

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA BIOLOGIJO

Tilen KONTE

**PROTIVEGETATIVNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH NEKATERIH  
KARIBSKIH IN AVSTRALSKIH MORSKIH SPUŽEV (PORIFERA)**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

**ANTIFOULING ACTIVITY IN EXTRACTS OF SELECTED  
CARIBBEAN AND AUSTRALIAN MARINE SPONGES (PORIFERA)**

GRADUATION THESIS

University studies

Ljubljana, 2008

*Človeštvo se velikokrat ne zaveda, da na Zemlji živijo tudi druga bitja, ki ne morejo slediti hitremu in neustavljivemu razvoju industrije in drugih panog človekovega delovanja. Po navadi ne pomislimo, kako škodljivo vplivamo na okolje s svojimi blestečimi in donosnimi izumi, saj se posledic zavemo šele tedaj, ko nas neposredno prizadenejo. Pomembna naloga zdajšnjih in bodočih znanstvenikov je zato presojanje vplivov človekovega delovanja na okolje in iskanje rešitev, ki bodo manj uničevale naš lepi in občutljivi modri planet.*

Diplomsko delo je sklep univerzitetnega študija biologije. Opravljeno je bilo na Inštitutu za raziskave morja ISMAR, podružnici italijanskega nacionalnega inštituta CNR (Genova, Italija), in Oddelku za biologijo Univerze v Genovi ter na Katedri za biokemijo, Oddelka za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Komisija za študijske zadeve univerzitetnega dodiplomskega študija biologije je dne 26. 6. 2008 za mentorico imenovala prof. dr. Kristino Sepčič, za somentorja pa dr. Marca Faimalija 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

Članica: 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 Faimani, ISMAR, CNR, Genova (Italija)

Datum zagovora: 6. 10. 2008

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

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Tilen Konte

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- UDK 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- KG spužve / Porifera / protivegetativna aktivnost / raki vitičnjaki / *Balanus amphitrite* / hemolitična aktivnost / anti-acetilholinesterazna aktivnost / toksičnost / naravni produkti
- AV KONTE, Tilen
- SA SEPČIĆ, Kristina (mentor)/FAIMALI, Marco (somentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo
- LI 2008
- IN PROTIVEGETATIVNA AKTIVNOST V EKSTRAKTIH NEKATERIH KARIBSKIH IN AVSTRALSKIH MORSKIH SPUŽEV (PORIFERA)
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 58 str., 2 pregl., 30 sl., 44 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Evolucija je spužve zaradi sesilnega načina življenja oborožila z množico visokoučinkovitih molekul s širokim repertoarjem bioloških aktivnosti (Fusetani in Clare, 2006; Blunt in sod., 2006; Sepčić, 2008). Ena izmed pomembnih lastnosti, ki jo imajo te snovi, je tudi protivegetativno delovanje. Ugotavljali smo učinkovitost inhibicije pritrjanja rakov vitičnjakov vrste *Balanus amphitrite* z ekstrakti petnajstih vrst liofiliziranih karibskih in avstralskih morskih spužev, ki so pripadale enajstim različnim družinam in sedmim redovom ter naredili tudi kontrolna poskusa s cinkovim piritionom in različnimi koncentracijami topila dimetilsulfoksida. Preverili smo toksičnost, hemolitično aktivnost, sposobnost inhibicije acetilholinesteraze in prisotnost kvartarnih amonijevih spojin tistih ekstraktov, ki so učinkovali protivegetativno. To so bili acetonska ekstrakta spužve *Phakellia striptata* (LI-5A) in *Topsentia ophiraphidites* (99A) ter acetonski in butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* (LI-47A in LI-47B). Acetonski ekstrakt spužve *Phakellia striptata* (LI-5A) je učinkoval toksično in protivegetativno, bil je hemolitičen in je šibko inhibiral acetilholinesterazo. Acetonski ekstrakt spužve *Topsentia ophiraphidites* (99A) iz redu Halichondrida je bil protivegetativno zelo učinkovit in hemolitičen. Acetilholinesterazo inhibira kompetitivno reverzibilno in vsebuje kvartarne amonijeve spojine. Butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47B iz redu Haplosclerida je na organizme deloval manj toksično. Acetilholinesterazo je inhibiral kompetitivno reverzibilno. Oba ekstrakta spužve *Xestospongia pacifica* vsebujeta kvartarne amonijeve spojine.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- UDC 577.1:593.4(043.2) = 163.6
- CX sponges / Porifera / antifouling activity / *Balanus amphitrite* / hemolytic activity / anti-acetylcholinesterase activity / toxicity / natural product
- AU KONTE, Tilen
- AA SEPČIĆ, Kristina (supervisor)/ FAIMALI, Marco (co-supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Vecna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology
- PY 2008
- TI ANTIFOULING ACTIVITY IN EXTRACTS OF SELECTED CARIBBEAN AND AUSTRALIAN MARINE SPONGES (PORIFERA)
- DT Graduation Thesis (Univesity studies)
- NO XI, 58 p., 2 tab., 30 fig., 44 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Sponges are sessile animals containing a plethora of biologically active secondary metabolites that have evolved during their evolution (Fusetani in Clare, 2006; Blunt in sod., 2006; Sepčič, 2008). Several of these compounds have a great antifouling potential. In this thesis, water and organic extracts of 15 liophilized Caribbean and Australian sponges (belonging to 11 different families and 7 different orda) were tested for their ability to inhibit the settlement of *Balanus amphitrite* cypris larvae. Zinc pirithione and the solvent (dimethylsulphoxide) were assayed as controls. Extracts exhibiting significant antifouling potential were tested also on their ability to induce hemolysis and inhibition of acetylcholinesterase, and were assayed on the presence of quaternary ammonium compounds. These extracts were as follows: acetone extracts of sponges *Phakellia striptata* (LI-5A) and *Topsentia ophiraphidites* (99A), and acetone and buthanolic extracts of the sponge *Xestospongia pacifica* (LI-47A in LI-47B). Acetone extract of the sponge *Phakellia striptata* (LI-5A) exhibited toxic antifouling activity, hemolysis and slight inhibition of acetylcholinesterase. Acetone extract of the sponge *Topsentia ophiraphidites* (99A) from the order Halichondrida has considerable antifouling and hemolytic potential. It also inhibited acetylcholinesterase by a reversible competitive mechanism which is probably due to the quaternary ammonium compounds found in its extract. Buthanolic aextract of the sponge *Xestospongia pacifica* LI-47B (order Haplosclerida) acted by a less toxic antifouling mechanism, and also inhibited acetylcholinesterase in a reversible competitive way. Both extracts of the sponge *Xestospongia pacifica* contained quaternary ammonium compounds.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	XI
1 UVOD.....	1
2 PREGLED OBJAV .....	3
2.1 ZNAČILNOSTI SPUŽEV .....	3
2.1.1 Biološko aktivne snovi morskih spužev .....	4
2.1.2 Protivegetativne snovi morskih spužev .....	5
2.1.3 Protivegetativni premazi.....	7
2.2 ZNAČILNOSTI RAKOV.....	8
2.2.1 Vitičnjaki .....	9
2.2.2 Ceponožci .....	12
3 MATERIALI IN METODE .....	14
3.1 MATERIALI IN METODE.....	14
3.1.1 Priprava vzorcev za testiranje protivegetativne aktivnosti.....	14
3.1.1.1 Izbor ekstraktov .....	15
3.1.2 Gojenje odraslih rakov vrste <i>Balanus amphitrite</i> .....	19
3.1.3 Zbiranje in gojenje ličink (navplijev) <i>B. amphitrite</i> .....	19
3.1.4 Gojenje kopepodnih rakov vrste <i>Tigriopus fulvus</i> .....	20
3.2 BIOLOŠKI TESTI.....	20
3.2.1 Test inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) <i>B. amphitrite</i> .....	20
3.2.2 Test akutne toksičnosti ekstraktov na ličinke (navplije) <i>B. amphitrite</i> .....	22

3.2.3	Test akutne toksičnosti ekstraktov na (navplije) <i>T. fulvus</i> .....	23
3.2.4	Določanje drugih bioloških aktivnosti v izbranih ekstraktih .....	23
3.2.4.1	Hemolitični test .....	24
3.2.4.2	Test inhibicije acetilholinesteraze .....	25
3.2.4.3	Določanje vrste inhibicije in konstante inhibicije acetilholinesteraze.....	26
3.2.4.1	Tankoplastna kromatografija.....	26
4	REZULTATI .....	27
4.1	TEST INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK (CIPRIS) <i>B. AMPHITRITE</i> .....	27
4.2	DOLOČANJE VREDNOSTI EC <sub>50</sub> INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK .....	35
4.2.1	Določanje EC <sub>50</sub> z ekstraktom spužve <i>Phakellia striptata</i> (LI-5A).....	35
4.2.2	Določanje EC <sub>50</sub> z ekstraktom spužve <i>Topsentia ophiraphidites</i> (99A) ..	36
4.2.3	Določanje EC <sub>50</sub> z ekstraktom spužve <i>Xestospongia pacifica</i> (LI-47B) ..	37
4.3	TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI NA NAVPLIJE <i>B. AMPHITRITE</i> .....	37
4.4	TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI NA NAVPLIJE <i>T. FULVUS</i> .....	39
4.5	DOLOČANJE DRUGIH BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI .....	42
4.5.1	Hemolitični test ekstraktov <i>P. striptata</i> in <i>T. ophiraphidites</i> .....	42
4.5.2	Test inhibicije acetilholinesteraze .....	43
4.5.3	Določanje vrste inhibicije in konstante inhibicije acetilholinesteraze ..	45
4.5.4	Tankoplastna kromatografija .....	46
5	RAZPRAVA IN SKLEPI .....	48
5.1	RAZPRAVA .....	48
5.2	SKLEPI .....	52
6	LITERATURA .....	53

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Biološke aktivnosti, taksonomska pripadnost, oznake ekstraktov in vrste spužev nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao (Karibsko morje) .....	16
Preglednica 2: Biološke aktivnosti, taksonomska pripadnost, oznake ekstraktov in vrste spužev nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija).....	18



## KAZALO SLIK

Slika 1: Odrasla raka vitičnjaka <i>B. amphitrite</i> .....	10
Slika 2: Larvalni stadiji <i>B. amphitrite</i> .....	12
Slika 3: Razvojne faze kopepodnega raka rodu <i>Tigriopus</i> .....	13
Slika 4: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije DMSO in cinkovega piritiona .....	28
Slika 5: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije ekstraktov <i>Agelas clathroides</i> .....	29
Slika 6: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Aplysina fistularis</i> 57A in metanolnega ekstrakta <i>Aplysina fulva</i> 10M.....	30
Slika 7: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije butanolnih ekstraktov <i>Callyspongia plicifera</i> 127B in <i>Callyspongia vaginalis</i> 15B .....	30
Slika 8: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije metanolnih ekstraktov <i>Geodia neptuni</i> 87M in <i>Holopsamma helwigi</i> 5M .....	30
Slika 9: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije ekstraktov <i>Ircinia strobilina</i> .....	31
Slika 10: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije ekstraktov spužve <i>Phakellia striptata</i> .....	32
Slika 11: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskih ekstraktov <i>Pseudoceratina crasa</i> 104A in <i>Scopalina ruetzleri</i> 78A.....	32
Slika 12: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije ekstraktov <i>Topsentia ophiraphidites</i> .....	34

Slika 13: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije metanolnega ekstrakta spužve <i>Verongula rigida</i> 105A in butanolnega ekstrakta spužve <i>Xestospongia muta</i> 53B .....	34
Slika 14: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije metanolnega in acetonskega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> .....	35
Slika 15: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Phakellia striptata</i> LI-5A.....	36
Slika 16: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Topsentia ophiraphidites</i> 99A.....	36
Slika 17: Delež pritrjenih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47B .....	37
Slika 18: Delež mrtvih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Phakellia striptata</i> LI-5A.....	38
Slika 19: Delež mrtvih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47A .....	38
Slika 20: Delež mrtvih ličink <i>B. amphitrite</i> v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47B .....	39
Slika 21: Delež mrtvih ličink <i>T. fulvus</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Phakellia striptata</i> LI-5A .....	40
Slika 22: Delež mrtvih ličink <i>T. fulvus</i> v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47A.....	40
Slika 23: Delež mrtvih ličink <i>T. fulvus</i> v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47B.....	41

Slika 24: Recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije acetonskih ekstraktov <i>Phakellia striptata</i> LI-5A in <i>Topsentia ophiraphidites</i> 99A .....	42
Slika 25: Časovni potek hemolize z acetonskim ekstraktom spužve <i>Topsentia ophiraphidites</i> (99A) .....	43
Slika 26: Inhibicija acetilholinesteraze v odvisnosti od koncentracije DMSO. ....	44
Slika 27: Inhibicija acetilholinesteraze v odvisnosti od koncentracije ekstraktov <i>Phakellia striptata</i> LI-5A, <i>Topsentia ophiraphidites</i> 99A in <i>Xestospongia pacifica</i> LI-47-B. ....	44
Slika 28: Dixonov diagram inhibicije acetilholinesteraze z ekstraktom <i>Topsentia ophiraphidites</i> 99A.....	45
Slika 29: Dixonov diagram inhibicije acetilholinesteraze z ekstraktom <i>Topsentia ophiraphidites</i> 99A.....	46
Slika 30: Rezultat tankoplastne kromatografije preverjanja prisotnosti kvartarnih amonijevih spojin .....	47

## SEZNAM OKRAJŠAV

DMSO	topilo dimetil sulfoksid
EC <sub>50</sub>	vrednost (efektivna koncentracija), pri kateri je delež pritrjenih poskusnih živali 50 odstotkov manjši kot pri kontrolni raztopini
LC <sub>50</sub>	vrednost (letalna koncentracija), ki povzroči smrt 50 odstotkov poskusnih živali glede na kontrolno raztopino
<i>B. amphitrite</i>	modelni organizem – rak vitičnjak <i>Balanus amphitrite</i> , ki smo ga uporabljali pri testih protivegetativne učinkovitosti in toksičnosti
<i>T. fulvus</i>	modelni organizem – kopepodni rak <i>Tigriopus fulvus</i> , ki smo ga uporabljali pri testih toksičnosti
A	ekstrakt, ki je bil pridobljen z ekstrakcijo z acetonom
B	ekstrakt, ki je bil pridobljen z ekstrakcijo z butanolom
M	ekstrakt, ki je bil pridobljen z ekstrakcijo z metanolom
S	ekstrakt, ki je bil pridobljen z ekstrakcijo z vodo in ni bil toplotno obdelan (surov vodni ekstrakt)
K	ekstrakt, ki je bil pridobljen z ekstrakcijo z vodo in je bil toplotno obdelan (kuhan vodni ekstrakt)
AChE	encim acetilholinesteraza
PP1	encim proteinska fosfataza 1

## 1 UVOD

Morje je s svojimi prostranstvi že milijarde let življenjski prostor številnih bitij, ki so v dolgi zemeljski zgodovini z evolucijskimi procesi spreminjala oblike in lastnosti. Te so jim omogočile življenje v fizikalno, kemijsko in biološko spreminjajočem se in pestrem okolju. Število bioloških oblik je največje v priobalnem pasu, kjer življenjski dejavniki in viri določajo ter omogočajo rast in razvoj različnih organizmov v številnih ekoloških nišah. S povečevanjem števila organizmov nastaja kompeticija za življenjske vire (Fusetani in Clare, 2006, Sepčić, 2008), kar pospeši proces nastajanja vrst in razvoj novih lastnosti (Tarman, 1992).

Veliko priobalnih morskih nevretenčarjev ima v svojem življenjskem ciklu stadij ličinke, ki nekaj časa živi kot meroplanktonski organizem, nato pa poišče primerno podlago, se nanjo pritrdi in preobrazi. Faza iskanja in izbire primerne prostora je ključna za preživetje organizma. Nanjo vplivajo različni dejavniki (hidrodinamika, temperatura, slanost, svetloba, starost organizma, podlaga itn.), med katerimi so zelo pomembni kemijski signali (Fusetani, 2004). Ti so lahko na podlagi zaradi njene kemijske strukture (Bavestrello in sod., 2000) ali jih oddajajo že naseljeni, predvsem istovrstni organizmi in tudi plenilci, plen, simbionti oziroma gostitelji (Fusetani, 2004). Podlaga za pritrditev in rast so poleg skal in drugih substratov lahko tudi različne v morju potopljene konstrukcije in organizmi, ki se pred preraščanjem zavarujejo z različnimi mehanizmi, med katerimi izstopa kemijska obramba (Fusetani, 2004).

V eno izmed skupin organizmov z učinkovito kemijsko obrambo spadajo tudi morske spužve (Porifera) (Tsoukatou, 2002, Sepčić, 2008). So izjemno bogat vir različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov in so potencialno uporabne v medicinskih (Faulkner, 2000) in industrijskih panogah (Fusetani, 2004). Spužve uporabljajo te snovi 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 plovil in drugih v morju potopljenih konstrukcij, ki se povečuje tudi zaradi evtrofikacije obalnih regij (Almeida in sod., 2007). Uporaba klasičnih toksičnih zaščitnih premazov na podlagi bakra, cinka in kositra se zaradi bioakumulacije in koncentriranja v prehranjevalnih verigah v zadnjem času opušča (Hellio, 2005; Omae, 2003b; Faimali in sod., 2003b, Almeida, 2007). Nastala je potreba po odkrivanju do okolja prijaznejših protivegetativnih snovi in znanost v naravi išče rešitve, ki bi lahko pri tem pomagale (Almeida in sod., 2007; Fusetani, 2004). Nekatere naravne snovi so že pokazale učinkovito netoksično delovanje proti preraščanju in bi jih lahko uporabili v industriji protivegetativnih premazov (Faimali in sod., 2003b; Tsoukatou, 2002).

**Namen** tega diplomskega dela je bil ugotoviti potencialno protivegetativno aktivnost (inhibicijo pritrjanja rakov vitičnjakov) in toksičnost izbranih ekstraktov liofiliziranih karibskih in avstralskih morskih spužev. Ker so morski organizmi bogat in še precej neraziskan vir novih organskih spojin z veliko zanimivimi biološkimi učinki (Sepčić in sod., 1997; Blunt in sod., 2006; Sepčić, 2008), med katerimi so tudi snovi s protivegetativnim delovanjem (Faimali in sod., 2003b; Fusetani, 2004), smo postavili **delovno hipotezo**, da bomo v ekstraktih našli snovi s tovrstnim netoksičnim delovanjem, ki jih bomo v prihodnje poskušali izolirati in opredeliti njihove kemijske, fizikalne in biološke lastnosti.

## 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. V primerjavi z drugimi metazoji kažejo spužvine celice tako visoko stopnjo samostojnosti, da njihovo telo prej spominja na kolonijo praživali. So sesilne in imajo nenavadno zgradbo telesa, zato so jih v preteklosti naravoslovci (Aristotel, Plinij) uvrščali med rastline. Šele leta 1765 so med raziskavami morskih tokov prvič ugotovili, da gre pravzaprav za živalske vrste (Ruppert in sod., 2004).

So slepa razvojna veja, saj se iz njih ni razvila nobena nova življenjska oblika. Zoologi jih zato ločujejo od pravih mnogoceličnih živali (Eumetazoa) in uvrščajo v drugo skupino, imenovano Parazoa. Z izjemo ene družine so morske živali. Njihove celice niso strogo specializirane, zaradi česar so funkcijsko zelo prilagodljive. Odrasle spužve so skoraj vedno pritrjene na podlago, njihova rast in oblika pa sta odvisni od njenih lastnosti ter vodnih tokov v njihovi neposredni okolici. Telo nima vidne simetrije. Po velikosti so zelo različne, saj lahko merijo od nekaj milimetrov do enega metra. 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. Prebavil nimajo, njihovo telo je zgrajeno iz kanalčkov in kamric, ki so obdane s slojem posebnih celic z ovratnikom, imenovanih hoanocite. Ker se zgradba teh kanalov razlikuje, ločimo tri gradbene tipe spužev: askon, sikon in levkon. Najpreprostejši je askon, ki vključuje majhne spužve brez posebej oblikovanih kamric in kanalov. Telo ima le enotno notranjo votlino (spongocel), ki je obdana s hoanocitami. Druga dva gradbena tipa, sikon in levkon, imata zapletenejšo in bolj razvejano zgradbo, kar jim zaradi povečane notranje telesne površine omogoča učinkovitejšo izmenjavo plinov in večji sprejem hrane. Zunanja površina spužev je prekrita s ploščatimi celicami pinakocitami, dotekalke pa so obdane s porocitami, ki segajo od zunanosti do spongocela. Pod epidermalnimi celicami so mezenhim, amebocite (npr. skleroblasti, ki izdelujejo spužvin skelet) in tudi skelet. Ta je lahko sestavljen iz apnenca in kremenca, ki tvorita temeljne skeletne elemente iglice oz. spikule, ter iz spongina, ki tvori

proteinsko sponginsko ogrodje. Iglice, ki so glavni morfološki taksonomski znak pri določanju spužev, delimo na megasklere in mikrosklere. Zadnje so po navadi razpršene in nepovezane, medtem ko megasklere gradijo mrežast skelet in so pri nekaterih vrstah povezane s sponginom. Nekatere spužve spikul nimajo in imajo ogrodje sestavljeno le iz spongina. Živijo vse od obrežnega pasu pa do največjih globin. Najdemo jih celo v poltemnih in temnih vodnih votlinah. Ker jih večina živi samo v čisti vodi, bogati s kisikom in z malo anorganskih delcev, jih lahko pojmujeemo kot bioindikatorje čistosti vode (Turk, 2007).

Deblo spužev ali Porifera delimo na poddeblo Symplasma z razredom Hexactinellida ter poddeblo Cellularia (spužve s celicami), ki vključuje razreda Calcarea in Demospongiae. Zadnji obsega več kot devetdeset odstotkov vseh vrst, ki so morske ali sladkovodne spužve gradbenega tipa levkon, razporejene v trinajst redov. Vse vrste, ki smo jih uporabili v naši raziskavi, spadajo v ta razred. Imajo sponginski skelet, ki je lahko podprt s kremenčevimi spikulami. Nekatere so celo brez skeleta. V razred Calcarea uvrščamo pet redov spužev večinoma preprostejših gradbenih tipov z apnenčastim ogrodjem brez spongina. Spužve steklenjače (Hexactinellida) uvrščamo v dva podrazreda in štiri redove. Imajo kremenčev skelet, sincicijska tkiva in so brez uniflagelarnih hoanocit (Hopper, 1997; Ruppert in sod., 2004). Večinoma živijo v velikih globinah.

### **2.1.1 Biološko aktivne snovi morskih spužev**

Sesilni organizmi v biotsko in abiotsko kompleksnem morskem okolju kot odgovor na stresne dejavnike proizvajajo množico visokoučinkovitih molekul z velikim razponom bioloških aktivnosti (Fusetani in Clare, 2006; Blunt in sod., 2006; Sepčić, 2008). Pri tem so zagotovo v ospredju spužve, ki jim včasih pravimo kar kemične tovarne (Sepčić, 2008). Med vsemi odkritimi morskimi biološko aktivnimi spojinami jih je malo manj kot štirideset odstotkov iz spužev (Sepčić, 2008). Proizvajalci teh spojin so velikokrat mikroorganizmi, ki z njimi živijo v simbiozi (Qian in sod., 2006). Produkti spužev in njihovih simbiotov delujejo hemolitično, citotoksično, protivnetno, protitumorsko, protivirusno, protibakterijsko, protiglivno, imunosupresivno ali 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). Seveda je za nas najpomembnejša njihova protivegetativna aktivnost (Walker in sod., 1985; Kato in sod., 1995; Scott in sod., 2000; Tsoukatou, 2002; Faimali in sod., 2003b, Fusetani, 2004; Hellio, 2005; Qian in sod., 2006; Hedner in sod., 2008).

### 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). Te in druge učinkovine so pogosto značilne za določene taksonomske skupine sorodnih spužev (Fusetani in Clare, 2006).

Spužve iz družin Axinellidae in Dictyonellidae (red Halichondrida) pogosto proizvajajo seskvi- in diterpene z različnimi biološkimi učinki. Protivegetativno aktivnost so pripisali izocianoterpenom iz spužve *Acanthella cavernosa*, ki vsebuje tudi protivegetativni steroid ter nenavadnim seskviterpenom iz spužev rodu *Axinyssa* (družina Halichondridae) (Fusetani, 2004). Preraščanje dobro preprečuje tudi saponin karibske spužve *Erylus formosus* iz družine Geodiidae redu Astrophorida (Fusetani, 2004).

Naslednja skupina aktivnih snovi so derivati pri presnovi maščob, sorodni maščobnim kislinam. Med njimi so plazmalogen *lyso*-PAF iz spužve *Crella incrustans* (družina Crellidae, podred Myxillina, red Poecilosclerida) in poliacetileni iz vrste *Callyspongia*

*truncata* (družina Callyspongiidae, red Haplosclerida) dobro inhibirali pritrjanje vitičnjakov (Fusetani, 2004).

*Geodia barretti* vsebuje zelo učinkovite bromirane ciklopeptide (Hedner in sod., 2008). Z bromotirozinskimi alkaloidi se pogosto srečamo pri družinah Aplysinidae in Pseudoceratinidae iz redu Verongida (Fusetani, 2004). Prvi družini pripada *Aplysina fistularis*, ki v vodo izloča repelenta aerotionin in homoaerotionin (Walker in sod., 1985), drugi družini pa *Pseudoceratina purpurea*, pri kateri so našli nekaj zelo aktivnih bromotirozinov in heterocikličnih molekul z visoko inhibicijo pritrjanja larv in nizko toksičnostjo. Spužva vrste *Agelas mauritiana* iz družine Agelasidae (red Agelasida) vsebuje protivegetativni heterocikel oroidin, *Stylotella aurantium* iz družine Axinellidae redu Halichondrida pa inhibitor hitinaze stilogvanidin, ki vpliva na levitev rakov (Kato in sod., 1995; Fusetani, 2004).

Posebno pozornost si zasluži red Haplosclerida. Iz družine Callyspongiidae so aktivnost pokazali ekstrakti spužev rodu *Callyspongia* (Qian in sod., 2006), kjer gre protivegetativni učinek pripisati alkilpiridinijevim solem (kvartarne amonijeve spojine) (Scott in sod., 2000). Te soli, ki imajo širok spekter bioloških aktivnosti (Scott in sod., 2000; Sepčić, 2008), vsebujejo tudi spužve *Reniera sarai* (Faimali in sod., 2003b), *Niphates* in *Amphimedon* iz družine Niphatidae, *Xestospongia widenmayeri* (družina Petrosiidae), *Calyx podatypa* (družina Phloeodyctidae) in tudi druge spužve iz redu Haplosclerida (Fusetani in Clare, 2006). Alikilpiridini preprečujejo pritrjanje organizmov predvsem z inhibicijo acetilholinesteraze (Turk in sod., 2007) in tudi drugimi mehanizmi (Scott in sod., 2000). V družini Chalinidae je poleg rodu *Reniera* tudi rod *Haliclona*, ki vsebuje še alkilpiperidine (Fusetani, 2004).

S številnimi gvanidinskimi alkaloidi je prepojena sredozemska spužva *Crambe crambe* iz družine Crambiidae (podred Myxillina, red Poecilosclerida) (Fusetani, 2004). Tudi pri mediteranskih spužvah *Ircinia oros* (družina Irciniidae) in *Cacospongia scalaris* (družina Thorectidae) iz redu Dictyoceratida ter pri spužvi *Dysidea* sp. (družina Disideidae) iz redu Dendroceratida so z ekstrakcijo z diklorometanom in etanolom pridobili nekaj zelo učinkovitih protivegetativnih snovi (Hellio, 2005).

### 2.1.3 Protivegetativni premazi

Objekti, kot so plovila in druge konstrukcije v stiku z morjem, ponujajo veliko površino, na katero se lahko naselijo združbe tam živečih organizmov. Zaščitene morajo biti pred preraščanjem in tudi pred rjavenjem. Pomorstvo se s temi težavami srečuje že od začetka in zaščitni premazi jih poskušajo odpravljati (Almeida in sod., 2007).

Pred devetnajstim stoletjem so za to uporabljali loj, katran, vosek ali smolo, ki so jo nanegli prek lesenih ladijskih trupov. Feničani so uporabljali baker, Grki in Rimljani tudi svinec. V osemnajstem stoletju so v lesene površine zabijali žebličke iz cinka ali 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. Zadnji 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), bakrov in cinkov pirition, ki naj bi bil po nekaterih raziskavah do okolja bolj prijazen (Voulvoulis in sod., 1999), ter ditiokarbamati tiram, ziram, zineb, maneb in drugi (Voulvoulis in sod., 1999; Almeida in sod., 2007; Omae, 2003b). Razvitih ali v razvoju je nekaj do okolja prijaznejših alternativnih premazov, kot so barve s nadzorovanim odvajanjem aktivnih molekul brez kositra (CDP), samočistilne barve brez kositra (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 toksičnih molekul (Almeida in sod., 2007). Neizogibno je, da nadaljnji razvoj zaščitnih premazov vključuje proučevanje naravnih, do okolja prijaznih in netoksičnih organskih molekul (Faimali in sod., 2003b; Tsoukatou, 2002; Almeida in sod., 2007) in encimov (Olsen in sod., 2007), nizkoenergetskih nepolarnih in ultragladkih hidrofobnih površin ter inteligentnih polimerov (Almeida in sod., 2007).

## 2.2 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. Zunanje ogrodje sestavljajo štiri kutikularne plasti, ki so izloček žlez v epi-ozioroma hipodermalnem sloju kože. Hitinska kutikula je pogosto utrjena z apnencem in fosfati. Izrastki ogrodja segajo tudi v notranjost telesa in omogočajo pritrditev mišic in drugih organov. Skoraj vse mišice so prečno progaste in se ujemajo z razporeditvijo telesnih členov. Živčevje pri raki imenujemo lestvičasta trebušnjača, ki ima v vsakem členu par živčnih vozlov. Povezana je s tridelnim osrednjim živčnim prepletom, ki leži nad žrelom. 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. Po njem se pretaka hemolimfa s hemocianinom, ki vsebuje baker. 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 amonijak. Razvoj pri večini poteka prek prosto plavajoče ličinke imenovane navplij pri nižjih raki in zoea pri višjih. Raki žive v različnih biotopih od plitve vode do velikih globin, mnogo jih biva v jamah in podzemnih vodah. Samotarci živijo v praznih polžjih hišicah ali v kamricah spužev. Veliko jih je v simbiozi z drugimi organizmi, so komenzali ali zajedalci (Turk, 2007).

### 2.2.1 Vitičnjaki

Vitičnjaki (Cirripedia) spadajo med nižje rake. Odrasli so močno spremenjeni, žive sesilno ali parazitsko. Členjenost telesa je slabo izražena, pri nekaterih vrstah popolnoma izgine. Odprtina na vrhu telesa se zapira s pokrovčkom, ki je povezan s posebno zapiralno mišico in, 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, prvi par tipalk delno in drugi par so popolnoma zakrneli. Parazitski vitičnjaki so še bolj spremenjeni, so brez apnenčastih ploščic in imajo vrečasto telo. 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 1) ob prvem pogledu niso videti kot raki, začnejo vitičnjaki svoj življenjski cikel kot navpliji, ki so tipične račje ličinke. Navplij se prelevi v ličinko imenovano cipris, ki se ne prehranjuje in je podobna ostrakodnem raku vrste *Cypris* (od tod ime). Ta v morju poišče ustrezen substrat, se nanj pritrudi ter preoblikuje v odraslega raka. Na podlago so 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. Kri se zbira v rostralnem sinusu v glavi in teče anteriorno in posteriorno proti regiji, kjer je rak pritrjen, nato v plašč, telo in nazaj do sinusa. 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).



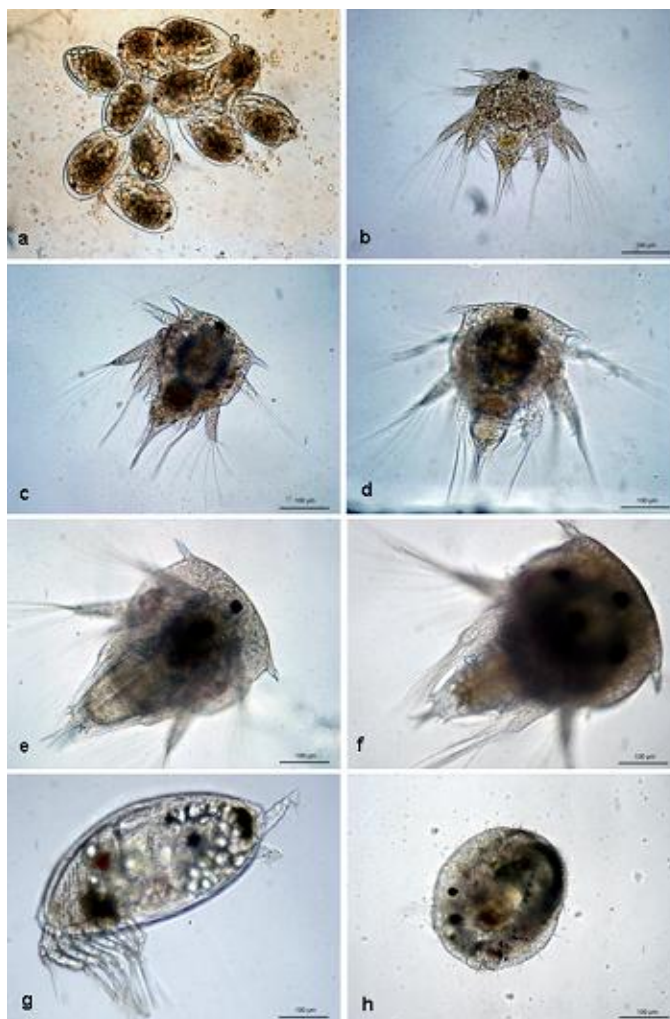
Slika 1: Odrasla raka vitičnjaka *B. amphitrite* (foto: dr. Marco Faimali).

Testni organizem *Balanus amphitrite* iz družine Balanidae, naddružine Balanoidea, spada v podred Balanomorpha, ki je del redu Sessilia, nadredu Thoracica, infrarazreda Cirripedia (podrazred Thecostraca, razred Maxillopoda, poddeblo Crustacea) (Martin in Davis, 2001). 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 študije. Embriji se razvijejo 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 pritrjujejo z izločanjem cementa iz parnih cementnih žlez in preoblikujejo v sesilne juvenilne osebkke (slika 2) (Faimali in sod., 2006; Faimali in sod., 2003a, 2003b). Prve antene imajo kemoreceptorje, ki so namenjene prepoznavanju primerne substrata. Sprva izločijo diske, nato pa cement, ki ličinko ireverzibilno pritrjuje. 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 iterspecifične kompeticije (Ruppert in sod., 2004).

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 kemorepcije in signaliziranja ter prenosa živčnih impulzov. Nanje delujejo z vplivom na holinergični sistem in različne receptorje (Faimali in sod., 2003a; Turk in sod., 2007), signalno pot proteinske kinaze C in adenilatne ciklaze s cikličnim AMP, endogene hormone (Fusetani in sod., 2004), hitinazo (Kato in sod., 1995) in druge tarčne molekule.

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 2: Larvalni stadiji *B. amphitrite*: a) navplij v fazi I; b) navplij v fazi II; c) navplij v fazi III; d) navplij v fazi IV; e) navplij v fazi V; f) navplij v fazi VI; g) cipris; h) novo pritrjena in preoblikovana larva (foto: dr. Marco Faimali).

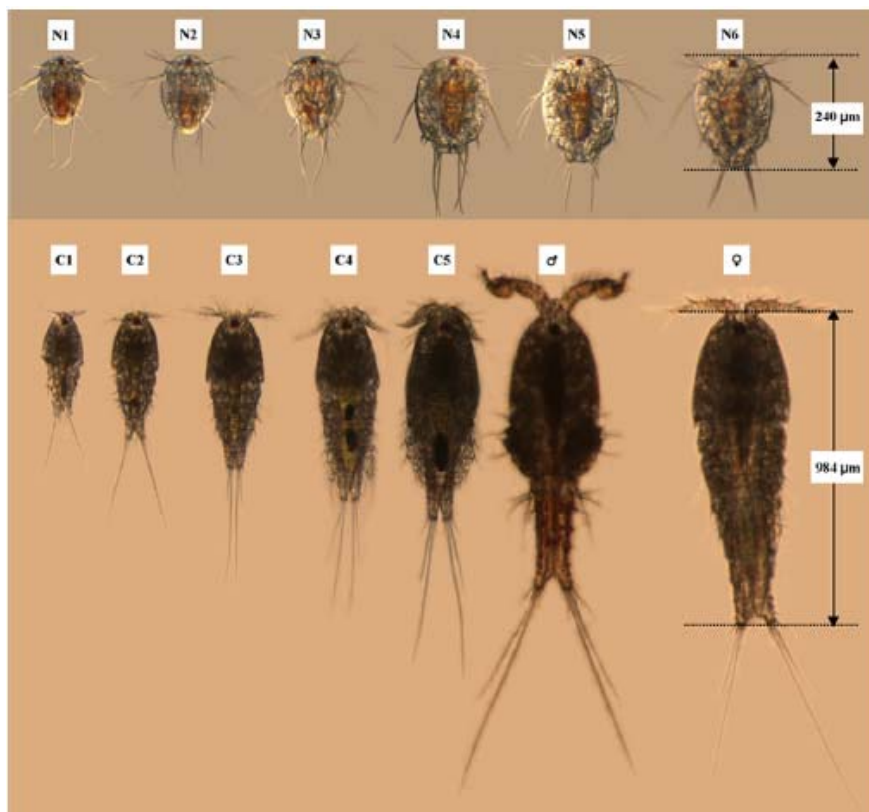
### 2.2.2 Ceponožci

Ceponožci (Copepoda) so ena najboljšežnejših skupin rakov. Večina je morskih, veliko jih najdemo tudi v celinskih vodah. Nekaj jih živi parazitsko, na kopnem v mahovih, vodnih filmih v zemlji in listni stelji. So eden izmed treh vrst organizmov, ki dominirajo v morskem zooplanktonu. Večina se hrani s fitoplanktonom, zato so temeljni člen prenosa energije in elementov ter tudi polutantov (Raisuddin in sod., 2007) v prehranjevalnih spletih med primarni producenti in višjimi trofičnimi nivoji. Dolgi so od enega do petih milimetrov, nekateri so tudi daljši (parazitski 25 mm). Navadno imajo cilindrično telo, zašiljeno proti posteriornemu delu. So večinoma prozorni, vendar najdemo tudi obarvane in



take, ki bioluminiscirajo. Po navadi imajo značilno sredinsko navplijevo oko in dolge nerazvejene prve antene. Uvrščamo jih med nižje rake. Podrazred Copepoda (razred Maxillopoda) vključuje deset redov, od katerih je pet parazitskih (Ruppert in sod., 2004).

Kopepodnega raka *Tigriopus fulvus*, modelni organizem ekotoksikoloških raziskav, uvrščamo v družino Harpacticidae, ki je umeščena v red Harpacticoida, nadred Podoplea in infrarazred Neocopepoda podrazreda Copepoda (Martin in Davis, 2001). Njegov razvoj poteka skozi šest navplijskih in pet kopepodidnih faz do odraslega organizma (slika 3). Zaradi pomembne vloge v morskem ekosistemu, strpnosti do slanosti in temperature, pigmentiranosti in nezahtevnega gojenja ga od sedemdesetih let uporabljajo v okoljskih študijah. Uporaben je tudi pri ugotavljanju prenosa toksičnih snovi med mediji (iz sedimenta v vodni stolpec) v ekosistemu (Raisuddin in sod., 2007).



Slika 3: Razvojne faze kopepodnega raka rodu *Tigriopus*. Faze N1–6 so navpliji, C1–5 kopepodidi. Zadnja dva organizma (od leve proti desni) v spodnji vrsti sta samec in samica (Raisuddin in sod., 2007: 163).

### 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI IN METODE

#### 3.1.1 Priprava vzorcev za testiranje protivegetativne aktivnosti

Potapljači so vzorce spužev nabrali na globini med 5 in 45 metri na morskem grebenu južne obale otoka Curacao v Karibskem morju in na otoku Lizard Island v Avstraliji. Nabrani material so v globoko zmrznjenem stanju ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) prepeljali v Evropo, kjer so pozneje določili posamezne vrste, ga liofilizirali in shranili (Dolinšek, 2007; Likar, 2007).

Vzorci, ki sem jih uporabljal pri poskusih, so bili predhodno pripravljene v diplomskih delih Aleša Likarja (Likar, 2007), Tine Dolinšek (Dolinšek, 2007) in Bojana Martinška (le ekstrakt spužve *Holopsamma helwigi* 5M; diplomsko delo še ni dokončano). Aleš Likar in Bojan Martinšek sta naredila ekstrakcijo homogeniziranega materiala s tremi organskimi topili (metanol (M), aceton (A) in butanol (B)), določila koncentracijo ekstrakta (suha masa ekstrakta/mL) s sušenjem z vodno vakuumsko črpalko (rotavaporjem) in posušene vzorce raztopila v etanolu. Tina Dolinšek je ekstrakcijo naredila z deionizirano vodo ter pol vsakega vzorca zavrela za 15 minut, da se je znebila beljakovinskih molekul (vzorci označeni s K). Ekstrakte, ki jih ni toplotno obdelala, je označila s črko S. Suho maso je določila s sušenjem na urnem stekelcu. Preverila je protibakterijsko in hemolitično aktivnost ter sposobnost inhibicije encimov acetilholinesteraze (AChE) in proteinske fosfataze (PP1) dobljenih ekstraktov. Za naše raziskave smo marca 2008 pripravili še dodatni acetonski ekstrakt spužve *Topsentia ophiraphidites* (99A EasterExtract).

Pred uporabo v bioloških testih z živimi organizmi smo iz vzorcev v organskih topilih odparili etanol in jih znova raztopili v dimetil sulfoksidu (DMSO; Sigma, ZDA). Volumen, iz katerega smo odparili etanol, smo določili glede na koncentracijo prej pripravljenega ekstrakta in tako pripravili izhodne vzorce v enem izmed treh koncentracijskih razredov  $10^5$ ,  $5 \times 10^4$  ali  $10^4$  mg/L. To nam je olajšalo nadaljnje delo, saj smo tako lahko naredili razredčitve z visoko koncentracijo ekstrakta (do 100 mg/L) in nizko koncentracijo DMSO (1 oziroma 0,1 %).

### 3.1.1.1 Izbor ekstraktov

Ekstrakti, ki smo jih za teste izbrali glede na literaturo, so navedeni v preglednici 1 in 2. Merila, ki smo jih upoštevali pri izboru, so bila:

- taksonomska sorodnost z znanimi protivegetativno aktivnimi vrstami (Walker in sod., 1985; Kato, 1995; Scott in sod., 2000; Tsoukatou, 2002; Fusetani, 2004; Hellio, 2005; Qian in sod., 2006; Hedner in sod., 2008);
- vsebnost kvartarnih amonijevih spojin, ki so predhodno pokazale učinkovito in netoksično protivegetativno aktivnost (Scott in sod., 2000; Faimali in sod., 2003b; Fusetani in Clare, 2006);
- druge biološke aktivnosti istih ekstraktov, ki bi bile lahko odgovorne za protivegetativno aktivnost (hemoliza, inhibicija acetilholinesteraze in proteinske fosfataze 1 ter protibakterijsko delovanje) (Likar, 2007; Dolinšek, 2007; neobjavljeni podatki iz diplomskega dela Bojana Martinška).

Preglednica 1: Biološke aktivnosti, taksonomska pripadnost, oznake ekstraktov in vrste spužev, nabranih na južnem morskem grebenu otoka Curacao (Karibsko morje), po ekstrahiranju z organskimi topili ali deionizirano vodo. M je metanolni ekstrakt, A je acetonski ekstrakt, B je butanolni ekstrakt, S je surov vodni ekstrakt in K je kuhan vodni ekstrakt. Ekstrakt 5M je bil pripravljen novembra 2007, A EsterExtract marca 2008, preostali ekstrakti marca 2007.

Vrsta spužve	Taksonomska pripadnost	Oznaka vzorca	Biološke aktivnosti, ki bi bile lahko vzrok za protivegetativne lastnosti
<i>Agelas clathrodes</i>	družina Agelasidae, red Agelasida	81M	močna hemoliza, inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE, šibka inhibicija PP1 (Likar, 2007)
		81A	močna hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE (Likar, 2007)
		81B	močna hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , šibka inhibicija AChE (Likar, 2007)
		81S	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE (Dolinšek, 2007)
		81K	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE (Dolinšek, 2007)
<i>Aplysina fistularis</i>	družina Aplysinidae, red Verongida	57A	hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> , (Likar, 2007)
<i>Aplysina fulva</i>	družina Aplysinidae, red Verongida	10M	hemoliza, močna inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija <i>E. coli</i> , inhibicija AChE (Likar, 2007)
<i>Callyspongia plicifera</i>	družina Callyspongiidae, red Haplosclerida	127B	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> (Likar, 2007)
<i>Callyspongia vaginalis</i>	družina Callyspongiidae, red Haplosclerida	15B	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> (Likar, 2007)

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Taksonomska pripadnost	Oznaka vzorca	Biološke aktivnosti, ki bi bile lahko vzrok za protivegetativne lastnosti
<i>Geodia neptuni</i>	družina Geodiidae, red Astrophorida	87M	šibka hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> (Likar, 2007)
<i>Holopsamma helwigi</i>	družina Microcionide, podred Microcionina, red Poecilosclerida	5M	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE (neobjavljeni podatki – Martinšek, 2007)
<i>Ircinia strobilina</i>	družina Irciniidae, red Dictyoceratida	124M	močna hemoliza, močna inhibicija <i>B. subtilis</i> , šibka inhibicija AChE (Likar, 2007)
		124A	močna hemoliza, močna inhibicija <i>B. subtilis</i> ,
		124B	hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> ,
<i>Pseudoceratina crassa</i>	družina Pseudoceratinidae, red Verongida	104A	močna hemoliza, šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> , šibka inhibicija AChE, inhibicija PP1 (Likar, 2007)
<i>Scopalina ruetzleri</i>	družina Dictyonellidae, red Halichondrida	78A	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija PP1 (Likar, 2007)
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	družina Halichondriidae, red Halichondria	99M	hemoliza, inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> , močna inhibicija AChE (Likar, 2007)
		99A	močna hemoliza, inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> , močna inhibicija AChE in inhibicija PP1 (Likar, 2007)
		99A EasterExtract, OldDilutions in Stock0	glej diskusijo (točka 5.1)
		99S	močna hemoliza, močna inhibicija <i>B. subtilis</i> , šibka inhibicija <i>E. coli</i> , inhibicija AChE in PP1 (Dolinšek, 2007)

se nadaljuje

nadaljevanje

Vrsta spužve	Taksonomska pripadnost	Oznaka vzorca	Biološke aktivnosti, ki bi bile lahko vzrok za protivegetativne lastnosti
<i>Topsentia ophiraphidites</i>	družina Halichondriidae, red Halichondria	99K	močna hemoliza, močna inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE in PP1 (Dolinšek, 2007)
<i>Verongula rigida</i>	družina Aplysinidae, red Verongia	105M	močna inhibicija <i>B. subtilis</i> , šibka inhibicija <i>E. coli</i> , šibka inhibicija AChE (Likar, 2007)
<i>Xestospongia muta</i>	družina Petrosiidae, podred Petrosina, red Haplosclerida	53B	močna hemoliza, inhibicija <i>B. subtilis</i> , (Likar, 2007)

Preglednica 2: Biološke aktivnosti, taksonomska pripadnost, oznake ekstraktov in vrste spužev, nabranih na lokaciji Lizard Island (Avstralija), po ekstrahiranju z organskimi topili ali deionizirano vodo. M je metanolni ekstrakt, A je acetonski ekstrakt, B je butanolni ekstrakt, K je kuhan vodni ekstrakt. Ekstrakti so bili pripravljene marca 2007.

Vrsta spužve	Taksonomska pripadnost	Oznaka vzorca	Biološke aktivnosti, ki bi bile lahko vzrok za protivegetativne lastnosti
<i>Phakellia stipitata</i>	družina Axinellidae, red Halichondrida	LI-5M	inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija PP1 (Likar, 2007)
		LI-5A	inhibicija <i>B. subtilis</i> (Likar, 2007)
		LI-5K	
<i>Xestospongia pacifica</i>	družina Petrosiidae, podred Petrosina, red Haplosclerida	LI-47A	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> in <i>E. coli</i> , inhibicija AChE, močna inhibicija PP1 (Likar, 2007)
		LI-47B	šibka inhibicija <i>B. subtilis</i> , inhibicija AChE, močna inhibicija PP1 (Likar, 2007)

### 3.1.2 Gojenje odraslih rakov vrste *Balanus amphitrite*

Odrasle vitičnjake vrste *B. amphitrite* smo pobrali s trupov plovil v genovskem pristanišču v Italiji. V laboratoriju smo jih očistili, zložili v petrijevke in nato v čaše. Gojili smo jih pri temperaturi  $22 \pm 1$  °C in nežni stalni svetlobi (300 luks) v litrskih čašah z 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 gojili trideset do štirideset odraslih organizmov ter vodo neprestano prezračevali. Trikrat na teden smo jih dopoldne vzeli iz posod, jih nežno splaknili pod hladno tekočo vodo in za približno eno uro položili na mizo pod svetilko, nato pa jih dali nazaj v čaše s svežo filtrirano morskovo vodo ( $<0,45$  µm). Tako smo ustvarili stresne razmere, po katerih so vitičnjaki sprostili ličinke (navplije). Popoldne smo rake nahranili s 50–100 mL solinskih rakcov *Artemia salina* (Salt Creek, ZDA) v koncentraciji 20 larv/mL in 100–200 mL alg *Tetraselmis suecica* v koncentraciji  $2 \times 10^6$  celic/mL, jih postavili nazaj na  $22 \pm 1$  °C in v čaše spet potopili cevke za prezračevanje. Tako lahko v laboratorijskih razmerah vse leto pridobivamo navplije (Rittshof in sod., 1992; Faimali in sod., 2002).

### 3.1.3 Zbiranje in gojenje ličink (navplijev) *B. amphitrite*

Navpliji, ki so jih sprostili odrasli vitičnjaki, so pozitivno fototaktični. V čašo smo usmerili svetilko in jih s pipeto posrkali ter prenesli v prazno posodo. 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 naravno morskovo vodo, ki smo jo prej prefiltrirali skozi celulozni filter (Whatman, VB) s porami, manjšimi od 0,22 µm in ji dodali kloramfenikol (Farmochimica, Italija) s koncentracijo 2 mg/L. Prav tako kot odraslim, smo jim trikrat na teden menjali vodo (jih precedili in splaknili z naravno filtrirano morskovo vodo ( $<0,22$  µm) in nahranili z algami *T. suecica* v koncentraciji  $5 \times 10^5$  celic/mL. Te smo pred vsakim hranjenjem pregledali, da ne bi vsebovale praživali, ki so za navplije patogene. Vodo z

organizmi smo nežno prezračevali. Kulture navplijev smo gojili v termostahirani omari (KW apparecchi scientifici, Italija) pri  $28 \pm 1$  °C in svetlobnem ciklu 12 ur svetlobe (1400 lux) in 12 ur teme. 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 hladilnik na 6 °C. Po štirih dneh smo jih lahko uporabili v poskusih (Rittshof in sod., 1992).

### **3.1.4 Gojenje kopepodnih rakov vrste *Tigriopus fulvus***

Odrasle rake *T. fulvus* smo nabrali v kamnitih bazenčkih ob obali predela Nervi v Genovi in jih vzdrževali v laboratorijskih razmerah nekaj generacij (aklimatizacija). Gojili smo jih v desetlitrskih plastičnih posodah s filtrirano morskovo vodo ( $<0,22 \mu\text{m}$ ) pri slanosti 37 promilov,  $20 \pm 0,5$  °C ter ciklu 16 ur svetlobe (500–1000 lux) in 8 ur teme. Enkrat na teden smo jih hranili s suspenzijo alg *Chlorella minutissima* in kvasovk *Saccharomyces cerevisiae* (Pane in sod., 2005).

## **3.2 BIOLOŠKI TESTI**

### **3.2.1 Test inhibicije pritrjanja ličink (ciprisov) *B. amphitrite***

Poskuse protivegetativne aktivnosti sem opravljal na genovskem inštitutu za raziskave morja ISMAR, podružnici italijanskega nacionalnega inštituta CNR. Ciprise, ki smo jih 4 dni hranili pri 6 °C, smo najprej ločili od odmrlega materiala in jih prenesli v petrijevko (Greiner Bio-One International AG). Sprva smo ekstrakte testirali v treh ponovitvah, nato pa strategijo spremenili in ponovitve opustili zaradi pomanjkanja testnih organizmov. Na mikrotirnih ploščah (Greiner Bio-One International AG) s 24 razdelki smo pripravili raztopine ekstraktov v filtrirani morski vodi. V dolbine smo napolnili z 800  $\mu\text{L}$  filtrirane morske vode in 200  $\mu\text{L}$  ekstrakta ter dodali od 15 do 20 testnih organizmov, ki smo jih najprej nanесли na filter in nato splaknili v dolbinico z natanko 1 mL filtrirane morske vode, da je bila končna prostornina raztopine vedno 2 mL. Končne koncentracije testiranih ekstraktov so bile 100 (50), 10, 1 in 0,1 mg/L ter seveda kontrolni raztopini s koncentracijo



0 mg/L. Plošče smo zavili v aluminijasto folijo in jih 3 dni inkubirali pri  $28 \pm 1$  °C. Po 24, 48 in 72 urah smo z lupo preverili število pritrjenih rakov in zapisali tudi morebitne posebnosti (neaktivni ali mrtvi organizmi itd.). Iz dobljenih rezultatov smo izračunali deleže pritrjenih organizmov glede na čas in koncentracije ekstraktov.

Ekstrakte smo raztopili v DMSO in nato redčili s filtrirano morskovo vodo, zato smo naredili tudi kontrolne raztopine brez ekstraktov samo v DMSO in samo v filtrirani morski vodi. Pri najvišji koncentraciji ekstrakta (100 mg/L) je bila koncentracija DMSO v prvi seriji poskusov 1 %, nato pa smo poskuse opravljali pri stalni koncentraciji DMSO 0,1 % in pri tej vrednosti poskušali doseči čim večjo vsebnost ekstrakta.

Za primerjavo smo na enak način opravili poskus inhibicije pritrjanja rakov s tremi koncentracijami DMSO (0,1, 1 in 10 %) in tudi s cinkovim piritionom (Orazio Brignola, Italija), raztopljenim v DMSO, ki so ga še pred kratkim obsežno uporabljali kot del zaščitnih protivegetativnih premazov, vendar so kasneje ugotovili, da je bil njegov učinek posledica neposrednih toksičnih učinkov na ličinke zoo- in fitoplanktona (Faimali in sod., 2003b).

Na prej opisan način smo opravili teste inhibicije pritrjanja ličink z DMSO, cinkovim piritionom in tridesetimi ekstrakti, ki so pripadali petnajstim vrstam spužev iz sedmih redov. Za nadaljnje teste smo izbrali tri vrste, ki so kazale najbolj izrazito inhibicijo pritrjanja: acetonska ekstrakta spužev *Phakellia striptata* (LI-5A) in *Topsentia ophiraphidites* (99A) ter butanolni in acetonski ekstrakt vrste *Xestospongia pacifica* (LI-47B in LI-47A).

Pri teh ekstraktih smo naredili tudi natančnejši test inhibicije pritrjanja s štirimi ponovitvami pri vsaki koncentraciji. Razpon koncentracij smo določili glede na rezultate predhodnega testa, in sicer pri ekstraktu *Phakellia striptata* (LI-5A) 20, 10, 5, 2,5 in 0 mg/L, pri ekstraktu *Topsentia ophiraphidites* (99A) 8, 4, 2 in 0 mg/L ter pri ekstraktu *Xestospongia pacifica* (LI-47B) 8, 4, 2, 1 in 0 mg/L. Iz dobljenih rezultatov smo izrazili deleže pritrjenih organizmov v odvisnosti od časa in koncentracije ekstraktov 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).

### 3.2.2 Test akutne toksičnosti ekstraktov na ličinke (stadij navplija) *B. amphitrite*

Za test akutne toksičnosti ekstraktov smo uporabili navplije v drugi fazi razvoja, dve do štiri ure po tem, ko so jih odrasli sprostili iz »plaščeve votline« (angl. *mantle cavity*). Pridobili smo jih iz kulture odraslih vitičnjakov, kot je opisano pri postopku gojenja in zbiranja ličink (točka 3.1.3).

Na mikrotitrnih ploščah s 24 razdelki smo pripravili raztopine ekstraktov v filtrirani morski vodi s štirimi ponovitvami. Vdolbine smo napolnili z 800  $\mu$ L filtrirane morske vode in 200  $\mu$ L ekstrakta ter dodali od 15 do 20 testnih organizmov, ki smo jih najprej nanесли na filter in nato splaknili v vdolbinico z natanko 1 mL filtrirane morske vode, da je bila končna prostornina raztopine vedno 2 mL. Končne koncentracije testiranih ekstraktov so bile 100, 50, 10, 5, 1, 0,5 in 0,1 mg/L ter seveda kontrolna raztopina s koncentracijo 0 mg/L. Ekstrakte spužev *Phakellia striptata* LI-5A, *Xestospongia pacifica* LI-47A in LI-47B smo pripravili v DMSO in nato redčili s filtrirano morsko vodo, zato je bila vsebnost DMSO pri vseh testiranih vzorcih in tudi pri kontrolni raztopini 0,1 %.

Plošče smo dva dni inkubirali pri  $28 \pm 1$  °C ter svetlobnem ciklu 12 ur svetlobe (1400 lux) in 12 ur teme. Po 24 in 48 urah smo z lupo preverili število mrtvih ličink. Kot mrtve smo ocenili tiste z iztegnjenimi antenami in pobledele hitinjačo. Iz dobljenih rezultatov smo izrazili deleže mrtvih organizmov v odvisnosti od časa izpostavljenosti in koncentracije ekstraktov ter iz rezultatov po 24 in 48 urah po spremenjeni metodi Spearman-Kärber 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).

### 3.2.3 Test akutne toksičnosti ekstraktov na netarčne organizme (navplije) *T. fulvus*

Teste akutne toksičnosti ekstraktov na navplijih kopepodnih rakov *T. fulvus* smo opravili na Oddelku za biologijo Univerze v Genovi. Iz kulture kopepodov, ki smo jo gojili, kot je opisano v točki 3.1.4, smo odvzeli nekaj samic, ki so nosile vrečke z jajčeci, da smo dobili zadostno število navplijev enake starosti. Valjenje smo spodbudili tako, da smo vrečke po tem, ko smo samice imobilizirali z nežno filtracijo na filtrih (0.47  $\mu\text{m}$ ) iz steklenih mikrovlakn (Whatman, VB), odstranili s secirno iglo. Vrečke smo prenesli na plošče s šestimi vdolbinami (Greiner Bio-One International AG) z 10 mL morske vode (slanost 30 promilov) in jih 24 ur pustili na temperaturi  $20 \pm 0,5$  °C (Pane in sod., 2005). Navplije, ki so se izvalili (v fazi 1 in 2), smo uporabili za test akutne toksičnosti ekstraktov spužev *Phakellia striptata* LI-5A ter *Xestospongia pacifica* LI-47A in LI-47.

Testne koncentracije ekstraktov so bile 0,5, 1, 5, 10, 50 in 100 mg/L. Pri vsaki koncentraciji in tudi kontrolnih raztopinah, ki so vsebovale le 0,1 % DMSO v filtrirani morski vodi ali le filtrirano morsko vodo smo opravili tri vzporedne meritve.

Plošče smo inkubirali pri temperaturi  $20 \pm 0,5$  °C in po 24 in 48 urah preverili število mrtvih organizmov (negibni ob dotiku s secirno iglo). Iz dobljenih rezultatov smo izrazili deleže mrtvih organizmov v odvisnosti od časa izpostavljenosti in koncentracije ekstraktov ter po spremenjeni metodi Spearman-Kärber 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).

### 3.2.4 Določanje drugih bioloških aktivnosti v izbranih ekstraktih *Phakellia striptata* (LI-5A), *Topsentia ophiraphidites* (99A) in *Xestospongia pacifica* (LI-47B)

Z nadaljnjimi testi (hemoliza in inhibicija acetilholinesteraze) smo hoteli natančneje raziskati mehanizme bioloških aktivnosti, ki bi bili lahko vzrok za protivegetativne lastnosti ekstraktov spužev *Phakellia striptata* (LI-5A), *Topsentia ophiraphidites* (99A) in

*Xestospongia pacifica* (LI-47B). Na koncu smo s tankoplastno kromatografijo v ekstraktih preverili prisotnost kvartarnih amonijevih spojin.

#### 3.2.4.1 Hemolitični test

S hemolitičnim testom ugotavljamo sposobnost snovi, da poškoduje membrane eritrocitov. Ti vsebujejo rdeče krvno barvilo hemoglobin, ki se ob poškodbah sprosti iz celic. Snov, ki hemolizira, je potencialno citotoksična tudi za druge celice. Lahko poškoduje tudi membrane celic pritrjajočih se ličink in tako deluje protivegetativno.

Eritrocite smo s centrifugiranjem izolirali iz sveže goveje krvi, ki smo ji pri odvzemu dodali citrat, da se ni strjevala. Trikrat smo jih sprali s fiziološko raztopino in uporabili za biološke teste ali spravili v Alseverjevem konzervansu v hladilnik. Tako pripravljene eritrocite lahko uporabljamo, dokler se supernatant ne pobarva rdeče, kar bi nakazovalo na hemolizo. Pred uporabo smo konzervirane eritrocite vedno dvakrat sprali s fiziološko raztopino. Za testiranje smo jih resuspendirali v pufru za eritrocite (raztopina 0,13 M NaCl in 0,02 M TRIS.HCl, pH 7,4) in pripravili suspenzijo, ki je imela pri 650 nm navidezno absorpcijo  $1 \pm 0,01$ .

Hemolitično aktivnost smo spremljali s čitalnikom mikrotitrih plošč (Dynex Technologies, ZDA), ki omogoča hkratno zasledovanje 96 časovnih potekov reakcij. Na mikrotitri plošči (TPP, Švica) smo v vse vdolbinice dodali 100  $\mu$ L eritrocitnega pufru ter v prvi stolpec še 90  $\mu$ L enakega pufru in 10  $\mu$ L posameznega vzorca, raztopljenega v DMSO (v dveh ponovitvah). Zadnji dve vdolbinici v stolpcu sta bili namenjeni negativni kontroli z DMSO. S pipeto smo po 100  $\mu$ L raztopine prenašali vzdolž vrst do predzadnje vdolbinice in zadnjih 100  $\mu$ L zavrgli. Redčili smo torej v razmerju 1 : 2 od začetne koncentracije 1,25 mg/mL pri ekstraktih spužev *Phakelia striptata* (LI-5A) in *Xestospongia pacifica* (LI-47B) ter 0,25 mg/mL pri ekstraktu *Topsentia ophiraphidites* (99A) do končnih 0 mg/mL. Vse vdolbinice v dvanajstem stolpcu so bile namreč namenjene kontroli in so vsebovale le pufer. Pred meritvijo smo v vseh 96 vdolbinic dodali

še 100  $\mu\text{L}$  eritrocitov in začeli meriti. Merili smo sipanje svetlobe pri valovni dolžini 630 nm (navidezno absorpcijo). Hemolizo smo spremljali 20 minut pri 25  $^{\circ}\text{C}$ .

Iz rezultatov smo odčitali polovični čas hemolize ( $t_{50}$ ), tj. čas, pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti, ter izrazili časovni potek hemolize v odvisnosti od koncentracije ekstrakta. Za ekstrakt vrste *Topsentia ophiraphidites* (99A) smo prikazali tudi časovni potek hemolize.

#### 3.2.4.2 Test inhibicije acetilholinesteraze

Acetilholinesteraza (AChE) je encim, ki v sinaptičnih špranjah med dvema živčnima celicama in na motorični ploščici hidrolizira acetilholin do holina in acetata. Acetilholin je pomemben nevrottransmitter, ki z vezavo na receptor odpre kanalčke  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  in depolarizira celico. Če je acetilholinesteraza zavirana, je postsinaptična membrana nenehno vzdružena, kar paralizira mišice in povzroči smrt organizma. Spojine, ki preprečujejo delovanje acetilholinesteraze, lahko zato uvrščamo med nevrotoksine.

Aktivnost AChE in njeno inhibicijo s testnimi ekstrakti smo spremljali z Ellmanovo metodo (Ellman in sod., 1961) s čitalnikom mikrotitrnih plošč (Dynex Technologies, ZDA). Vdolbinice na mikrotitrni plošči (TPP, Švica) smo napolnili s po 150  $\mu\text{L}$  Ellmanovega reagenta z 1 mM substratom (raztopina 5,5-ditiobis 2-nitrobenzojske kisline, natrijevega hidrogen karbonata in acetilholin jodida (substrat) v 25 mM fosfatnem pufru pH 7,0). V prve štiri vdolbinice prvega stolpca smo dodali še 140  $\mu\text{L}$  Ellmanovega reagenta z 1 mM substratom in 10  $\mu\text{L}$  ekstraktov v DMSO – dve ponovitvi z vzorcem *Phakelia striptata* (LI-5A) in dve z ekstraktom *Xestospongia pacifica* (LI-47B). Naslednjima dvema vdolbinicama smo dodali le 100  $\mu\text{L}$  Ellmanovega reagenta z 1 mM substratom in 50  $\mu\text{L}$  ekstrakta *Topsentia ophiraphidites* (99A), saj je bila izvorna koncentracija ekstrakta v DMSO petkrat manjša kot pri prvih dveh. Zadnji dve vdolbinici v stolpcu sta bili namenjeni negativni kontroli z DMSO. Sto petdeset  $\mu\text{L}$  raztopine smo s pipeto prenašali vzdolž vrst do predzadnje vdolbinice in zadnjih 150  $\mu\text{L}$  zavrgli. Ekstrakte smo torej redčili v razmerju 1 : 2 od koncentracije 1,25 mg/mL do 0 mg/mL. Po končanem

redčenju smo v vsako vdolbinico dodali 50  $\mu$ L encima AChE iz električne jegulje (Sigma, ZDA), ki smo ga prej raztopili v 100 mM fosfatnem pufru pH 7,3 v koncentraciji 500 encimskih enot (EE)/mL, in začeli meritve. Končna koncentracija encima v reakcijski mešanici je bila 12,5 EE/mL. Reakcijo smo spremljali 5 minut pri 412 nm in 25 °C.

#### 3.2.4.3 Določanje vrste inhibicije in konstante inhibicije acetilholinesteraze ekstraktov *Xestospongia pacifica* (LI-47B) in *Topsentia ophiraphidites* (99A)

V tem testu smo poleg redčenja ekstraktov naredili tudi tri redčitve substrata (acetilholina). Štiri stolpce na mikrotitrni plošči smo napolnili s 150  $\mu$ L Ellmanovega reagenta z 1 mM substratom, štiri s 150  $\mu$ L Ellmanovega reagenta z 0,5 mM substratom ter štiri s 150  $\mu$ L Ellmanovega reagenta z 0,25 mM substratom. V prve tri pare vdolbinic z različnimi koncentracijami substrata smo dodali 2,5  $\mu$ L ekstrakta *Xestospongia pacifica* (LI-47B) in 147,5  $\mu$ L Ellmanovega reagenta z ustreznimi koncentracijami substrata (paroma 1, 0,5 in 0,25 mM). Redčitve 1 : 2 smo naredili tako, da smo prenašali 150  $\mu$ L raztopine od zgornjih vdolbinic stolpca proti spodnjim in 150  $\mu$ L pred zadnjo vdolbinico zavrgli. Tako smo dobili koncentracijsko vrsto od 0,312 mg/mL do 0 mg/mL. Enako smo naredili redčitve z ekstraktom *Topsentia ophiraphidites* (99A), le da smo v začetne tri pare vdolbinic z različnimi koncentracijami substrata dodali 3,125  $\mu$ L ekstrakta in jih dopolnili z reagentom in substratom do končnega volumna 300  $\mu$ L. Začetna koncentracija je bila 78,125 in končna 0 mg/L. Rezultate smo izrazili v obliki Dixonovih diagramov, iz katerih smo odčitali tip ter konstanto inhibicije ( $K_i$ ) encima.

#### 3.2.4.1 Tankoplastna kromatografija

S tankoplastno kromatografijo smo preverili prisotnost kvartarnih amonijevih spojin in njihovo mobilnost, med katere spadajo tudi biološko aktivne alkilpiridinijske spojine. Na plošče s silikagelom Kieselgel F<sub>245</sub> (Merck, Nemčija) smo nanесли v DMSO raztopljene ekstrakte: metanolni ekstrakt *Holopsamma helwigi* (5M), butanolne ekstrakte *Callyspongia plicifera* (127B), *Xestospongia muta* (53B) in *Xestospongia pacifica* (LI-47B) ter

acetonske ekstrakte *Phakelia striptata* (LI-5A), *Xestospongia pacifica* (LI-47A) in *Topsentia ophiraphidites* (99A). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili poli-APS (polimerne alkilpiridinijeve soli iz morske spužve *Reniera sarai*). Plošče smo razvili z mešanico topil metanol: kloroform (9 : 3). Po razvitju smo na plošče razpršili Dragendorffov reagent (raztopina 0,11 M kalijevega jodida in 0,6 mM bizmutovega subnitrata v 3,5 M očetni kislini), ki vse kvartarne amonijeve spojine obarva močno oranžno.

## 4 REZULTATI

### 4.1 TEST INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK (CIPRIS) *B. amphitrite*

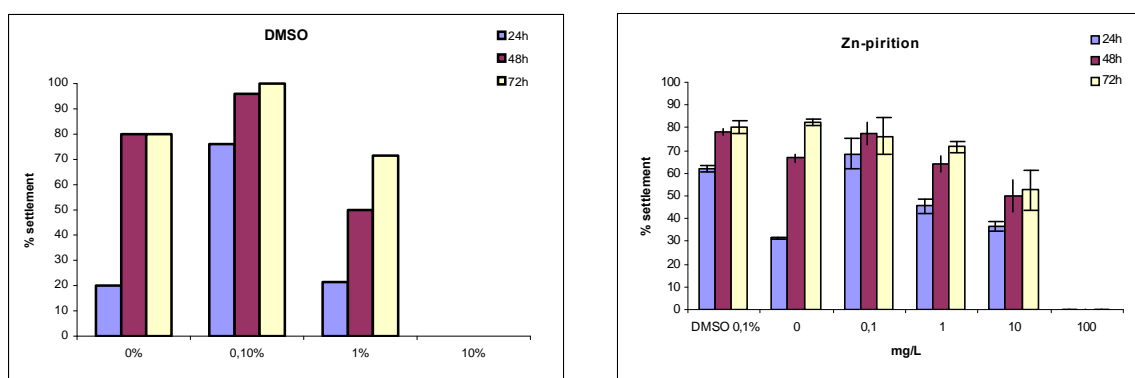
V nadaljevanju so prikazani rezultati inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z različnimi ekstrakti spužev, ki smo jih izbrali glede na taksonomsko sorodnost z znanimi protivegetativno aktivnimi vrstami, vsebnost kvartarnih amonijevih spojin ter druge predhodno opažene biološke aktivnosti, ki bi lahko bile vzrok za protivegetativno aktivnost.

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.1, in zapisali deleže pritrjenih organizmov po 24 (modri stolpci), 48 (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci) v odvisnosti od koncentracije suhe snovi v ekstraktu. Opravili smo tudi poskusa inhibicije pritrjanja s topilom DMSO in močnim industrijskim protivegetativnim sredstvom cinkovim piritiomom. Na slikah organskih ekstraktov so na začetku osi x razvrščene kontrolne raztopine brez ekstraktov. Vsebujejo le 0,1 % dimetil sulfoksid v morski vodi (razdelek DMSO 0,1 %), 0,5 % dimetil sulfoksid v morski vodi (DMSO 0,5 %), 1 % dimetil sulfoksid v morski vodi (razdelek DMSO 1 %) ali le morsko vodo (razdelek 0), nato pa si naraščajoče sledijo koncentracije ekstraktov. Na slikah vodnih ekstraktov je prvi razdelek namenjen rezultatu kontrolne raztopine z morsko vodo (razdelek 0). Delež pritrjenih organizmov s časom narašča.

Najaktivnejši ekstrakti so bili *Phakellia striptata* LI-5A (slika 10), *Topsentia ophiraphidites* 99A (slika 12) ter oba ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47A (slika 14

levo) in LI-47B (slika 14 desno), ki smo jih nato podrobneje analizirali v nadaljnjih poskusih (točka 4.2).

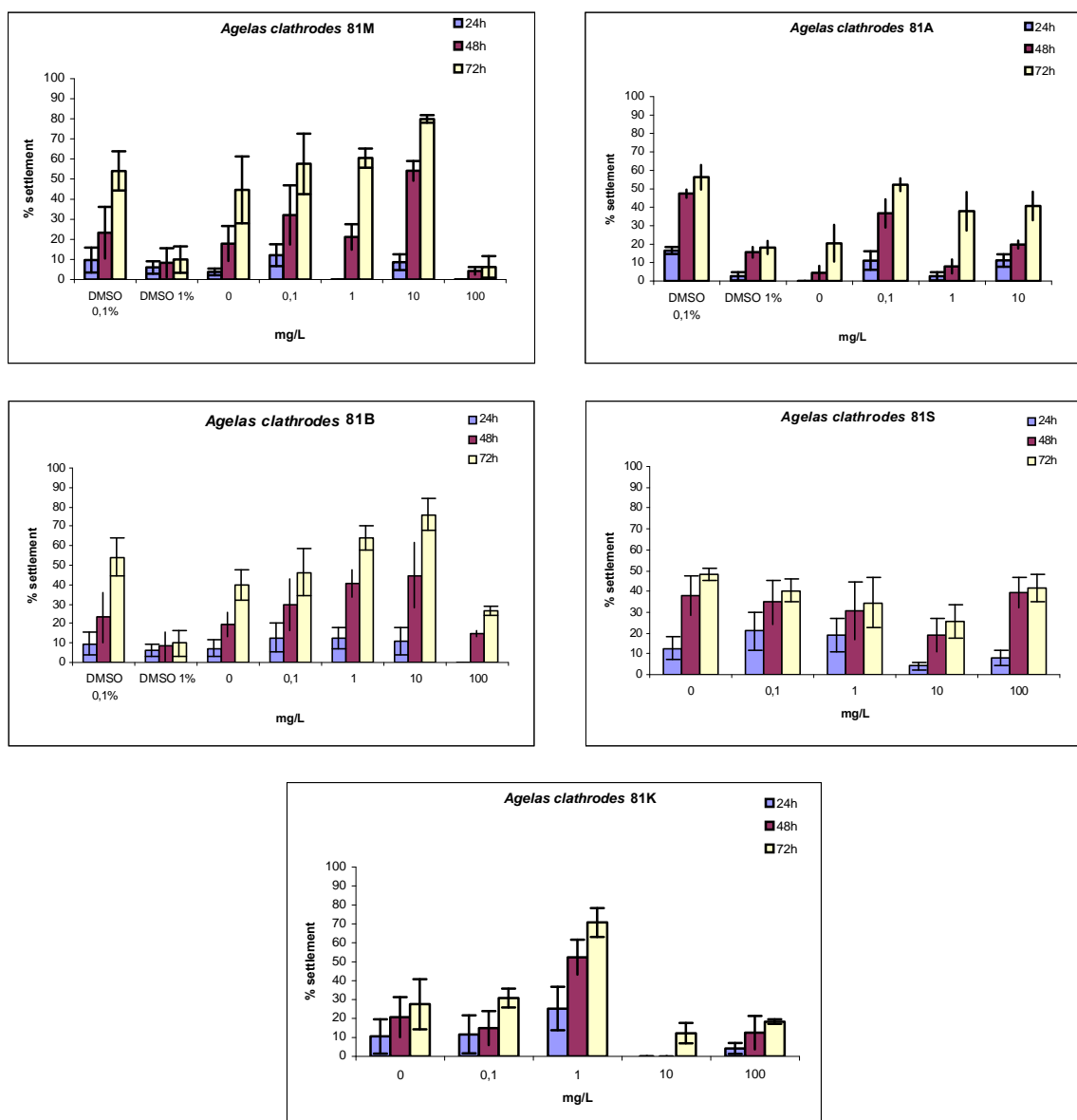
Na sliki 4 (levo) je prikazan rezultat vpliva koncentracije DMSO na pritrjanje ličink *B. amphitrite*. Ta pri koncentraciji 0,1 % poveča pritrjanje, pri 10 % ga popolnoma zavre. Cinkov piriton deluje pri koncentraciji 10 mg/L delno, pri koncentraciji 100 mg/L pa popolnoma protivegetativno (slika 4 desno).



Slika 4: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije DMSO in cinkovega piritiona po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev pri cinkovem piritionu.

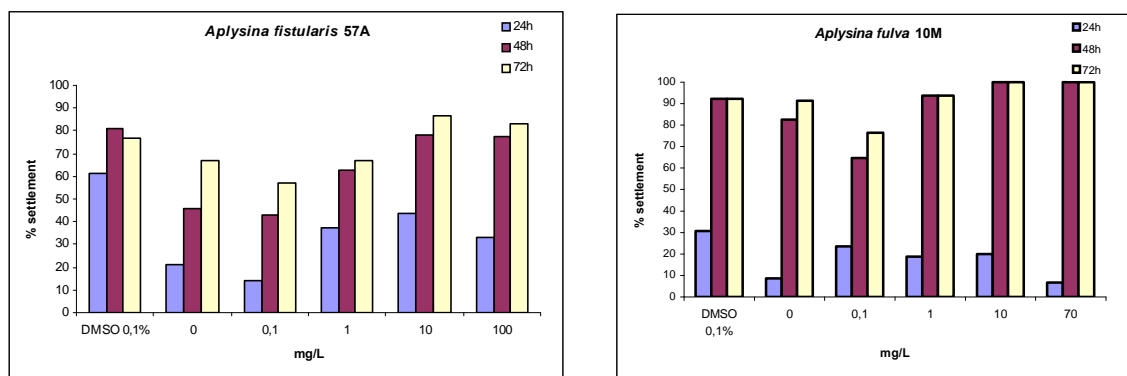
Vodni in organski ekstrakti karibske morske spužve *Agelas clatroides* imajo zelo šibko protivegetativno aktivnost ali je nimajo (slika 6). Pri ekstraktih 81M, 81B in 81K lahko opazimo povečevanje deleža pritrjenih organizmov ob povečevanju koncentracije do določene meje, potem delež upade. Pri organskih ekstraktih ima kontrolna raztopina z 0,1 % DMSO večji delež pritrjenih organizmov kot tista z morsko vodo. Največjo inhibicijo opazimo pri ekstraktu 81K s koncentracijo 10 mg/L. Delež pritrjenih organizmov pri koncentraciji 100 mg/L ekstrakta 81M je sicer majhen, a ga moramo primerjati z rezultatom kontrolne raztopine DMSO 1 %.



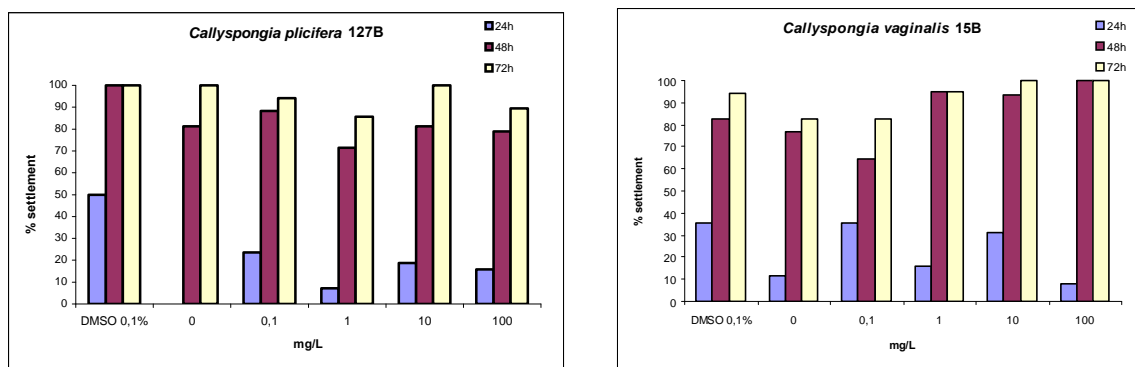


Slika 5: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije ekstraktov *Agelas clathrodes* po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev. 81M je metanolni ekstrakt, 81A je acetonski ekstrakt, 81B je butanolni ekstrakt, 81S je surov vodni ekstrakt in 81K je kuhan vodni ekstrakt.

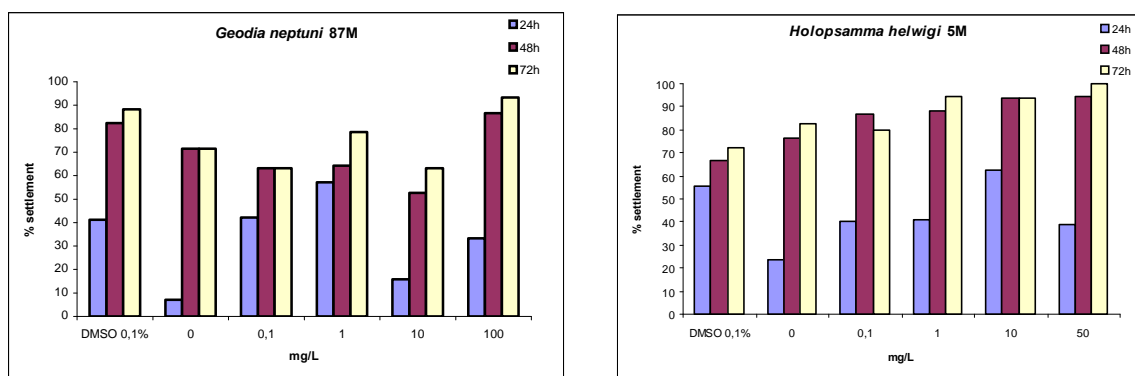
Acetonski ekstrakt *Aplysina fistularis* 57A (slika 6 levo), butanolna ekstrakta *Callyspongia plicifera* 127B in *Callyspongia vaginalis* 15B (slika 7) ter metanolni ekstrakti *Aplysina fulva* 10M (slika 6 desno), *Geodia neptuni* 87M in *Holopsamma helwigi* 5M (slika 8) nimajo protivegetativne aktivnosti.



Slika 6: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Aplysina fistularis* 57A in metanolnega ekstrakta *Aplysina fulva* 10M po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci).

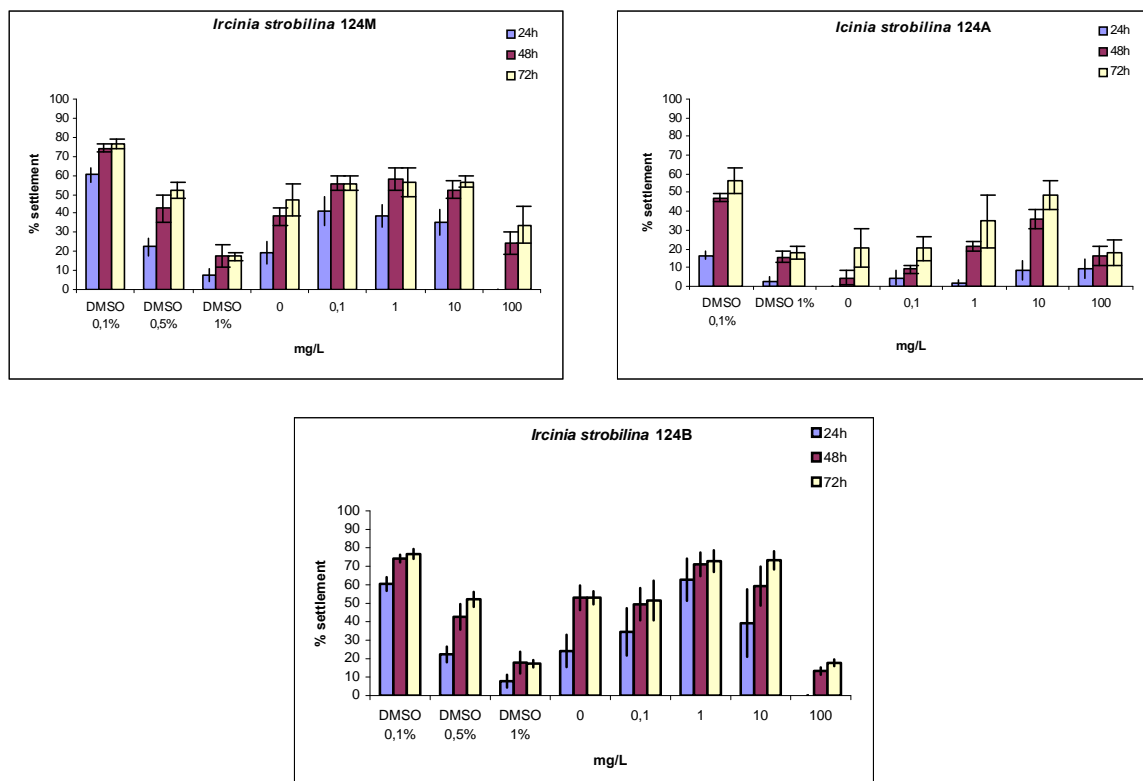


Slika 7: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije butanolnih ekstraktov *Callyspongia plicifera* 127B in *Callyspongia vaginalis* 15B po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci).



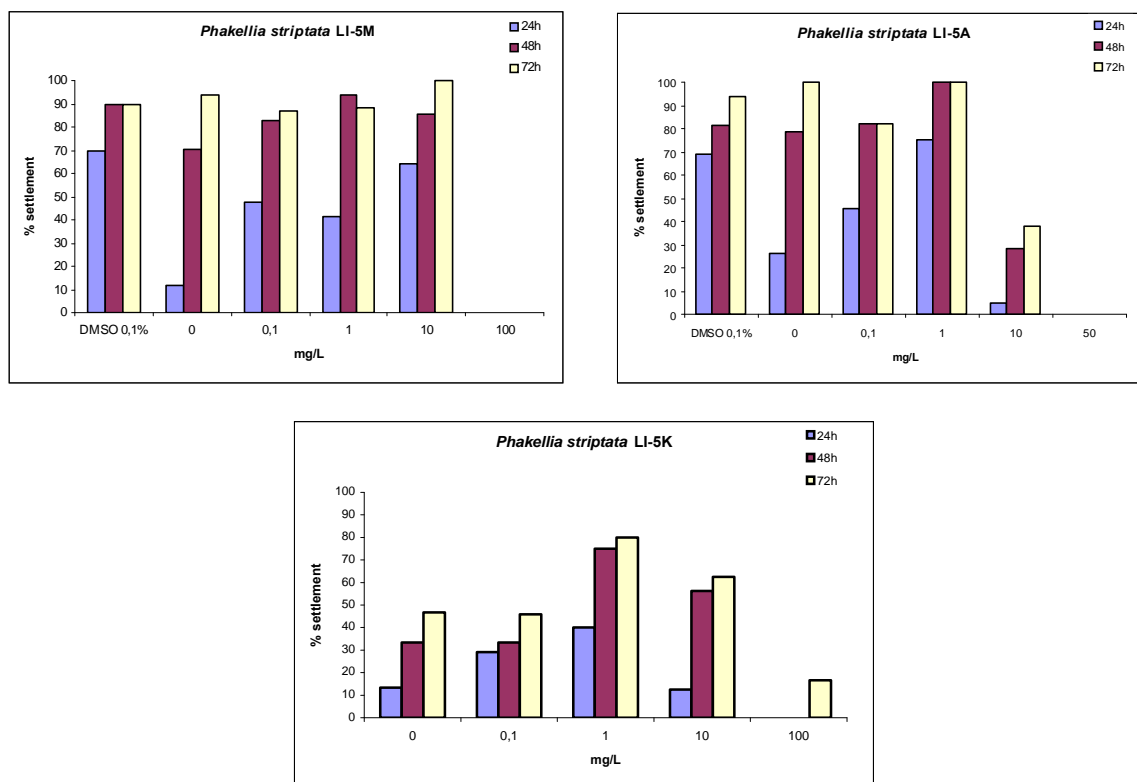
Slika 8: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije metanolnih ekstraktov *Geodia neptuni* 87M in *Holopsamma helwigi* 5M po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci).

Organski ekstrakti karibske morske spužve *Ircinia strobilina* imajo zelo šibko protivegetativno aktivnost ali je nimajo (slika 9). Opazimo lahko zmanjševanje deleža pritrjenih organizmov, vendar ne zaradi delovanja ekstrakta, saj moramo rezultate primerjati z ustreznimi kontrolnimi raztopinami. Kontrolna raztopina z 1 % DMSO močno zavira pritrjanje, 0,1 % DMSO ga glede na kontrolo poveča.



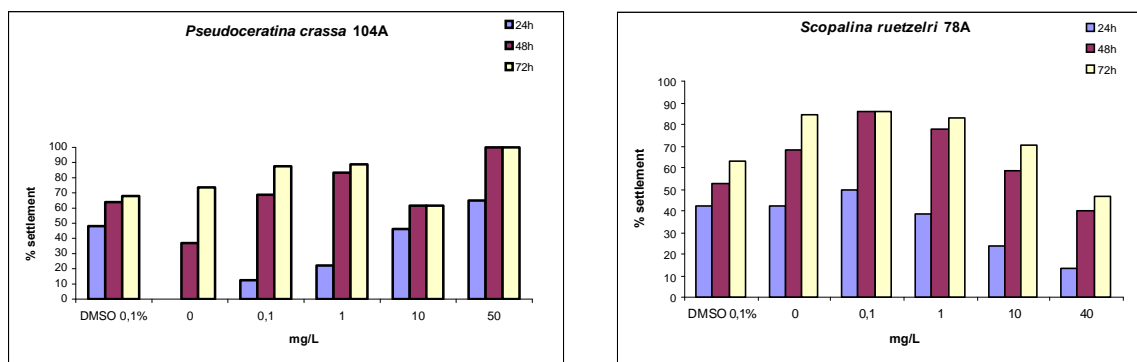
Slika 9: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije ekstraktov *Ircinia strobilina* po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev. 124M je metanolni ekstrakt, 124A je acetonski ekstrakt in 124B je butanolni ekstrakt.

Metanolni (LI-5M) in acetonski (LI-5A) ekstrakt avstralske spužve *Phakelia striptata* imata protivegetativno aktivnost (slika 10). Acetonski popolnoma prepreči pritrjanje pri koncentraciji 50 mg/L in delno že pri 10 mg/L. Metanolni ekstrakt je šibkejši in popolnoma zavre pritrjanje pri koncentraciji 100 mg/L. Kuhan vodni ekstrakt (LI-5K) pri najvišji koncentraciji prepreči pritržitev približno polovici ciprisov.



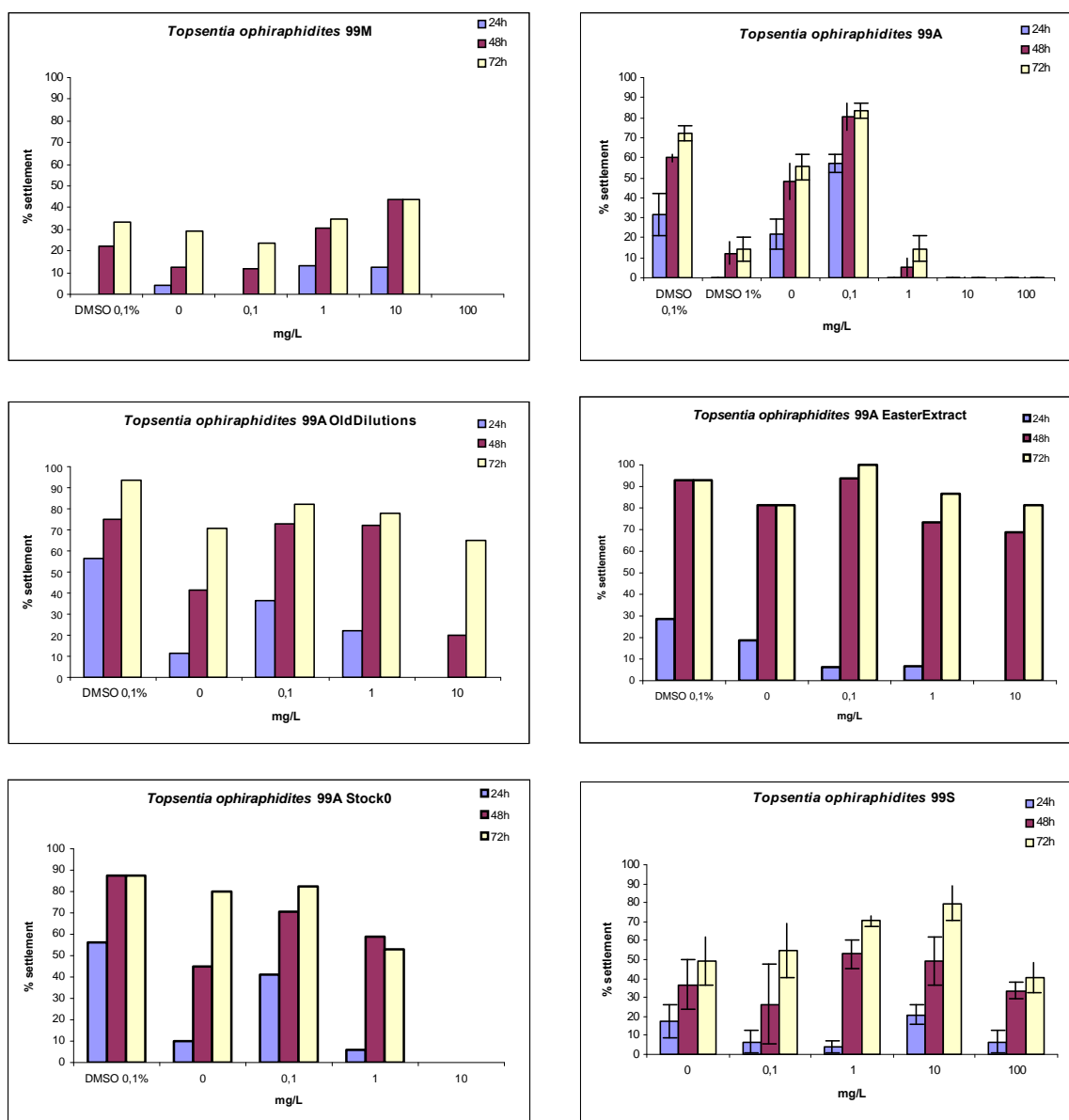
Slika 10: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije ekstraktov spužve *Phakellia striptata* po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). LI-5M je metanolni ekstrakt, LI-5A je acetonski ekstrakt in LI-5K je kuhan vodni ekstrakt.

Acetonska ekstrakta karibskih spužev *Pseudoceratina crasa* 104A in *Scopalina ruetzleri* 78A ne inhibirata pritrjanja rakov vitičnjakov (slika 11).



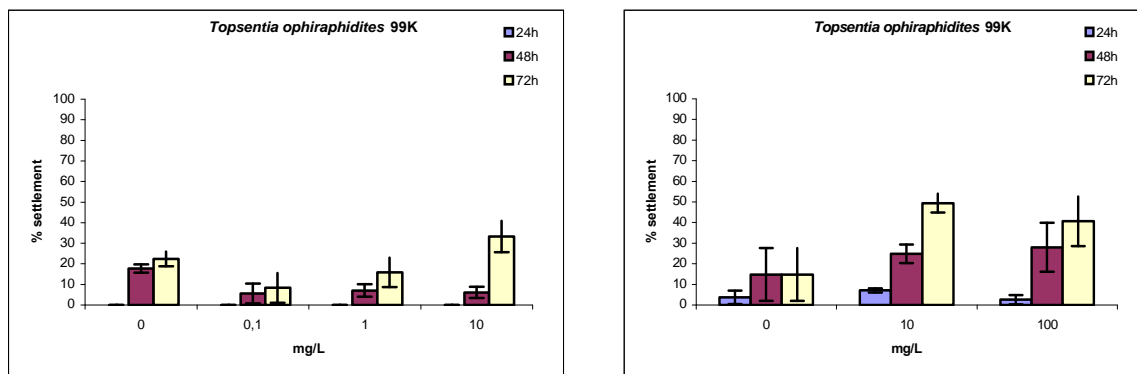
Slika 11: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskih ekstraktov *Pseudoceratina crasa* 104A in *Scopalina ruetzleri* 78A po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci).

Spužvi *Topsentia ophiraphidites* smo posvetili največ pozornosti. Metanolni ekstrakt (99M) popolnoma inhibira pritrjanje pri koncentraciji 100 mg/L, medtem ko acetonska 99A in 99A Stock0 (ekstrakt v DMSO je bil shranjen v hladilniku tri tedne) delujeta delno protivegetativno že pri koncentraciji 1 mg/L, popolnoma pa zavreta pritrjanje pri 10 mg/L. Acetonska ekstrakta 99A OldDilutions (razredčine ekstrakta, ki so bile shranjene na svetlobi pri sobni temperaturi tri tedne) in 99A EasterExtract (pozneje pripravljen acetonski ekstrakt) imata zelo šibko protivegetativno delovanje. Pri kuhanem vodnem ekstraktu 99K je delež pritrjenih organizmov povečan (slika 12).



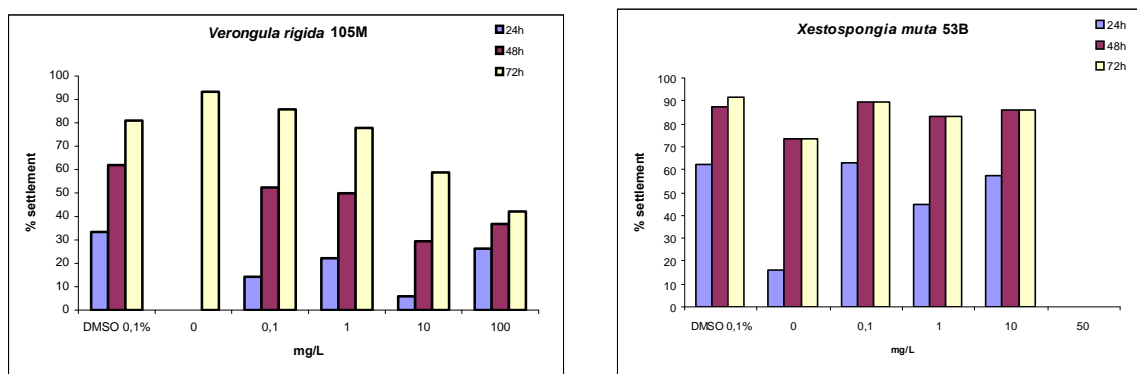
se nadaljuje

nadaljevanje



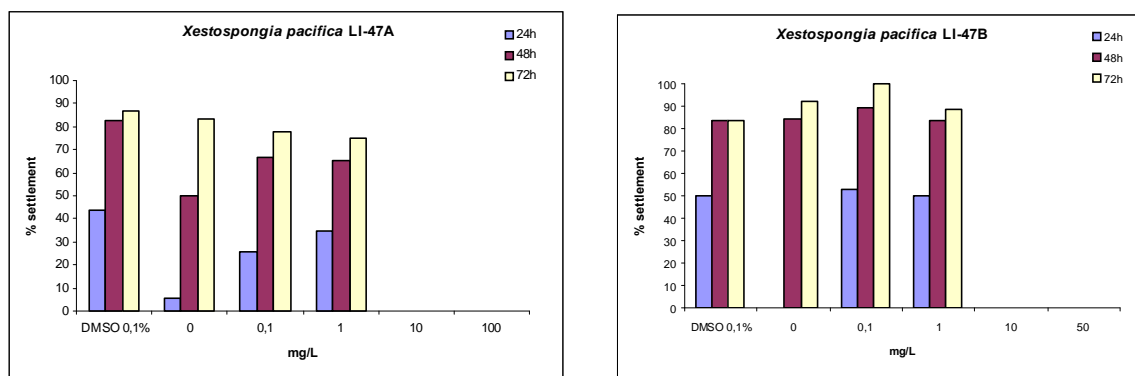
Slika 12: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije ekstraktov *Topsisentia ophiraphidites* po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev. 99M je metanolni ekstrakt; 99A, 99A OldDilutions, 99A EasterExtract in 99A Stock0 so acetonski ekstrakti, 99S je surov vodni ekstrakt in 99K je kuhan vodni ekstrakt.

*Verongula rigida* 105M (metanolni ekstrakt) ima šibko protivegetativno aktivnost pri koncentraciji 100 mg/L. *Xestospongia muta* 53B (butanolni ekstrakt) popolnoma prepreči pritrjanje rakov pri 50 mg/L (slika 13).



Slika 13: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije metanolnega ekstrakta spužve *Verongula rigida* 105A in butanolnega ekstrakta spužve *Xestospongia muta* 53B po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci).

Acetonski (LI-47A) in butanolni (LI-47B) ekstrakt avstralske spužve *Xestospongia pacifica* sta močno protivegetativno dejavna že pri koncentracijah 10 mg/L (slika 14).



Slika 14: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije metanolnega in acetonskega ekstrakta *Xestospongia pacifica* po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). LI-47A je acetonski ekstrakt, LI-47B butanolni ekstrakt.

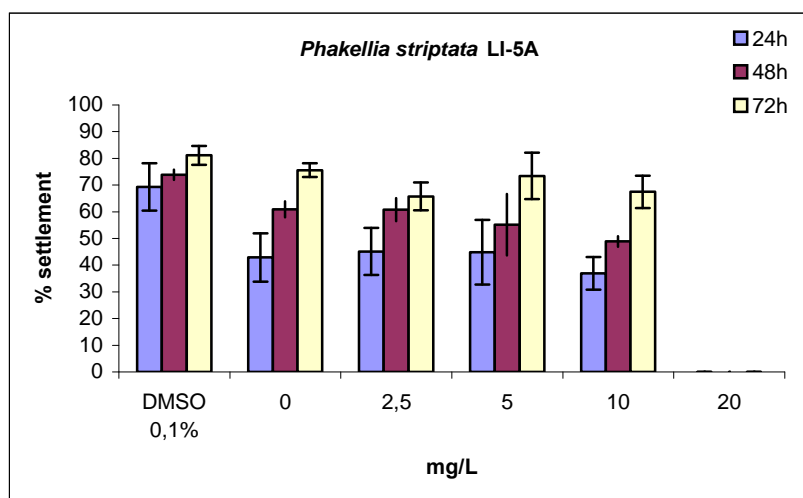
#### 4.2 DOLOČANJE VREDNOSTI $EC_{50}$ INHIBICIJE PRITRJANJA LIČINK *B. amphitrite*

V nadaljevanju so prikazani rezultati inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z najbolj aktivnimi ekstrakti: *Phakellia striptata* LI-5A, *Topsentia ophiraphidites* 99A ter *Xestospongia pacifica* LI-47B, ki smo jih nato podrobneje analizirali v nadaljnjih poskusih.

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.1, in zapisali deleže pritrjenih organizmov po 24 (modri stolpci), 48 (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci) v odvisnosti od koncentracije ekstraktov. Na začetku osi x sta razvrščeni kontrolni raztopini brez ekstraktov. Vsebujeta le 0,1 % dimetil sulfoksid v morski vodi (razdelek DMSO 0,1 %) ali le morsko vodo (razdelek 0), nato pa si naraščajoče sledijo koncentracije ekstraktov.

##### 4.2.1 Določanje vrednosti $EC_{50}$ inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z ekstraktom spužve *Phakellia striptata* (LI-5A)

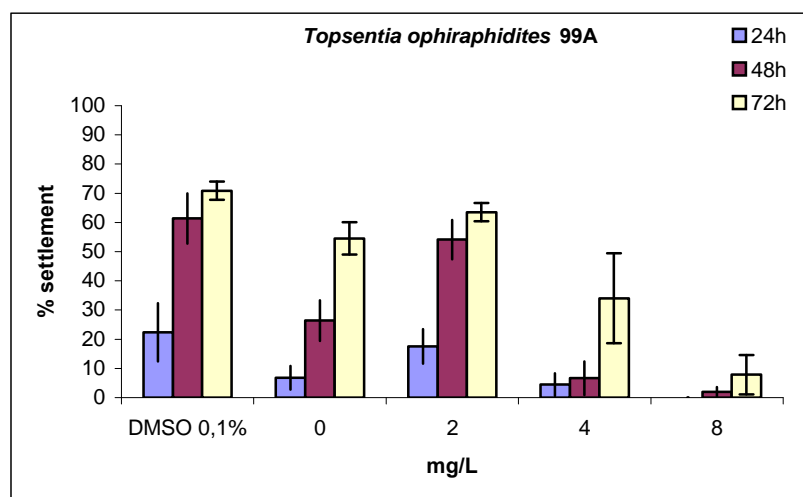
Natančnejši test inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z acetonskim ekstraktom *Phakellia striptata* LI-5A nam je omogočil zanesljivejši izračun  $EC_{50}$  vrednosti po 72 urah inkubacije, ki je za to spužvo 12,78 (11,82–13,81) mg/L. Ekstrakt popolnoma zadrži pritrjanje rakov že pri koncentraciji 20 mg/L (slika 15).



Slika 15: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako štirih vzporednih meritev.

#### 4.2.2 Določanje vrednosti $EC_{50}$ inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z ekstraktom spužve *Topsentia ophiraphidites* (99A)

*Topsentia Ophiraphidites* 99A ima zelo močno protivegetativno aktivnost že pri koncentraciji 8 mg/L. Vrednost  $EC_{50}$  po 72 urah znaša 3,93 (3,49–4,41) mg/L (slika 16).

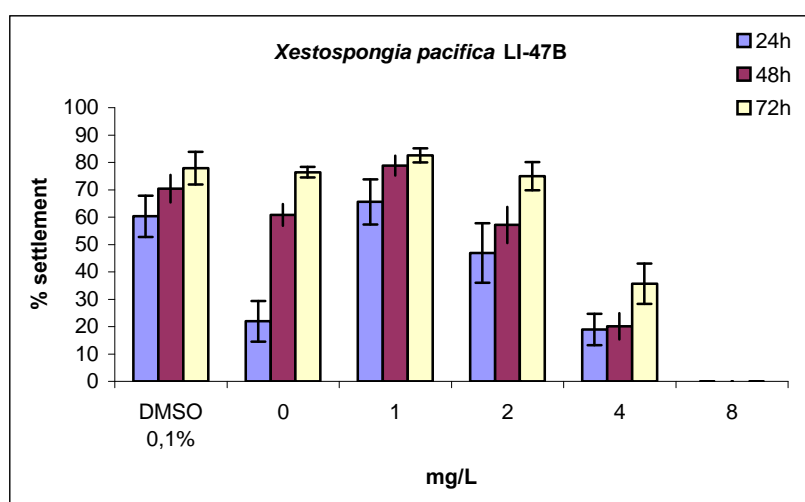


Slika 16: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Topsentia ophiraphidites* 99A po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako štirih vzporednih meritev.



#### 4.2.3 Določanje vrednosti $EC_{50}$ inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z ekstraktom spužve *Xestospongia pacifica* (LI-47B)

Natančnejši test inhibicije pritrjanja ličink *B. amphitrite* z butanolnim ekstraktom spužve *Xestospongia pacifica* LI-47B nam je omogočil boljši izračun vrednosti  $EC_{50}$  po 72 urah inkubacije, ki znaša 3,76 (3,46–4,09) mg/L. Ta spužva popolna zavre pritrjanje rakov že pri koncentraciji 8 mg/L (slika 17).



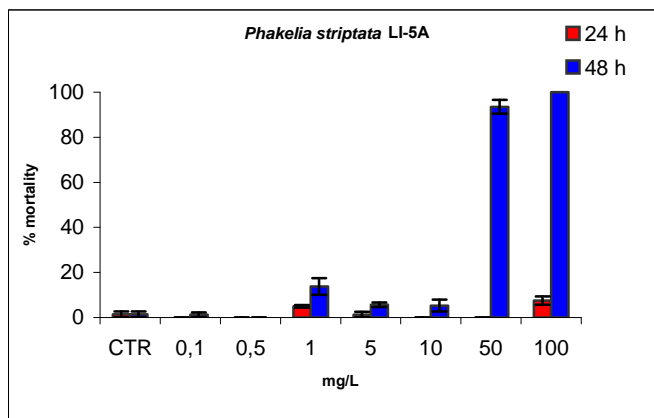
Slika 17: Delež pritrjenih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47B po 24 urah (modri stolpci), 48 urah (rdeči stolpci) in 72 urah (rumeni stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako štirih vzporednih meritev.

#### 4.3 TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI EKSTRAKTOV NA LIČINKE (NAVPLIJE) *B. amphitrite*

Test smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.2, ter rezultate podali v obliki diagrama odvisnosti deleža mrtvih organizmov od koncentracije ekstraktov po 24 (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Prvi razdelki na osi x z oznako CTR kažejo rezultate deležev mrtvih organizmov v kontrolni raztopini z 0,1 % DMSO v morski vodi.

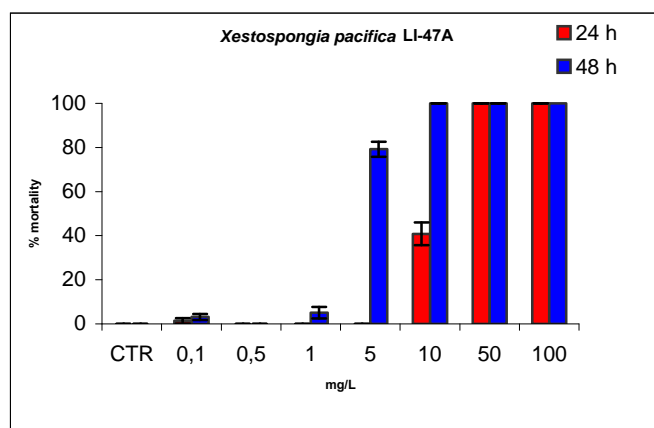
Acetonski ekstrakt spužve *Phakellia striptata* LI-5A pri koncentraciji 50 mg/L po 48 urah inkubacije zmanjša preživetje navplijev za 90 %. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev

mrtvih organizmov po 48 urah inkubacije, za ta ekstrakt znaša 18,58 (16,45–20,98) mg/L (slika 18).



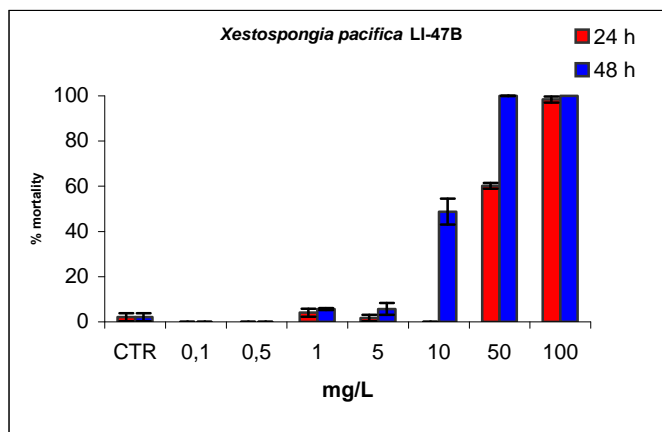
Slika 18: Delež mrtvih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev.

Acetonski ekstrakt vrste *Xestospongia pacifica* LI-47A že po 24 urah pri koncentraciji 10 mg/L ubije 40 % ličink, pri koncentraciji 5 mg/L po 48 urah inkubacije pa zmanjša preživetje navplijev celo za 80 %. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev mrtvih organizmov po 24 urah inkubacije, za ta ekstrakt znaša 13,93 (12,43–15,61) mg/L, po 48 urah pa celo 2,69 (2,41–3,00) mg/L (slika 19).



Slika 19: Delež mrtvih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47A po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev.

Butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47B deluje malo manj toksično. Po 48 urah pri koncentraciji 10 mg/L in po 24 urah pri koncentraciji 50 mg/L ubije približno polovico organizmov. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev mrtvih organizmov po 24 urah inkubacije, znaša 35,58 (31,57–40,10) mg/L, po 48 urah pa 11,29 (9,85–12,94) mg/L (slika 20).

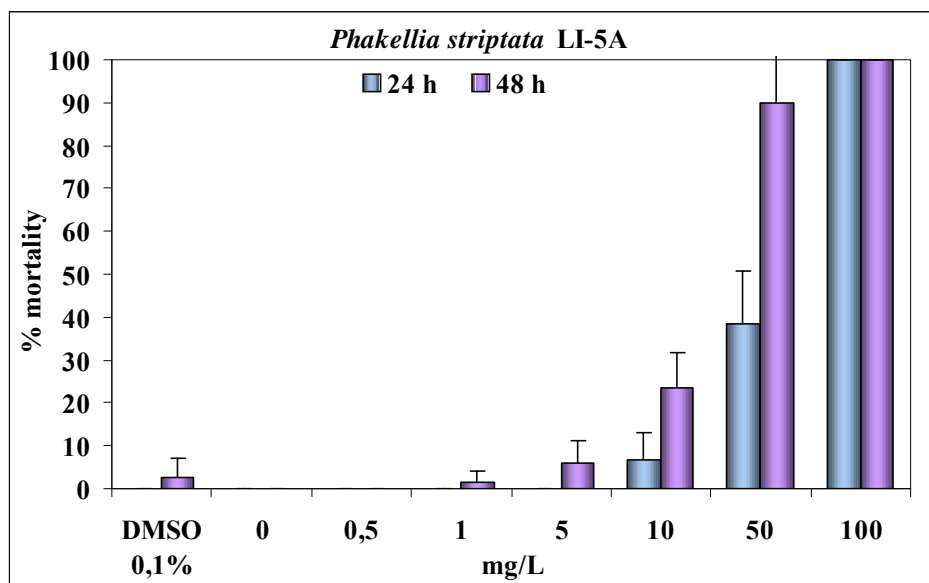


Slika 20: Delež mrtvih ličink *B. amphitrite* v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47B po 24 urah (rdeči stolpci) in 48 urah (modri stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev

#### 4.4 TEST AKUTNE TOKSIČNOSTI EKSTRAKTOV NA NETARČNE ORGANIZME (NAVPLIJE KOPEPODOV *T. fulvus*)

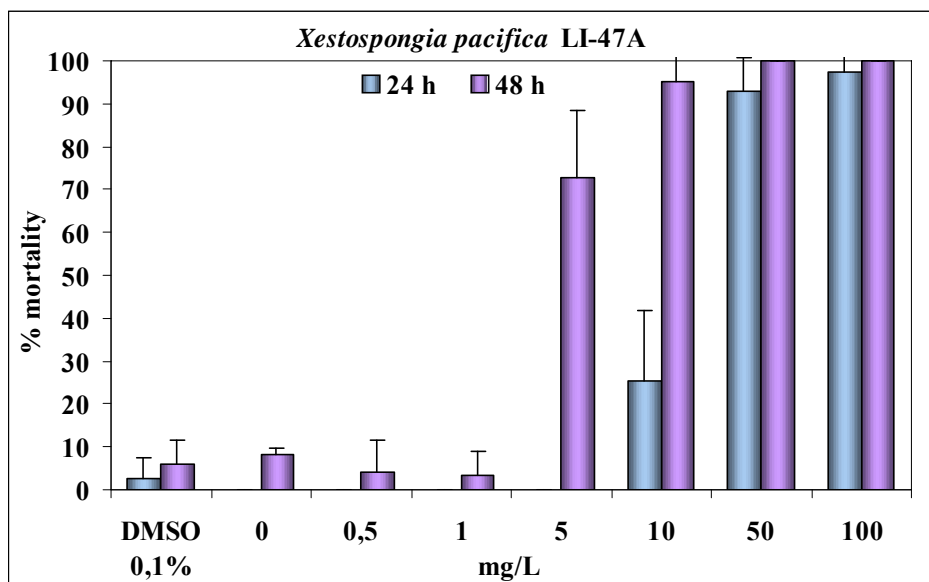
Test akutne toksičnosti na kopepode *T. fulvus* smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.3, ter rezultate prikazali v obliki diagrama odvisnosti deleža mrtvih organizmov od koncentracije ekstraktov po 24 (modri stolpci) in 48 urah (vijolični stolpci). Prvi razdelki na osi x podajajo rezultate deležev mrtvih organizmov v kontrolni raztopini z 0,1 % DMSO v morski vodi (razdelek DMSO 0,1 %) in kontrolni raztopini z morsko vodo (razdelek 0).

Acetonski ekstrakt spužve *Phakellia striptata* LI-5A pri koncentraciji 50 mg/L po 24 urah inkubacije zmanjša preživetje navplijev za 40 %, po 48 urah celo za 90 %. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev mrtvih kopepodov po 24 urah inkubacije, za ta ekstrakt znaša 42,76 (27,67–67,03) mg/L, po 48 urah pa 17,66 (11,70–26,75) mg/L (slika 21).



Slika 21: Delež mrtvih ličink *T. fulvus* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A po 24 urah (modri stolpci) in 48 urah (vijolični stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev.

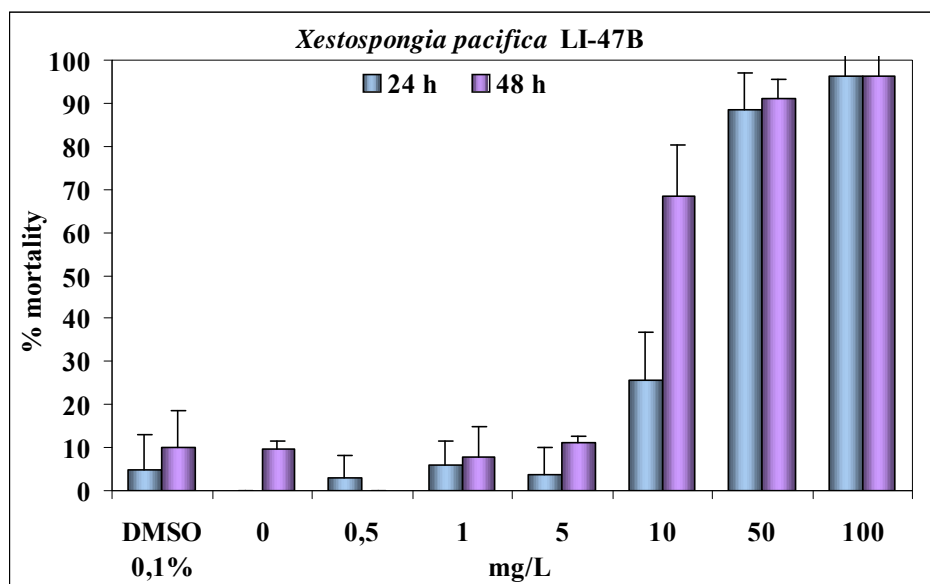
Acetonski ekstrakt vrste *Xestospongia pacifica* LI-47A (slika 22) po 24 urah inkubacije pri koncentraciji 10 mg/L ubije 25 % ličink.



Slika 22: Delež mrtvih ličink *T. fulvus* v odvisnosti od koncentracije acetonskega ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47A po 24 urah (modri stolpci) in 48 urah (vijolični stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev.

Po 48 urah pri koncentraciji 5 mg/L preživi le 30 % navpljev, pri koncentraciji 10 mg/L le okrog 5 %. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev mrtvih organizmov po 24 urah inkubacije, znaša 18,20 (13,72–24,35) mg/L, po 48 urah 3,24 (2,31–4,55) mg/L.

Butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47B deluje malo manj toksično od acetonskega ekstrakta tudi na navplije *T. fulvus*. Po 48 urah pri koncentraciji 10 mg/L ubije približno 70 % organizmov, koncentracijo 50 mg/L po dveh dneh preživi le 10 % ličink. Vrednost  $LC_{50}$ , izračunana iz deležev mrtvih organizmov po 24 urah inkubacije, za ta ekstrakt znaša 19,06 (12,45–29,18) mg/L, po 48 urah pa 10,30 (6,59–16,12) mg/L (slika 23).

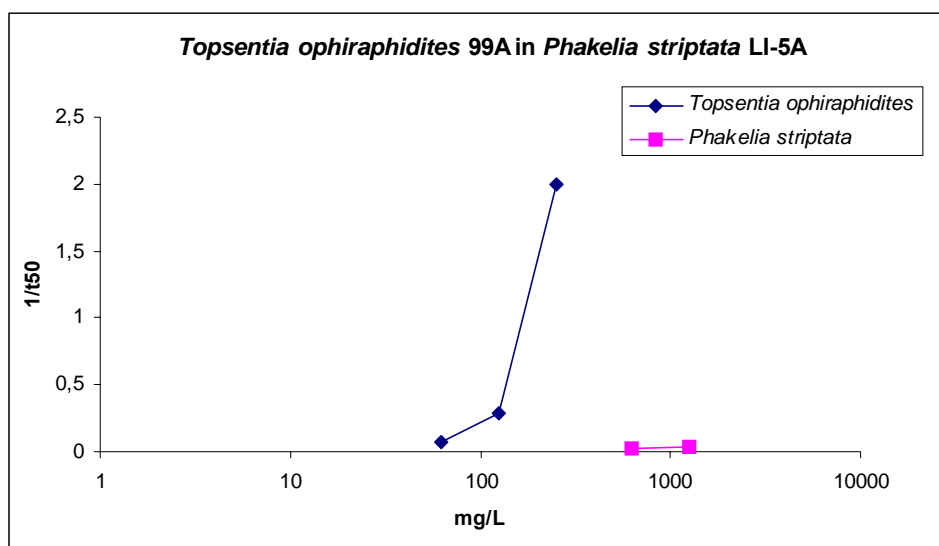


Slika 23: Delež mrtvih ličink *T. fulvus* v odvisnosti od koncentracije butanolnega ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47B po 24 urah (modri stolpci) in 48 urah (vijolični stolpci). Vrh stolpcev prikazuje srednjo vrednost  $\pm$  standardno napako treh vzporednih meritev.

#### 4.5 DOLOČANJE DRUGIH BIOLOŠKIH AKTIVNOSTI V EKSTRAKTIH spužev *Phakellia striptata* (LI-5A), *Topsentia ophiraphidites* (99A) in *Xestospongia pacifica* (LI-47B)

##### 4.5.1 Hemolitični test ekstraktov *Phakellia striptata* LI-5A in *Topsentia ophiraphidites* 99A

Poskus hemolize smo izvedli, kot je opisano v točki 3.2.4.1. Časovni potek hemolize je sigmoidna krivulja, iz katere smo odčitali polovični čas hemolize ( $t_{50}$ ), tj. čas, pri katerem navidezna absorpcija suspenzije eritrocitov pade na polovico svoje začetne vrednosti. Krivulja ima kratko fazo lag, kateri sledi hitra liza eritrocitov, nato se krivulja približuje asimptotični vrednosti. Večja, kot je koncentracija aktivnih snovi v ekstraktu, krajši je čas hemolize.

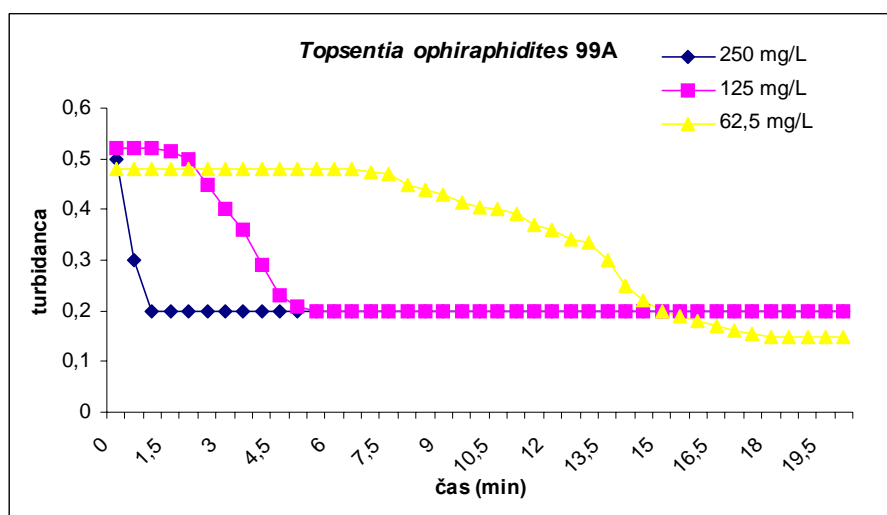


Slika 24: Recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije acetonskih ekstraktov *Phakellia striptata* LI-5A in *Topsentia ophiraphidites* 99A. Skala osi x je logaritemska.

Recipročne vrednosti polovičnih časov hemolize v odvisnosti od koncentracije acetonskih ekstraktov *Phakellia striptata* LI-5A in *Topasentia ophiraphidites* 99A so prikazane na sliki 24. Recipročna vrednost  $t_{50}$  se s povečevanjem koncentracije večja. Ekstrakt karibske spužve *Topsentia ophiraphidites* 99A ima več kot za en velikostni razred hitrejšo hemolizo.

Njegova recipročna vrednost polovičnega časa hemolize pri najmanjši koncentraciji je še vedno večja kot recipročna vrednost  $t_{50}$  pri najvišji koncentraciji ekstrakta avstralske spužve *Phakellia striptata* LI-5A.

Podali smo tudi časovni potek hemolize acetonskega ekstrakta karibske spužve *Topsentia ophiraphidites* 99A pri koncentracijah 62,5, 125 in 250 mg/L. Turbidanca ali navidezna absorpcija s časom najhitreje pada pri 250 mg/L. Takrat je liza eritrocitov najmočnejša (slika 25).

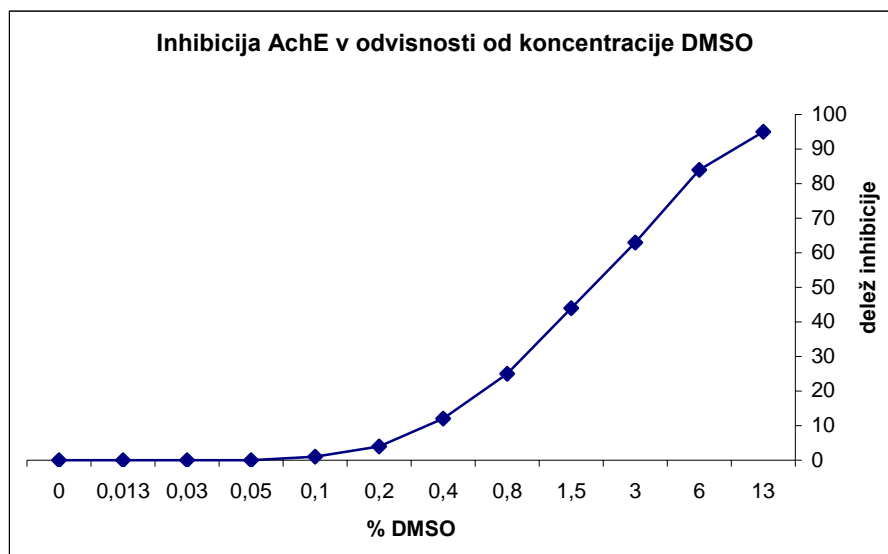


Slika 25: Časovni potek hemolize z acetonskim ekstraktom spužve *Topsentia ophiraphidites* (99A) pri koncentraciji 62,5 mg/L (rumena), 125 mg/L (rožnata) in 250 mg/L (modra).

#### 4.5.2 Test inhibicije acetilholinesteraze

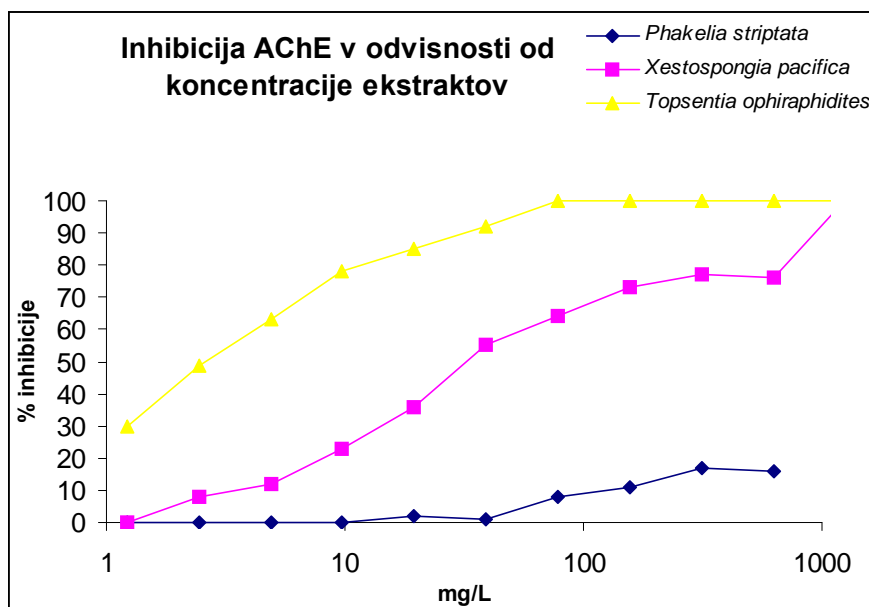
Inhibicijo acetilholinesteraze smo preverili pri ekstraktih spužev *Phakellia striptata* LI-5A, *Topsentia ophiraphidites* 99A in *Xestospongia pacifica* LI-47-B. Izvedba poskusa je opisana v točki 3.2.4.2.

Na začetku smo preverili inhibicijo acetilholinesteraze v odvisnosti od koncentracije topila DMSO, kjer so bili raztopljeni ekstrakti (slika 26).



Slika 26: Inhibicija acetilholinesteraze v odvisnosti od koncentracije DMSO.

Pri testu inhibicije acetilholinesteraze z ekstrakti *Phakellia striptata* LI-5A, *Topsentia ophiraphidites* 99A in *Xestospongia pacifica* LI-47-B (slika 27) smo vpliv DMSO pri inhibiciji odšteli, tako da rezultati kažejo le vpliv ekstrakta na inhibicijo encima. *Topsentia ophiraphidites* 99A je spet najaktivnejši ekstrakt.



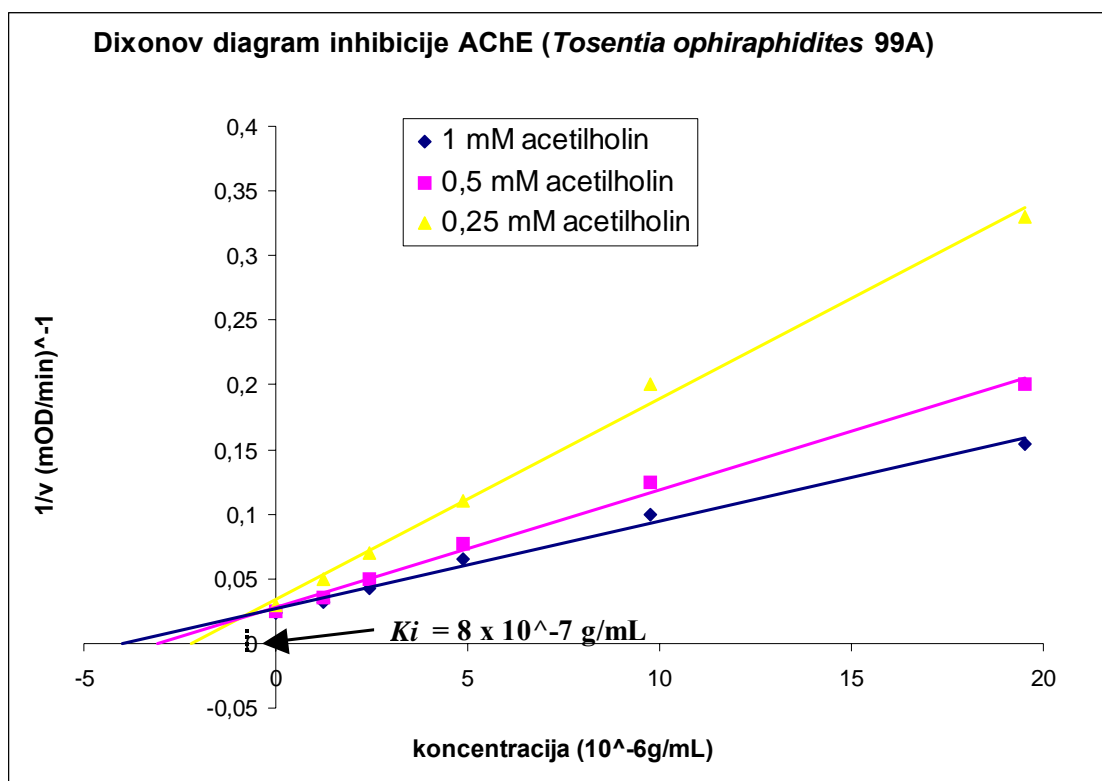
Slika 27: Inhibicija acetilholinesteraze v odvisnosti od koncentracije ekstraktov *Phakellia striptata* LI-5A, *Topsentia ophiraphidites* 99A in *Xestospongia pacifica* LI-47-B. X os ima logaritemsko skalo.



Acetilholinesterazo inhibira že pri koncentraciji, manjši od 1 mg/L. Popolno inhibicijo encima doseže pri koncentraciji 100 mg/L. Butanolni ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47B pri tej koncentraciji doseže približno 60 % inhibicije. *Phakellia striptata* LI-5A pri najvišji koncentraciji zavre encim le 10 odstotno.

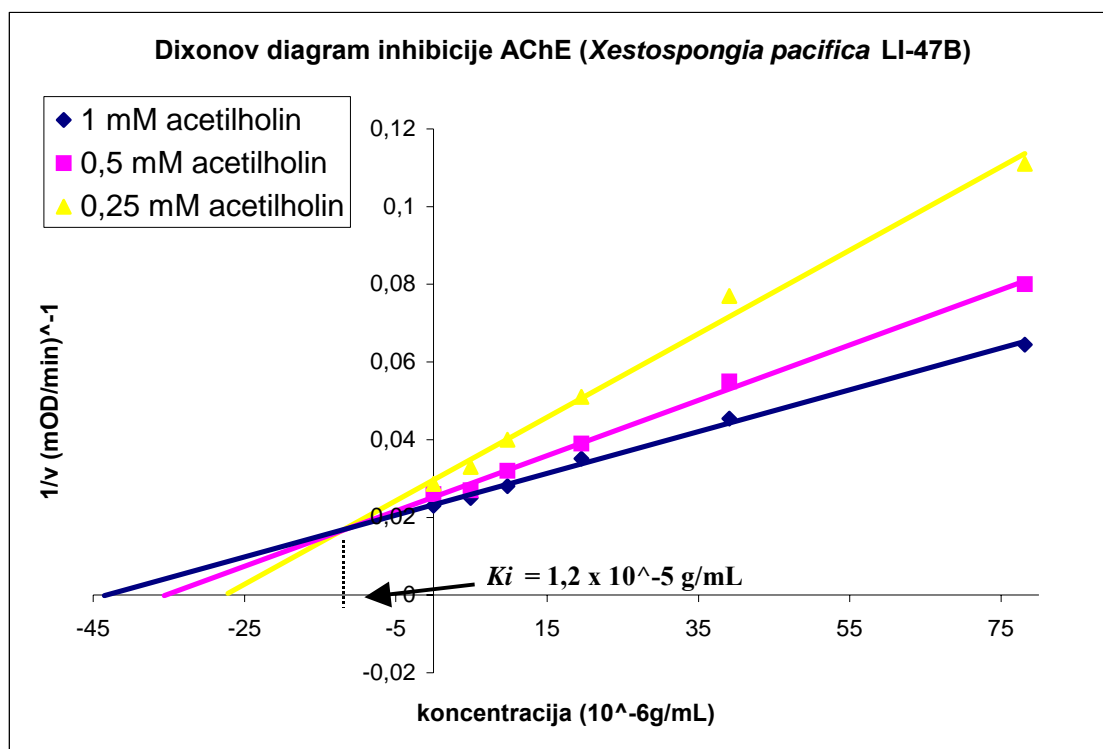
#### 4.5.3 Določanje vrste inhibicije in konstante inhibicije acetilholinesteraze pri ekstraktih *Xestospongia pacifica* (LI-47B) in *Topsentia ophiraphidites* (99A)

Vrsto in konstanto inhibicije ( $K_i$ ) smo določali pri vzorcih *Xestospongia pacifica* (LI-47B) in *Topsentia ophiraphidites* (99A) s testom, opisanim v točki 3.2.4.3. Pri obeh vzorcih je bil potek inhibicije AChE linearen, kar nakazuje na to, da je inhibicija encima reverzibilna. Podatke smo zato lahko obdelali z Dixonovimi diagrami in določili konstante inhibicije (sliki 28 in 29).



Slika 28: Dixonov diagram inhibicije acetilholinesteraze z ekstraktom *Topsentia ophiraphidites* 99A pri treh različnih koncentracijah substrata acetilholina: 250 (▲), 500 (■) in 1000 (◆) μM.

Pri obeh vzorcih smo opazili, da gre za kompetitivno reverzibilno inhibicijo (inhibitor se veže v aktivno mesto encima), saj se krivulje inhibicije pri različnih koncentracijah substrata sekajo v prvem kvadrantu. Konstanta inhibicije je bila pri ekstraktu *Topsentia ophiraphidites* 99A približno 40-krat nižja od konstante inhibicije ekstrakta *Xestospongia pacifica* LI-47B, kar pomeni, da je bil prvi ekstrakt 40-krat aktivnejši od drugega.

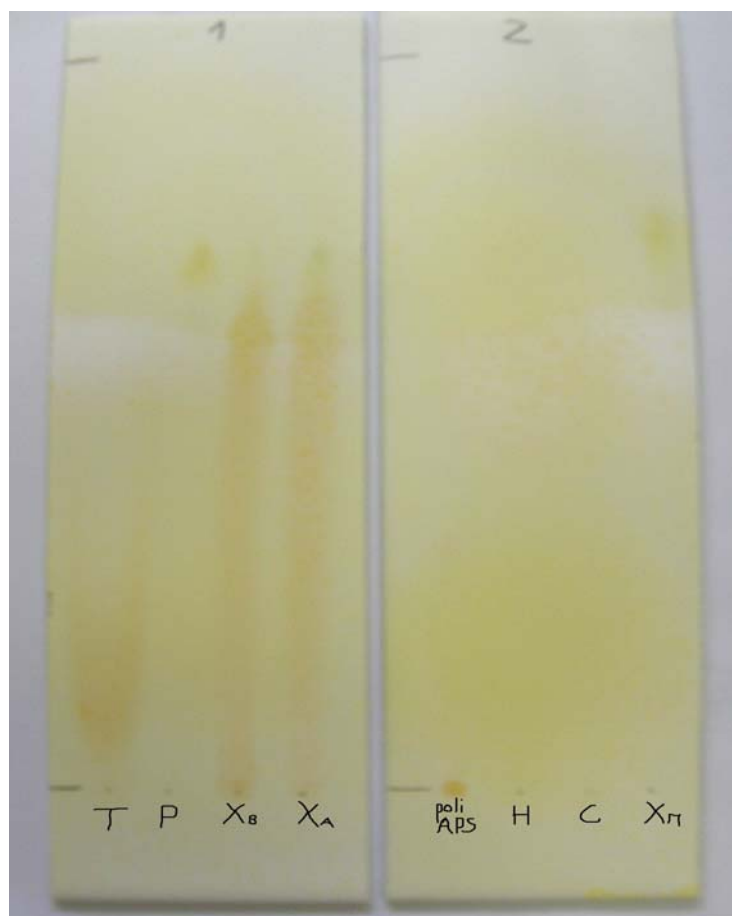


Slika 29: Dixonov diagram inhibicije acetilholinesteraze z ekstraktom *Topsentia ophiraphidites* 99A pri treh različnih koncentracijah substrata acetilholina: 250 (▲), 500 (■) in 1000 (◆) μM.

#### 4.5.4 Tankoplastna kromatografija

Pri metanolnem ekstraktu spužve *Holopsamma helwigi* 5M, butanolnih ekstraktih *Callyspongia plicifera* 127B, *Xestospongia muta* 53B in *Xestospongia pacifica* LI-47B ter acetonskih ekstraktih *Phakelia striptata* LI-5A, *Xestospongia pacifica* LI-47A in *Topsentia ophiraphidites* 99A smo preverili prisotnost kvartarnih amonijevih spojin in njihovo mobilnost. Kot pozitivno kontrolo smo na ploščo nanegli tudi poli-APS (polimerne alkilpiridinijske soli). Ekstrakti, kjer so prisotne te spojine, se obarvajo oranžno. Manjše, kot so molekule, dlje potujejo. Na prvem razdelku druge plošče vidimo intenzivno oranžno

obarvan kontrolni rezultat poli-APS, ki zaradi visoko polimerne zgradbe ni mobilni. Pri ekstraktih butanolnega in acetonskega ekstrakta *Xestospongia pacifica* vidimo kvartarne amonijeve spojine, razporejene na veliki razdalji. *Holopsamma helwigi* in *Callyspongia plicifera* ne vsebujeta kvartarnih amonijevih spojin. Rezultat spužve *Topsentia ophiraphidites* je tudi pozitiven. Vsebuje večje molekule oranžnih spojin, saj je njihova mobilnost omejena. Pri rezultatih spužev *Phakellia striptata* in *Xestospongia muta* lisi na zgornjem delu plošče pomenita prisotnost manjših kvartarnih amonijevih spojin.



Slika 30: Rezultat tankoplastne kromatografije preverjanja prisotnosti kvartarnih amonijevih spojin. Na plošči številka 1 (od leve proti desni): T je *Topsentia ophiraphidites*, P je *Phakelia striptata*, X<sub>B</sub> je butanolni ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47B, X<sub>A</sub> je acetonski ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47A. Na plošči številka 2 (od leve proti desni): poli-APS so polimerne alkilpiridinijeve soli, H je *Holopsamma helwigi*, C je *Callyspongia plicifera* in X<sub>M</sub> je *Xestospongia muta*.

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

Evolucija je spužve zaradi sesilnega načina življenja oborožila z množico visokoučinkovitih molekul s široko paleto bioloških aktivnosti (Fusetani in Clare, 2006; Blunt in sod., 2006; Sepčić, 2008). Ena izmed pomembnih lastnosti, ki jo imajo te snovi, je tudi protivegetativno delovanje. Kemijska industrija je s strupenimi pripravki sicer ustvarila premaze, ki uspešno preprečujejo pritrjanje morskih organizmov, a je z njimi močno vplivala na morski ekosistem in prav zato se je znanost usmerila v iskanje učinkovitih protivegetativnih snovi naravnega izvora. Pomembnejše molekule, ki preprečujejo pritrjanje morskih organizmov, so večinoma sekundarni metaboliti, ki jih uvrščamo med terpene, steroide, saponine, derivate amino- in maščobnih kislin ter heterociklične organske spojine (Fusetani, 2004).

V tem diplomskem delu smo ugotavljali učinkovitost inhibicije pritrjanja rakov vitičnjakov *B. amphitrite* z ekstrakti petnajstih vrst liofiliziranih karibskih in avstralskih morskih spužev. Preverili smo tudi toksičnost in druge lastnosti tistih ekstraktov, ki so učinkovali protivegetativno.

Pri testu inhibicije pritrjanja ličink smo preverjali protivegetativne lastnosti tridesetih organskih in vodnih ekstraktov ter naredili tudi kontrolna poskusa s cinkovim piritionom in različnimi koncentracijami DMSO. Čeprav smo v literaturi našli vrsto *Agelas mauritiana* iz tega rodu, ki je protivegetativno aktivna (Fusetani, 2004), pri sorodni spužvi *Agelas chlatrodes* nismo ugotovili obetavne protivegetativne aktivnosti. Le pri kuhanem vodnem ekstraktu 81K je bila šibka in še tu nas preseneča rezultat pri koncentraciji 10 mg/L, saj je delež pritrjenih ličink nižji kot pri desetkrat višji koncentraciji. Zelo verjetno gre za napako pri poskusu. Glede na literaturo pritrjanje učinkovito preprečujejo tudi ekstrakti spužev *Aplysina fistularis* (družina Aplysinidae) (Walker in sod., 1985), *Callyspongia truncata* (Fusetani, 2004) in *Geodia barretti* (Hedner in sod., 2008). Mi pri spužvah *Aplysina fistularis*, *A. fulva*, *Callyspongia plicifera*, *C. vaginalis* in *Geodia neptuni* nismo opazili protivegetativne aktivnosti. Faulkner (2004) navaja, da so za družino Aplysinidae značilni

bromotirozinski alkaloidi, vendar tudi pri vrsti *Verongula rigida* nismo dobili obetajočih rezultatov. *Holopsamma helwigi* v literaturi ni omenjena in tudi v naših poskusih ni imela aktivnosti. *Ircinia oros* je v literaturi navedena kot spužva s protivegetativno aktivnostjo (Hellio, 2005). V metanolnem, acetonskem in butanolnem ekstraktu njene ožje sorodnice *Ircinie strobiline* nismo zaznali omembe vredne inhibicije pritrjanja. Čeprav so pri spužvi *Pseudoceratina purpurea* našli nekaj zelo aktivnih bromotirozinov in heterocikličnih molekul z visoko inhibicijo pritrjanja larv in nizko toksičnostjo (Fusetani, 2004), acetonski ekstrakt karibske spužve *Pseudoceratina crasa* v naših testih ni bil aktiven. Fusetani (2004) prav tako omenja, da so za družini Dictyonellidae in Axinellidae značilni protivegetativni seskvi- in diterpeni. V prvo uvrščamo vrsto *Scopalina ruetzleri*, vendar v njenem acetonskem ekstraktu nismo zaznali aktivnosti. Drugi družini pripada *Phakellia striptata* iz redu Halichondrida. Metanolni in acetonski ekstrakt te avstralske spužve sta bila protivegetativno aktivna. Acetonski popolnoma prepreči pritrjanje pri koncentraciji 50 mg/L in delno že pri 10 mg/L, zato smo ga uporabili tudi v drugih testih. V isti red kot *Phakellia* spada tudi *Topsentia ophiraphidites*. Kuhan in surov vodni ekstrakt nista bila aktivna, metanolni 99M je popolnoma zavrl pritrjanje pri koncentraciji 100 mg/L, acetonski 99A pa že pri 1 mg/L prepreči pritrnitev kar 85 % ličink. Acetonski ekstrakt 99A EasterExtract je bil pripravljen marca 2008 po istem postopku kot 99A, toda v testih ni bil protivegetativno učinkovit. Ker med prevozom ni bil več čas v stiku z ledom, domnevamo, da je termolabilna snov, odgovorna za inhibicijo pritrjanja, izgubila svoje lastnosti. V podobnih razmerah so bile shranjene razredčine acetonskega ekstrakta 99A OldDilutions, ki so prav tako izgubile svojo aktivnost. Poskus z ekstraktom 99A Stock0 potrjuje, da gre za labilno snov, saj je ta ekstrakt ohranil aktivnost, ker je bil shranjen v trdnem agregatnem stanju v zamrzovalniku. Pri vrstah iz redu Haplosclerida smo ugotovili protivegetativno aktivnost butanolnega ekstrakta spužve *Xestospongia muta* (popolna inhibicija pritrjanja pri 50 mg/L), ter butanolnega in acetonskega ekstrakta vrste *Xestospongia pacifica*, ki popolnoma inhibirata pritrjanje pri koncentraciji 10 mg/L. Tudi v literaturi opisujejo protivegetativno aktivnost vrste *Xestospongia widenmayeri*, ker vsebuje alkilpiridinijeve soli (Fusetani, 2004).

Zanimivo je, da rezultati velikokrat razkrivajo, da se pri nizki koncentraciji ekstrakta ali topila v kontrolni raztopini pritrjanje ličink vitičnjakov poveča glede na kontrolo brez

topila (le morska voda). Skoraj pri vseh rezultatih pri kontrolni raztopini z 0,1 % DMSO je delež pritrjenih ličink večji od kontrole brez topila. Verjetno gre za toksikološki fenomen, imenovan hormeza, kjer se pri majhni koncentraciji toksikanta poveča aktivnost organizmov (Calabrese in Baldwin, 2002). To je potrdil kontrolni poskus inhibicije pritrjanja rakov vitičnjakov v odvisnosti od koncentracije DMSO, kjer je pri 0,1 % DMSO delež pritrjenih rakov večji od deleža v morski vodi, pri 10 % DMSO pa je inhibicija pritrjanja popolna. Zaradi tega smo v drugi seriji poskusov pripravljali testne raztopine ekstraktov v največ 0,1 % DMSO. DMSO naj se pri nadaljnjih testih uporablja s previdnostjo, kar predlaga tudi Nylund (1999).

Prav tako preseneča tudi rezultat protivegetativne aktivnosti cinkovega piritiona raztopljenega v 0,1% DMSO. Njegova aktivnost je približno desetkrat slabša od tiste, opisane v literaturi (Faimali in sod., 2003b). Slabša je tudi od najaktivnejših ekstraktov spužev, ki smo jih testirali.

V protivegetativnem testu so bili zelo aktivni acetonska ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A in *Topsentia ophiraphidites* 99A ter acetonski in butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47A in LI-47B. Za natančnejši protivegetativni test ekstraktov v manjšem razponu koncentracij smo izbrali tri ekstrakte. Izračunali smo vrednosti  $EC_{50}$  po 72 urah inkubacije in jih primerjali z rezultati toksičnosti. Butanolni ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47B iz redu Haplosclerida je imel vrednost  $EC_{50}$  efektivne koncentracije približno 4 mg/L. Toksičnost tega ekstrakta je bila približno 2,5-krat manjša, saj je  $LC_{50}$  pri testu z ličinkami *B. amphitrite* po 48 urah inkubacije znašala približno 11, pri testu z navpliji *T. fulvus* pa okrog 10 mg/L. Acetonski ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47A je bolj toksičen – vrednosti  $LC_{50}$  za *B. amphitrite* in *T. fulvus* so okoli 3 mg/L. Hemolitične aktivnosti ta spužva nima. Protivegetativno delovanje je lahko posledica kompetitivne reverzibilne inhibicije acetilholinesteraze (inhibitor se veže v aktivno mesto encima), ki sodeluje pri prenosu živčnih impulzov (Faimali in sod., 2003a, 2003b; Turk in sod., 2007), ali vpliva na celično signaliziranje z inhibicijo proteinske fosfataze PP1 (Likar, 2007; Fusetani in sod., 2004). Oba ekstrakta spužve *Xestospongia pacifica* vsebujeta kvartarne amonijeve spojine (alkilpiridinijeve soli), ki so verjetno odgovorne za močno biološko učinkovitost. Njihovo prisotnost smo dokazali s tankoplastno kromatografijo. Acetonski ekstrakt spužve

*Phakellia striptata* LI-5A ima po 72 urah delovanja vrednost  $EC_{50}$  približno 13 mg/L. Vrednost  $LC_{50}$  v testih toksičnosti po 48 urah je pri navplijih *B. aphitrite* približno 19, pri navplijih netarčnega organizma *T. fulvus* pa okoli 18 mg/L. Sklepamo, da gre za toksičen način protivegetativnega delovanja, ki je lahko posledica hemolitične aktivnosti. V literaturi smo našli, da v isto družino (Axinellidae) spada *Stylotella aurantium*, ki sintetizira inhibitorje hitinaze (Kato in sod., 1995) in ti bi bili lahko tudi vzrok protivegetativne aktivnosti spužve *Phakellia striptata*. Spužva *Topsentia ophiraphidites* je vrsta iz istega redu kot prejšnji dve. Njen acetonski ekstrakt 99A je bil protivegetativno zelo učinkovit, saj je po 72 urah njegova vrednost  $EC_{50}$  znašala približno 4 mg/L. Testa toksičnosti nam zaradi pomanjkanja časa ni uspelo izvesti, vendar že iz testa pritrjanja lahko predvidevamo, da je mehanizem delovanja manj toksičen, saj se pri višji koncentraciji ekstrakta ciprasi niso pritrčili na podlago, a so še vedno aktivno plavali v vodnem stolpcu. Protivegetativno delovanje je lahko posledica velike hemolitične aktivnosti, močne kompetitivne reverzibilne inhibicije acetilholinesteraze (inhibitor se veže v aktivno mesto encima) ali inhibicije proteinske fosfataze PP1, ki jo navaja Likar (2007), saj te komponente sodelujejo pri mehanizmih kemorepcije, signaliziranja in prenosa živčnih impulzov (Faimali in sod., 2003a; Fusetani in sod., 2004; Turk in sod., 2007). S tankoplastno kromatografijo smo tudi pri tej spužvi dokazali prisotnost kvartarnih amonijevih spojin, ki so lahko vzrok za opažene biološke učinke.

Prisotnosti kvartarnih amonijevih spojin nismo dokazali pri karibski vrsti *Holopsamma helwigi* ter tudi pri haploskleridni spužvi *Callyspongia plicifera*. Zadnji rezultat nas je presenetil, saj Scott s sodelavci (2000) pripisuje njeni rodovni sorodnici *Callyspongia ridleyi* vsebnost alkilpiridinijevih soli z močno biološko aktivnostjo. Tudi test s spužvo *Xestospongia muta* (red Haplosclerida) ni pokazal prepričljivih rezultatov.

V okviru naloge smo testirali trideset ekstraktov spužev petnajstih različnih vrst, sedmih redov in enajstih družin. Najaktivnejši so pripadali redovoma Halichondrida (*Topsentia* in *Phakellia*) ali Haplosclerida (*Xestospongia*). To nakazuje, da so protivegetativne snovi bolje zastopane v teh dveh redovih, vendar nas preseneča, da povezave med aktivnostjo in pripadnostjo družini ali rodu pri številnih vrstah ne najdemo. Morda so vzrok za to napačno izbrani ekstrakti (glede na ekstrakcijo z različno polarnimi topili). Pogosto so

protivegetativne lastnosti povezane tudi s simbiozami mikroorganizmov in spužev, ki se lahko med habitati razlikujejo (Qian in sod., 2006). Opazili smo tudi, da moramo za prepričljivo interpretacijo rezultatov ekstrakta shranjevati v zamrzovalnikih.

Med ekstrakti so posebno veliko aktivnost kazali predvsem acetonska ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A in *Topsentia ophiraphidites* 99A ter acetonski in butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47A in LI-47B. Posebno pozornost v nadaljnjih raziskavah si zagotovo zasluži *Topsentia ophiraphidites*, ki je bila zelo aktivna že v diplomah Aleša Likarja (Likar, 2007) in Tine Dolinšek (Dolinšek, 2007), njen velik razpon biološko aktivnih snovi pa lahko najdemo tudi v drugi literaturi (Slate in sod., 1994; Fusetani, 1994). Najprej bi bilo treba seveda preveriti njeno toksičnost za navplije testnih organizmov *B. amphitrite* in *T. fulvus*, kar nam ni uspelo.

## 5.2 SKLEPI

V diplomskem delu smo ugotavljali učinkovitost inhibicije pritrjanja rakov vitičnjakov *B. amphitrite* z ekstrakti petnajstih vrst liofiliziranih karibskih in avstralskih morskih spužev, ki so pripadale enajstim različnim družinam in sedmim redovom, ter naredili tudi kontrolna poskusa s cinkovim piritonom in različnimi koncentracijami DMSO.

Preverili smo toksičnost, hemolitično aktivnost, inhibicijo acetilholinesteraze in prisotnost kvartarnih amonijevih spojin tistih ekstraktov, ki so učinkovali protivegetativno. To so bili acetonska ekstrakta *Phakellia striptata* LI-5A in *Topsentia ophiraphidites* 99A ter acetonski in butanolni ekstrakt spužve *Xestospongia pacifica* LI-47A in LI-47B.

Acetonski ekstrakt *Phakellia striptata* LI-5A je učinkoval toksično protivegetativno ( $EC_{50}$  je približno 13 mg/L,  $LD_{50}$  (navpliji *B. amphitrite*, 48 ur) je približno 19 mg/L in  $LD_{50}$  (navpliji *T. fulvus*, 48 ur) je približno 18 mg/L), bil je hemolitičen, šibko je zaviral acetilholinesterazo in vsebuje manjše kvartarne amonijeve soli.



Acetonski ekstrakt spužve *Topsentia ophiraphidites* 99A iz redu Halichondrida je bil zelo protivegetativno učinkovit ( $EC_{50}$  je približno 4mg/L) in hemolitičen. Acetilholinesterazo zavira kompetitivno reverzibilno in vsebuje kvartarne amonijeve spojine.

Butanolni ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47B je na organizme deloval manj toksično ( $EC_{50}$  je približno 4 mg/L,  $LD_{50}$  (navpliji *B. amphitrite*, 48 ur) je približno 11 mg/L in  $LD_{50}$  (navpliji *T. fulvus*, 48 ur) je približno 10 mg/L). Acetilholinesterazo je inhibiral kompetitivno reverzibilno. Acetonski ekstrakt *Xestospongia pacifica* LI-47A je toksičen ( $LD_{50}$  (navpliji *B. amphitrite*, 48 ur) in  $LD_{50}$  (navpliji *T. fulvus*, 48 ur) sta približno 3 mg/L). Oba ekstrakta *Xestospongia pacifica* vsebujeta kvartarne amonijeve spojine.

Kontrolni poskus inhibicije pritrjanja rakov vitičnjakov v odvisnosti od koncentracije DMSO je pokazal vpliv topila na poskus. Zaradi tega smo v drugi seriji poskusov pripravljali testne raztopine ekstraktov v največ 0,1 % DMSO.

Presenetil nas je tudi rezultat protivegetativne aktivnosti cinkovega piritiona, raztopljenega v 0,1% DMSO, ki je desetkrat slabša, kot jo navaja literatura.

## 6 LITERATURA

Abarzua 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.

Bavestrello G., Bianchi C. N., Calcinai B., Cattaneo-Vietti R., Cerrano C., Morri C., Puce S. in Sara M. 2000. Bio-mineralogy as a structuring factor for marine epibenthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 193: 241–249.

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.

Dolinšek T. 2007. Biološko aktivne snovi v vodnih ekstraktih nekaterih karibskih in avstralskih morskih spužev (Porifera). Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Ellman G. L., Courtney D., Andres V. in Featherstone R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7: 88–95.

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 acetylcholine 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-alkylpyridium salts from the Mediterranean sponge *Reniera sarai* (Pulitzer-Finali). *Biofouling* 19: 47–56.

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.

Fusetani N., Takahashi M. in Matsunaga S. 1994. Topsentiasterol Sulfates, Antimicrobial sterol sulfates Possessing novel side chains, from marine sponge, *Topsentia* sp. *Tetrahedron* 50, 26: 7765–7770.

Fusetani N. 2004. Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports*, 21: 94–104.

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

Hamilton M. A., Russo R. C. in Thurston R. V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. *Environmental Science and Technology*, 11, 714–719; Correction 12 (1978), 417.

Hedner E., Sjörgen M., Hodzic S., Andersson R., Göransson U., Jonsson P.R. in Bohlin L. 2008. Antifouling Activity of a dibrominated cyclopeptide from the marine sponge *Geodia barretti*. *J. Nat. Prod.*, 71: 330–333.

Hopper J. N. A. 2000. »Spongguide«. Guide to sponge detection and identification. Queensland museum, Australia.

<http://www.qm.qld.gov.au/organisation/sections/SessileMarineInvertebrates/spong.pdf> (10. sept. 2008)

Kato T., Shizuri Y., Izumida H., Yokoyama A in Endo M. 1995. Styloguanidines, new chitinase inhibitors from marine sponge *Stylotella aurantium*. *Tetrahedron Letters*, 36, 12: 2133–2136.

Likar A. 2007. Biološko aktivne snovi v organskih ekstraktih nekaterih karibskih in avstralskih morskih spužev (Porifera). Diplomsko delo, Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo.

Martin J. W. in Davis G. E. 2001. An Updated Classification of the Recent Crustacea. (*Natural History Museum of Los Angeles County*) *Science Series* 39: 20–24.

Nylund G. M. 1999. Epibiosis of red algae and algal metabolites as settlement inhibitors of the barnacle *Balanus improvisus* Darwin. Master thesis in marine botany. Göteborg University.

[http://www.tmbi.gu.se/pdf/TMBL\\_pdf/Library\\_and\\_databases\\_pdf/examensarbeten\\_pdf/Nylund20p.pdf](http://www.tmbi.gu.se/pdf/TMBL_pdf/Library_and_databases_pdf/examensarbeten_pdf/Nylund20p.pdf) (15. sept 2008)

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.

Olsen S. M., Pedersen L. T., Laursen M. H., Kiil S. in Dam-Johansen K. 2007. Enzyme based-antifouling coatings. *Biofouling*, 23, 5: 369–383.

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.

Pane L., Giacco E. in Mariottini G. L. 2005. Acute and chronic heavy metal bioassay on *Tigriopus fulvus* Fisher (Copepoda: Harpacticoida). 13th Symposium Primo 13. »Pollutant responses in marine organisms« Alessandria - Italy. 19–22 jun. 2005: 113.

Qian P. Y., Dobretsov S., Dahms H. U. in Pawlik J. 2006. Antifouling activity and microbial diversity of two congeneric sponges *Callyspongia* spp. From Hong Kong and the Bahamas. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 324: 151–165.

Raisuddin S., Kwok K. W. H., Leung K. M. Y., Schlenk D. in Lee J. 2007. The copepod *Tigriopus*: A promising marine model organism for ecotoxicology and environmental genomics. *Aquatic Toxicology*, 83: 161–173.

Rittshof D., Clare A. S., Gerhart D. J., Sister Avelin M. in Bonaventura J. 1992. Barnacle *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. 3. 4. 2008. Zdravila iz morja: Prvaki so spužve, ki so prave kemične tovarne. *Delo (priloga Znanost)* 77, str. 20.

Scott R. H., Whymant 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.

Slate D. L., Lee R. H., Rodriguez J. in Crews P. 1994. The marine natural product, halistanol trisulfate, inhibits pp60<sup>v-src</sup> protein tyrosine kinase activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 203, 1: 260–264.

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. 128–132 in 296–300.

Turk T., Frangež R. in Sepčič 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.

Walker R.P., Thompson J.E. in Faulkner D.J. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*. *Marine Biology* 88: 27–32.

## **ZAHVALA**

Najlepše se zahvaljujem predragi Kristini, ki je srčna prijateljica in najboljša mentorica. Za pomoč hvala Veronici, Marcu, Elisabetti, Gianu Luigiju in celotni ekipi inštituta v Genovi. Hvala Tei za lektoriranje ter mami in očetu za brezpogojno podporo.