaldehida in dokončno prešteli pritrjene in nepritrjene larve. Iz dobljenih rezultatov smo izračunali deleže pritrjenih organizmov glede na čas in koncentracije sintetičnih analogov.

Zaradi slabe topnosti v morski vodi smo dvema od šestih analogov (APS 12-1 in APS 12-2) morali dodati 5% dimetilsulfoksid (DMSO). DMSO smo dodali samo v začetno matično raztopino, naprej pa smo koncentracije pripravili z dodajanjem filtrirane morske vode ($<0,22$ μm).

Na zgoraj opisan način smo opravili teste inhibicije pritrjanja ličink s šestimi sintetičnimi analogi polimernih 3-alkilpiridinijevih soli (poli-APS) iz morske spužve *Reniera sarai*. Za nadaljnje teste smo izbrali tri analoge: APS 12Cl, ki je pokazal najbolj izrazito inhibicijo pritrjanja ter APS 7Cl in APS 8Br, ki sta v prvem poskusu pokazala inhibicijo pritrjanja pri nizkih, ter upad inhibicije pri višjih koncentracijah.

Pri APS 12Cl in APS 8Br analogih smo naredili tudi natančnejši test inhibicije pritrjanja s tremi ponovitvami pri vsaki koncentraciji. Razpon koncentracij smo določili glede na rezultate predhodnega testa, in sicer pri APS 12Cl analogu: 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2, 6.4 in 12.8 mg/L, pri APS 8Br analogu pa: 0, 0.3, 0.6, 1.2, 2.4, 4.8, 9.6 in 19.2 mg/L. Pri analogu APS 7Cl smo poskus ponovili v enakem koncentracijskem območju kot v prvem poskusu, saj smo zaradi nejasnih rezultatov (neenakomernega odnosa med koncentracijo in aktivnostjo) želeli ponoviti prvi poskus. Iz dobljenih rezultatov smo izrazili deleže pritrjenih organizmov v odvisnosti od časa in koncentracije sintetičnih analogov ter po 72 urah inkubacije po spremenjeni metodi Spearman-Kärber izračunali vrednost EC_{50} (efektivna koncentracija pri 95-odstotnem intervalu zaupanja), pri kateri je delež pritrjenih poskusnih živali 50 odstotkov manjši kot pri kontrolni raztopini (Hamilton in sod., 1977).

3.4.2 Test akutne toksičnosti sintetičnih polimernih analogov na ličinke (stadij navplija)

B. amphitrite

Za test akutne toksičnosti sintetičnih polimernih analogov smo uporabili navplije v drugi fazi razvoja, kmalu po tem, ko so jih odrasli sprostili iz plaščeve votline. Pridobili smo jih iz kulture odraslih vitičnjakov, kot je opisano pri postopku gojenja in zbiranja ličink (točka 3.3).

Na mikrotirnih ploščah s 24 razdelki smo pripravili raztopine sintetičnih analogov v filtrirani morski vodi z dvema ponovitvama. Vsako vdolbino smo napolnili z 2 mL različnih raztopin sintetičnih analogov ter dodali od 20 do 25 testnih organizmov (navplijev vrste *B. amphitrite*). Končne koncentracije testiranih sintetičnih analogov so bile 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 in 0,1 mg/L ter seveda kontrolna raztopina s koncentracijo 0 mg/L.

Plošče smo najprej previdno prekrili s prozorno folijo, nato pa še zavili v aluminijasto folijo in jih dva dni inkubirali pri 20 ± 1 °C. Po 24 in 48 urah smo z lupo preverili število mrtvih ličink. Kot mrtve smo ocenili tiste organizme, ki so bili popolnoma nepremični. Iz dobljenih rezultatov smo izrazili deleže mrtvih organizmov v odvisnosti od časa izpostavljenosti in koncentracije sintetičnih analogov ter iz rezultatov po 24 in 48 urah (po spremenjeni metodi Spearman- Karber) izračunali LC_{50} (letalna koncentracija pri 95-odstotnem intervalu zaupanja), ki povzroči smrt 50 odstotkov poskusnih živali glede na kontrolno raztopino (Hamilton in sod., 1977).

3.4.3 Test inhibicije plavanja ličink (stadij navplija) *B. amphitrite* (SSA test)

Navplije, dobljene iz odraslih organizmov, smo prenesli v čašo z morsko vodo, prefiltrirano skozi 0,45 µm filter, in jih prezračevali s cevko. Potem smo jih prefiltrirali skozi sito z odprtinami 80 µm in jih prenesli v fino filtrirano morsko vodo (0,22 µm). S pomočjo mikroskopa in pipete smo 15-20 osebkov, ki jih potrebujemo za vsako ponovitev, prenesli v

25 razdelkov mikrotitrne plošče. V vsakem razdelku je že bil 1 ml raztopine določenega sintetičnega analoga.

Plošče smo prekrili s prozorno folijo, da preprečimo izhlapevanje in jih za 48h prenesli v termostatisirano sobo s $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$, fotoperiodo 16h:8h dan:noč, svetlobo 1400 lux, brez hrane in prezračevanja.

Eksperimentalni sistem (rekorder), ki smo ga uporabili za merjenje inhibicije plavanja predstavlja video-kamera z makro-objektivom, ki snema vzorec plavanja ličink v mali snemalni komori (črni perspex, velikost: $21 \times 4 \times 3\text{ mm}^3$) z eno prozorno stranjo. Aparaturo smo postavili v črno škatlo ($60 \times 60 \times 100\text{ cm}^3$) in s tem izključili zunanje vire svetlobe. Snemalno komoro smo potem opazovali pod infrardečo lučjo. Pred začetkom snemanja smo ploščo postavili v komoro za snemanje in počakali 2 minuti, da so se navpliji prilagodili na temo. Potem smo digitalno posneli plavanje ličink v temi pri 20°C . Trajanje snemanja je bilo 3 sekunde, posneli pa smo 25 okvirjev na zaslonu za vsak vzorec. Slike smo analizirali s pomočjo softwerja SBR System, ki so ga razvili v timu E-magine IT, Genova, Italija. Na ta način smo rekonstruirali posamezne poti plavanja ter izmerili povprečno hitrost plavanja (mm/s) za vsak vzorec (15–20 osebkov). Podatke smo končno izrazili kot inhibicijo plavanja ter jih normalizirali na povprečno hitrost plavanja kontrole:

$$\text{Inhibicija plavanja (\%)} = 100 * (V_{\text{KONTROLA}} - V_{\text{TEST}}) / V_{\text{KONTROLA}}$$

kjer V_{KONTROLA} pomeni povprečno hitrost plavanja kontrole, V_{TEST} pa povprečno hitrost plavanja ličink v raztopini sintetičnega analoga določene koncentracije.

Na osnovi analize slik (prisotnosti/odsotnosti posameznih vzorcev plavanja za kontrolne in testne vzorce ličink) smo lahko izračunali odstotek inhibicije plavanja, normaliziran na kontrolo. Koncentracijo, ki je povzročila inhibicijo plavanja 50% eksperimentalnih organizmov, smo označili kot IC_{50} .

3.4.4. Ovrednotenje zaviranja nastajanja biofilma s pomočjo izbranih sintetičnih analogov alkilpiridinijevih polimerov

Za analizo inhibicije nastajanja biofilma smo uporabili tri steklene plošče s substratom (mikroskopsko prekrute površine). Steklene ploščice ($2 \times 2 \text{ cm}^3$) smo za 10 in 20 dni pri 20°C potopili v nefiltrirano naravno morsko vodo, v katero smo dodali dva sintetična APS analoga (APS 8Br in APS 12Cl), ki sta v predhodnih testih pokazala največjo protivegetativno aktivnost. Končne koncentracije APS 8Br analoga so bile 0, 0.05, 0.5 in 5 mg/L, koncentracije APS 12Cl analoga pa so bile 0, 0.02, 0.2 in 2 mg/L. Po 10 in 20 dneh smo plošče vzeli iz vode in jih rahlo sprali s filtrirano morsko vodo ($<0,22 \mu\text{m}$) zato, da smo odstranili nepritrjene celice. Pritrjene celice smo za 30 minut fiksirali z 2% paraformaldehidom in jih zatem sprali v filtriranem slanem fosfatnem pufru (PBS; 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 150 mM NaCl, pH 7,4).

Pred barvanjem celic in mikroskopsko analizo smo plošče, potopljene v PBS, postavili na 4°C . Bakterijske celice smo obarvali z DAPI (4'-6-diamidino-2-fenilindol, Sigma) (Takata and Hirano, 1990) in jih opazovali pri $400\times$ povečavi s pomočjo epifluorescenčnega mikroskopa (Olympus BX41) in UV filtra. Za slikanje celic smo uporabili digitalno kamero CAMEDIA 5060 (Olympus), s katero smo poslikali 30 slik v velikosti $67,5 \mu\text{m}^2$, ki smo jih naključno izbrali na vsaki plošči.

Slike smo preoblikovali v tiff-format, površine, prekrute z bakterijami, pa smo izmerili s pomočjo "Image J" računalniškega programa (Rasband, 1997).

4. STATISTIČNE ANALIZE

Smrtnost po 24 urah (LC_{50} vrednosti) in inhibicijo plavanja ličink (navplijev) po 24 urah (IC_{50} vrednosti) smo določili z uporabo Spearman–Karber-jevih analiz (Finney 1978). Najnižji opaženi učinek koncentracije (LOEC) smo določili s pomočjo statistično pomembnih razlik glede na kontrolno skupino ($P < 0.05$). Enosmerne analize variance (ANOVA) smo izvedli s Student–Newman–Keulsovim (SNK) testom z naknadno primerjavo kontrolnih skupin.

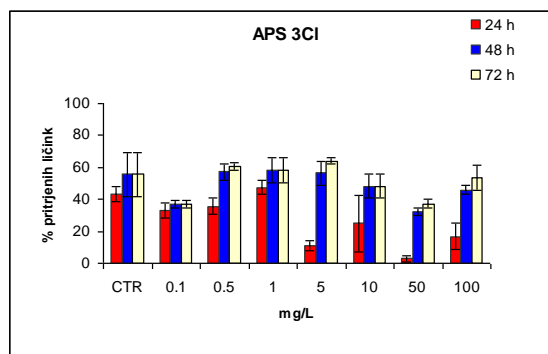
5. REZULTATI

5.1 TEST INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK (CIPRISOV) *B. amphitríte*

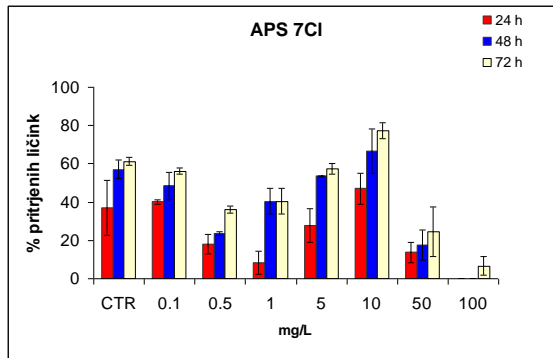
V nadaljevanju so prikazani rezultati inhibicije pritrjanja ličink rakov vitičnjakov *B. amphitríte* z različnimi sintetičnimi analogi polimernih 3-alkilpiridinijevih soli iz morske spužve *Reniera sarai* (slike 14-19).

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.4.1, in zapisali deleže pritrjenih organizmov po 24 (rdeči stolpci), 48 (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci) v odvisnosti od koncentracije posameznih sintetičnih analogov v raztopini. Na vsakem grafu je na začetku osi x prikazana kontrolna skupina (sveže filtrirana morska voda ($<0,22 \mu\text{m}$)) brez sintetičnih analogov, nato pa si naraščajoče sledijo koncentracije testiranih sintetičnih analogov.

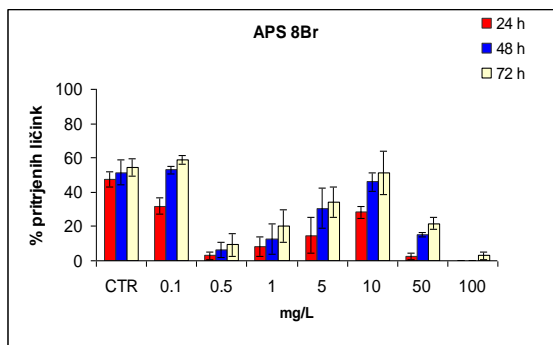
Za nadaljnje teste smo izbrali tri analoge: APS 12Cl, ki je pokazal najbolj izrazito inhibicijo pritrjanja (slika 19) ter APS 7Cl-1 in APS 8Br-1, ki sta v prvem poskusu pokazala inhibicijo pritrjanja pri nizkih, ter upad inhibicije pri višjih koncentracijah (slika 15, slika 16).



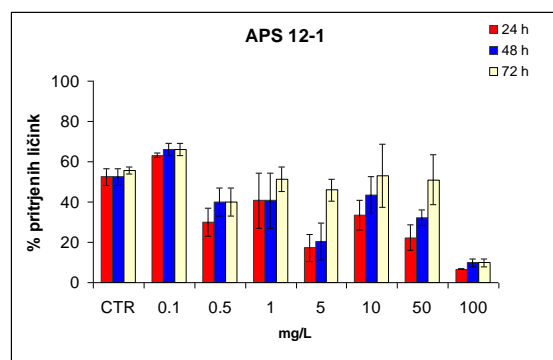
Slika 14: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitríte* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 3Cl po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev ($N=3$).



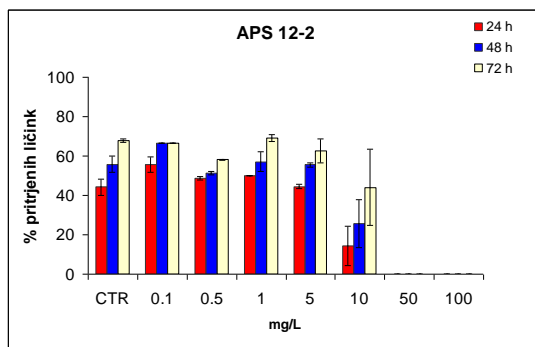
Slika 15: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev (N=3).



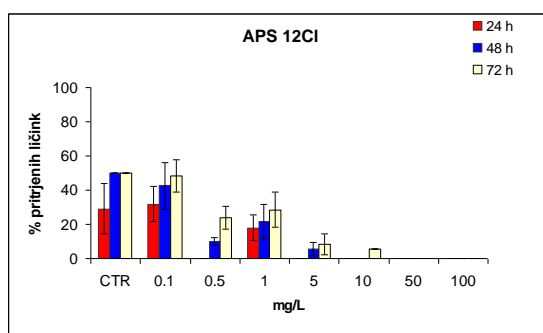
Slika 16: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev (N=3).



Slika 17: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-1 po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev (N=3).



Slika 18: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-2 po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev (N=3).



Slika 19: Delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih meritev (N=3).

5.2 DOLOČANJE VREDNOSTI EC_{50} INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK *B. amphitrite*

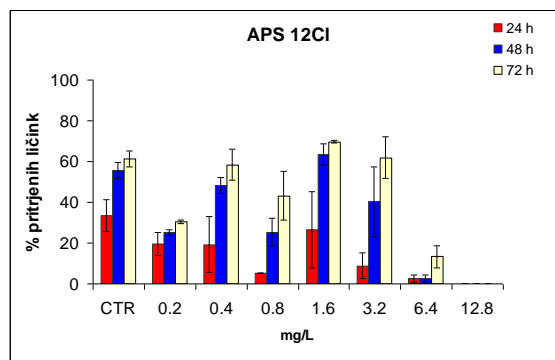
V nadaljevanju so prikazani rezultati inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z najbolj aktivnim analogom APS 12Cl ter rezultati testov z analogoma APS 7Cl in APS 8Br, ki sta v prvem poskusu pokazala inhibicijo pritrjanja pri nizkih, ter upad inhibicije pri višjih koncentracijah (sliki 15 in 16).

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.4.1, in zapisali deleže pritrjenih organizmov po 24 (rdeči stolpci), 48 (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci) v odvisnosti od koncentracije posameznih sintetičnih analogov v raztopini. Na vsakem grafu je na začetku osi x prikazana

kontrolna skupina (sveže filtrirana morska voda ($<0,22 \mu\text{m}$)) brez sintetičnih analogov, nato pa si naraščajoče sledijo koncentracije testiranih sintetičnih analogov.

5.2.1 Določanje vrednosti EC_{50} inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* s sintetičnim analogom APS 12Cl

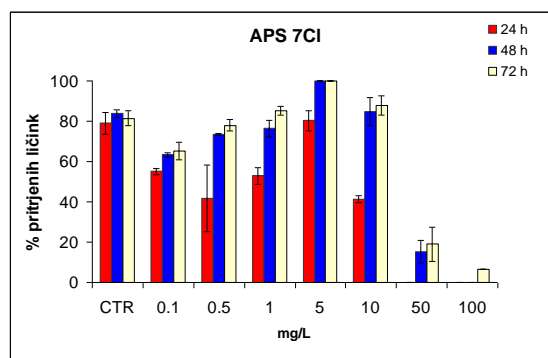
Natančnejši test inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* s sintetičnim analogom APS 12Cl nam je omogočil zanesljivejši izračun EC_{50} vrednosti po 24 urah inkubacije, ki je za ta analog 0,89 (0,48-1,65) mg/L. Analog popolnoma prepreči pritrjanje ličink rakov že pri koncentraciji 12,8 mg/L (slika 20).



Slika 20: Test določanja EC_{50} : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov ($N=3$).

5.2.2 Določanje vrednosti EC_{50} inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* s sintetičnim analogom APS 7Cl

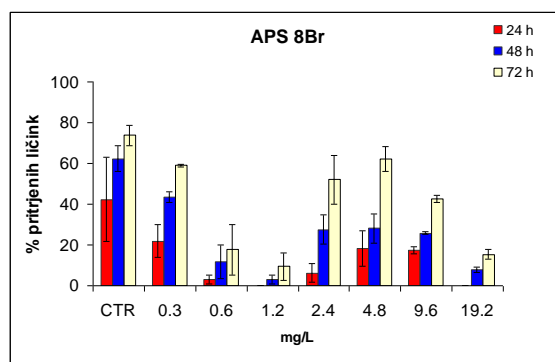
Ponovni test z analogom APS 7Cl v istem razponu koncentracij kot v prvem poskusu nam je potrdil, da ta analog ni zelo učinkovit, saj deluje protivegetativno šele pri maksimalni koncentraciji 100mg/L.



Slika 21: Test določanja EC_{50} : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).

5.2.3 Določanje vrednosti EC_{50} inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* s sintetičnim analogom APS 8Br

Analog APS 8Br deluje protivegetativno že pri koncentraciji 1,2 mg/L. Vrednost EC_{50} po 24 urah znaša 0,32 (0,26-0,39) mg/L (slika 22).

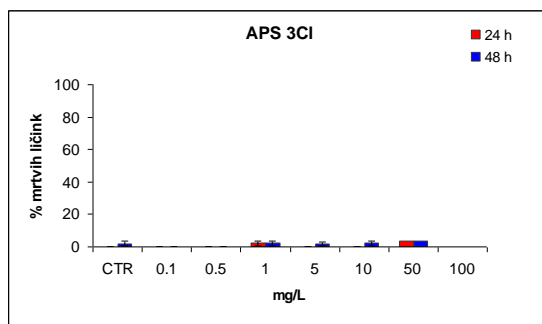


Slika 22: Test določanja EC_{50} : delež pritrjenih ličink (ciprisov) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br po 24 urah (rdeči stolpci), 48 urah (modri stolpci) in 72 urah (beli stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).

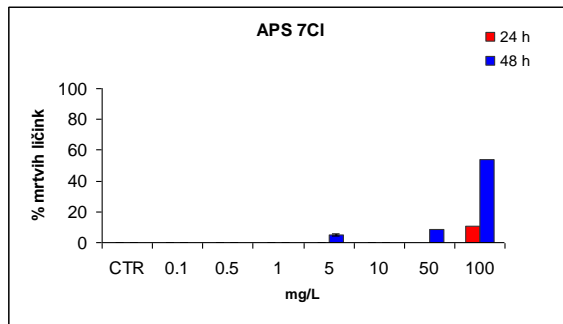
5.3 TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI SINTETIČNIH POLIMERNIH ANALOGOVI NA LIČINKE (STADIJ NAVPLIJA) *B. amphitrite*

V nadaljevanju so prikazani rezultati testa akutne toksičnosti na ličinke (stadij navplija) raka vitičnjaka *B. amphitrite* z različnimi sintetičnimi analogi polimernih 3-alkilpiridinijevih soli iz morske spužve *Reniera sarai* (slike 23-28).

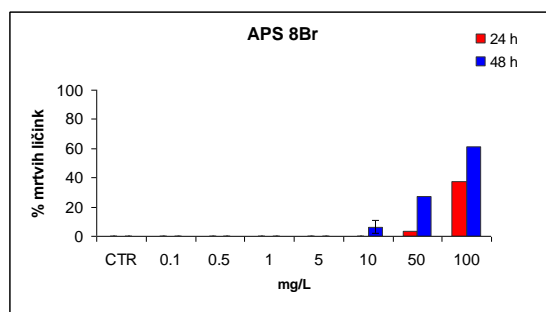
Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.4.2, in zapisali deleže mrtvih organizmov po 24 (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci) v odvisnosti od koncentracije posameznih sintetičnih analogov v raztopini. Na vsakem grafu je na začetku osi x prikazana kontrolna skupina (sveže filtrirana morska voda ($<0,22 \mu\text{m}$)) brez sintetičnih analogov, nato pa si naraščajoče sledijo koncentracije sintetičnih analogov.



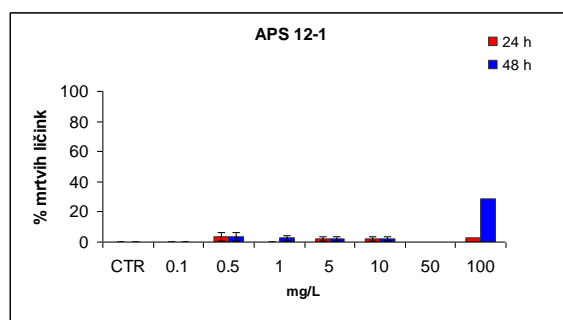
Slika 23: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 3Cl po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).



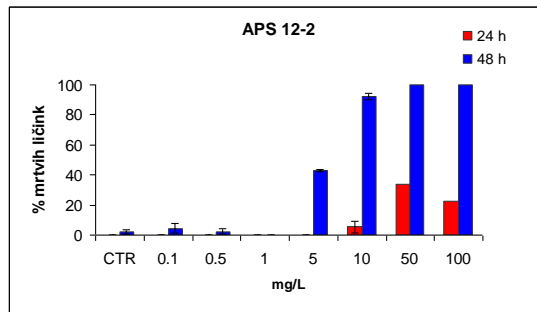
Slika 24: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 7Cl po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).



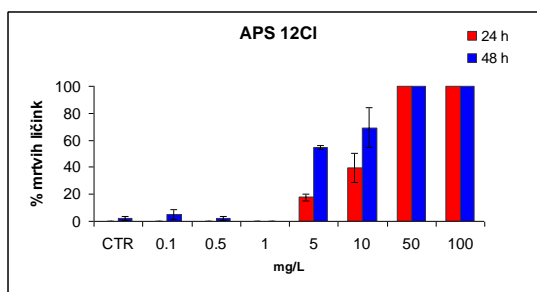
Slika 25: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 8Br po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).



Slika 26: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-1 po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).



Slika 27: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12-2 po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).

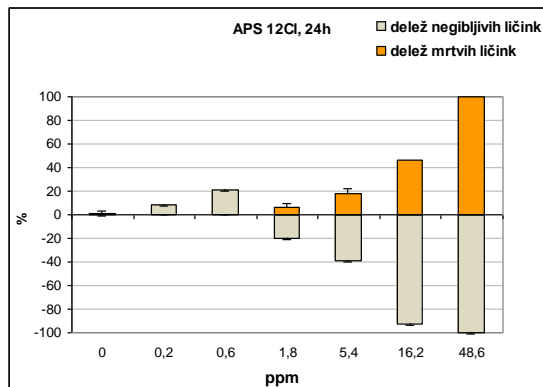


Slika 28: Delež mrtvih ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).

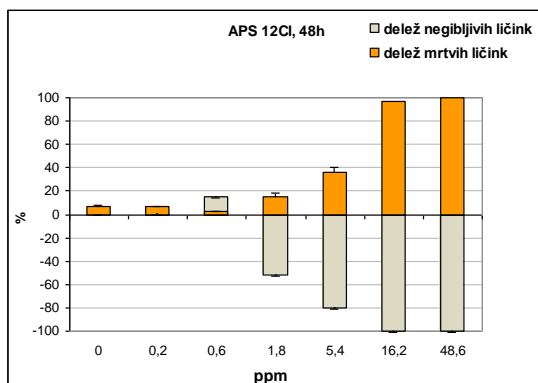
5.4 TEST INHIBICIJE PLAVANJA LIČINK (STADIJ NAVPLIJA) *B. amphitrite* (SSA test)

V nadaljevanju (sliki 29 in 30) so prikazani rezultati inhibicije plavanja ličink (stadij navplija) raka vitičnjaka *B. amphitrite* s sintetičnim analogom APS 12Cl, ki je pokazal zelo učinkovito inhibicijo pritrjanja (slika 19).

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.4.3, in zapisali deleže mrtvih (rumeni stolpci) in negibljivih (sivi stolpci) organizmov po 24 in 48 urah v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl. Na vsakem grafu je na začetku osi x prikazana kontrolna skupina (sveže filtrirana morska voda ($<0,22 \mu\text{m}$)) brez APS 12Cl, nato pa si naraščajoče sledijo testirane koncentracije APS 12Cl.



Slika 29: Delež mrtvih (rumeni stolpci) in negibljevih (sivi stolpci) ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 24 urah. Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).



Slika 30: Delež mrtvih (rumeni stolpci) in negibljevih (sivi stolpci) ličink (navplijev) raka vitičnjaka *Balanus amphitrite* v odvisnosti od koncentracije sintetičnega analoga APS 12Cl po 48 urah. Stolpci prikazujejo srednjo vrednost \pm standardno napako treh neodvisnih poskusov (N=3).

5.5 OVREDNOTENJE ZAVIRANJA NASTAJANJA BIOFILMA S POMOČJO IZBRANIH SINTETIČNIH ANALOGOVI ALKILPIRIDINIJEVIH POLIMEROV

Rezultatov nismo uspeli ovrednotiti, saj je bilo (kljub 3-kratni ponovitvi poskusa) preraščanje substrata v kontrolnih vzorcih preslabo, da bi lahko izračunali deleže inhibicije ob dodatku posameznih sintetičnih analogov.

6 RAZPRAVA

V tem diplomskem delu smo ugotavljali učinkovitost inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) rakov vitičnjakov *B. amphitrite* s sintetičnimi analogi polimernih 3-alkilpiridinijevih soli iz morske spužve *Reniera sarai*. Prav tako smo preverili toksičnost istih sintetičnih analogov na ličinke (navplije) že omenjenih rakov.

Rezultati vseh testov, v primerjavi z protivegetativno učinkovitostjo naravne spojine (poli-APS), ter učinki dveh komercialno dostopnih biocidov (cinkovega in bakrovega piritiona) so prikazani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Primerjava vrednosti EC₅₀, LC₅₀ in IC₅₀ poli-APS, cinkovega in bakrovega piritiona (Faimali in sod., 2003; Garaventa in sod., 2003) ter sintetičnih alkilpiridinijevih polimerov (ta diplomsko naloga) v različnih testih. Vrednost EC₅₀ je polovična učinkovita koncentracija oz. koncentracija, pri kateri je delež pritrjenih poskusnih živali 50 odstotkov manjši kot pri kontrolni raztopini. Vrednost IC₅₀ je polovična inhibitorna koncentracija oz. koncentracija, ki povzroči inhibicijo plavanja 50 odstotkov poskusnih živali. Vrednost LC₅₀ je polovična letalna koncentracija oz. koncentracija, ki povzroči smrt 50 odstotkov poskusnih živali glede na kontrolno raztopino. Vrednosti prikazujejo srednjo koncentracijo ± standardni odklon. N.I. = ni izmerjeno.

Vrsta	Biološki test	Izmerjene vrednosti (mg/L)	Poli-APS	Cinkov pirition	Bakrov pirition	APS3CI	APS7CI	APS8Br	APS12-1	APS12-2	APS12CI
<i>Balanus amphitrite</i>	Test inhibicije pritrjanja ličink (ciprissi)	24 h-EC ₅₀	0.27 (0.47-0.15)	0.02 (NC)	< 0.01	5.72 (4.24-7.72)	10.50 (8.47-13.01)	0.32 (0.26-0.39)	N.I.	8.78 (8.37-9.20)	0.89 (0.48-1.65)
		48 h-EC ₅₀				N.I.	25.86 (23.29-28.71)	0.50 (0.36-0.70)	N.I.	9.38 (8.76-10.05)	4.03 (3.49-4.65)
		72 h-EC ₅₀				N.I.	29.38 (26.32-32.99)	2.33 (1.78-3.04)	49.82 (37.18-66.76)	11.13 (10.38-11.94)	4.76 (4.44-5.11)
<i>Balanus amphitrite</i>	Test akutne toksičnosti na ličinke (navpliji)	24 h-LC ₅₀	30.01 (41.49-21.71)	0.19 (0.30-0.13)	< 0.01	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	11.60 (10.06-13.38)
		48 h-EC ₅₀				N.I.	94.02 (81.73-108.2)	79.37 (68.29-92.25)	N.I.	4.80 (4.21-5.46)	5.44 (4.64-6.37)
<i>Balanus amphitrite</i>	Test inhibicije plavanja ličink (navpliji)	24 h-IC ₅₀	> 10	0.23 (0.33-0.16)	0.03 (0.04-0.03)	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	4.83 (3.97-5.88)
Morski mikroorganizmi	Test zaviranja nastajanja biofilma	20 d-IC ₅₀	0.1	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	Poskus ni uspel	N.I.	N.I.	Poskus ni uspel

Pri testu inhibicije pritrjanja ličink smo preverjali protivegetativne lastnosti šestih sintetičnih analogov, ki izvirajo iz naravnih polimernih 3-alkilpiridinijevih soli iz morske spužve *Reniera sarai*.

Glede na izračunane EC_{50} vrednosti pri testu inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* lahko iz vseh rezultatov po učinkovitosti razvrstimo analoge v naslednjem vrstnem redu: APS 8Br > APS 12Cl > APS 3Cl > APS 7Cl > APS 12-2 > APS 12-1.

Glede na izračunane LC_{50} vrednosti pri testu akutne toksičnosti sintetičnih polimernih analogov na ličinke (stadij navplija) *B. amphitrite* po 48h, lahko iste analoge razvrstimo v naslednjem vrstnem redu: APS 12-2 > APS 12Cl > APS 8Br > APS 7Cl > APS 3Cl = APS 12-1.

Med vsemi testiranimi sintetičnimi poli-APS analogi sta APS 8Br in APS 12Cl najučinkoviteje inhibirala pritrjanje ličink *B. amphitrite*, zato bi ju lahko uvrstili med učinkovine, ki so najbolj podobne naravnim protivegetativnim spojinam. Vrednost EC_{50} analoga APS 8Br je bila v drugem poskusu celo zelo blizu vrednosti naravnega poli-APS (0,32 mg/L za APS 8Br in 0,27 mg/L za poli-APS), njegova toksičnost pa je bila zelo nizka (vrednost LC_{50} po 48h je znašala 79,37 mg/mL; Preglednica 1). Poleg tega pa je ta analog pokazal še nenavadno, nelinearno obnašanje pri testu inhibicije pritrjanja (slika 22): najprej je postopoma preprečil pritrjanje ličink do koncentracije 1,2 mg/L, nato pa je z višanjem koncentracije vse do 5 mg/L ponovno omogočil pritrjanje, pri koncentraciji 19,2 mg/L pa ga je spet zavrl. Ta nenavadna anomalija se je pojavila tudi v prvem poskusu z analogom APS 8Br, pri katerem smo testirali večji razpon koncentracij (slika 16). Ob primerjavi rezultatov toksičnosti in inhibicije pritrjanja smo ugotovili, da toksične koncentracije delujejo toksično na organizme pri tistih koncentracijah, kjer je zmanjšan učinek na sposobnost pritrjanja, zato bi lahko trdili, da gre za toksikološki fenomen imenovan hormeza, kjer se pri majhni koncentraciji toksikanta poveča aktivnost organizmov (Calabrese in Baldwin, 2002). Enak pojav smo zasledili tudi pri analogu APS 7Cl, ki pa je pokazal zanemarljivo protivegetativno učinkovitost.

Naslednji analog, ki bi lahko bil potencialno učinkovit za vključevanje v zaščitne premaze, je APS 12Cl. Pri testu pritrjanja ličink je pokazal precej visoko učinkovitost ($EC_{50}=0,89$ mg/L), vendar je trikrat bolj toksičen od naravnega poli-APS (LC_{50} za APS 12Cl je 11,60 mg/mL, LC_{50} za poli-APS pa 30 mg/mL; Preglednica 1). Kljub temu so te vrednosti 60 in 1200 krat manjše oz. manj toksične v primerjavi s toksičnostjo cinkovega in bakrovega piritiona (Preglednica 1) (Faimali in sod., 2003).

Ostali testirani APS analogi (APS 12-2, APS 7Cl, APS 3Cl in APS 12-1) so pokazali vsaj 10 krat nižjo protivegetativno učinkovitost v testih proti poskusnem organizmu *B. amphitrite*, zato so neprimerni za nadaljnje raziskave in kasnejšo uporabo (Preglednica 1).

Pri testu akutne toksičnosti sintetičnih polimernih analogov se je kot najbolj toksičen analog izkazal APS 12-2 z vrednostjo LC_{50} 4,80 mg/L po 48h, ki je že pri koncentraciji 10 mg/L povzročil smrt skoraj vseh ličink (slika 27). Sledil mu je nekoliko manj toksičen, vendar protivegetativno učinkovit APS 12Cl z LC_{50} 11,60 mg/L po 24h. Še za manj toksičnega se je izkazal analog APS 8Br z LC_{50} 79,37 mg/L, ostali trije analogi (APS 7Cl, APS 3Cl in APS 12-1) pa sploh niso imeli nobenega vpliva na navplije, saj je bila njihova vrednost LC_{50} zelo visoka oz. nad mejo detekcije (Preglednica 1).

Test inhibicije plavanja ličink (stadij navplija) smo izvedli samo s sintetičnim analogom APS 12Cl, ki je zelo učinkovito pokazal inhibicijo pritrjanja ciprisov. Ta analog je pri koncentraciji 48,6 ppm popolnoma onеспособil navplije, njegova IC_{50} vrednost je bila 4,83 (3,97-5,88) mg/L (slika 30).

Rezultatov zaviranja nastajanja biofilma s pomočjo sintetičnih analogov na žalost nismo uspeli ovrednotiti, saj je (kljub 3-kratni ponovitvi poskusa) preraščanje substrata v kontrolnih vzorcih bilo preslabo, da bi lahko izračunali deleže inhibicije ob dodatku posameznih sintetičnih analogov. Kakorkoli, glede na rezultate protimikrobne aktivnosti testiranih sintetičnih analogov proti nekaterim kopenskim bakterijam, ter na rezultate inhibicije bakterijskega

morskega biofilma z naravnim poli-APS, ki se v obeh primerih gibljejo v območju nekaj deset mikrogramov/mililiter (Garaventa in sod., 2003; Houssen in sod., 2010; A. Zovko, neobjavljeni rezultati), lahko sklepamo, da bi bil trend podoben.

Odnos med protivegetativno aktivnostjo in smrtnostjo oz. inhibicijo plavanja pri naravnem poli-APS je pokazal nizko vrednost EC_{50} pri testu inhibicije pritrjanja ciprisov (0,27 $\mu\text{g/mL}$) in relativno visoko LC_{50} in IC_{50} vrednost pri testu akutne toksičnosti in inhibicije plavanja navplijev (30 $\mu\text{g/mL}$ in $>10 \mu\text{g/mL}$). V nasprotju, pa je poskus s cinkovim in bakrovim piritionom pokazal visoko inhibicijo pritrjanja in prav tako visoko smrtnost za ličinke. Čeprav se je izvorna poli-APS spojina izkazala za manj učinkovito v primerjavi z bakrovim in cinkovim piritionom, pa je po drugi strani veliko manj toksična, vsaj za larve vitičnjakov in druge izbrane netarčne organizme (ličinke zoo- in fitoplanktona). Zatorej je njena protivegetativna učinkovitost, vsaj v akutni obliki, netoksična. Podoben odnos, kjer je vrednost EC_{50} pri testu inhibicije pritrjanja nizka in vrednosti LC_{50} in IC_{50} pri testu akutne toksičnosti ter inhibicije plavanja ličink relativno visoki, smo zaznali tudi v naših poskusih, predvsem pri analogih APS 8Br in APS 12Cl, ki sta se izkazala kot zelo učinkovita pri inhibiciji pritrjanja ličink in nizki toksičnosti.

Iz strukture posameznih APS analogov in njihove povezave z aktivnostjo je razvidno, da ima analog APS 3Cl najkrajšo alkilno verigo, njegova molekulska masa je verjetno majhna, kar je lahko razlog za zanemarljivo toksičnost na navplije in slab vpliv na pritrjanje ciprisov. Enak trend lahko opazimo tudi pri analogu APS 7Cl.

Po drugi strani pa se je za navplije kot najbolj toksičen analog izkazal APS 12-2, ki ima največjo molekulska maso (14,7 kDa), zatorej bi lahko iz tega sklepali, da je višja toksičnost verjetno povezana z večjo molekulska maso in obratno.

Analogi APS 8Br in APS 12Cl, ki sta pokazala najbolj učinkovito protivegetativno aktivnost, imata daljši alkilni verigi, kar je verjetno s kemijskega vidika vzrok za večjo protivegetativno učinkovitost.

Naši rezultati v glavnem potrjujejo splošni trend, po katerem se biološka aktivnost amfifilnih spojin povečuje s podaljševanjem alkilne verige ter stopnje polimerizacije in koncentriranjem pozitivnih nabojev (Zarif et al., 1993; Kuroda and DeGrado, 2005; Kleszczyńska et al., 2006).

7 ZAKLJUČEK

Na podlagi dobljenih rezultatov bi za nadaljnje raziskave in kasnejšo izdelavo netoksičnih aditivov oz. protivegetativnih premazov lahko uporabili analoga **APS 8Br** in **APS 12Cl**. Oba analoga, sintetizirana na podlagi naravne spojine poli-APS, sta pokazala učinkovito inhibicijo pritrjanja in dokaj nizko toksičnost proti larvam *B. amphitrite*. Njihovo učinkovitost bi morali v kasnejših raziskavah testirati tudi na drugih tarčnih organizmih, tako živalskega kakor rastlinskega izvora. Če pa bi bila oba analoga na voljo v večjih količinah, bi ju lahko uporabili za izdelavo naravnih premazov ter za *in situ* testiranje na podlagi protokola, ki je že sestavljen za naravne spojine (Sepčić, 2006).

8 POVZETEK

Morske spužve zaradi svoje starobitnosti in edinstvene vloge v ekosistemu že od nekdaj predstavljajo vir spojin z nenavadnimi kemijskimi strukturami in zanimivimi biološkimi aktivnostmi. Med take spojine spadajo tudi polimerne 3-alkilpiridinijeve soli, izolirane iz kruhaste spužve *Reniera sarai*.

Polimerne 3-alkilpiridinijeve soli (poli-APS) so spojine, ki kažejo širok spekter bioloških aktivnosti, ki delujejo protitumorsko, hemolitično, citotoksično, protimikrobno, inhibirajo encim acetilholinesterazo ter preprečujejo pritrjanje organizmov na potopljene površine.

Pred kratkim so na osnovi strukture poli-APS sintetizirali analoge, ki posnemajo naravno spojino in bi bili prav tako primerni za izdelavo zaščitnih premazov. Z izbranimi sintetičnimi analogi smo ugotavljali učinkovitost inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) rakov vitičnjakov vrste *Balanus amphitrite* in prav tako preverili toksičnost istih sintetičnih analogov za ličinke (navplije) že omenjenih rakov. Analogi imajo različno dolge alkilne verige (od 3 do 12 C-atomov), različno stopnjo polimerizacije in posledično različne molekulske mase – od 3.5 do 14.7 kDa, ter različne nasprotne ione (kloridni ali bromidni ion). Te spojine so: APS 3Cl, APS 7Cl, APS 8Br, APS 12-1, APS 12-2 in APS 12Cl.

Kot najbolj protivegetativno učinkovita in najmanj toksična sta se izkazala analoga APS 8Br in APS 12Cl, zato smo naredili tudi natančnejši test inhibicije pritrjanja v ožjem razponu koncentracij. Pri analogu APS 7Cl smo poskus ponovili v enakem koncentracijskem območju kot v prvem poskusu, saj smo zaradi nejasnih rezultatov (neenakomernega odnosa med koncentracijo in aktivnostjo) želeli ponoviti prvi poskus.

Kasneje se je izkazalo, da je ta anomalija verjetno toksikološki fenomen, imenovan hormeza, kjer se pri majhni koncentraciji toksikanta poveča aktivnost organizmov. Enak pojav smo zasledili tudi pri analogu APS 8Br.

Na podlagi dobljenih rezultatov bi za nadaljnje raziskave in kasnejšo izdelavo netoksičnih aditivov oz. protivegetativnih premazov lahko uporabili analoga APS 8Br in APS 12Cl. Oba analoga sta pokazala učinkovito inhibicijo pritrjanja in zelo nizko toksičnost proti ličinkam *B. amphitrite*.

9 LITERATURA

Abrazua S. in Yakubowski S. 1995. Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention on biofouling. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 123: 301-312.

Almeida E., Diamantino T.C. in de Sousa O. 2007. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Progress in Organic Coatings*, 59: 2-20.

Andersen M. J. in Underwood A. J. 1994. Effects of substratum on the recruitment and development of an intertidal estuarine fouling assemblage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 184: 217-236.

Antizar-Ladislao B. 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT) - contaminated marine environment. *Environment International*, 34: 292- 308.

Blunt J. W., Copp B. R., Munro M. H. G., Northcote P. T. in Prinsep M. R. 2006. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 23: 26- 78.

Calabrese E. J. in Baldwin L. A. 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21: 91- 97.

Faimali M., Magillo F., Piazza V., Garaventa F., in Geraci S. 2002. A simple toxicological bioassay using phototactic behaviour of *Balanus amphitrite* (Darwin) nauplii: Role of some cultural parameters and application with experimental biocides. *Periodicum Biologorum*, 104: 225- 232.

Faimali M., Falugi C., Gallus L., Piazza V. in Tagliafierro G. 2003a. Involvement of acetyl choline in settlement of *Balanus amphitrite*. *Biofouling*, 19: 213- 220.

Faimali M., Sepčić K., Turk T. in Geraci S., 2003b. Non-toxic antifouling activity of polymeric 3-alkylpyridinium salts from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* (Pultizer-Finali). *Biofouling*, 19: 47- 56.

Faimali M., Garaventa F., Mancini I., Sicurelli A., Guella G., Piazza V., Greco G. (2005). Antisettlement activity of synthetic analogues of polymeric 3-alkylpyridinium salts isolated from the sponge *Reniera sarai*. *Biofouling* 21:49-57.

Faimali M., Garaventa F., Piazza V., Greco G., Corra C., Magillo, Pittore M., Giacco E., Gallus L., Falugi C. in Tagliafierro G. 2006. Swimming speed alternation of larvae *Balanus amphitrite* as behavioural end-point for laboratory toxicological bioassays. *Marine Biology*, 149: 87- 96.

Faulkner D. J. 2000. Marine natural products. *Natural Product Reports*, 17,1: 7- 55.

Finney DJ (1978) Statistical method in biological assay, 3rd edn. Charles Griffin & Co. Ltd, London, England, p 508

Fusetani N. 2004. Biofouling and antifouling. *Nat. Prod. Rep.*, 21: 94-104.

Fusetani N. in Clare A. S. 2006. Antifouling compounds. *Progress in Molecular and Subcellular Biology, Subseries: Marine Molecular Biotechnology*, 42: 105- 124.

Garaventa F., Faimali M., Sepčić K., Geraci S. (2003). Laboratory analysis of antimicrofouling activity of Poly-APS extracted from *Reniera sarai* (Porifera: Demospongiae). *Biol Mar Mediterr* 10:565-567.

Hamilton M. A., Russo R. C. in Thurston R. V. 1997. Trimmed Spearman- Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11, 714- 719; Correction 12 (1978), 417.

Houssen W. E., Lu Z., Edrada-Ebel R., Chatzi C., Tucker S. J., Sepčić K., Turk T., Zovko A., Shen S., Mancini I., Scott R. H., Jaspars M. 2010. Chemical synthesis and biological activities of 3-alkylpyridinium polymeric analogues of marine toxins. *J. Chem. Biol.*, v tisku.

Kleszczyńska H., Bielecki K., Sarapuk J., Bonarska-Kujawa D., Pruchnik H., Trela Z., łuczynski J. 2006. Biological activity of new N-oxides of tertiary amines. *Z Naturforsch C*. 61: 715-20.

Konte T. 2008. Protivegetativna aktivnost v ekstraktih nekaterih karibskih in avstralskih morskih spužev (Porifera). Diplomsko delo.

Kuroda K. in DeGrado W. F. 2005. Amphiphilic polymethacrylate derivatives as antimicrobial agents. *J. Am. Chem. Soc.* 127:4128-9.

Mancini I., Sicurelli A., Guella G., Turk T., Maček P., Sepčić K. 2004. Synthesis and bioactivity of linear oligomers related to polymeric alkylpyridinium metabolites from the Mediterranean sponge *Reniera sarai*. *Org. Biomol. Chem.* 2:1368-1375.

Oku N., Nagai K., Shindoh N., Terada Y., Van Soest R. W. M., Matsunaga S. in Fusetani N. 2004. Three new cyclostellamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 2617- 2620.

Omae I. 2003a. Organotin based antifouling paints and their alternatives. *Applied organometallic chemistry*, 17: 81-105.

Omae I. 2003b. General Aspects of Tin-Free Antifouling Paints. *Chem. Rev.*, 103: 3431- 3448.

Raveendran T. V., Limna M. V. P. 2009. Natural product antifoulants. *Current science*, 97, 4: 508-520.

Rittshof D., Clare A.S., Gerhart D. J., Sister Avelin M in Bonaventura J. 1992. Baranle *in vitro* assays for biologically active substances: Toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite* Darwin. *Biofouling*, 6: 115-122.

Ruppert E. E., Fox R.S. in Barnes R.D. 2004. Invertebrate Zoology: A Functional Evolutionary Approach. Belmont ZDA, Thomson Brooks/Cole: str.77- 95, 669- 675 in 678-687.

Sepčič K., Batista U., Vacelet J., Maček P. in Turk T. 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3-alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 117; 47-53.

Sepčič K., Turk T. 2006. 3-alkylpyridinium compounds as potential non-toxic antifouling agents. In: Fusetani, N, Clare, A. (Eds.). Marine molecular biotechnology, (Progress in molecular and subcellular biology, 42). Berlin: *Springer*, pp. 105-124.

Sepčič K. 3. 4. 2008. Zdravila iz morja; Prvaki so spužve, ki so prave kemične tovarne. *Delo (priloga Znanost)* 77, str. 20.

Sepčič K. 2009. Scientific report on the research activity carried out during the stay of Dr. Kristina Sepčič at the CNR-ISMAR of Genova from 15. to 26. 6. 2009 within the International short-term mobility Program for scientists/researchers from Italian and Foreign Institutions (N. 0030697, 09/04/2009).

Scott R. H., Whyment A. D., Foster A., Gordon K. H., Milne B. F. in Jaspars M. 2000. Analysis of the Structure and Electrophysiological Actions of Halitoxins: 1,3 Alkylpyridinium Salts from *Callyspongia ridleyi*. *J. Membrane Biol.*, 176: 119-131.

Takata K, Hirano H (1990). Use of fluorescein-phalloidin and DAPI as a counterstain for immunofluorescence microscopic studies with semithin frozen sections, *Acta Histochem. Cytochem.* 23: 679–683.

Tarman K., 1992. Osnove ekologije in ekologija živali. Ljubljana, DZS: str. 414 in 415.

Tremblay R., Olivier F., Bourget E. in Rittshof D. 2007. Physiological condition of *Balanus amphitrite* cyprid larvae determines habitat selection success. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 340: 1-8.

Tsoukatou M., Hellio C., Vagias C., Harvala C., Roussis V. 2002. Chemical defense and antifouling activity of three mediterranean sponges of the genus *Ircinia*. *Z. Naturforschung*, 57c: 161-171.

Turk T. 2007. Pod gladino Mediterana. 1. izdaja. Ljubljana, Založba Modrijan, str.

Turk T., Frangež R. in Sepčić K. 2007. Mechanisms of Toxicity of 3-Alkylpyridinium Polymers from Marine sponge *Reniera sarai*. *Mar Drugs*, 5, 4, : 157-167.

Voulvoulis N., Scrimshaw M. D. in Lester J. N. 1999. Alternative Antifouling Biocides. *Applied organometalic chemistry*, 13: 135-145.

Zarif L., Riess J. G., Pucci B., Pavia A. A. 1993. Biocompatibility of alkyl and perfluoroalkyl telomeric surfactants derived from THAM. *Biomater. Artif. Cells Immobilization Biotechnol.*, 21: 597-608.

ZAHVALA

Največja zahvala gre mentorici prof. Kristini Sepčić, za ponujeno možnost opravljanja praktičnega dela v tujini, vsestransko pomoč, prijaznost, razpoložljivost in toplino.

Vorrei specialmente ringraziare carissima dott. Veronica Piazza per tutto il suo aiuto, soprattutto nell' organizzazione del lavoro, per la professionalità, gentilezza e tutta disponibilità.

Grazie anche a dott. Marco Faimali e tutto il gruppo di ISMAR per l' accoglienza premurosa e gentilezza.

Hvala vsem, ki omogočajo, da moje življenje ni dolgočasno.

In nenazadnje en velik Hvala mami in očetu za brezpogojno ljubezen in podporo.

