

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΟΜΕΑΣ ΖΩΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΘΑΛΑΣΣΙΑΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη των αντιβιοεπιστρωτικών ιδιοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς»

Μαρία Ι. Πρωτοπαπά

ΑΘΗΝΑ Μάιος 2020

«Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του ΕΚΠΑ δεν υποδηλώνει αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (ν. 5343/1932, άρθρο 202)»

«Το κείμενο της Διδακτορικής Διατριβής δεν αποτελεί προϊόν λογοκλοπής.»

Αποδοχή εκπόνησης Διδακτορικής Διατριβής από τη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιολογίας: 20/2/2013

Αποδοχή αναδιατύπωσης θέματος Διδακτορικής Διατριβής από τη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Βιολογίας: 25/5/2016

Ορισμός **Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής** από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1964/ 20/2/2013

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: Ντέντος Σκαρλάτος, Αναπλ. Καθηγητής ΕΚΠΑ

Μέλη: Ρούσσης Βασίλειος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ Τμήμα Φαρμακευτικής

Ζερβουδάκη Σουλτάνα, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 20/2/2013

Ημερομηνία αναδιατύπωσης θέματος: 25/5/2016

Θέμα: «Μελέτη των αντι-βιοεπιστρωτικών ιδιοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: 1134/12-12-2019

- 1. Ντέντος Σκαρλάτος, Αναπλ. Καθηγητής ΕΚΠΑ Τμήμα Βιολογίας
- 2. Ρούσσης Βασίλειος, Καθηγητής, ΕΚΠΑ Τμήμα Φαρμακευτικής
- Ζερβουδάκη Σουλτάνα, Ερευνήτρια Α΄, Ελληνικό Κέντρο Θαλασσίων Ερευνών, Ινστιτούτο Ωκεανογραφίας
- 4. Ιωάννου Ευσταθία, Επίκ. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ Τμήμα Φαρμακευτικής
- 5. Παπαζαφειρη Παναγιώτα, Αναπλ. Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ Τμήμα Βιολογίας
- 6. Τσιτσιλώνη Ουρανία, Καθηγήτρια, ΕΚΠΑ Τμήμα Βιολογίας
- 7. Χονδρογιάννη Νίκη, Ερευνήτρια Β΄, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών

«Η έγκριση της παρούσας Διδακτορικής Διατριβής από το Τμήμα Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δε δηλώνει την αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα (Ν. 5343/32 αρ. 202 παρ.2) »

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το πρόγραμμα «Καινοτόμα αυτοϊάσιμα οικολογικά υφαλοχρώματα με αντιδιαβρωτική και αντιβιοεπιστρωτική δράση», Κωδικός: 11ΣΥΝ_5_1274, που εντασσόταν στο «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011»



Ε. Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ ΙΙ), ΠΕΠ Μακεδονίας – Θράκης, ΠΕΠ Κρήτης και Νήσων Αιγαίου, ΠΕΠ Θεσσαλίας – Στερεάς Ελλάδας – Ηπείρου, ΠΕΠ Αττικής

Μελέτη των αντιβιοεπιστρωτικών ιδιοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς

Περίληψη

Το θέμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι η μελέτη των αντιβιοεπιστρωτικών ιδιοτήτων χημικών ενώσεων που έχουν απομονωθεί και ταυτοποιηθεί από θαλάσσιους οργανισμούς, καθώς και η ανάλυση της τοξικότητας αυτών των χημικών ενώσεων σε οργανισμούς που δεν προκαλούν βιοεπίστρωση αλλά και σε καλλιέργειες κυτταρικών σειρών ψαριών και ανθρώπου.

Στόχος της διδακτορικής διατριβής είναι ο εντοπισμός μιας ή περισσότερων χημικών ενώσεων που θα έχουν αντιβιοεπιστρωτική δράση ενάντια σε θαλάσσιους οργανισμούς που προκαλούν βιοεπίστρωση, αλλά και ταυτόχρονα θα εμφανίζουν και οικοτοξικό προφίλ συμβατό με τις σύγχρονες απαιτήσεις για χρήση φιλικών προς το περιβάλλον χημικών ενώσεων προς εμπορική αξιοποίηση. Παράλληλα έγιναν δοκιμές στο πεδίο ενώ στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά των κυπρίδων του θυσανόποδου *Α. amphitrite* παρουσία χημικών ενώσεων, αφού πρώτα αποδείχθηκε στις πειραματικές δοκιμές η αντιβιοεπιστρωτική τους δράση.

Με τον όρο θαλάσσια βιοεπίστρωση αναφερόμαστε στην μη θεμιτή αποίκιση των υποθαλάσσιων τεχνιτών επιφανειών από μικρο- και μακρο- οργανισμούς. Την κυριότερη επίδραση αυτού του φαινομένου την εντοπίζουμε κυρίως στα ύφαλα των πλοίων, των οποίων η ταχύτητα αλλά και η κατανάλωση καυσίμων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό από την παρουσία βιοεπίστρωσης. Μια άλλη σημαντική παράμετρος της βιοεπίστρωσης προκύπτει από το γεγονός ότι οι θαλάσσιες μεταφορές προκαλούν σημαντικές οικονομικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις καθώς τα πλοία που φέρουν βιοεπίστρωση ταξιδεύοντας σε παγκόσμιες εμπορικές οδούς μεταφέρουν τους θαλάσσιους οργανισμούς από ένα σημείο της Γης σε κάποιο άλλο. Η βιοεπίστρωση επηρεάζει και άλλες θαλάσσιες βιομηχανίες, όπως τις υδατοκαλλιέργειες, τη βιομηχανία πετρελαίου και φυσικού αερίου, τα πάρκα αιολικής ενέργειας αλλά και τα επιβατηγά πλοία. Τα τελευταία χρόνια, οι επιστήμονες δουλεύουν πολύ δυναμικά πάνω σε αυτό το θέμα προσπαθώντας να εφεύρουν νέες αντιβιοεπιστρωτικές μεθόδους οι οποίες θα πρέπει να είναι φιλικές προς το περιβάλλον.

Η παρούσα μελέτη εστιάζεται στην εύρεση μιας (ή περισσότερων) φιλικής προς το περιβάλλον χημικής ένωσης, εναλλακτικής από αυτές που ήδη υπάρχουν, με προέλευση το θαλάσσιο φυσικό περιβάλλον.

Για την ολοκλήρωση της πειραματικής έρευνας ακολουθήθηκε μια αυστηρή

διαδικασία ελέγχου και απόρριψης δευτερογενών μεταβολιτών ως προς την ικανότητά τους να αποτρέπουν την εγκατάσταση κυπρίδων του Θυσανόποδου, Amphibalanus amphitrite. Τα Θυσανόποδα είναι εδραίοι ασπόνδυλοι οργανισμοί που θεωρούνται ως οι κύριοι παράγοντες πρόκλησης της σκληρής βιοεπίστρωσης.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες απομονώθηκαν από είδη ροδοφυκών του γένους *Laurencia*, αλλά και Μαλάκια του γένους *Aplysia*, τα οποία είναι γνωστό ότι τρέφονται με ροδοφύκη του γένους *Laurencia*. Ως χημική ένωση αναφοράς αλλά και ως κριτήριο δραστικότητας χρησιμοποιήθηκε η χημική ένωση βρωμοσφαιρόλη, η οποία απομονώθηκε από το ροδοφύκος, *Sphaerococcus coronopifolius*, και η οποία έχει δειχθεί στο παρελθόν ότι έχει ισχυρή αντιβιοεπιστρωτική δράση ενάντια σε κυπρίδες του είδους *Amphibalanus amphitrite*. Από τους 25 δευτερογενείς μεταβολίτες που αναλύθηκαν ως προς τις αντιβιοεπιστρωτικές τους ιδιότητες, 8 προκρίθηκαν και ελέγχθηκαν ως προς την τοξικότητα τους στο Καρκινοειδές, *Artemia sp.*, και απορρίφθηκαν 2, 6 δευτερογενείς μεταβολίτες ελέγχθηκαν σε πειράματα κυτταροτοξικότητας σε 2 κυτταρικές σειρές: Μια κυτταρική σειρά του ήπατος πέστροφας (RTL-W1) και μια κυτταρική σειρά επιθηλιακών κυττάρων του ανθρώπου (HEK293).

Συνθέτοντας τα συνολικά αποτελέσματα των πειραματικών προσεγγίσεων προτείνεται ότι η χημική ένωση, περφορενόλη (perforenol), ένα σεσκιτερπένιο που απομονώθηκε από είδη Ροδοφυκών του γένους *Laurencia*, εμφανίζει ίση αντιβιοεπιστρωτική δράση αλλά σχετικά καλύτερο οικοτοξικό προφίλ από τη βρωμοσφαιρόλη. Τέλος, και οι δύο αυτοί δευτερογενείς μεταβολίτες δεν προκαλούν αλλαγές στη συμπεριφορά εγκατάστασης των κυπρίδων του είδους *Amphibalanus amphitrite* όπως προκύπτει από πειράματα ανοσοαποτυπώματος κατά Western για την πρωτεΐνη SIPC που εναποθέτουν οι κυπρίδες κατά τη διάρκεια εξερεύνησης του υποστρώματος όπου θα εγκατασταθούν.

Συμπεραίνεται ότι η περφορενόλη είναι μια αρκετά δραστική χημική ένωση ενάντια στη βιοεπίστρωση που προκαλείται από τα Θυσανόποδα και αξίζει περαιτέρω διερεύνησή της συμπεριφοράς της ως αντιβιοεπιστρωτικό παράγοντα σε υφαλοχρώματα.

[v]

Study of the antifouling properties of secondary metabolites by marine organisms

Abstract

The subject of this doctoral thesis is the study of the antifouling properties of chemical compounds isolated and identified by marine organisms, as well as the analysis of the toxicity of these chemicals in target organisms, non-target organisms along with fish and human cell lines.

The goal of the doctoral thesis is to identify one or more chemicals that will exhibit antifouling activity against marine organisms that cause biofouling, but also exhibit an ecotoxic profile that is compatible with modern environmentally friendly requirements for the use of chemicals in the market.

The term marine biofouling refers to the colonization of subterranean artificial surfaces by micro- and macro-organisms. The main effect of this phenomenon is mainly found in ship hauls, whose speed and fuel consumption are largely influenced by the presence of biofouling. Another important parameter stems from the fact that maritime transport has significant economic and environmental impacts as vessels traveling global commercial routes transport marine organisms from one place on Earth to another. Biofouling also affects other marine industries, such as the aquaculture, oil and gas industry, wind farms and passenger ships. In recent years, scientists have been working very strongly on this issue trying to invent new antifouling methods that should be environmentally friendly.

The present study focuses on finding one (or more) environmentally friendly chemicals, alternative to those that already exist, originating from the marine natural environment.

Completion of the experimental study was followed by a rigorous process of screening and rejecting secondary metabolites in terms of their ability to prevent the establishment of the balanus *Amphibalanus amphitrite*. Balanus are invertebrates that are considered to be the major causative agents of biofouling.

The secondary metabolites were isolated from species of the genus *Laurencia* and also from the molluscs of the genus *Aplysia*, which are known to feed on the genus *Laurencia*. Bromospherol, which was isolated from the red algae, *Sphaerococcus coronopifolius*, has been used as a reference and activity criterion and which has been previously shown to have potent antifouling activity against *Amphibalanus amphitrite*. Of the 25 secondary metabolites analyzed for their

antifouling properties, 8 were selected and tested for their toxicity to the crustacean, *Artemia sp.,* and 2, 6 secondary metabolites were rejected for their toxicity to the diatom *Chaetoceros gracilis*, 3, and finally, 3 secondary metabolites were tested in cytotoxicity experiments in 2 cell lines: One trout liver cell line (RTL-W1) and one human epithelial cell line (HEK293).

Compounding the overall results of the experimental approaches, it is suggested that the compound, perforenol, a sesquiterpene isolated from the species of the genus *Laurencia*, exhibits equal antifouling activity compared to bromosphaerol, whereas it exhibits relatively better ecotoxic profile. Finally, both secondary metabolites do not alter the establishment behavior of cyprids of *Amphibalanus amphitrite* as shown by immunoblotting experiments on the SIPC protein deposited by the cyprids during exploration of the substrate where they will settle.

It is concluded that perforenol is a fairly active antifouling chemical and deserves further investigation of its behavior as an antifouling agent in antifouling paints.

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Με τον όρο θαλάσσια βιοεπίστρωση (biofouling) αναφερόμαστε στη μη θεμιτή αποίκιση των υποθαλάσσιων τεχνιτών επιφανειών από μικρο- και μακροοργανισμούς. Την κυριότερη επίδραση αυτού του φαινομένου την εντοπίζουμε κυρίως στα ύφαλα των πλοίων, των οποίων η ταχύτητα αλλά και η κατανάλωση καυσίμων επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό. Επειδή η παγκόσμια αγορά σχετίζεται άμεσα με τις θαλάσσιες μεταφορές, σημαντικές οικονομικές και περιβαλλοντικές επιδράσεις προκύπτουν από τα προσβεβλημένα πλοία που ταξιδεύουν σε παγκόσμιες εμπορικές οδούς. Η βιοεπίστρωση επηρεάζει και άλλες θαλάσσιες εφαρμογές, όπως οι υδατοκαλλιέργειες, η βιομηχανία πετρελαίου και φυσικού αερίου, τα πάρκα αιολικής ενέργειας, το πολεμικό ναυτικό αλλά και τα επιβατηγά πλοία. Τα τελευταία χρόνια οι επιστήμονες δουλεύουν πολύ εντατικά πάνω σε αυτό το θέμα προσπαθώντας να εφεύρουν νέες αντιβιοεπιστρωτικές μεθόδους οι οποίες μάλιστα να είναι φιλικές προς το περιβάλλον.

Η μελέτη αυτή εστιάζεται στην πρόκληση της εύρεσης μιας φιλικής προς το περιβάλλον χημικής ένωσης, εναλλακτικής από αυτές που ήδη υπάρχουν, με προέλευση τα θαλάσσια φυσικά προϊόντα. Με τον όρο θαλάσσια χημική οικολογία αναφερόμαστε στη μελέτη των χημικών ουσιών που παράγονται από τις φυσικές διεργασίες μεταξύ των οργανισμών και του φυσικού τους περιβάλλοντος. Αυτός ο ερευνητικός τομέας μπορεί να εφαρμοστεί στο πεδίο της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας, ειδικότερα στις αντιβιοεπιστρωτικές εφαρμογές. Αυτές οι ενώσεις υπάρχουν ήδη στο φυσικό περιβάλλον και λόγω του ότι οι οργανισμοί τις παράγουν για συγκεκριμένο σκοπό, αναμένεται να έχουν στοχευμένη δράση.

Στην παρούσα μελέτη ειδικότερα, χρησιμοποιήθηκαν ενώσεις με προέλευση τα μακροφύκη, έχοντας υπόψιν ότι οι οργανισμοί αυτοί πιθανά να είναι εύκολα καλλιεργήσιμοι. Στην εισαγωγή αυτή θα γίνει μια πλήρης περιγραφή του φαινομένου της βιοεπίστρωσης, ποιοι οργανισμοί εμπλέκονται και ο τρόπος διαδοχής των βασικότερων και πιο συχνά εμφανιζόμενων οργανισμών. Επίσης θα γίνει παρουσίαση και ανάλυση των πειραμάτων που έγιναν στο εργαστήριο και στο πεδίο. Τέλος θα γίνει μια πλήρης αναφορά της ανοσοενζυμικής τεχνικής που αναπτύχθηκε προκείμενου να γίνεται έγκαιρη πρόβλεψη της βιοεπίστρωσης.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στον Τομέα Ζωολογίας– Θαλάσσιας Βιολογίας του Τμήματος Βιολογίας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και χρηματοδοτήθηκε για τους πρώτους 30 μήνες από το πρόγραμμα MARIPAINTS «Καινοτόμα αυτοϊάσιμα οικολογικά υφαλοχρώματα με αντιδιαβρωτική και αντιβιοεπιστρωτική δράση», που εντασσόταν στο «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011» ΕΣΠΑ 2007-2013.

Ολοκληρώνοντας τη διδακτορική μου διατριβή θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσοι με βοήθησαν και με στήριξαν όχι μόνο υλικά αλλά και ηθικά σε αυτό το ταξίδι γνώσεων και εμπειριών.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα μου Σκαρλάτο Ντέντο για την άψογη συνεργασία και καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω για τη βοήθειά τους τα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής τον Καθηγητή του Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ Βασίλειο Ρούσση, που με καθοδήγησε στο θαυμαστό κόσμο της Φαρμακογνωσίας, καθώς επίσης και την Ερευνήτρια Α΄ του ΕΛΚΕΘΕ Σουλτάνα Ζερβουδάκη η οποία στάθηκε δίπλα μου στις πιο δύσκολες στιγμές και με την καθοδήγηση της κατάφερα να ξεπεράσω όλα τα εμπόδια και να προχωρήσω. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ Γεώργιο Βερροιόπουλο για τις πολύτιμες συμβουλές του και την άριστη συνεργασία μας στα πλαίσια του προγράμματος MARIPAINTS.

Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής που δέχτηκαν να συμμετάσχουν στην αξιολόγηση της διδακτορικής μου διατριβής. Την Επίκουρο Καθηγήτρια του Τμήματος Φαρμακευτικής ΕΚΠΑ Ευσταθία Ιωάννου, για το ενδιαφέρον και την υποστήριξη που πάντα έδειχνε, καθώς επίσης και για την άριστη συνεργασία μας στα πλαίσια του προγράμματος MARIPAINTS. Την Καθηγήτρια του Τμήματος Βιολογίας ΕΚΠΑ Ουρανία Τσιτσιλώνη και την Αναπλ. Καθηγήτρια Παναγιώτα Παπαζαφείρη για τη βοήθεια που μου παρείχαν με τις γνώσεις τους και τέλος την Ερευνήτρια Β΄ του ΕΙΕ Νίκη Χονδρογιάννη για τις πολύτιμες συμβουλές και διορθώσεις.

Ευχαριστώ θερμά το Δρ. Βασιλάκο Δημήτρη για τη δημιουργία του μονοκλωνικού αντισώματος, καθώς επίσης τους προπτυχιακούς φοιτητές Σοφοκλή Μουρατίδη και Ειρήνη Τριάντη για την άψογη συνεργασία που είχαμε και για την πολύτιμη βοήθεια που προσέφεραν.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον τεχνικό του προγράμματος MARIPAINTS Γιάννη Κλειδά για τη συνολική βοήθεια στην κατασκευή και συντήρηση των ενυδρείων. Δε θα ξεχάσω τις ατελείωτες συζητήσεις και ώρες

[ix]

δουλειάς προκυμμένου να βρίσκουμε λύσεις σε κάθε μικρό ή μεγάλο πρόβλημα που προέκυπτε. Τέλος να ευχαριστήσω τη Μαντώ Κοτσίρη, για την άψογη συνεργασία όλα αυτά τα χρόνια. Για τις ατελείωτες ώρες εμψυχωτικών συζητήσεων, για τις υπέροχες και τρελές αναμνήσεις που δημιουργήσαμε στους διαδρόμους του ΕΚΠΑ με τα καρότσια (ξέρεις εσύ), για τις υπέροχες στιγμές που ζήσαμε στα εργαστήρια. Δεν ήταν λίγες οι φορές που λυγίσαμε, αλλά με κάποιο μαγικό τρόπο καταφέραμε η μία να στηρίζει πάντα την άλλη και να προχωράμε μπροστά. Την ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου για την υπέροχη φιλία που έχουμε μέχρι και σήμερα και ελπίζω παραμείνει μια φιλία ζωής.

Τέλος ευχαριστώ ιδιαίτερα την οικογένεια μου, Γιάννη και Γεωργία, και τα αδέρφια μου Θάνο και Άντζελα για την καθοδήγηση, στήριξη και ανοχή σε όλη αυτή την προσπάθεια.

....Στην οικογένεια μου

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣνιἰἰ						
1.	ΕΙΣΑΓΩΙ	⁻ H1				
1.1	Βιοεπί	στρωση: διαδικασία αποίκησης2				
	1.1.1	Βακτηριακό βιοφιλμ				
	1.1.2	Βιοφίλμ μικροφυκών5				
	1.1.3	Μακρο-βιοεπιστρωτές7				
		1.1.3.1 Μακροφύκη				
		1.1.3.2 Ασπόνδυλα ζώα9				
1.2	στρωση: επιπτώσεις και πρόληψη12					
1.2.1 Οικονομικές επιπτώσεις						
	1.2.2	2 Περιβαλλοντικές επιπτώσεις14				
	1.2.3	Αντιβιοεπιστρωτικές προσπάθειες15				
1.3	Θαλάς	σσια χημική οικολογία18				
	1.3.	1 Υφαλοχρώματα και θαλάσσιοι οργανισμοί18				
1.3.2 Βιοδραστικές ουσίες προερχόμενες από μακροφύκη: η περίτ						
	των	Ροδοφυκών του γένους Laurencia19				
1.4 тпс Г	Μελέτες πεδίου για τον υπολογισμό της αντιβιοεπιστρωτικής ενεργότητας					
1.5 SIP	Κύκλο C (Settlem	ς ζωής του Θυσανόποδου <i>Α. amphitrite</i> και ο ρόλος της πρωτεΐνης nent-Inducing Protein Complex)30				
	151	Η ποωτείνη που επάνει την ενκατάσταση της κυποίδας στα				
	Θυσαν					
	SIPC)					
	1 5 0					
	1.5.2	Η σομη της SIPC				
	1.5.3 Έκφραση της πρωτεΐνης SIPC και η χρήση της μεθοδολογία					
	ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών για την μελέτη της συμπεριφορά					
	εξερεύνησης του υποστρώματος από τις					
	κυπρίδες					

1.6	Μελέτη α	συμπεριφοράς τω	ον κυπρίδων του Θυ	σανόποδου Α	. amphitrite κατά				
тη	διαδικασία	εξερεύνησης	υποστρώματος	παρουσία	δευτερογενών				
μετα	αβολιτών								
1.7	Στόχος Διδακτορικής Διατριβής35								
2.	ΥΛΙΚΑ & Μ	ΊΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ37							
2.1	Εκχύλισ	η και απομόνωσr	ι των μεταβολιτών						
2.2	Συλλογή	Συλλογή ατόμων <i>Α. amphitrite</i> 39							
2.3	Βιοδοκιμ	Βιοδοκιμές εγκατάστασης του είδους Α. amphitrite40							
2.4	Πειράμα	Πειράματα τοξικότητας έναντι του είδους <i>Artemia sp</i> 40							
2.5	Πειράμα	Πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου Chaetoceros gracilis41							
2.6	Πειράμα	Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W142							
2.7	Πειράμα	τα τοξικότητας έν	αντι της κυτταρικής	σειράς ΗΕΚ 2	9344				
2.8	Πειράμα	τα τοξικότητας έν	αντι θαλάσσιων βαι	κτηριακών στελ	λεχών44				
2.9	Μελέτες	πεδίου για τον ι	υπολογισμό της αντ	ιιβιοεπιστρωτιι	κής ενεργότητας				
της	Βρωμοσφαι	ρόλης			45				
	2.9.1 Пр	οετοιμασία μεταλ	λικών δοκιμίων		45				
	2.9.2 Ka	2.9.2 Κατασκευή πόντισης των δοκιμίων							
	2.9.3 Av	2.9.3 Ανάλυση δοκιμίων							
	2	2.9.3.1 Εκτίμηση τ	τροκαρυωτικών οργ	/ανισμών	49				
	2	2.9.3.2 Εκτίμηση α	ολικής πρωτεΐνης		50				
	2	2.9.3.3 Ταξινομική	ανάλυση εδραίων	οργανισμών	50				
2.10 διαδ	.10 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους <i>Α. amphitrite</i> κατά τ ιαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος								
	2.10.1 N	Λονοκλωνικό και	πολυκλωνικό αντίσι	ωμα	51				
	2.10.2 A	Ανάλυση πρωτεϊν	ών σε πήκτωμα πο	λυακρυλαμιδίο	u (SDS-				
PAC	PAGE)								
	2.10.3 A	Ανοσοαποτύπωσ	η πρωτεϊνών (Weste	ern blotting)	52				
	2.10.4 A	Ανοσοενζυμική αν	ίχνευση των πρωτε	ϊνών	53				

2.10.5 Ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) με πολυκλωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη SIPC54

	2.10.6 Μελέτη συμπεριφοράς των κυπρίδων κατά τη διαδικασία						
εξερεύνησης υποστρώματος παρουσίαδευτερογενών μεταβολιτών55							
2.11	1 Στατιστική Ανάλυση56						
3. /	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ57						
3.1	Μεταβολίτες που απομονώθηκαν από Ροδοφύκη του Γένους <i>Laurencia</i> και						
Γαστε	Γαστερόποδα του Γένους <i>Aplysia</i> 58						
3.2	Βιοδοκιμές εγκατάστασης του είδους <i>Α. amphitrite</i> 88						
3.3	Πειράματα τοξικότητας έναντι του είδους <i>Artemia sp</i> 113						
3.4	Πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου Chaetoceros gracilis116						
3.5	Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1119						
3.6	Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς ΗΕΚ293124						
3.7	Πειράματα τοξικότητας έναντι θαλάσσιων στελεχών βακτηρίων129						
3.8 Ανάλυση των δοκιμίων από τις μελέτες πεδίου για τον υπολογισμό της αντιβιοεπιστρωτικής ενεργότητας της Βρωμοσφαιρόλης							
	3.8.1 Εκτίμηση προκαρυωτικών οργανισμών						
	3.8.2 Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης134						
	3.8.3 Ταξινομική ανάλυση εδραίων οργανισμών						
	3.8.4 Εκτίμηση του χρόνου εμφάνισης βιοεπίστρωσης142						
3.9 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους <i>Α. amphitrite</i> κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος							
	3.9.1 Ανοσοαποτύπωση της ποωτεΐνης SIPC 145						
	3.9.2 Ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) με						
πολυι	λωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα148						
3.10 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους <i>Α. amphitrite</i> κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος							
4 2	4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ152						
5 E	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ169						
ПАРАРТНМА							

Πίνακες

Σχήματα

Σχήμα 3.1α Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), *iso*-laurenisol (4).....90 **Σχήμα 3.1β** Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (5), Σχήμα 3.1γ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol Σχήμα 3.1δ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (13), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), deoxyparguerol 16-Σχήμα 3.1ε Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (17–18), neorogioldiol (19), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (**20**)......94 Σχήμα 3.1στ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών (3E)laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene I (24), and Σχήμα 3.2α Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), iso-laurenisol (4)... 97 Σχήμα 3.2β Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (5), Σχήμα 3.2γ Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol Σχήμα 3.2δ Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (13), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), deoxyparguerol 16-

Σχήμα 3.3β Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (5), laurinterol (6), epibrasilenol (7), 4-hydroxy-5-brasilene (8)105 Σχήμα 3.3γ Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12).....106 **Σχήμα 3.3δ** Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A*. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (13), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), deoxyparguerol **Σχήμα 3.3ε** Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A*. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (17-18), neorogioldiol (19), O11,15-cyclo-Σχήμα 3.3στ Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών Α. μεταβολιτών (3E)-laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene Σχήμα 3.4 Αποτελέσματα πειραμάτων εγκατάστασης των κυπρίδων του A. amphitrite Σχήμα 3.5α Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών iso-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol (12), που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους Laurencia και Γαστερόποδων του Γένους Aplysia έναντι του είδους Artemia sp......114

Σχήμα 3.5β Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων Bρωμοσφαιρόλης και των δευτερογενών μεταβολιτών 3,15-dibromo-7,16-dihydroxyisopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19), laurencienyne (22) που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Artemia sp.....*115 **Σχήμα 3.6α** Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9), perforatone (11), 3,15-dibromo-7,16dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Chaetoceros gracilis......*117

Σχήμα	3.15	Ικανότητα	των	διαφορετικών	συνδυαα	τμών	υφαλοχρι	ωμάτων	και
αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Θυσανόποδων									
στα δοκίμια141									
Σχήμα	3.16	Αποτελέσμα	α π	ρότυπης καμπ	ύλης του	πολυ	κλωνικού	(Α) και	TOU
μονοκλωνικού (Β) αντισώματος									

Εικόνες

Εικόνα 1.1 Διαδικασία σχηματισμού θαλάσσιας βιοεπίστρωσης σε καθαρές επιφάνειες (Reversible adhesion: Αναστρέψιμη προσκόλληση, Irreversible Εικόνα 1.2 Φαινόμενο βιοεπίστρωσης σε κατασκευή που έμεινε ποντισμένη στην περιοχή του μικρολίμανου για 4 μήνες.....9 Εικόνα 1.3 Κυπρίδα του είδους Amphibalanus amphitrite. (Μεγέθυνση 60x, Εικόνα 1.4 Κύκλος ζωής του θυσανόποδου *Α. amphitrite.....*30 Εικόνα 2.1 (α) κατασκευή σωλήνων οδηγών, (β) τοποθέτηση σωλήνων οδηγών στο εσωτερικό του κορμού, (γ) τοποθέτηση συρματόσχοινων στήριξης, (δ) ολοκλήρωση κατασκευής, (ε) παραλαβή δοκιμίων, (ζ) τοποθέτηση δοκιμίων, (η) κλείσιμο σωλήνα δοκιμίων, (θ) τελική εικόνα σωλήνα με δοκίμια, (ι) ολοκλήρωση τοποθέτησης σωλήνων δοκιμίων, (κ) επιτυχής ολοκλήρωση διαδικασίας πόντισης, (λ) διαδικασία ανέλκυσης, (μ) αφαίρεση καπακιού, (ν) παραλαβή πρώτης σειράς δοκιμίων, (ξ) άνοιγμα πρώτου σωλήνα δοκιμίων, (ο) πρώτη σειρά δοκιμίων, (π) τοποθέτηση δοκιμίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο θαλασσινό

Κεφάλαιο 1

Εισαγωγή

1.1 Βιοεπίστρωση: διαδικασία αποίκησης

Είναι γενικώς αποδεκτό ότι η βιοεπίστρωση συμβαίνει μέσω μιας σειράς διαδοχικών και/ή επικαλυπτόμενων σύνθετων σταδίων που περιλαμβάνουν φυσικές, χημικές και βιολογικές διεργασίες (Εικόνα 1.1) (Abarzua & Jakubowski, 1995; Yebra et al., 2004; Hellio et al., 2009a).

Η πρώτη φάση είναι γνωστή ως μοριακή επίστρωση (molecular fouling): οι υποθαλάσσιες επιφάνειες προσροφούν διαλυμένη οργανική ύλη που σχηματίζει μια μεμβράνη-φιλμ της οποίας η σύνθεση (πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, λιπίδια, χουμικά οξέα, νουκλεϊκά οξέα και αμινοξέα) υπόκειται σε χρονική και εποχική τροποποίηση (Garg et al., 2009). Τέτοιες επιφάνειες αποτελούν πηγή άνθρακα για τους οργανισμούς που εμπλέκονται στη διαδικασία προσκόλλησης στην επιφάνεια, διευκολύνοντας έτσι το σχηματισμό πρωτογενούς φιλμ (Bakker et al., 2004). Ο σχηματισμός πρωτογενούς φιλμ περιλαμβάνει ένα στρώμα γλοιού ο οποίος αποτελείται από μικροοργανισμούς, κυρίως βακτήρια (συμπεριλαμβανομένου των κυανοβακτηρίων), Διάτομα, μύκητες και άλλους μονοκύτταρους ευκαρυωτικούς οργανισμούς (Dobretsov et al., 2010). Ο σχηματισμός του δευτερεύοντος φιλμ περιλαμβάνει μακροφύκη, Υδρόζωα και Πολύχαιτους της οικογένειας των Σερπουλίδων, ενώ τέλος το τριτογενές φιλμ σχηματίζεται από μεγαλύτερους οργανισμούς όπως μύδια, ασκίδια, σφουγγάρια και Θυσανόποδα (Jones, 2009).



Εικόνα 1.1 Διαδικασία σχηματισμού θαλάσσιας βιοεπίστρωσης σε καθαρές επιφάνειες (Reversible adhesion: Αναστρέψιμη προσκόλληση, Irreversible adhesion: Μη αναστρέψιμη προσκόλληση) (Lejars et al., 2012).

1.1.1 Βακτηριακό βιοφίλμ

Το βακτηριακό βιοφίλμ σχηματίζεται κατά τις πρώτες ώρες πόντισης ενός αντικειμένου στο νερό (Lee et al., 2008). Η πολλαπλών σταδίων διαδικασία βακτηριακής προσκόλλησης περιλαμβάνει τη μεταφορά κυττάρων στην επιφάνεια, την αρχική προσκόλληση των κυττάρων, ακολουθούμενη από αναστρέψιμη και στη συνέχεια μη αναστρέψιμη προσκόλληση και αποικισμό της επιφάνειας **(Εικόνα 1.1)** (van Loosdrecht et al., 1990; Harder & Yee, 2009; Busscher & van der Mei, 2012).

Οι φυσικο-χημικές αλληλεπιδράσεις (όπως οι κινητικές δυνάμεις Μπράουν, οι απωθητικές ή ελκυστικές ηλεκτροστατικές δυνάμεις, οι δυνάμεις Van der Waals και οι δεσμοί υδρογόνου) συμβάλουν στην αναστρέψιμη προσκόλληση των κινούμενων βακτηρίων (Hori & Matsumoto, 2010; Busscher et al., 2012; Hwang et al., 2012). Η χημική σύνθεση της επιφάνειας που εκτίθεται στο νερό, έχει αποδειχθεί ότι επηρεάζει την επιφανειακή της ενέργεια και την τραχύτητα του υποστρώματος, τα οποία πιθανά να έχουν σημαντικό ρόλο στην επακόλουθη αποίκιση και σύνθεση των πρώτων βακτηρίων που θα προσκολληθούν (Bakker et al., 2004; Garg et al., 2009; Hwang et al., 2012).

Είναι γνωστό ότι τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των βακτηρίων έχουν σημαντικό ρόλο στην προσκόλληση (Hori et al., 2010; Busscher et al., 2012). Για παράδειγμα, οι πρωτεϊνικές μικροΐνες, όπως οι βλεφαρίδες και τα μαστίγια, μπορούν να διαπεράσουν το φράγμα που έχει δημιουργηθεί από την απωθητική ενέργεια χαμηλής ιοντικής δύναμης και να βοηθήσουν στην προσκόλληση των κυττάρων στο υπόστρωμα με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι μη αναστρέψιμη (Hori et al., 2010). Οι ιδιότητες της επιφάνειας των βακτηρίων, όπως η υδροφοβικότητα και το φορτίο της επιφάνειας, διαφέρουν ανάμεσα στα βακτηριακά στελέχη και ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να επηρεάζουν τη βακτηριακή προσκόλληση (Fletcher & Pringle, 1985; Harder et al., 2009). Για παράδειγμα, το ευμετάβλητο μήκος της αλυσίδας των λιποπολυσακχαριτών στην εξωτερική επιφάνεια των Gram-αρνητικών βακτηρίων καθορίζει το βαθμό υδροφοβικότητας της επιφάνειας και επομένως τη δύναμη προσκόλλησης (Harder et al., 2009). Οι φαινοτυπικές αλλαγές εμφανίζονται προοδευτικά με αυξημένες δυνάμεις πρόσφυσης: η παραγωγή εξωκυτταρικών πολυμέρων ενώσεων (EPS) που αποτελούνται από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα και λιπίδια οδηγεί σε μη αναστρέψιμη προσκόλληση καθώς και αυξημένη αντίσταση στα βιοκτόνα (Busscher et al., 2012; Vázquez-Sánchez et al., 2014). Εκτός από τις φυσικές δυνάμεις πρόσφυσης, οι χημικές αλληλεπιδράσεις και η επικοινωνία μεταξύ των βακτηρίων παίζουν επίσης σημαντικό ρόλο στην παραγωγή της προστατευτικής

μεμβράνης στην οποία είναι ενσωματωμένα τα βακτήρια (Lowery et al., 2008; Liaqat et al., 2014). Η εξωκυτταρική μεμβράνη επιτρέπει στους μικροοργανισμούς να προστατεύονται από την αφυδάτωση, τα βιοκτόνα, τα μεταλλικά κατιόντα, την υπεριώδη ακτινοβολία και τους θηρευτές (Flemming & Wingender, 2010; Moryl et al., 2014). Παρά την ύπαρξη ενδελεχών μελετών επί των κυττάρων που σχηματίζουν βιοφίλμ, μόλις τα τελευταία χρόνια οι έρευνες έχουν προσανατολιστεί στη μελέτη της εξωκυτταρικής μεμβράνης που τα περιβάλλει (Decho, 2013). Πολλές μελέτες έχουν αποδείξει την πολυπλοκότητα και τη δυσκολία της εξαγωγής και του καθορισμού των EPS προκειμένου να γίνει πλήρης καταγραφή των βιοχημικών τους προφίλ, με αποτέλεσμα ο όρος EPS να αναφέρεται ως "η σκοτεινή ύλη του βιοφιλμ" (Flemming et al., 2007, 2010; Decho, 2013).

Η πολύπλοκη και δυναμική τρισδιάστατη δομή που σχηματίζεται από βακτηριακά βιοφίλμ σε μια ποντισμένη επιφάνεια, μπορεί να ευνοήσει τον αποικισμό από άλλους μικροοργανισμούς αλλά και μεγαλύτερους σε μέγεθος, μέσω χημικών διαδικασιών (Hadfield & Paul, 2001; Salta et al., 2013; Yang et al., 2014). Έχει αποδειχθεί πως τα μόρια που διαχέονται όπως οι λακτόνες AHLs (Nacyl homoserine lactones) που παράγονται από το Vibrio anguillarum, μπορούν να αποτελέσουν πηγή εκμετάλλευσης από ευκαρυωτικούς οργανισμούς, όπως τα ζωοσπόρια του φύκους Ulva, μέσω κυτταρικής επικοινωνίας ή μέσω quorum sensing (QS), δηλαδή, μέσω διακυτταρικής χημικής επικοινωνίας, επηρεάζοντας την διερευνητική τους συμπεριφορά και εγκατάσταση (Joint et al., 2002). Επίσης έχει προταθεί ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από βακτήρια, τα χημικά μόρια σηματοδότησης και τα γλυκοπρωτεϊνικά βακτηριακά εξωπολυμερή, θα μπορούσαν να δράσουν ως χημικές ενδείξεις για εγκατάσταση και μεταμόρφωση των ασπόνδυλων ζώων που συμμετέχουν στη βιοεπίστρωση (Hadfield et al., 2001; Harder et al., 2002; Joint et al., 2007). Ωστόσο, παρά τα περισσότερα από 60 χρόνια μελέτης, οι γνώσεις για τον τρόπο που συμμετέχουν τα βακτήρια στη διέγερση της εγκατάστασης των προνυμφών αλλά και οι γνώσεις για τους υποδοχείς που ανιχνεύουν τα βακτηριακά σήματα είναι ελάχιστες (Hadfield, 2011). Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η σύνθεση των ειδών της κοινωνίας του βακτηριακού υποστρώματος παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην εγκατάσταση προνυμφών των ασπόνδυλων ζώων, επιδρώντας αρνητικά ή θετικά στην εγκατάσταση των προνυμφών των Θυσανόποδων και των Πολύχαιτων (Lau et al., 2003, 2005). Η ηλικία του βιοφίλμ επίσης επηρεάζει τους υπόλοιπους αποικιστές, όπως μάλιστα αποδείχθηκε ότι επιδρά θετικά στην εγκατάσταση του Δίθυρου, Mytilus coruscus (Yang et al., 2014). Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι τα βιοφίλμ μπορούν να έχουν αντιβιοεπιστρωτική δράση σε ανώτερους οργανισμούς μέσω

[4]

απωθητικών χημικών ενώσεων (Fenical, 1993; Hadfield et al., 2001; Dobretsov & Qian, 2002; Huggett et al., 2006). Καθώς η κοινότητα των μικροοργανισμών εξελίσσεται μέσα στο βιοφίλμ, οι χημικές ενώσεις που παράγονται από τα βακτήρια και άλλους μικροοργανισμούς, όπως τα διάτομα, ποικίλουν ποιοτικά και ποσοτικά κατά τη διάρκεια του σχηματισμού βιοφίλμ. Ο χημικός χαρακτηρισμός θα μπορούσε να αποτελέσει ένα καλό σημείο εκκίνησης τόσο για τον προσδιορισμό των οργανισμών όσο και για τα βιοδραστικά μόρια (Chung et al., 2010).

1.1.2 Βιοφίλμ μικροφυκών

Ο ευτροφισμός, που εμφανίζεται στις παράκτιες περιοχές, μπορεί να ευνοήσει τον πολλαπλασιασμό των μικρο- και μακροφυκών και παράγοντες όπως η αφθονία των θρεπτικών συστατικών (νιτρικά, φωσφορικά) και η θερμοκρασία έχουν ρυθμιστικό ρόλο στον πολλαπλασιασμό των μικροφυκών (Van Dolah, 2000). Οι υψηλές συγκεντρώσεις των κυττάρων μπορούν να προκαλέσουν έντονο ανταγωνισμό στην εύρεση κατάλληλων επιφανειών εγκατάστασης, με τα είδη που έχουν γρήγορο ρυθμό ανάπτυξης να υπερτερούν ως προς τα υπόλοιπα (lanora et al., 2011). Επιπροσθέτως, μερικά βενθικά είδη μικροφυκών ευνοούνται από το διμορφικό κύκλο ζωής τους, κατά τον οποίο παρασύρονται στην υδάτινη στήλη μέχρι να καταλήξουν στη βενθική τους φάση, κάτι το οποίο διευκολύνει τη διασπορά και αποίκηση νέων επιφανειών (Fattom & Shilo, 1984).

Τα μικροφύκη αποτελούν ένα βασικό κομμάτι των μικροοργανισμών που συμμετέχουν στην βιοκοινωνία του θαλάσσιου βιοφίλμ (Decho, 2000; Salta et al., 2013) και τα Διάτομα, όπως τα Navicula sp., Nitzschia sp. και Amphora sp., είναι τα πιο κοινά είδη που εντοπίζονται στην αρχή της βιοεπίστρωσης (Molino & Wetherbee, 2008; Hellio et al., 2009a; Salta et al., 2013). Τα μικροφύκη μπορούν να εγκατασταθούν ακόμα και αν απουσιάζει το βακτηριακό φιλμ, χρησιμοποιώντας βλεννώδεις εκκρίσεις (Eulin & Le Cohu, 1998; Higgins et al., 2002). Ως πρωτογενείς παραγωγοί μπορούν να στηρίξουν την ανάπτυξη άλλων εποίκων και να προκαλέσουν την εγκατάσταση προνυμφών ασπόνδυλων ζώων μέσω χημικών σηματοδοτών (Daume et al., 1999; Harder et al., 2002; Mieszkin et al., 2013), οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας της βιοεπίστρωσης και ως εκ τούτου, αντίσταση στη τριβή (Schultz et al., 2011). Η διαδικασία εγκατάστασης, παρόλα αυτά, δεν είναι πλήρως κατανοητή, παρόλη τη σημαντικότητα της για τη δημιουργία νέων αντιβιοεπιστρωτικών προϊόντων. Έχει προταθεί μια διαδικασία δύο σταδίων: η αρχική και αναστρέψιμη επίστρωση περιλαμβάνει αδιάλυτες εκκρίσεις EPS το οποίο διευκολύνει την κινητικότητα ("gliding" motility), η οποία ακολουθείται από

[5]

ένα μη αναστρέψιμο στάδιο, το οποίο περιλαμβάνει το σχηματισμό του σκληρού υποστρώματος (Underwood, 2005; Chiovitti et al., 2006; Molino et al., 2008).

Το EPS που εκκρίνεται κατά τη διάρκεια της πρώτης επαφής με το υπόστρωμα είναι ένα πολύπλοκο και πολυσύνθετο υλικό, του οποίου η σύσταση διαφέρει ανάμεσα στα είδη Διατόμων και ανάλογα με την περιοχή στην οποία εντοπίζεται (Chiovitti et al., 2006). Βιοχημικές και ιστοχημικές μελέτες δείχνουν ότι οι υδρογονάνθρακες είναι τα κύρια στοιχεία των βλεννών που εκκρίνονται, οι οποίοι περιλαμβάνουν σύνθετους πολυσακχαρίτες, ουδέτερους μονοσακχαρίτες, θειικούς εστέρες καθώς επίσης και ουρικά οξέα (Chiovitti et al., 2008).

Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου εγκατάστασης, τα κύτταρα μικροφυκών μπορούν να προσαρμόσουν τη θέση τους υποβοηθούμενα από τη βλέννα που εκκρίνουν (Underwood, 2005). Οι κυτταρικές αλληλεπιδράσεις και η αναπαραγωγή των κυττάρων μπορούν επίσης να εξηγήσουν το μοτίβο εγκατάστασης των Διατόμων (Cao et al., 2013).

Προοδευτικά, η σύνθεση του συμπλόκου πρόσφυσης υπόκειται σε αλλαγές με νέα συνδετικά μόρια και μετασχηματισμούς μέσω ενζύμων που οδηγούν σε πιο δυνατή και μόνιμη εγκατάσταση (Molino et al., 2008; Hellio et al., 2009a). Για παράδειγμα, καθώς το Διάτομο, Achnantes longipes, απαιτεί βρώμιο για το σχηματισμό μίσχου και την παραγωγή αδιάλυτου EPS, προτάθηκε ότι η βρωμουπεροξειδάση μπορούσε να μεσολαβήσει στους μηχανισμούς που οδηγούν στη συνάθροιση, στο σχηματισμό μίσχου και στη μόνιμη εγκατάσταση (Vreeland et al., 1998; Chiovitti et al., 2006). Η ακριβής χημική φύση των δομών που συμμετέχουν στην εγκατάσταση δεν είναι ακόμη γνωστή, αλλά αποδεικτικά στοιχεία που αφορούν τη σύνθεση τους, έδειξαν ότι συμμετέχουν μικροΐνες πρόσφυσης αποτελούμενες από πολυ-λειτουργικές πρωτεΐνες (Dugdale et al., 2006). Εξαιτίας του ότι πολλά από τα συστατικά αλλά και οι διαδικασίες είναι ακόμα άγνωστα, το μοντέλο εγκατάστασης παραμένει ακόμα μια υπόθεση, παρά το γεγονός ότι τα δεδομένα που υπάρχουν για την εγκατάσταση των Διατόμων είναι συνεπή στο μοντέλο αυτό (Molino et al., 2008; Poulsen et al., 2014; Willis et al., 2014). Χρειάζεται ακόμα περισσότερη έρευνα για να γίνει ένας πλήρης χαρακτηρισμός αυτών των μορίων και του τρόπου που αλληλοεπιδρούν με τα μόρια EPS (Poulsen et al., 2014; Willis et al., 2014). Παρόλη την αναγνώριση του κυρίαρχου ρόλου των Διατόμων στη λειτουργία του μικροβιακού φιλμ, η μελέτη των ουσιών που εκκρίνουν και πως αυτές επιδρούν στην εγκατάσταση των προνυμφών ασπόνδυλων ζώων, που πιθανά να είναι το ίδιο σημαντικές όσο και τα βακτήρια, χρήζουν περαιτέρω έρευνας (Salta et al, 2013).

[6]

1.1.3 Μακρο-βιοεπιστρωτές

Η κατηγορία των μακρο-βιοεπιστρωτών περιλαμβάνει τα μακροφύκη και τα ασπόνδυλα ζώα όπως για παράδειγμα τα Θυσανόποδα, Δίθυρα και Καρκινοειδή. Η στρατηγική αποίκησης αυτών των οργανισμών περιλαμβάνει πλαγκτονικό στάδιο, το οποίο, όταν οι συνθήκες είναι ιδανικές, τους δίνει τη δυνατότητα εξάπλωσης και εύρεσης κατάλληλου υποστρώματος για εγκατάσταση (Zimmer et al., 2009). Τα πρότυπα διασποράς, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν έντονα τη δομή των εδραίων κοινοτήτων, προκύπτουν από περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά, όπως η υδροδυναμική, καθώς επίσης και από συμπεριφορικά χαρακτηριστικά (Levine & Murrell, 2003). Η διαδικασία αποίκησης των μακροφυκών και των ασπόνδυλων ζώων περιγράφεται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

1.1.3.1 Μακροφύκη

Μια μεγάλη ποικιλία από μακροφύκη, όπως τα είδη των Γενών Ulva (Chlorophyta, Ulvaceae), *Ectocarpus* (Phaeophyceae, Ectocarpaceae), *Laminaria* (Phaeophyceae, Laminariaceae) και *Porphyra* (Rhodophyceae, Bangiophyceae), συμμετέχουν στη διαδικασία της βιοεπίστρωσης (Hellio et al., 2009a). Η αποίκηση των επιφανειών από τα μακροφύκη εξαρτάται από βενθικά και πελαγικά στάδια: τα ζωοσπόρια ελευθερώνονται και εξαπλώνονται στη στήλη του νερού έως ότου εγκατασταθούν σε μια κατάλληλη επιφάνεια, οδηγώντας τελικά σε μακροβιοεπίστρωση (Fletcher & Callow, 1992; Hellio et al., 2009a).

Πολλές συμπεριφορές επηρεάζουν τη διασπορά των ζωοσπορίων και μπορούν να είναι αρκετά διαφορετικές ανάλογα με το είδος καθώς και τα φυσικά και χημικά τους χαρακτηριστικά (Callow & Callow, 2002). Ο θετικός και αρνητικός φωτοτακτισμός μπορούν να επηρεάσουν τη διασπορά στη στήλη νερού (Maggs & Callow, 2003): θετικά φωτοτακτικά σπόρια κινούνται προς το φως, γεγονός που βοηθά στη διασπορά στη στήλη του νερού ενώ αρνητικά φωτοτακτικά σπόρια οδηγούνται σε περιοχές χαμηλής ακτινοβολίας προκειμένου να εγκατασταθούν.

Οι διαδικασίες εγκατάστασης ποικίλλουν σημαντικά μεταξύ των διαφορετικών ειδών μακροφυκών και η ανάπτυξη επιτυχημένων στρατηγικών αντιβιοεπίστρωσης επικεντρώνεται στην κατανόηση των μηχανισμών προσκόλλησης των σπορίων καθώς και των χημικών ενώσεων που εμπλέκονται στη διαδικασία αυτή (Petrone et al., 2011). Τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του υποστρώματος, όπως η επιφανειακή ενέργεια και η μικροτοπογραφία, επηρεάζουν έντονα την εγκατάσταση των σπορίων (Callow et al., 2002). Για παράδειγμα,

[7]

μελέτες έδειξαν ότι τα περισσότερα ζωοσπόρια προτιμούν να εγκαθίστανται σε τραχιές επιφάνειες (Maggs et al., 2003), αλλά η τραχύτητα σε επίπεδο νανοκλίμακας, αποδείχθηκε ότι αναστέλλει την εγκατάσταση σπορίων άλλων ειδών όπως του *Polysiphonia sphaerocarpa* (Scardino, 2009). Άλλες παράμετροι που επηρεάζουν την προσκόλληση των σπορίων είναι οι εξής: Τα σπόρια του Γένους *Ulva* επηρεάζονται από τη λιπαρότητα, την επιφανειακή ενέργεια και τη διαβροχή (Bowen et al., 2007, Petrone et al., 2011) ενώ είδη της Οικογένειας των Φαιοφυκών (Phaeophycea), όπως το *Hinksia irregularis*, κατά προτίμηση εγκαθίστανται σε μη φορτισμένες επιφάνειες παρά σε θετικά ή αρνητικά φορτισμένα υποστρώματα (Greer & Amsler, 2002). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι οι οργανισμοί που είναι ήδη προσκολλημένοι στην επιφάνεια μπορεί να επηρεάσουν τον αποικισμό επειδή τροποποιούν την μικροτοπογραφία καθώς και τις φυσικές και χημικές ιδιότητες της (Maggs et al., 2003). Τέλος, οι οργανισμοί του βιοφίλμ παράγουν χημικές ουσίες που μπορούν να ανιχνευθούν από τα ζωοσπόρια των φυκών και να επηρεάσουν την εγκατάσταση τους, είτε θετικά είτε αρνητικά (Mieszkin et al., 2012).

Η διαδικασία προσκόλλησης των ζωοσπορίων είναι πολύ γρήγορη, η αρχική φάση μπορεί να επιτευχθεί μέσα σε δευτερόλεπτα από τη στιγμή που γίνει η επαφή με την επιφάνεια ενώ η μόνιμη προσκόλληση ολοκληρώνεται μόλις μέσα σε μια ώρα με τη σκλήρυνση των συγκολλητικών ουσιών που εκκρίνονται (Callow & Callow, 2006). Ο χαρακτηρισμός των χημικών ενώσεων που εμπλέκονται στη διαδικασία προσκόλλησης είναι καθοριστικής σημασίας για την ανάπτυξη στρατηγικών αντιβιοεπίστρωσης, αλλά μόνο λίγες πρόσφατες μελέτες έχουν εξετάσει τη φύση του συγκολλητικού υλικού που εκκρίνεται από τα σπόρια των μακροφυκών κατά τη διάρκεια αυτού του σταδίου (Dimartino et al., 2013). Έχει αποδειχθεί ότι το κολλώδες υλικό που εκκρίνεται από το είδος Undaria pinnatifida (Phaeophyta), πιθανώς από τα σωμάτια Golgi, περιέχει πρωτεΐνες, ανιονικούς πολυσακχαρίτες (θειικούς και φωσφορικούς), καθώς και ιόντα ασβεστίου και μαγνησίου (Petrone et al., 2011). Έχει προταθεί ότι αυτά τα ιόντα θα μπορούσαν να εμπλέκονται στη ζελατινοποίηση των εκκρινόμενων συγκολλητικών δομών αλληλοεπιδρώντας με τους αρνητικά φορτισμένους πολυσακχαρίτες και ενισχύοντας την πρόσφυση (Chiovitti et al., 2008, Petrone et al., 2011). Τα εγκατεστημένα μακροφύκη στη συνέχεια θα αναπτυχθούν, παράγοντας ενώσεις οι οποίες δρουν χημειοτακτικά και προσελκύουν άλλους οργανισμούς, όπως τα ασπόνδυλα ζώα, για βόσκηση ή για εγκατάσταση (Qian et al., 2003; Hammann et al., 2013; Flöthe et al., 2014).

1.1.3.2 Ασπόνδυλα ζώα

Αρκετές τάξεις και φύλα ασπόνδυλων ζώων, όπως τα Δίθυρα, ασβεστολιθικοί Πολύχαιτοι, Βρυόζωα και Θυσανόποδα, είναι υπεύθυνα για τη μακρο-βιοεπίστρωση (Εικόνα 1.2). Το μεγάλο τους μέγεθος (έως και αρκετά εκατοστά) και τα ασβεστούχα χαρακτηριστικά τους μπορούν να προκαλέσουν αυξημένη αντοχή στην τριβή (έως και 80%) (Schultz, 2007) προσθέτοντας επίσης επιπλέον βάρος στις βυθισμένες κατασκευές. Πολλοί από τους παραπάνω



Εικόνα 1.2 Φαινόμενο βιοεπίστρωσης σε κατασκευή που έμεινε ποντισμένη στην περιοχή του μικρολίμανου για 4 μήνες.

amphitrite έχει εξαπλωθεί στις πιο θερμές και εύκρατες περιοχές. Αυτά είναι τα πιο συνηθισμένα είδη λόγω της υψηλής γονιμότητάς τους (έως και 20.000 αυγά ανά ενήλικο, Hills & Thomason 2003), της ευρείας παγκόσμιας κατανομής τους και

του νυμφικού σταδίου της κυπρίδας (Εικόνα 1.3) (Clare & Aldred, 2009; Holm, 2012; Kamino, 2013) η οποία εγκαθίσταται σε κατάλληλο υπόστρωμα για την ανάπτυξη



Εικόνα 1.3 Κυπρίδα του είδους Amphibalanus amphitrite. (Μεγέθυνση 60x, Πρωτοπαπά Μ.)

του ενήλικου ατόμου. Οι Laresson & Høeg (2002) έχουν περιγράψει τη συμπεριφορά αυτού του σταδίου ανάπτυξης, η οποία ξεκινά αρχικά με μια ευρεία

οργανισμούς έχουν μελετηθεί εντατικά προκειμένου να κατανοηθούν οι διαδικασίες που είναι υπεύθυνες για τον αποικισμό των υποστρωμάτων.

Θυσανόποδα είναι βασικό Тα μοντέλο της κατηγορίας των ασπόνδυλων ζώων και έχουν υποβληθεί σε εκτεταμένες μελέτες αντιβιοεπίστρωσης σχετικά με τη συμπεριφορά τους, τους μηχανισμούς προσκόλλησης και την ευαισθησία τους σε αντιβιοεπιστρωτικές ουσίες (Favi et al., 2012; Kamino, 2013). Тο είδος Semibalanus balanoides εντοπίζεται συνήθως σε διαπαλιρροϊκές ζώνες στις βόρειες θάλασσες, ενώ το Amphibalanus

εξερεύνηση όπου οι κυπρίδες «περπατούν», χρησιμοποιώντας τις κεραίες τους (Clare et al., 2009), σε ευθεία γραμμή κατά μήκος της επιφάνειας για αρκετά λεπτά πριν από την απομάκρυνση τους από αυτήν και την εξερεύνηση ενός νέου σημείου. Η συμπεριφορά τους αλλάζει όταν εντοπίζουν το κατάλληλο σημείο ενώ στη συνέχεια παράγουν ένα προσωρινό έκκριμα συγκόλλησης που ακολουθείται από ένα «μόνιμο» έκκριμα, οδηγώντας τα σε μόνιμη εγκατάσταση (Clare et al., 2009). Η εγκατάσταση των κυπρίδων επηρεάζεται κυρίως από τις ιδιότητες της επιφάνειας, όπως η διαβροχή και η τραχύτητα (Berntsson et al., 2000; Clare et al., 2009), αλλά και από την πρωτεΐνη SIPC (Settlement Induced Protein Complex) που μπορεί να έχει εκκριθεί από άλλες κυπρίδες, καθώς δρα ως φερορμόνη (Bacchetti De Gregoris et al., 2012). Στην πραγματικότητα, μια σύνθετη σχέση μεταξύ της υδροδυναμικής, του τύπου του υποστρώματος και της ηλικίας των κυπρίδων οδηγεί στην κατάλληλη επιλογή των οικοτόπων από τις κυπρίδες για την τελική εγκατάσταση (Miron et al., 2000; Clare et al., 2009; Bacchetti De Gregoris et al. Holm, 2012). Ωστόσο, όσο μειώνεται το ενεργειακό τους απόθεμα, οι κυπρίδες μπορεί να γίνουν λιγότερο επιλεκτικές σε σχέση με τις επιφάνειες εγκατάστασης, φτάνοντας στο καθεστώς των «απελπισμένων κυπρίδων» (Elkin & Marshall, 2007).

Τα Βρυόζωα όπως το είδος, Bugula neritina, τα οποία είναι κοσμοπολίτικοι βιοεπιστρωτικοί οργανισμοί που συχνά απαντώνται σε υποθαλάσσιες κατασκευές, υφίστανται ένα πελαγικό στάδιο πριν γίνουν αρνητικά φωτοτακτικοί (κατά προτίμηση καταλήγουν σε σκιασμένες επιφάνειες), καθιστώντας τους οργανισμούς αυτούς ιδανικούς για πειραματικές μελέτες: οι προνύμφες μπορούν εύκολα να συλλεχθούν και εγκαθίστανται λίγες ώρες μετά την απελευθέρωση τους (Qian, Wong, & Zhang, 2010; Yu, Yan, & Gu, 2007). Για παράδειγμα, σε βιοδοκιμές το *B. neritina* έδειξε ότι προτιμά τις επιφάνειες που καλύπτονται από βιοφίλμ αποτελούμενο από Διάτομα, όπως τα είδη Achnantes sp. και Amphora coffeaeformis, ενώ βιοφίλμ αποτελούμενα από το βακτήριο Pseudoalteromonas sp. είχαν το αντίθετο αποτέλεσμα (Dahms et al., 2004). Ωστόσο, αφού έχουν χρησιμοποιήσει τα ενεργειακά τους αποθέματα, φτάνουν και αυτά σε ένα καθεστώς «απελπισμένων προνυμφών» και εγκαθίστανται όπου βρουν (Elkin et al., 2007).

Τα ασκίδια είναι επίσης κοσμοπολίτικοι βιοεπιστρωτικοί οργανισμοί, κυρίως λόγω της ανθρωπογενούς διασποράς τους σε ολόκληρο τον πλανήτη (Aldred & Clare, 2014). Επιπλέον, η αποτελεσματική αναπαραγωγική τους μέθοδος προσδίδει έναν ιδιαίτερα επιθετικό χαρακτήρα βιοεπίστρωσης, ιδιαίτερα προβληματικό στις εγκαταστάσεις υδατοκαλλιεργειών (Cahill et al., 2012; Bullard et al., 2013; Aldred et al., 2014). Το αποικιακό ασκίδιο του είδους, *Diplosoma listerianum*, συνήθως εγκαθίσταται σε σκιασμένες και με κατεύθυνση προς τα κάτω

επιφάνειες, ανταποκρινόμενο σε περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως η χαμηλή ακτινοβολία και η βαρύτητα (Hurlbut, 1993). Έχει επίσης αποδειχθεί ότι η εγκατάσταση των προνυμφών ασκιδίων (*Ciona intestinalis* και *Pyura praeputialis*, που ευθύνονται για σοβαρές δυσλειτουργίες στα συστήματα υδατοκαλλιέργειας στη Νότια Αμερική) μπορούν να ανασταλούν από βακτηριακά βιοφιλμ (Zapata et al., 2007).

Τα μύδια προκαλούν σοβαρά προβλήματα βιοεπίστρωσης καθώς προσκολλώνται σταθερά σε μια μεγάλη ποικιλία υποθαλάσσιων επιφανειών χρησιμοποιώντας το βύσσο (Bandara et al., 2012). Πρωτεΐνες όπως το κολλαγόνο και η οξειδάση της κατεχόλης από την βυσσική πλάκα είναι υπεύθυνες για την ισχυρή τους προσκόλληση (Bandara et al., 2012). Το μπλε μύδι, *Mytilus edulis*, έδειξε προτίμηση εγκατάστασης σε τραχείες επιφάνειες (Dobretsov & Railkin, 1996), αλλά και σε επιφάνειες καλυμμένες από το Χλωρόφυτο, *Cladophora rupestris* υποδηλώνοντας ότι εμπλέκονται και χημικές ενώσεις στην εγκατάσταση εκτός από τα χημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας (Dobretsov & Wahl, 2001).

Η ποικιλομορφία των οργανισμών που εμπλέκονται στη βιοεπίστρωση και η ποικιλία των διαδικασιών εγκατάστασης προσθέτουν πολυπλοκότητα στην ανάπτυξη αντιβιοεπιστρωτικών λύσεων. Όταν οι οργανισμοί αυτοί εγκατασταθούν, η προκύπτουσα βιοκοινότητα μπορεί να είναι υπεύθυνη για σημαντικές τεχνικές και περιβαλλοντικές ζημίες, οι οικονομικές επιπτώσεις των οποίων είναι και η βασική αιτία αναζήτησης αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων.

1.2 Βιοεπίστρωση: επιπτώσεις και πρόληψη

Παρόλο που όλες οι βυθισμένες επιφάνειες μπορούν να σχηματίσουν ένα υπόστρωμα για το σχηματισμό βιοφίλμ και την επακόλουθη ανάπτυξη μεγαλύτερων οργανισμών, το φαινόμενο αυτό επηρεάζει εμφανώς τις τεχνητές δομές (ύφαλα πλοίων, σημαδούρες, πλωτήρες, αιολικά πάρκα, αγωγοί κτλ.) έχοντας τεράστιες οικονομικές και περιβαλλοντικές επιπτώσεις.

1.2.1 Οικονομικές επιπτώσεις

Τα βακτηριακά βιοφίλμ ευθύνονται για τη σημαντική υποβάθμιση και φθορά των τεχνητών κατασκευών, μέσω του αποχρωματισμού των επιφανειών (Swain et al., 2006) και της διάβρωσης των μεταλλικών επιφανειών (Lee et al., 2004). Υπάρχουν ενδείξεις ότι το EPS που παράγεται από τα βακτήρια μπορεί να επιταχύνει τη διάβρωση (Beech et al., 1998). Τα βακτήρια που αναγάγουν τα θειικά άλατα, όπως το Shewanella oneidensis (γ-Proteobacteria, πρώην S. putrefaciens) συνδέονται με τη βιοδιάβρωση του χάλυβα μέσω οξείδωσης του σιδήρου, η οποία επιταχύνεται κάτω από μικροαερόβιες συνθήκες, όπου ο σίδηρος είναι διαθέσιμος ως εναλλακτικός δέκτης ηλεκτρονίων (Lee & Newman, 2003). Η διαδικασία διάβρωσης μπορεί επίσης να προκληθεί από ένζυμα που μπορούν να παραμείνουν δραστικά ακόμη και απουσία ζωντανών κυττάρων (Beech et al., 2002). Πράγματι, τα βακτήρια παράγουν ένα ευρύ φάσμα ενζύμων (υδρογονάση, καταλάση, υπεροξειδάση, δισμουτάση υπεροξειδίου) που μπορεί να παγιδευτούν στο βακτηριακό EPS. Είναι γνωστό ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στη διάβρωση του σιδήρου και των κραμάτων του, κυρίως μέσω αντιδράσεων αφαίρεσης του οξυγόνου σε συνδυασμό με την ενζυμική διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Busalmen et al., 2002, Beech et al., 2005). Τα βιοφίλμ των μικροφυκών μπορούν επίσης να είναι υπεύθυνα για τη διάβρωση μέσω της παραγωγής EPS και της κατανάλωσης/απελευθέρωσης οξυγόνου (de Brito et al., 2007). Επιπρόσθετα, όταν οι κυπρίδες εγκαθίστανται, για παράδειγμα στα ύφαλα ενός πλοίου, τα σκληρά κελύφη των ενήλικων πλέον ατόμων μπορούν να προκαλέσουν ζημιές στο υφαλόχρωμα και να προκαλέσουν διάβρωση του υποκείμενου μετάλλου (Clare et al., 2009).

Επιδρώντας στην ακεραιότητα των κατασκευών, οι συνέπειες της βιοεπίστρωσης στα ύφαλα των πλοίων είναι σημαντικές στο οικονομικό κομμάτι, λόγω σημαντικής αύξηση της κατανάλωσης καυσίμων που προκαλείται από την επιπρόσθετη τριβή: η συνολική αντίσταση εκτιμάται ότι αυξάνεται κατά 20% με το πρώτο στάδιο βιοεπίστρωσης, 35% με τα μακροφύκη και μέχρι 80% με τους

[12]

μεγαλύτερους οργανισμούς (Schultz et al., 2011; Schultz, 2007). Ως εκ τούτου, το φαινόμενο αυτό είναι υπεύθυνο για σημαντικές οικονομικές δαπάνες (Callow, 1996; Champ, 2000). Για παράδειγμα, για μια ολόκληρη τάξη πολεμικών πλοίων μεσαίου μεγέθους, εκτιμάται ότι το συνολικό ετήσιο κόστος που σχετίζεται με τη βιοεπίστρωση (κατανάλωση καυσίμου, υφαλόχρωμα και συντήρηση) ήταν 56 εκατομμύρια δολάρια (Schultz et al., 2011).

Οι βιομηχανίες υδατοκαλλιέργειας επηρεάζονται επίσης σοβαρά από τη βιοεπίστρωση, όπου OI βιοεπιστρωτές παρεμποδίζουν тα αποθέματα καλλιεργούμενων ειδών (περιορισμός της ανταλλαγής νερού, φυσικές βλάβες των καλλιεργούμενων οργανισμών, κίνδυνοι από ασθένειες και βιολογικός ανταγωνισμός) και καταστρέφουν τις υποδομές λόγω αυξημένου βάρους (de Nys & Guenther, 2009; Fitridge et al., 2012). Το σχετικό κόστος θεωρείται ότι είναι 5-10% του κόστους παραγωγής, το οποίο θα μπορούσε να αντιπροσωπεύει τουλάχιστον 1,5 δισεκατομμύρια δολάρια ετησίως (Fitridge et al., 2012). Λόγω της ύπαρξης τοξικών χημικών ενώσεων ή βαρέων μετάλλων στα υφαλοχρώματα, ο έλεγχος της βιοεπίστρωσης στις υδατοκαλλιέργειες συνήθως περιορίζεται στον συχνό καθαρισμό και τη μείωση του χρόνου έκθεσης στο θαλασσινό νερό (Dürr & Watson, 2010). Άλλες στρατηγικές που ξεκίνησαν από τους υδατοκαλλιεργητές περιλαμβάνουν την εισαγωγή θηρευτών για τη μείωση της βιοεπίστρωσης, αλλά οι βιομηχανίες υδατοκαλλιέργειας χρειάζονται επειγόντως περιβάλλον φιλικά προς то υφαλοχρώματα (Fitridge et al., 2012).

Τα προβλήματα που σχετίζονται με τη βιοεπίστρωση εκτός από τις βιομηχανίες ναυτιλίας και τις υδατοκαλλιέργειας επηρεάζουν και άλλες τεχνητές κατασκευές, όπως μαρίνες, συστήματα ψύξης, υποβρύχια ακουστικά όργανα όπως αισθητήρες, υποβρύχια καλώδια και όλες τις παράκτιες βιομηχανίες (Yebra et al., 2004; Whelan & Regan, 2006; Jones, 2009; Chapman & Regan, 2012). Για παράδειγμα, δομές όπως οι παράκτιες πλατφόρμες που σχετίζονται με τις βιομηχανίες πετρελαίου και φυσικού αερίου προκειμένου να σταθεροποιηθούν αγκιστρώνονται στον πυθμένα του ωκεανού σε βάθος που κυμαίνεται από 100 έως 1000 μέτρα, όμως η διάβρωση που σχετίζεται με τη βιοεπίστρωση μπορεί να προκαλέσει σοβαρά ζητήματα ασφάλειας στις κατασκευές αυτές. Επιπλέον, παρέχουν ένα υπόστρωμα εγκατάστασης σε διαφόρων ειδών προνύμφες επιτρέποντας την ολοκλήρωση του κύκλου ζωής τους σε απροσδόκητους οικοτόπους, προσελκύοντας άλλους οργανισμούς για τροφή και προστασία δημιουργώντας έτσι ένα νέο οικοσύστημα (Apolinario & Coutinho, 2009). Επίσης, η βιοεπίστρωση αποτελεί σημαντικό πρόβλημα για την ακεραιότητα των σταθμών παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας και των δικτύων ύδρευσης όπου αναφέρεται η

[13]
τακτική παρεμπόδιση των φίλτρων λόγω της «μικροβιακής λάσπης» και των μεγαλύτερων σε μέγεθος βιοεπιστρωτών. Εκτός από τη μηχανική αφαίρεση, χρησιμοποιούνται τεχνικές θερμότητας και χλωρίωσης, οι οποίες όμως επηρεάζουν το περιβάλλον (Henderson, 2010). Τέλος, τα συστήματα ανανεώσιμων πηγών ενέργειας όπως η αιολική ενέργεια και η κυματική ενέργεια επηρεάζονται επίσης από τη βιοεπίστρωση (Langhamer et al., 2010; Krone et al., 2013). Για παράδειγμα, έχει καταγραφεί αύξηση του πληθυσμού του μπλε μυδιού, *Mytilus edulis*, στη Βόρεια Θάλασσα λόγω της παρουσίας των παράκτιων αιολικών πάρκων (Krone et al., 2013).

1.2.2. Περιβαλλοντικές επιπτώσεις

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι βυθισμένες επιφάνειες αποικίζονται πολύ γρήγορα από μικρο- και μακροβιοεπιστρωτές όταν δεν έχουν υποστεί κάποια επεξεργασία. Η βιοεπίστρωση στα ύφαλα των πλοίων, ειδικότερα, είναι υπεύθυνη για μείζονα περιβαλλοντικά προβλήματα όπως η αύξηση των εκπομπών αερίων του θερμοκηπίου και η διασπορά ξενικών ειδών.

Η αύξηση της τριβής προκαλεί μεγαλύτερη κατανάλωση καυσίμων από τα πλοία, συμβάλλοντας έτσι στις παγκόσμιες οικολογικές επιπτώσεις μέσω της αύξησης των εκπομπών αερίων θερμοκηπίου στην ατμόσφαιρα. Για παράδειγμα, η χρήση αποτελεσματικών προληπτικών μεθόδων ενάντια στη βιοεπίστρωση στα ύφαλα των πλοίων θα μπορούσε να μειώσει τις παγκόσμιες εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα κατά 23 εκατομμύρια τόνους ετησίως (Abbott et al., 2000), γεγονός που αποτελεί σημαντική συμβολή στη μείωση των εκπομπών στο Ηνωμένο Βασίλειο (623,9 εκατ. τόνων μέσου όρου διοξειδίου του άνθρακα ετησίως για την περίοδο 2013-2020) όπως αναφέρεται στο νόμο περί κλιματικής αλλαγής του 2008 (Anonymous, 2014).

Τα ύφαλα των πλοίων επηρεάζονται ιδιαίτερα από τον αποικισμό των μακροφυκών, καθώς ταξιδεύουν μέσα από διάφορες υδάτινες μάζες και κλίματα, επειδή διατηρούν οργανισμούς στην εύφωτη ζώνη, η οποία είναι ευνοϊκή για την ανάπτυξη των φυκών (Chambers et al., 2006). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την εξάπλωση δυνητικά ξενικών ειδών (Gollasch, 2006). Για παράδειγμα, είναι γνωστό ότι το Undaria pinnatifida (Ιαπωνική κέλπα) εξαπλώθηκε μέσω των υφάλων των πλοίων (Hay, 1990). Επίσης, έχει επισημανθεί ότι τα ύφαλα των πλοίων χαρακτηρίζονται από περιβαλλοντικές αλλαγές και τοξικά υφαλοχρώματα (Yebra et al., 2004), χαρακτηριστικά που επιτρέπουν τα πιο «ισχυρά» είδη να εξαπλωθούν

(Coutts et al., 2010). Ορισμένα πλοία, ιδίως τα εμπορικά με κακής ποιότητας επίστρωση υφαλοχρώματος, είναι πιο πιθανό να διευκολύνουν την εξάπλωση των ειδών παγκοσμίως. Παραδείγματος χάριν, υπάρχουν ενδείξεις ότι ένα εμπορικό πλοίο 10.000 τόνων επισκέπτεται αρκετούς λιμένες στον κόσμο σε μια περίοδο πέντε ετών και ακόμη και σύντομες περίοδοι ελλιμενισμού είναι επαρκείς για να επιτραπεί η εγκατάσταση στην περιοχή πιθανών ξενικών ειδών (Minchin & Gollasch, 2003).

Διάφορα ξενικά είδη πιστεύεται ότι εισήχθησαν μέσω της βιοεπίστρωσης των πλοίων, όπως το Dreissena polymorpha (μύδι) στην Ιρλανδία, η Crepidula fornicata (πεταλίδα) στη βόρεια Γαλλία, το Δεκάποδο Hemigraspus penicillatus κατά μήκος της ατλαντικής ακτής της Γαλλίας και το Mytilus galloprovincialis (μύδι) στη Χαβάη (Noël et al., 1997; Apte et al., 2000; Lewis et al., 2003; Minchin et al., 2003). Αυτά τα ξενικά είδη μπορούν να έχουν μεγάλη επίδραση στους αυτόχθονες οργανισμούς. Για παράδειγμα, το είδος *C. fornicata* μείωσε σημαντικά την πυκνότητα των ιχθυδίων γλώσσας στο Βισκαϊκό κόλπο στη Γαλλία. Αυτό πιθανά να οφείλεται σε διαρθρωτικές αλλαγές στον βενθικό βιότοπο όπως υψηλότερη θολερότητα (λόγω επαναιώρησης ιζημάτων), παρουσία κελύφων και δημιουργία στρώσεων (Le Pape et al., 2004).

1.2.3 Αντιβιοεπιστρωτικές προσπάθειες

Οι αρχικές προσπάθειες για τη μείωση της βιοεπίστρωσης περιλάμβαναν τη χρήση μεταλλικών επενδύσεων (μολύβδου, σιδήρου, χαλκού) σε ξύλινα ύφαλα, αλλά τα προβλήματα διάβρωσης που προκλήθηκαν οδήγησαν τελικά στη χρήση τοξικών (με τη προσθήκη οξειδίων του χαλκού) υφαλοχρωμάτων τον 20° αιώνα, (Readman, 2006). Πολλές οργανικές ενώσεις, όπως του υδραργύρου, μολύβδου και αρσενικού, ενσωματώθηκαν στη συνέχεια στα υφαλοχρώματα, αλλά ενώσεις όπως αυτή του τριβουτυλο-κασσίτερου (tributyl-tin, TBT) ήταν η πιο αποτελεσματική και οικονομική, ειδικότερα σε συνδυασμό με αυτο-στιλβωτικά πολυμερή (SPCs) που παρείχαν ελεγχόμενη απελευθέρωση (Yebra et al., 2005). Παρόλα αυτά, το TBT έχει επιβλαβείς επιδράσεις σε πολλά θαλάσσια είδη που δεν αποτελούν στόχο, όπως τα Δίθυρα, τα οποία εμφάνισαν μη φυσιολογική ανάπτυξη κελύφους (Nell & Chvojka, 1992; Coelho et al., 2006). Τα χρώματα με βάση τον κασσίτερο έχουν επίσης συνδεθεί με το θάνατο Κητωδών, όπως τα δελφίνια και οι φάλαινες στο Βόρειο Ατλαντικό, από τη δεκαετία του 1980 (Ponasik et al., 1998). Επίσης, το ΤΒΤ είναι ανθεκτικό στο θαλάσσιο περιβάλλον και βιοσυσσωρεύεται στους θαλάσσιους οργανισμούς (Anonymous, 2003). Στην πραγματικότητα, μια μελέτη έδειξε ότι το TBT υφίσταται σημαντική βιοσυσσώρευση μέσω της τροφικής αλυσίδας στα Ιαπωνικά

παράκτια ύδατα (Murai et al., 2008) και, τελικά, στην έκθεση του ανθρώπου σε αυτό μέσω της κατανάλωσης ρυπασμένου ύδατος και θαλάσσιων τροφών (Okoro et al., 2011). Λόγω τέτοιων προβλημάτων, ο Διεθνής Ναυτιλιακός Οργανισμός (IMO) ενέκρινε τη Διεθνή Σύμβαση για τον έλεγχο των επιβλαβών συστημάτων προστασίας από βιοεπίστρωση επί των πλοίων (International Convention for the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships) που επικυρώθηκε το 2008. Η σύμβαση αυτή πρότεινε την πλήρη απαγόρευση των υφαλοχρωμάτων με βάση το TBT (Pereira & Ankjaergaard, 2009).

Μετά την απαγόρευση του ΤΒΤ, χρησιμοποιήθηκαν σκευάσματα που συνδυάζουν βαρέα μέταλλα, όπως ο χαλκός ή ο ψευδάργυρος, και τα βιοκτόνα, όπως το Irgarol 1051, το Diuron και το Sea-Nine 211, ωστόσο η ευρεία τους τοξικότητα αναγνωρίζεται ως προβληματική και η χρήση τους ρυθμίζεται τώρα από την οδηγία για τα βιοκτόνα (Biocidal Products Directive, 98/8/EC). Η πυροθειονίνη ψευδαργύρου και χαλκού (zinc / copper pyrithione) είναι οργανομεταλλικό άλας με πολλαπλό τρόπο αναστολής εγκατάστασης οργανισμών (Dafforn et al., 2011). Αυτή η ιδιότητα του δίνει ένα ευρύ φάσμα δραστικότητας, αλλά η έλλειψη εξειδίκευσης επηρεάζει και άλλους οργανισμούς, όπως αχινούς, μακροφύκη και κοράλλια (Kobayashi & Okamura, 2002; Piola & Johnston, 2007; Dafforn et al., 2011; Guardiola et al., 2012). Από την άλλη πλευρά, αποδείχθηκε ότι η συσσώρευση βαρέων μετάλλων όχι μόνο έχει επιβλαβείς μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στα θαλάσσια οικοσυστήματα, αλλά αυξάνει επίσης την ανάπτυξη ανθεκτικών μικροβιακών ειδών και ξενικών ειδών (Paradas & Amado Filho, 2007; Dafforn et al., 2011; Guardiola et al., 2012). Το Irgarol 1051 είναι γνωστό ότι εμποδίζει τη βιοεπίστρωση των φυκών αναστέλλοντας το φωτοσύστημα ΙΙ μέσω της σύνδεσης με την πρωτεΐνη D1 (Arrhenius et al., 2006), αλλά έχει επίσης επιβλαβείς επιδράσεις σε οργανισμούς που δε στοχεύει, όπως στη συμβιωτική ζωοξανθέλα σε κοράλλια, σε μακροφύκη και μανγκρόβιες (Carbery et al., 2006). Είναι επίσης πολύ ανθεκτικό στο θαλάσσιο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των ιζημάτων, με χρόνο ημιζωής 100 ημερών (Konstantinou & Albanis, 2004). Επιπρόσθετα, τα προϊόντα αποικοδόμησής του εμφανίζουν ακόμη μεγαλύτερη τοξικότητα και είναι ακόμη πιο ανθεκτικά στην αποδόμηση από τα αρχικά συστατικά μόρια (Okamura, 2000). Ένα άλλο ζήτημα αφορά την επαναιώρηση του ιζήματος με την απελευθέρωση του βιοκτόνου στη στήλη ύδατος, καθιστώντας το βιοδιαθέσιμο για άλλους οργανισμούς (Tolhurst et al., 2007). Έχει αναφερθεί ότι σε συγκεντρώσεις άνω των 0.024 μg L⁻¹, το Irgarol 1051 μπορεί να είναι επικίνδυνο για το 95% των θαλάσσιων οργανισμών, αλλά η συγκέντρωση αυτή έχει ήδη ξεπεραστεί σε διάφορες περιοχές του κόσμου, όπως η Καραϊβική, οι ΗΠΑ και η Ευρώπη (Dafforn et al., 2011). Το Diuron χρησιμοποιείται

επίσης για την καταπολέμηση των μικροφυκών σε υφαλοχρώματα, αλλά μπορεί να παραμείνει στο θαλάσσιο περιβάλλον για ένα χρόνο (Giacomazzi & Cochet, 2004). Ως εκ τούτου, η Οργάνωση Υγείας και Ασφάλειας του Ηνωμένου Βασιλείου ανακάλεσε τη χρήση του (Gatidou, Thomaidis, & Zhou, 2007, Thomas, McHugh, & Waldock, 2002) και πλέον η θαλάσσια ρύπανση θα συνδέεται πιθανότερα με τη χρήση του σε γεωργικές βιομηχανίες (Haynes et al., 2000). Το Sea-Nine 211 φαίνεται να έχει τους χαμηλότερους περιβαλλοντικούς κινδύνους σε σύγκριση με τα άλλα βιοκτόνα, με εκτιμώμενο χρόνο ημιζωής μικρότερο από 24 ώρες (Thomas, 2009), ωστόσο, έχει αποδειχθεί ότι όταν συνδυάζεται με σωματίδια χρώματος, ο χρόνος ζωής του Sea-Nine 211 αυξάνεται σε 9.9 ημέρες (Thomas et al., 2003). Ως εκ τούτου, η Βρετανική Υγειονομική και Εκτελεστική Επιτροπή περιορίζει τη χρήση του σε πλοία μήκους άνω των 25 μέτρων (Konstantinou et al., 2004; Chambers et al., 2006). Είναι επομένως απολύτως απαραίτητο να εξεταστεί η τύχη των νέων ενεργών συστατικών αντιβιοεπίστρωσης κατά την έκλουση τους στη στήλη νερού όπως και στα ιζήματα.

Νέες τεχνολογίες ανάπτυξης υποστρωμάτων με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, έχουν διερευνηθεί ως μέσο πρόληψης της βιοεπίστρωσης (Lejars et al., 2012): παρέχουν χαμηλή τριβή και εξαιρετικά λεία επιφάνεια όπου οι οργανισμοί δύσκολα θα μπορούν να εγκατασταθούν. Οι Yebra et al. (2004) επανεξέτασαν τα όρια αυτής της τεχνολογίας λέγοντας πως είναι πολύ ακριβή, η επικάλυψη μπορεί να μην προσκολλάται έντονα στην επιφάνεια και μπορεί να καταστραφεί εύκολα ενώ δεν λειτουργεί για σταθερές επιφάνειες. Πράγματι, οι συγκεκριμένες επιστρώσεις απαιτούν μια ελάχιστη ταχύτητα 22 kn για την απομάκρυνση των προσκολλημένων οργανισμών ενώ το αρχικό στάδιο του βιοφίλμ απομακρύνεται δύσκολα ακόμα και με ταχύτητες άνω των 30 kn.

Μία από τις μεγαλύτερες προκλήσεις της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας και μηχανικής είναι η προσπάθεια ανάπτυξης νέων φιλικών προς το περιβάλλον αντιβιοεπιστρώσεων, οι οποίες πρέπει να πληρούν αυστηρά κριτήρια: πρέπει να είναι ανθεκτικά (12 έτη), να επισκευάζονται, να είναι οικονομικώς αποδοτικά, να εφαρμόζονται εύκολα και να διατηρούνται αποτελεσματικά στο λιμάνι και στη θάλασσα, ενώ το προϊόν πρέπει να είναι διαθέσιμο στο εμπόριο και να καταχωρείται στον Οργανισμό Προστασίας του Περιβάλλοντος (Ralston & Swain, 2009).

[17]

1.3 Θαλάσσια χημική οικολογία

Η θαλάσσια χημική οικολογία περιλαμβάνει τη μελέτη της παραγωγής και της αλληλεπίδρασης βιοδραστικών μορίων που επηρεάζουν τη συμπεριφορά και τη λειτουργία των θαλάσσιων οργανισμών (lanora et al., 2011). Μία από τις βιομιμητικές προσεγγίσεις για την εξεύρεση νέων λύσεων αντιβιοεπίστρωσης είναι η κατανόηση της χημικής οικολογίας των θαλάσσιων οργανισμών. Πρόκειται για μια περιοχή διεπιστημονικής έρευνας που υπόσχεται μεγάλες δυνατότητες στον τομέα της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας, καθώς οι χημικές ενώσεις που μεσολαβούν σε συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις μπορούν να αξιοποιηθούν για τεχνολογίες με βιολογικές εφαρμογές, ειδικά στις εφαρμογές αντιβιοεπίστρωσης.

1.3.1 Υφαλοχρώματα και θαλάσσιοι οργανισμοί

Τα βιοαποικοδομήσιμα MNPs (Marine Natural Products, Φυσικά Θαλάσσια Προϊόντα) θα μπορούσαν να παράσχουν φιλικά προς το περιβάλλον υφαλοχρώματα (Clare, 1998; Burgess et al., 2003; Hellio et al., 2009b). Η θαλάσσια χημική οικολογία περιλαμβάνει την ταυτόχρονη διερεύνηση των χημικών και βιολογικών παραμέτρων εντός οικολογικά ρεαλιστικών περιορισμών (Hay, 1996). Πολλοί θαλάσσιοι οργανισμοί, όπως τα σφουγγάρια και τα μακροφύκη, είναι γνωστό ότι παράγουν δευτερογενείς μεταβολίτες (οι οποίοι δεν εμπλέκονται άμεσα στην φυσιολογική ανάπτυξη και αναπαραγωγή) με αντιβιοεπιστρωτική δράση (Amin, Parker, & Armbrust, 2012; Hellio, Marechal et al. 2009; Natrah, et al., 2014; Qian Xu & Fusetani, 2010; Raveendran & Limna Mol, 2009). OI ενώσεις αυτές παράγονται ως μέρος των θετικών και αρνητικών οικολογικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ οργανισμών για την άμυνα ή την αλληλοπάθεια¹ και έχουν αποδειχθεί ότι στοχεύουν ένα ευρύ φάσμα οργανισμών που προκαλούν βιοεπίστρωση από βακτήρια και μικροφύκη σε μακροφύκη και ασπόνδυλα ζώα (Hellio et al., 2009b; Zhang et al., 2009; Amin et al., 2012; Natrah et al., 2014). Αυτοί οι δευτερογενείς μεταβολίτες περιλαμβάνουν τερπένια, αλκαλοειδή και πολυφαινόλες και μπορούν να διαφέρουν σημαντικά από TOUC δευτερογενείς μεταβολίτες της ξηράς στη χημική τους δομή, συμπεριλαμβανομένης της αλογόνωσης τους. Επιπλέον, οι θαλάσσιοι οργανισμοί μπορούν να παράγουν μια μεγάλη ποικιλία διαφορετικών χημικών ενώσεων, όπως

¹ Η αλληλοπάθεια είναι κάθε διαδικασία που περιλαμβάνει βιοχημικές ενώσεις γνωστές ως δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίες παράγονται από οργανισμούς (φυτά, φαιοφύκη, βακτήρια, μύκητες) και επηρεάζουν την ανάπτυξη άλλων οργανισμών σε καλλιεργούμενες εκτάσεις και φυσικά περιβάλλοντα (Torres et al., 2006).

συμβαίνει με τα Ροδοφύκη του Γένους *Laurencia* (Rhodophyceae) που παράγουν πάνω από 1000 διαφορετικά τερπένια (MarineLit, πρόσβαση το 2019), αλλά αυτός ο τεράστιος αριθμός θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στη μικροχλωρίδα τους. Ωστόσο, δεν έχουν ακόμη αναπτυχθεί οι μέθοδοι μαζικής παραγωγής των δραστικών συστατικών που εξάγονται από αυτούς τους οργανισμούς και η χημική σύνθεση των σύνθετων λειτουργικών ομάδων αυτών των δραστικών συστατικών μπορεί να είναι πολύ δύσκολη (Li & Trost, 2008; Wohlgemuth, 2009).

1.3.2 Βιοδραστικές χημικές ενώσεις που προέρχονται από μακροφύκη: η περίπτωση Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia.*

Λόγω της συν-εξέλιξής τους με τα βιολογικά συστήματα, τους ζωντανούς οργανισμούς και το περιβάλλον, τα φυσικά προϊόντα προσφέρουν αυξημένη εξειδίκευση και αποδοτικότητα προς τους στόχους τους ως μέσο βελτίωσης της φυσικής τους κατάστασης και επιβίωσης του οργανισμού που τα παράγει (Alves et al., 2018; Gribble, 2015; Mishra & Tiwari, 2011) Οι θαλάσσιοι οργανισμοί δεν αποτελούν εξαίρεση στον κανόνα αυτόν, διαθέτοντας μια εκπληκτική ποικιλία φυσικών προϊόντων με ποικίλες βιολογικές δραστηριότητες (Alves et al., 2015; Mishra & Tiwari, 2011). Για παράδειγμα, αυτό που έχει ονομαστεί ως «παράδοξο της *Laurencia*» (Harizani et al., 2016). Είδη Ροδοφυκών που ανήκουν οποίων ο αριθμός και η τεκμηριωμένη δομική και λειτουργική ποικιλομορφία ανέρχονται σε αρκετές χιλιάδες (Wang et al., 2013).

Τα είδη του Γένους *Laurencia* έχουν διερευνηθεί εκτενώς και είναι μια πολύ γνωστή πηγή βιοδραστικών αλογονωμένων και μη αλογονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών (Masuda et al., 1997). Περισσότερες από 1000 ενώσεις έχουν απομονωθεί και ταξινομηθεί σε τέσσερις ομάδες: σεσκιτερπένια, διτερπένια, τριτερπένια και βρωμοαιθέρες 15 ατόμων άνθρακα. Τα είδη του γένους *Laurencia* έχουν μελετηθεί εκτενέστερα για τη δυνητική δραστικότητα τους σε υφαλοχρώματα στο παρελθόν από ερευνητικές συνεργασίες μεταξύ του Τμήματος Φαρμακευτικής και προέκυψαν κάποια προκαταρκτικά αποτελέσματα για μερικούς μεταβολίτες, που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα αντιβιοεπίστρωσης, στα πλαίσια μεταπτυχιακής διπλωματικής διατριβής.

Υπάρχουν πολλά βιβλιογραφικά δεδομένα για τους δευτερογενείς μεταβολίτες που προέρχονται από είδη του Γένους Laurencia. Για παράδειγμα, οι αντιμικροβιακές ενώσεις, elatol και lembyne-A από το είδος Laurencia sp. και iso-obtusol από το L. majuscula παρουσίασαν δράση ενάντια σε θαλάσσια βακτήρια με τιμές MIC (Minimum Inhibitory Concentration: ελάχιστη δόση αναστολής εγκατάστασης) κυμαινόμενες από 5-30 μg/δίσκο για την elatol, 20-60 μg/δίσκο για τη lembyne-A και 10-15 μg/δίσκο για το iso-obtusol (Vairappan et al., 2001α), τιμές που είναι συγκρίσιμες με τα εμπορικά διαθέσιμα αντιβιοτικά. Πιο πρόσφατα, οι Da Gama et al. (2002, 2003), Pereira et al. (2003), Sudatti et al. (2006, 2008) και Salgado et al. (2008) διεξήγαγαν μια πλήρη διερεύνηση των οικολογικών ρόλων της elatol για τη L. obtusa, από τη Βραζιλία, συμπεριλαμβανομένων εργαστηριακών δοκιμών (προνύμφες Θυσανόποδων και προσκόλληση νεαρών μυδιών), δοκιμών πεδίου (με τη χρήση phytagel για έλεγχο της διάχυσης), δοκιμές με φύκη, την ποσοτικοποίηση και τελικά την αποσαφήνιση της αποθήκευσης, της μεταφοράς και της εξωκυττάρωσης του μεταβολίτη. Το συμπέρασμα ήταν ότι οι δευτερογενείς μεταβολίτες, οι οποίοι αργότερα αναγνωρίστηκαν ως elatol (Da Gama et al., 2003; Sudatti et al., 2006, 2008; Salgado et al., 2008), ανέστειλαν σημαντικά την εγκατάσταση σε μια σειρά από βιοεπιστρωτικούς οργανισμούς (Da Gama κ.ά., 2002). Το ίδιο είδος από την Αυστραλία αναλύθηκε επίσης από τον de Nys et al. (1998) για τον προσδιορισμό των επιφανειακών συγκεντρώσεων της aplysistanin και της palisadin A. Αυτές οι ενώσεις βρέθηκαν σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (ng cm⁻²) σε σύγκριση με τη συγκέντρωση ολόκληρου του εκχυλίσματος του Ροδοφύκους. Επίπεδα αλογονωμένων φουρανών μετρήθηκαν επίσης στο κόκκινο φύκος Delisea pulchra, επιδεικνύοντας τον οικολογικό ρόλο αυτών των ενώσεων στην προστασία από τη βιοεπίστρωση (Dworjanyn et al., 1999). Οι Vairappan et al., (2001b) απομόνωσαν τρεις ενώσεις από είδη Laurencia: την (6R,9R,10S)-10-bromo-9hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene(brominated sesquiterpene) από το είδος L. majuscula και laurintenol και iso-laurintenol από το L. nidifica. Όλα ήταν ενεργά έναντι διαφόρων θαλάσσιων βακτηρίων με τιμές MIC ≤ 20 μα/δίσκο. Οι Konig και Wright (1997) απομόνωσαν αντιβιοεπιστρωτικές ενώσεις από το είδος L. rigida (elatol και deschloroelatol) που αναστέλλουν την εγκατάσταση των ειδών Amphibalanus amphitrite και Bugula neritina, αλλά έδειξαν υψηλή τοξικότητα έναντι των κυπρίδων. Το ξενικό είδος L. caduciramulosa που βρέθηκε πρόσφατα στη Βραζιλία είναι επίσης γνωστό ότι παράγει ενδιαφέρουσες χημικές ενώσεις με αντιβιοεπιστρωτικές ιδιότητες (Cassano et al., 2008), ενεργές κατά της προσκόλλησης νεαρών μυδιών (Perna perna).

Δύο παλαιότερα αναφερθέντα αλογονωμένα μονοτερπένια, τα 3,7,11,15-

tetramethylhexadec-1-en-3-ol και 3,7,11,15-tetramethylhexadec-1-phyten- 3-ol, απομονώθηκαν από το Ροδοφύκος *Plocamium costatum* και ήταν εξαιρετικά δραστικά έναντι της εγκατάστασης των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* (εκχυλίσματα CH₂Cl₂, 10 έως 1 μg/cm²) (Konig et al., 1999a, b). To Isethionic acid και το φθοριδοσίδιο (Floridoside) που απομονώθηκαν από το *Grateloupia turuturu* (Simon-Colin et al., 2002, 2003) απεδείχθη (Hellio et al., 2004a) ότι αναστέλλουν την εγκατάσταση των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite*. Το Floridoside είχε το πλεονέκτημα ότι εμποδίζει την εγκατάσταση σε μη τοξικές συγκεντρώσεις (0.01 mg.ml⁻¹).

Το πολυακόρεστο λιπαρό οξύ (5Ζ, 8Ζ, 11Ζ, 14Ζ, 17Ζ) - eicosapentaenoic acid, απομονωμένο από τα *Neodilsea yendoana*, *Palmaria palmata*, *Chondrus yendoi* και *Ptilota filicina*, και η lipobetaine, (2S)-2- [(3R)-3-[(5Ζ,8Ζ,11Ζ,14Ζ,17Ζ)-5,8,11,14,17-icosapentaenoyloxy]- (8Ζ,11Ζ,14Ζ)-8,11,14-icosatrienoylamino]-5 trimethylammoniopentanoate (yendolipin) που απομονώθηκε από το *N. yendoana*, έδειξαν δραστικότητα αναστολής εγκατάστασης έναντι του πράσινου φύκους, *Monostroma oxyspermum* (Suzuki et al., 1996, Matsuo et al., 1997).

Παρόλο που οι μηχανισμοί βιοσύνθεσης των δευτερογενών μεταβολιτών στα Ροδοφύκη δεν είναι πλήρως κατανοητοί, και προτείνεται ότι προκαλούνται από τις αλογονοπεροξειδάσες (Salgado et al., 2008) και τις λακτοπεροξειδάσες (Murai et al., 1999) λόγω της παρουσίας υψηλών ποσοστών μεταβολιτών, που περιέχουν βρώμιο, χλώριο και λακτόνες (Harizani et al., 2016; MarinLit accesses on 2019; Wang et al. 2013), ο χλωροπλάστης φαίνεται να παίζει κάποιο ρόλο στη σύνθεση των δευτερογενών μεταβολιτών τους (Salgado et al., 2008). Οι δομές εντός των κυττάρων των Ροδοφυκών, που εντοπίζονται κυρίως κοντά ή στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος (Salgado et al., 2008), δρουν ως κυστίδια αποθήκευσης για δευτερογενείς μεταβολίτες βοηθώντας τα κύτταρα να αποφύγουν την αυτοτοξικότητα (ΜcKey, 1979) από τους μεταβολίτες που παράγουν. Αυτές οι υποκυτταρικές δομές μπορούν να καταλάβουν ολόκληρο το κύτταρο όπως στην περίπτωση των αδένων ή των κυψελιδικών κυττάρων (vesicle cells) (Dworjanyn et al. 1999) ή μπορούν να είναι διαθλαστικά κυστίδια όπως το corps en cerise (Salgado et al., 2008; Young et al. 1980) και τα κυστίδια που αναφέρονται ως physodes (Schoenwaelder, 2002). Ανεξάρτητα από την ενδοκυτταρική δομική μορφή, η μεταφορά και η εξωκυττάρωση των δευτερογενών μεταβολιτών είναι πολύ καλύτερα κατανοητή (Reis et al., 2013), από ότι η βιοσυνθετική τους οδός (Harizani et al., 2016; Wang et al., 2013), και φαίνεται να συμβαίνει μέσω μικροϊνών ακτίνης και εξωκυττάρωσης μεσολαβούμενης από μικροσωληνίσκους (Salgado et al., 2008). Οι μεμβρανώδεις σωληνώδεις συνδέσεις (Salgado et al., 2008) ή οι συνδετικές δομές τύπου μίσχου (Paul et al.,

2006) έχουν προταθεί ότι βοηθούν στη μεταφορά του περιεχομένου των κυστιδίων στη θαλλοειδή επιφάνεια και έτσι προκαλούν χημική άμυνα ενάντια των θαλάσσιων βακτηρίων (Paul et al., 2006; Kubanek et al., 2003) ή προκαλούν χημική έλξη για το φυτοφάγο Γαστερόποδο, *Aplysia brasiliana* (Nocchi et al., 2017). Παρά το γεγονός ότι τα αποτελέσματα από τα *in vitro* πειράματα έχουν δείξει ότι οι συγκεντρώσεις των δευτερογενών μεταβολιτών στην επιφάνεια του θαλλού, όπως του elatol (De Nys et al., 1996; Sudatti et al., 2008), είναι αρκετά χαμηλές ώστε να προκαλέσουν χημική άμυνα εναντίον των βιοεπιστρωτών, η παρουσία βρωμίου και χλωρίου σε υποκυτταρικά κυστίδια είναι επαρκώς αποδεδειγμένη ώστε να υποδηλώνει ότι μια αύξηση της βιοεπιστρωτικής πίεσης και των προγραμματισμένων γεγονότων κυτταρικού θανάτου μπορεί να προκαλέσει απελευθέρωση μεταβολιτών και ταυτόχρονα να προκαλέσει χημική άμυνα (Salgado et al., 2008).

Η κατανόηση της κατανομής των επιφανειοδραστικών μορίων των Ροδοφυκών σε σχέση με τις χημικές, βιολογικές και οικολογικές συνέπειες τους ήταν η επιδίωξη αρκετών μελετών (Steinberg & De Nys, 2002) που εστιάστηκαν είτε στη συμπεριφορά διατροφής του Γένους *Aplysia* με είδη του Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia*, και η μεταγενέστερη χρήση των δευτερογενών μεταβολιτών της *Laurencia* από αυτά (Nocchi et al., 2017) ή στην τεκμηριωμένη αποτρεπτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών μεταβολιτών της *Laurencia* έναντι των Θυσανόποδων ή άλλων θαλάσσιων ασπόνδυλων και βακτηρίων (Sudatti et al., 2008; Steinberg & De Nys, 2002; Umezawa et al., 2014).

Τα είδη των Θυσανόποδων, και ειδικά το είδος Amphibalanus amphitrite, είναι ένα από τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα ζώα προκειμένου να γίνει έλεγχος της αντιβιοεπιστρωτικής δράσης των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από τα Ροδοφύκη (Al-Lihaibi et al., 2015; Umezawa et al., 2014; Piazza et al., 2011; Sudatti et al., 2008; Clare et al., 1992). Λόγω των καθιερωμένων πρωτοκόλλων για τις βιοδοκιμές εγκατάστασης (Rittschof et al., 1984, 1992; Kotsiri et al., 2018a,b), οι κυπρίδες του *A. amphitrite* έχουν γίνει ένας υποδειγματικός οργανισμός μοντέλο για βιοδοκιμές έναντι απομονωμένων δευτερογενών μεταβολιτών, ή άλλων συνθετικών ενώσεων. Προκειμένου να εγκατασταθούν οι κυπρίδες εναποθέτουν μια πρωτεΐνη που ονομάζεται Settlement Inducing Protein Complex (SIPC), η οποία ενεργεί ως φερορμόνη προσέλκυσης για εγκατάσταση και αναπαραγωγή των άλλων ατόμων του είδους (Aldred et al., 2018; Kotsiri et al., 2018; Dreanno et al., 2006 a,b;c, 2007).

Εκτός από τη χρήση κυπρίδων *Α. amphitrite* ως βασικό μοντέλο σε δοκιμές αντιβιοεπίστρωσης, έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλοι κύριοι βιοεπιστρωτικοί οργανισμοί όπως βακτήρια, μικροφύκη, μύκητες, μακροφύκη και άλλα ασπόνδυλα ζώα (De Nys et al., 1996, Dahms et al., 2009, 2017; Briand 2009; Hellio et al., 2001).

[22]

Η παροχή εμπεριστατωμένης και αυστηρής αξιολόγησης της αντιβιοεπιστρωτικής δράσης και τοξικότητας των φυσικών ενώσεων αποτελούσε πάντοτε το κρίσιμο σημείο σε οποιαδήποτε τεκμηριωμένη προσπάθεια εντοπισμού νέων και χρήσιμων χημικών ενώσεων (Qian et al., 2015). Τέτοιες εργαστηριακές βιοδοκιμές, με δεδομένο τους περιορισμούς τους (De Nys et al., 1996), προσφέρουν ευελιξία και ευκολία αξιολόγησης όταν αρκετές διαφορετικές ενώσεις πρέπει να δοκιμαστούν σε μια ποικιλία οργανισμών (Rittschof et al., 1984). Αρκετές αξιόπιστες αναθεωρήσεις (Dahms et al., 2009; Qian et al., 2009, 2015) πρότειναν κριτήρια επιλογής και αξιολόγησης στην εξέταση πιθανών αντιβιοεπιστρωτικών ενώσεων όπως η θεραπευτική δόση, TR² > 50 (Qian et al., 2009), ωστόσο, η απουσία οποιασδήποτε συγκεκριμένης γνώσης σχετικά με τον τρόπο δράσης των αντιβιοεπιστρωτικών ενώσεων έναντι των βιοεπιστρωτικών οργανισμών (Qian et al., 2013) καθιστούν δύσκολη την «ταυτοποίηση» ενός μόνο μορίου ως ικανού να ικανοποιήσει όλα τα κριτήρια αντιβιοεπίστρωσης και τοξικότητας που έχουν προταθεί.

Με βάση αυτούς τους περιορισμούς και σύμφωνα με τα ήδη προτεινόμενα κριτήρια αξιολόγησης για τις αντιβιοεπιστρωτικές ενώσεις (Qian et al., 2009, 2015), στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής έγινε έλεγχος 25 δευτερογενών μεταβολιτών από διαφορετικά είδη *Laurencia* με σκοπό την εκτίμηση τόσο του αντιβιοεπιστρωτικού δυναμικού τους όσο και του προφίλ τοξικότητάς τους σε κυπρίδες του Θυσανόποδου *Α. amphitrite*. Εκτός από αυτούς τους μεταβολίτες, χρησιμοποιήθηκε και το διτερπένιο Βρωμοσφαιρόλη, το οποίο σύμφωνα με την βιβλιογραφία φαίνεται να είναι μια αρκετά υποσχόμενη χημική ένωση για την καταπολέμηση του φαινομένου της βιοεπίστρωσης (Piazza et al., 2011) και γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιήθηκε ως σημείο αναφοράς σε όλες τις πειραματικές δοκιμές.

Εφόσον ολοκληρώθηκαν τα αρχικά πειράματα με τις κυπρίδες κατά την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής, ήταν σημαντικό να γίνει επιλογή των χημικών ενώσεων που πληρούν ορισμένες προδιαγραφές προκειμένου να χρησιμοποιηθούν στην επόμενη πειραματική δοκιμή με το Καρκινοειδές *Artemia* spp.. Για το λόγο αυτό τηρήθηκε ένα αυστηρό πρωτόκολλο αποκλεισμού (elimination protocol) των χημικών ενώσεων έτσι ώστε να υπάρχει εξ ορθολογισμός στη χρήση των χημικών ενώσεων, μερικές από τις οποίες είναι σε περιορισμένη διαθεσιμότητα αλλά και να γίνει διαχειρίσιμη και οικονομικά βιώσιμη η ανάλυση του τεράστιου όγκου των πειραματικών δεδομένων χωρίς τη σπατάλη πόρων. Η βασικότερη παράμετρος που ελέγχθηκε πρώτα ήταν η τοξικότητα των χημικών ενώσεων, εκτιμώντας το LC₅₀

² Θεραπευτικό Λόγος (Therapeutic Ratio, TR): ο λόγος ανάμεσα στη συγκέντρωση όπου μία ουσία είναι τοξική με τη συγκέντρωση όπου η ουσία είναι δραστική (TR= LC_{50}/EC_{50}). Όσο μεγαλύτερο το TR, τόσο πιο ασφαλής είναι η ουσία.

και το TR στις κυπρίδες των Θυσανόποδων γιατί αυτοί είναι οι οργανισμοί που προκαλούν τη χειρότερη μορφή βιοεπίστρωσης. Στη συνέχεια ελέγχθηκε η ενεργότητα των μεταβολιτών έναντι της αναστολής εγκατάστασης των κυπρίδων εκτιμώντας το ΙC₅₀, έναντι της μη μεταμόρφωσης των κυπρίδων, εκτιμώντας το EC₅₀ και τέλος προκειμένου να γίνει έλεγχος της επίδρασης των χημικών ενώσεων στη συμπεριφορά των κυπρίδων εκτιμήθηκε ο λόγος IC50 / EC50. Είναι κρίσιμης σημασίας, για την κατανόηση της ερευνητικής προσέγγισης της παρούσας διατριβής, να τονιστεί ότι υπάρχει μια μεγάλης έκτασης βιβλιογραφία σχετικά με την ικανότητα χημικών ενώσεων να μεταβάλουν τη συμπεριφορά εγκατάστασης των κυπρίδων και αυτό το φαινόμενο μπορεί να μην εμφανίζεται όταν κανείς μετρά απλά το EC_{50} . Σαν συνέπεια, δεν πρέπει ποτέ να θεωρείται δεδομένο ότι μια ικανοποιητική τιμή ΕС50 αποτροπής εγκατάστασης αποτελεί ένα καλό αποτέλεσμα. Η τιμή αυτή μπορεί να είναι είτε προϊόν τοξικότητας, ή αποτέλεσμα αλλαγής της συμπεριφοράς ανίχνευσης του υποστρώματος από τις κυπρίδες, ή αποτέλεσμα μεταβολής των διαδικασιών μεταμόρφωσης αυτών των Αρθρόποδων ή τέλος μια τιμή που πραγματικά αντιπροσωπεύει αποτροπή εγκατάστασης χωρίς άλλες φυσιολογικές συνέπειες στο ζώο. Θα ήταν επιστημονικά μη αποδεκτό να εντοπιστεί και να προταθεί ως αντιβιοεπιστρωτικός παράγοντας μια χημική ένωση η οποία θα προκαλούσε φυσιολογικές και μορφολογικές αλλοιώσεις σε Αρθρόποδα λόγω παρεμβολής της στο βιολογικό μηχανισμό της μεταμόρφωσης γιατί η χρήση μιας τέτοιας χημικής ένωσης θα είχε καταστροφικές συνέπειες στο θαλάσσιο περιβάλλον. Υπό αυτό το πρίσμα, κρίθηκε ως απαραίτητη η ανάλυση της συμπεριφοράς εγκατάστασης των κυπρίδων σε συγκεκριμένες, επιλεγμένες χημικές ενώσεις.

Σε συνέχεια των πειραματικών δοκιμών, αφού μόλις 8 χημικές ενώσεις κρίθηκαν κατάλληλες για να συνεχίσουν στο επόμενο στάδιο (*iso*-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol (12), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22)) επιλέχθηκε το Καρκινοειδές *Artemia spp.*, για το οποίο κριτήριο αποκλεισμού ήταν η εκτίμηση τοξικότητας (LC₅₀) καθώς επίσης αρνητική κρίθηκε η αύξηση > 10 φορές στην τιμή EC₅₀ μεταξύ των χρονικών σημείων 24 ωρών και 48 ωρών (όπου και εάν υπήρχε). Αν και πρόκειται για έναν οργανισμό που δεν εμπλέκεται στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης, χρησιμοποιείται κατά κόρον σε πειράματα μελέτης των επιπτώσεων των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται σε υφαλοχρώματα στο περιβάλλον (Thomas & Brooks, 2010).

Έξι χημικές ενώσεις κρίθηκαν κατάλληλες για να συνεχίσουν στην επόμενη πειραματική δοκιμή έναντι του Διατόμου *Chaetoceros gracilis (*(perforenol (9), perforatone (11), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22)), με βασικό κριτήριο αποκλεισμού την εκτίμηση αναστολής του ρυθμού αύξησης των κυττάρων ενώ επίσης ο μεταβολίτης θα πρέπει να μην έχει χαμηλότερη τιμή EC₅₀ από την Βρωμοσφαιρόλη, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας της ανάπτυξης του *Chaetoceros gracilis*.

Στην επόμενη φάση των πειραματικών δοκιμών με τις κυτταρικές σειρές RTL-W1 και HEK 293 προκρίθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν μόλις τρείς μεταβολίτες (perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και neorogioldiol (19)), σε τρεις διαφορετικές δοκιμές κυτταροτοξικότητας σε μια προσπάθεια εντοπισμού πιθανών τρόπων δράσης μέσω των οποίων κάθε δευτερογενής μεταβολίτης επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, προϋπόθεση για οποιαδήποτε εφαρμογή αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών (Qian et al., 2013). Αναλυτικότερα, έγινε εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας και της μιτοχονδριακής λειτουργίας των κυττάρων με τη χρήση ρεσαζουρινης (alamar blue/resazurin). Η ρεσαζουρίνη ανάγεται από μεταβολικά ενδιάμεσα των ζωντανών κυττάρων (πχ. NADH, NADPH) και αυτή η αναγωγή συνοδεύεται από μια μετρήσιμη μετατροπή στο χρώμα δηλαδή μετατροπή από την οξειδωμένη μορφή (μη φθορίζουσα-μπλε) στην ανηγμένη μορφή (φθορίζουσα κόκκινη). Τα μιτοχόνδρια απαντώνται μόνο στα ευκαρυωτικά κύτταρα και έχουν καθοριστικό ρόλο στην παραγωγή της μεταβολικής ενέργειας. Όταν λοιπόν τα κύτταρα είναι νεκρά δε μπορούν να μειώσουν τη ρεσαζουρίνη και δεν είναι σε θέση να παράγουν σήμα φθορισμού λόγω απώλειας της μεταβολικές δραστηριότητας (O'Brien et al., 2000). Στη συνέχεια επιλέχθηκε η δοκιμασία κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) με την οποία γίνεται έμμεση ποσοτικοποίηση κυτταρικού θανάτου. Το κρυσταλλικό ιώδες έχει την ιδιότητα να προσδένεται στο DNA και στις πρωτεΐνες των κυττάρων. Ο προσδιορισμός βασίζεται στην απόσπαση των προσκολλημένων κυττάρων από πλάκες κυτταρικής καλλιέργειας κατά τη διάρκεια του κυτταρικού θανάτου. Κατά τη διάρκεια της ανάλυσης, τα μη βιώσιμα και αποσπασμένα κύτταρα χάνουν την ικανότητα πρόσδεσης τους στη δοκιμαστική πλάκα με αποτέλεσμα μετά τη διαδικασία ξεπλύματος μόνο τα ζωντανά να παραμένουν σε αυτήν και να υφίστανται χρώση (Feoktistova et al., 2016). Ως τελευταία δοκιμασία επιλέχθηκε το ουδέτερο ερυθρού (natural red) για τον προσδιορισμό της λυσοσωμικής δραστηριότητας των κυττάρων. Τα λυσοσώματα είναι οι αποικοδομητές ενδοκυτταρικού υλικού (πρωτεΐνες, νουκλεϊκά οξέα, υδατάνθρακες, λιπίδια) ενώ η αρχή αυτής της ανάλυσης βασίζεται στην ανίχνευση βιώσιμων κυττάρων μέσω της πρόσληψης της χρωστικής ουδέτερου ερυθρού. Το ουδέτερο ερυθρό εισέρχεται στα λυσοσώματα των βιώσιμων κυττάρων αφού μόνο αυτά μπορούν να προσλάβουν ουδέτερο ερυθρό μέσω ενεργού μεταφοράς και να

ενσωματώσουν τη βαφή στα λυσοσώματα τους, σε αντίθεση με τα μη βιώσιμα κύτταρα που δεν μπορούν να προσλάβουν αυτό το χρωμοφόρο. Κατά συνέπεια, μετά τη διαδικασία ξεπλύματος, τα βιώσιμα κύτταρα μπορούν να απελευθερώσουν την ενσωματωμένη χρωστική υπό συνθήκες οξινισμένης εκχύλισης. Η ποσότητα απελευθερωμένης χρωστικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του συνολικού αριθμού βιώσιμων κυττάρων ή κυτταροτοξικότητας του ουδέτερου ερυθρού (Repetto et al., 2008).

Οι κυτταρικές σειρές επιλέχθηκαν προκειμένου να γίνει μια αξιολόγηση των χημικών ενώσεων σε περίπτωση που καταλήξουν σε ανώτερους οργανισμούς μέσω της τροφικής αλυσίδας. Έτσι επιλέχθηκε η κυτταρική σειρά RTL-W1 η οποία είναι μια μη-τροποποιημένη κυτταρική σειρά προερχόμενη από το ήπαρ ιριδίζουσας πέστροφας. Το ήπαρ ως βασικό όργανο αποτοξίνωσης του οργανισμού είναι σημαντικό να έχει μια καλή απόκριση στα πειράματα τοξικότητας, ενώ η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται εκτενώς τα τελευταία χρόνια καθώς η επιστημονική κοινότητα προσπαθεί να αποφύγει τη χρήση ζωντανών οργανισμών σε πειράματα τοξικότητας (Kienzler at al., 2012). Η κυτταρική σειρά ΗΕΚ 293 προέρχεται από ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα, είναι γενετικά τροποποιημένη αλλά μη καρκινική σειρά και γι' αυτό επιλέχθηκε για τις πειραματικές μας δοκιμές. Η συγκεκριμένη κυτταρική σειρά επιλέχθηκε μετά από πολύ σκέψη και βιβλιογραφική αναζήτηση. Εδώ θα μπορούσε να διερωτηθεί κανείς γιατί είναι αναγκαίο να χρησιμοποιήσει κανείς μια ανθρώπινη κυτταρική σειρά σε πειράματα αντιβιοεπίστρωσης; Σημαντικό είναι να τονιστεί ότι η επιδιόρθωση της βιοεπίστρωσης από τα ύφαλα πλοίων γίνεται από ανθρώπους, οι οποίοι έρχονται σε άμεση επαφή με ύφαλα των πλοίων καθώς καθαρίζουν τη βιοεπίστρωση για να προχωρήσουν σε επισκευή και βαφή των υφάλων. Με το δεδομένο αυτό, θα ήταν επικίνδυνη για τη δημόσια υγεία η χρήση μια χημικής ένωσης ως αντιβιοεπιστρωτικού παράγοντα που θα ήταν ιδιαίτερα τοξική για τον άνθρωπο. Ακολουθώντας αυτό τον τρόπο σκέψης, η χρήση άλλων καρκινικών κυτταρικών σειρών κρίνεται ως άστοχη ενώ η χρήση πρωτογενών ανθρώπινων κυττάρων θα δημιουργούσε ηθικά ζητήματα πέρα από το καθαρά πρακτικό ζήτημα της ανάγκης χρήσης ενός τεράστιου αριθμού κυττάρων για τα πειράματα που έγιναν.

Τέλος, με τις ίδιες χημικές ενώσεις, αφού δεν αποδείχθηκαν τοξικές στις κυτταρικές σειρές, ολοκληρώθηκε η πειραματική διαδικασία στο εργαστήριο με πειράματα σε 5 διαφορετικά είδη θαλάσσιων βακτηρίων (*Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis, Bacillus thuringiensis, Pseudomonas putita* και *Pseudomonas pseudoalcaligenes*) τα οποία εμπλέκονται στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης. Όπως αναλύθηκε εκτενώς προηγουμένως, τα βακτήρια αποτελούν βασικό κομμάτι της

[26]

δημιουργίας της βιοεπίστρωσης επηρεάζοντας και την εξέλιξη του φαινομένου, γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να αποτελούν αναπόσπαστο κομμάτι στις αντιβιοεπιστρωτικές μελέτες.

1.4. Μελέτες πεδίου για τον υπολογισμό της αντιβιοεπιστρωτικήςενεργότητας της Βρωμοσφαιρόλης

Η λογική πίσω από όλες τις αντιβιοεπιστρωτικές μελέτες είναι η κατανόηση του φαινομένου της βιοεπίστρωσης και των μηχανισμών που την ελέγχουν, καθώς τα αποτελέσματα από μια τέτοια μελέτη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την πρόβλεψη και/ή τη συσχέτιση με τα αποτελέσματα από άλλες μελέτες που γίνονται στο πεδίο. Αυτό απαιτεί συσχέτιση μεταξύ δεδομένων από εργαστηριακές μελέτες και μελέτες πεδίου όπως αναφέρεται και σε διάφορες δημοσιεύσεις (Briand, 2009; Maximilien et al., 1998; Thompson et al., 1998; Dobretsov, 1999; Dobretsov & Qian, 2004; Dobretsov et al., 2005; Dworjanyn et al., 2006; Barbosa et al., 2007; Nylund et al., 2007). Ως παράδειγμα της αναγκαιότητας για μια τέτοια προσέγγιση, οι Nylund et al. (2007) μέτρησαν την κάλυψη φυσικής βιοεπίστρωσης σε έξι θαλάσσια είδη φυκών σε μια μελέτη πεδίου και εξέτασαν κατά πόσο το επίπεδο της βιοεπίστρωσης στα θαλάσσια φύκη στο πεδίο θα μπορούσε να προβλεφθεί μελετώντας τη δραστηριότητα των εκχυλισμάτων που πήραν από την επιφάνεια των φυκών και των εκχυλισμάτων από ολόκληρα τα κύτταρα αυτών των ειδών έναντι της εγκατάστασης δύο οικολογικά σημαντικών βιοεπιστρωτικών ειδών. Συμπέραναν ότι τα αποτελέσματα από τις δοκιμασίες εγκατάστασης με τα εκχυλίσματα από όλο το φύκος ήταν κακοί προγνωστικοί παράγοντες της αντιβιοεπίστρωσης σε σύγκριση με τα αποτελέσματα από τα επιφανειακά εκχυλίσματα. Μια άλλη μελέτη έδειξε ότι τα εργαστηριακά πειράματα εγκατάστασης των κυπρίδων του S. balanoides δεν ήταν συμβατά με τα δεδομένα εγκατάστασης από το πεδίο (Thompson et al., 1998). Μια σύγκριση της εργαστηριακής δοκιμής μυδιών με τη μέθοδο πεδίου «phytagel» (Henrikson & Pawlik, 1995) πρότεινε ότι η πρώτη ήταν μια αξιόπιστη μέθοδος για τον έλεγχο των αντιβιοεπιστρωτικών ουσιών, αν και οι αναλύσεις πεδίου αναφέρονται ως πιο ευαίσθητες για την ανίχνευση του εύρους δράσης τους (DaGama et al., 2003; Barbosa et al., 2007). Για εργαστηριακές δοκιμές που αποσκοπούν στη αξιολόγηση νέων αντιβιοεπιστρωτικών ουσιών, η κατάσταση είναι ακόμα πιο πολύπλοκη, ειδικά επειδή παράγοντες όπως ο ρυθμός απελευθέρωσης της δραστικής ουσίας εξαρτάται από τη φόρμουλα επικάλυψης, δηλαδή η χημική ένωση μπορεί να «δουλέψει» μόνο εάν η φόρμουλα επικάλυψης έχει βελτιστοποιηθεί.

Στην παρούσα μελέτη πεδίου δόθηκε έμφαση στη συμπεριφορά της Βρωμοσφαιρόλης σε σχέση με την ικανότητα παρεμπόδισης εγκατάστασης οργανισμών που ευθύνονται κυρίως για το φαινόμενο της βιοεπίστρωσης. Ο βασικός λόγος που μας οδήγησε στο σχεδιασμό των συγκεκριμένων πειραμάτων είναι η απόδειξη, σε εργαστηριακές μελέτες, της ικανής ανασταλτικής της δράσης ως προς την εγκατάσταση Θυσανόποδων (παρούσα διδακτορική διατριβή; Piazza et al., 2011) και του καλού οικοτοξικού της προφίλ, χωρίς όμως να γνωρίζουμε κάτι για τη δράση της στο πεδίο.

Στα πειράματα αυτά εκτιμήθηκε η ενεργότητα της Βρωμοσφαιρόλης σε μεταλλικές επιφάνειες (δοκίμια) ποντισμένες στη θαλάσσια περιοχή του Πειραιά (Μικρολίμανο). Εδώ να τονιστεί ότι η θαλάσσια περιοχή του Πειραιά αποτελεί μια πολύ σημαντική περιοχή πρόσβασης εμπορικών πλοίων και σκαφών αναψυχής και είναι πλούσια σε οργανικό υλικό (Siokou-Frangou et al., 2010).

Το πρώτο βήμα της διαδικασίας επικύρωσης για μια εργαστηριακή δοκιμασία περιλαμβάνει την αξιολόγηση της αξιοπιστίας της με την σύγκριση των δεδομένων για τυποποιημένα (εμπορικά) βιοκτόνα. Αυτά τα μόρια αναφοράς βοηθούν στην ερμηνεία των δεδομένων για άγνωστες ενώσεις. Πρέπει να εξεταστεί η αναφορά σε διεθνή πρότυπα (π.χ. πρότυπες μέθοδοι δοκιμών της ASTM (American Society for Testing and Materials) ή της AFNOR (Association Francaise de NORmalisation) και πρέπει να αποδειχθεί ότι τα δεδομένα τόσο από το εργαστήριο όσο και από το πεδίο μπορούν να αναπαραχθούν και να επικυρωθούν στατιστικά.

Η μεγάλη ποικιλία πιθανών θαλάσσιων βιοεπιστρωτών, και οι χημικές και φυσικές διαφορές μεταξύ των ωκεανών και των θαλασσών του πλανήτη καθιστούν τη διαδικασία επικύρωσης σε παγκόσμια κλίμακα ένα δύσκολο έργο. Οποιαδήποτε προσπάθεια προσομοίωσης αυτής της γενικής σύνθετης διαδικασίας βιοεπίστρωσης in vitro φαίνεται να είναι παράλογη. Ο Rittschof (1999) το εξέφρασε ως «θεωρητική αδυναμία». Η επικύρωση των εργαστηριακών δεδομένων εξαρτάται επίσης από την τελική χρήση, και ένας προσδιορισμός μπορεί να είναι χρήσιμος για μία εφαρμογή και όχι για μια άλλη. Για παράδειγμα, οι απαιτήσεις για τις υδατοκαλλιέργειες και τις επιστρώσεις στα ύφαλα των πλοίων είναι διαφορετικές, καθώς οι κοινωνίες οργανισμών που συμμετέχουν στη βιοεπίστρωση δεν είναι οι ίδιες, αλλά ούτε και οι συνθήκες έκθεσης, όπως η υδροδυναμική ή οι απαιτήσεις χρόνου ζωής του αντιβιοεπιστρωτικού υλικού. Ωστόσο, οι Webster et al. (2007) κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι «είναι απαραίτητη η ύπαρξη επικυρωμένων εργαστηριακών δοκιμών». Παρά ταύτα, η επιστημονική βιβλιογραφία περιέχει μόνο λίγες εργασίες που δείχνουν συσχετισμούς μεταξύ δεδομένων που λαμβάνονται από εργαστηριακές δοκιμασίες και δοκιμασίες πεδίου (Stafslien et al., 2007b; Rittschof et al., 2008).

Τα πειράματα στο πεδίο εκτελέστηκαν στα πλαίσια του έργου με τίτλο «Καινοτόμα αυτοϊάσιμα οικολογικά υφαλοχρώματα με αντιδιαβρωτική και αντιβιοεπιστρωτική δράση» (Novel Self-Healing Eco-friendly Coatings with Antifouling and Anticorrosion Properties for Maritime Applications) και κωδικό 11ΣYN 5 1274 της Δράσης «ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011» TOU Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» σε συνεργασία μεταξύ των φορέων: 1) Εργαστήριο Sol-Gel, Ινστιτούτο Προηγμένων Υλικών Φυσικοχημικών Διεργασιών Νανοτεχνολογίας & Μικροσυστημάτων, ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος, 2) Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας, ΕΚΠΑ, 3) Τομέας Ζωολογίας και Θαλάσσιας Βιολογίας, ΕΚΠΑ, 4) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, Εργαστήριο Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών, Μονάδα Νανομηχανικής και Νανοτεχνολογίας, Σχολή Χημικών Μηχανικών, 5) Wilckens Paints Factory SA, 6) ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΦΟΡΚΥΣ ΑΕ, 7) ΠΕΤΡΟΚΟΛ Α.Ε.Β.Ε Πετροκολ Ανώνυμος Βιομηχανική και Εμπορική εταιρεία Παραγωγής και Εμπορίας Χημικών Προϊόντων.

Η ειδική κατασκευή που δημιουργήθηκε για τα πειράματα πεδίου ποντίστηκε στο θαλάσσιο περιβάλλον στην περιοχή του Πειραιά (Μικρολίμανο) σε 4 χρόνους, με έναρξη στις 14 Φλεβάρη του 2014. Με τα πειράματα έγινε εξαγωγή ενός μεγάλου όγκου δεδομένων σχετικά με την προτίμηση εγκατάστασης διαφορετικών ειδών οργανισμών στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν. Συμπερασματικά, όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ακόμη και οι αρνητικοί μάρτυρες εμφάνισαν βιοφίλμ προκαρυωτικών οργανισμών μέσα σε ένα μήνα από την εφαρμογή τους στο πεδίο, ενώ στα περισσότερα δοκίμια είχαμε την παρουσία μακρο-οργανισμών που είναι χαρακτηριστικοί του φαινομένου της βιοεπίστρωσης.

1.5 Κύκλος ζωής του Θυσανόποδου *Α. amphitrite* και ο ρόλος της πρωτεΐνης SIPC (Settlement-Inducing Protein Complex)

Όπως έχει αναφερθεί εκτενώς στις προηγούμενες ενότητες, το φαινόμενο της βιοεπίστρωσης στο θαλάσσιο περιβάλλον, προκαλεί ποικίλα προβλήματα τόσο σε ναυτιλιακές επιχειρήσεις, όσο και στο ίδιο το περιβάλλον. Ένας από τους κύριους οργανισμούς που συμμετέχει στο φαινόμενο αυτό είναι το Θυσανόποδο *Amphibalanus amphitrite*.

Ο κύκλος ζωής του *Α. amphitrite* αποτελείται δύο φάσεις, την προνυμφική φάση η οποία είναι πλαγκτονική και περιλαμβάνει 6 αναπτυξιακά στάδια ναυπλίου (ναύπλιος Ι, ΙΙ, ΙΙΙ, ΙV, V, VI)

και то στάδιο της κυπρίδας, και τη βενθική φάση κατά την οποία το οίαασ άτομο ωριμάζει (Aldred & Clare, 2008) (Εικόνα 1.4). Η μετάβαση από την πλαγκτονική στην βενθική φάση ξεκινάει με εγκατάσταση тпу της κυπρίδας, ενώ αποτελεί το πιο κρίσιμο σημείο του κύκλου ζωής των οργανισμών αυτών (Raimondi, 1988).



Εικόνα 1.4 Κύκλος ζωής του θυσανόποδου A. amphitrite

Οι ναύπλιοι, τρέφονται με πλαγκτονικούς οργανισμούς και παρουσιάζουν θετικό φωτοτροπισμό, ενώ η μεταμόρφωση τους από το ένα στάδιο στο επόμενο, συνοδεύεται από μια μία έκδυση με τελικό στάδιο τη μεταμόρφωση τους σε κυπρίδα. Συνολικά η πλαγκτονική προνυμφική φάση μπορεί να διαρκέσει από 4 έως 18 ημέρες (Anil et al., 1995),. Στο στάδιο της κυπρίδας, ο οργανισμός παύει να τρέφεται και η συμπεριφορά του χαρακτηρίζεται από έντονη αναζήτηση και εξερεύνηση υποστρωμάτων, προκειμένου να προσκολληθεί και να εγκατασταθεί, ώστε να μεταμορφωθεί σε ενήλικο άτομο (Aldred & Clare, 2008). Η αποίκηση των επιφανειών από τα Θυσανόποδα εξαρτάται τόσο από τις περιβαλλοντικές συνθήκες όσο και από μορφολογικά και χημικά χαρακτηριστικά της επιφάνειας. Ακρογωνιαίος λίθος στην ευρεία αποίκηση των Θυσανόποδων θεωρείται ότι αποτελεί η πρωτεΐνη Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) η οποία εκκρίνεται κατά την εξερεύνηση στατικών επιφανειών από τις κυπρίδες συμβάλλοντας στη διαδικασία εύρεσης του κατάλληλου υποστρώματος προς εγκατάσταση (Dreanno et al., 2006a). Τα Θυσανόποδα σχηματίζουν αποικίες, ενώ παρότι ερμαφρόδιτα αναπαράγονται εγγενώς. Η παρουσία ενός άλλου ατόμου του ίδιου είδους σε κοντινή απόσταση επιτρέπει στα εδραία ενήλικα να χρησιμοποιήσουν τα γεννητικά τους όργανα. Επομένως, η SIPC μπορεί να θεωρηθεί ότι παίζει το ρόλο φερορμόνης για την προσέλκυση ατόμων του ίδιου είδους (Matsumura et al., 1998; Dreanno et al., 2006c).

1.5.1 Η πρωτεΐνη που επάγει την εγκατάσταση της κυπρίδας στα Θυσανόποδα (Settlement-Inducing Protein Complex, SIPC)

Οι αρχικές έρευνες για τον χαρακτηρισμό του μοριακού αποτυπώματος της SIPC έδειξαν ότι πρόκειται για μια επιδερμική πρωτεΐνη, ενώ έρευνες που επικεντρώθηκαν στο είδος *S. balanoides* έδειξαν ότι το μοριακό αποτύπωμα είναι μια υδατοδιαλυτή γλυκοπρωτεΐνη που εντοπίζεται στην επιδερμίδα των ενήλικων ατόμων και ενεργοποιείται κατά την απορρόφησή της από το υπόστρωμα (Crisp & Meadows, 1963). Ο Knight-Jones (1953) έδειξε πως το μοριακό αποτύπωμα ανιχνεύεται από τις κυπρίδες κατά την επαφή με τα ενήλικα άτομα μέσω επαφής.

Η πρωτεΐνη SIPC που επάγει την εγκατάσταση της κυπρίδας στα Θυσανόποδα συμμετέχει στην ευρεία αποίκηση των Θυσανόποδων και συμβάλλει στη συμμετοχή τους στη βιοεπίστρωση. Εμφανίζει 30% ομολογία σε επίπεδο αλληλουχίας με την οικογένεια πρωτεΐνών που διαθέτουν θειοεστέρες (Thioestercontaining proteins, TEPs), η οποία περιλαμβάνει τις α-2-μακροσφαιρίνες. Το cDNA (5.2 kb) της SIPC κωδικοποιεί για μια πρόδρομη πρωτεΐνη 1547 αμινοξέων και φέρει σηματοδοτικό πεπτίδιο έκκρισης 17 αμινοξέων. Πολυάριθμα δομικά χαρακτηριστικά της SIPC, καθώς και η απουσία θειοεστερικού δεσμού υποδηλώνουν πως αυτή η πρωτεΐνη μάλλον εξελίχθηκε από προγονικό γονίδιο συγγενικό της α-2μακροσφαιρίνης. Παρόλο που η SIPC αποτελεί το κύριο σήμα που αναγνωρίζεται από τις κυπρίδες κατά την αποίκηση, εκφράζεται επίσης από τους ναύπλιους και τα νεαρά εδραία άτομα. Πειράματα έχουν ποσοτικοποιήσει την παρουσία της πρωτεΐνης SIPC σε ποσότητα 43,5 μg ανά Θυσανόποδο (Dreanno et al., 2006c).

1.5.2 Η δομή της SIPC

Η πρωτεΐνη SIPC έχει ανιχνευτεί με ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE όπου παρουσιάζεται ως τρεις κύριες ζώνες διαφορετικής μοριακής μάζας 76-, 88-, και 98kDa (Matsumura et al., 1998a). Από αυτά τα κομμάτια, τα θραύσματα των 88- και 98-kDa προέρχονται από το N-τελικό άκρο της πρωτεΐνης SIPC, ενώ το θραύσμα των 76-kDa προέρχεται από το C-τελικό άκρο (Matsumura et al., 1998b). Περαιτέρω πειράματα έχουν δείξει ότι αυτά τα κομμάτια διαθέτουν κοινούς επίτοπους (Matsumura et al., 1998b), καθώς επίσης κάθε κομμάτι από μόνο του επάγει την αποίκηση, που σημαίνει ότι κάθε ένα από τα κομμάτια είναι τόσο ενεργό όσο και ολόκληρο το μόριο της SIPC (Matsumura et al., 1998a). Επιπλέον μελέτες έχουν δείξει πως τα συγκεκριμένα θραύσματα διαφορετικού μοριακού βάρους παρουσιάζουν σημαντική ομολογία με μέλη της οικογένειας των α-2-μακροσφαιρινών, των πρωτεϊνών TEP των εντόμων, καθώς και της οικογένειας των παραγόντων του συμπληρώματος (Dreanno et al., 2006c).

Εξαιρώντας πιθανές μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις, το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης SIPC εκτιμάται πως είναι 170 kDa. Σύμφωνα με τη βιοπληροφορική ανάλυση της αλληλουχίας SIPC από την Kotsiri et al. (2018) φαίνεται ότι υπάρχουν αρκετές πιθανές θέσεις N-συνδεδεμένων και Ο-συνδεδεμένων γλυκοζυλιώσεων στη SIPC ενώ με βάση το υπολογισμένο μοριακό βάρος των μικρότερων χιμαιρικών μορίων της SIPC και τις δοκιμές απογλυκοζυλίωσης, οι πιθανές θέσεις των N-συνδεδεμένων γλυκοζυλιώσεων, που εντοπίζονται στο καρβοξυτελικό άκρο της SIPC, φαίνεται να μην είναι γλυκοζυλιωμένες (Kotsiri et al.; 2018).

1.5.3 Έκφραση της πρωτεΐνης SIPC και η χρήση της μεθοδολογίας ανοσοαποτύπωσης πρωτεΐνών για την μελέτη της συμπεριφοράς εξερεύνησης του υποστρώματος από τις κυπρίδες.

Η πρωτεΐνη SIPC ανιχνεύεται πρώτα στο ναυπλιϊκό στάδιο VI, με τη μέγιστη συγκέντρωση να παρατηρείται στο ενήλικο άτομο (Dreanno et al., 2006a). Άλλες μελέτες έχουν δείξει πως συγκεκριμένα το κομμάτι των 76-kDa ανιχνεύεται σε όλα τα στάδια του ναυπλίου και αυξάνεται σε έκφραση αυξανόμενου του σταδίου του ναυπλίου, ενώ εκφράζεται σε μέγιστο βαθμό στο στάδιο της κυπρίδας (Matsumura et al., 1998b).

Η SIPC εκφράζεται στο κέλυφος του *Α. amphitrite,* στην αιμολέμφο (Dreanno et al., 2006a) καθώς και σε άλλες περιοχές όπως στο σώμα, στις ωοθήκες και σε

[32]

μάζες αυγών (Matsumura et al., 1998b). Πιο συγκεκριμένα, στα στάδια του ναυπλίου η SIPC εκφράζεται στη περιοχή του στόματος, στις κεραίες, στις γνάθους και στην οπίσθια περιοχή του σώματος. Στις κυπρίδες, η πρωτεΐνη εντοπίζεται στην επιδερμίδα που περιβάλλει το κέλυφος, τα θωρακοπόδια και το σύνθετο οφθαλμό (Matsumura et al., 1998b). Η SIPC μπορεί να απελευθερώνεται από πόρους μετωπιαίου προεξέχοντος εξαρτήματος και από πόρους του κελύφους. Με αυτό τον τρόπο, όταν οι κυπρίδες εξερευνούν το περιβάλλον τους, οι πόροι του προεξέχοντος εξαρτήματος και στα φή με επιφάνειες και ίσως να εναποθέτουν τη SIPC πάνω σε αυτές (Zhang 2016). Τέλος, στα ενήλικα άτομα η SIPC εντοπίζεται στην επιδερμίδα του θύσανου, του οργάνου αναπαραγωγής και στο οπίσθιο μέρος του σώματος (Matsumura et al., 1998b).

Οι κυπρίδες κατά την ανίχνευση ενός υποστρώματος αφήνουν μέσω των κεραιών τους, και συγκεκριμένα των βαδιστικών τους ποδίσκων, πρωτεϊνικά αποτυπώματα/ίχνη της SIPC (footprints), τα οποία μπορούν να εμφανιστούν μετά από χρώση με κυανό του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue) (Walker & Yule, 1984). Όταν ένα υπόστρωμα είναι ελκυστικό για τις κυπρίδες εξερευνάται περισσότερο συγκριτικά με ένα λιγότερο ελκυστικό αποκτώντας αντίστοιχα περισσότερα αποτυπώματα. Με αυτό το θετικό ερέθισμα, οι κυπρίδες προσελκύουν τα άλλα άτομα του ίδιου είδους για εγκατάσταση στο υπόστρωμα με τα περισσότερα αποτυπώματα (Yule & Walker, 1985; Clare et al., 1994). Επομένως, οι εναποθέσεις των κυπρίδων αποτελούν μέρος του σταδίου της προσωρινής προσκόλλησης αλλά έχουν και μια δεύτερη λειτουργία, αυτή του χημικού σήματος με σκοπό την πρόκληση εγκατάστασης από συγγενικά άτομα (Clare et al., 1994).

Μια σειρά από έρευνες έχουν δείξει ότι η εναπόθεση της SIPC μπορεί να είναι ένας αξιόπιστος μάρτυρας τόσο για την καταλληλόλητα του υποστρώματος για την εγκατάσταση των κυπρίδων όσο και για τις φυσικο-χημικές ιδιότητες του υποστρώματος αυτού (Dreanno et al., 2006b). Πηγαίνοντας ένα βήμα παραπέρα αυτές τις έρευνες, στην παρούσα διδακτορική διατριβή δημιουργήσαμε ένα πρωτόκολλο μελέτης τη συμπεριφορά των κυπρίδων κατά τη διαδικασία εναπόθεσης της SIPC παρουσία χημικών ενώσεων, συμβάλλοντας σημαντικά στο τρόπο αξιολόγησης χημικών ενώσεων που πιθανά να χρησιμοποιηθούν στο μέλλον ως αντιβιοεπιστρωτικοί παράγοντες.

[33]

1.6 Μελέτη συμπεριφοράς των κυπρίδων του Θυσανόποδου *Α. amphitrite* κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών

Πρωταρχικό βήμα για τη μελέτη της συμπεριφοράς των κυπρίδων παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών, ήταν η ποιοτική και η ποσοτική εκτίμηση της πρωτεΐνης SIPC σε εκχυλίσματα από διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια του Θυσανόποδου *Α. amphitrite*, με τη χρήση αρχικά ενός πολυκλωνικού και σε συνέχεια ενός μονοκλωνικού αντισώματος. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν η μεθοδολογία ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών καθώς και η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA).

Η ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος ELISA είναι μια ανοσολογική μέθοδος, η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για την μέτρηση αντισωμάτων, αντιγόνων και πρωτεϊνών σε βιολογικά δείγματα. Οι δοκιμές ELISA πραγματοποιούνται σε κατάλληλα πιάτα με 96 οπές, κάτι που επιτρέπει τη μέτρηση πολλών δειγμάτων σε ένα μόνο πείραμα. Τα πιάτα που χρησιμοποιούνται στις δοκιμές ELISA είναι ειδικά προσροφητικά πιάτα, έτσι ώστε να εξασφαλίζεται ότι το αντίσωμα ή το αντιγόνο θα κολλήσει στην επιφάνεια κάθε πηγαδιού. Υπάρχουν διάφορα είδη μεθόδων ELISA (άμεση, έμμεση, sandwich κτλ.), αλλά στη συγκεκριμένη μελέτη ακολουθήθηκε η ανταγωνιστική μέθοδος ELISA.

Με αυτό τον τρόπο έχουμε την ευκαιρία να μελετήσουμε περαιτέρω τη συμβολή των Θυσανόποδων στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης, ενώ κάτι τέτοιο θα μπορούσε να φανεί χρήσιμο στην ανάπτυξη βιολογικών υφαλοχρωμάτων, χωρίς να επηρεάζουν την επιβίωση οργανισμών όπως τα Θυσανόποδα.

[34]

1.7 Στόχος Διδακτορικής Διατριβής

Με βάση τις παραπάνω ενότητες, στόχος της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι ο εντοπισμός μιας ή περισσότερων χημικών ενώσεων, που έχουν απομονωθεί από θαλάσσιους οργανισμούς, με αντιβιοεπιστρωτική δράση ενάντια σε θαλάσσιους οργανισμούς που προκαλούν βιοεπίστρωση, έχοντας ταυτόχρονα ένα συμβατό οικοτοξικό προφίλ. Παράλληλα έγιναν δοκιμές στο πεδίο ενώ στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά των κυπρίδων του Θυσανόποδου *Α. amphitrite* παρουσία χημικών ενώσεων, αφού πρώτα αποδείχθηκε στις πειραματικές δοκιμές η αντιβιοεπιστρωτική τους δράση.

Οι οργανισμοί που χρησιμοποιήθηκαν για αυτά τα πειράματα, τα οποία διεξήχθησαν στο εργαστήριο, στο σύνολο τους αποτελούν μοντέλα οργανισμούς για πειράματα μελέτης τοξικότητας χημικών ενώσεων. Όπως αναλύθηκε εκτεταμένα προηγουμένως, τα βακτήρια και τα Διάτομα παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της βιοεπίστρωσης, ενώ τα Θυσανόποδα είναι μια κατηγορία οργανισμών που πλήττει ιδιαίτερα τα ύφαλα των πλοίων. Το Καρκινοειδές *Artemia spp.* επιλέχθηκε συμπληρωματικά, καθώς πρόκειται για έναν πολύ σημαντικό μοντέλο οργανισμό που χρησιμοποιείται κατά κόρον σε πειράματα τοξικότητας, ενώ παράλληλα ήταν και βασική τροφή των καλλιεργειών ώριμων θυσανόποδων που διατηρούνταν στο εργαστήριο. Τέλος οι δυο κυτταρικές σειρές επιλέχθηκαν προκειμένου να γίνει μελέτη επίδρασης των χημικών ενώσεων σε ανώτερους οργανισμούς στους οποίους πιθανά να κατέληγαν μέσω της τροφικής αλυσίδας αν γινόταν απελευθέρωση τους στο περιβάλλον. Ειδικότερα η χρήση κυτταρικής σειράς ψαριών είναι μια καινοτόμος μέθοδος, καθώς τα τελευταία χρόνια η επιστημονική κοινότητα,

Παράλληλα με τις δοκιμές στο εργαστήριο έγιναν και δοκιμές στο πεδίο με τη χρήση της Βρωμοσφαιρόλης, ενός διτερπενίου με αποδεδειγμένη αντιβιοεπιστρωτική δράση. Η διεξαγωγή πειραμάτων στο πεδίο είναι σημαντική καθώς μπορούν να προκύψουν αξιόλογες πληροφορίες για την κατανόηση του φαινομένου της βιοεπίστρωσης και των μηχανισμών που την ελέγχουν. Πρέπει να τονιστεί εδώ ότι τα πειράματα αυτά πραγματοποιούνται σε πραγματικές, πολυσύνθετες περιβαλλοντικές συνθήκες, με τη συμμετοχή πληθώρας διαφορετικών θαλάσσιων οργανισμών, κάτι το οποίο δε μπορεί να γίνει στα πειράματα του εργαστηρίου. Άρα τέτοιου είδους πειράματα είναι εξαιρετικά σημαντικά καθώς μας δίνουν πληροφορίες για τη δράση μια χημικής ένωσης σε πραγματικές συνθήκες.

Τέλος, μετά την ολοκλήρωση των πειραματικών δοκιμών στο εργαστήριο

[35]

αλλά και στο πεδίο, ακολούθησε η μελέτη της συμπεριφοράς των κυπρίδων του Θυσανόποδου *A.amphitrite* παρουσία συγκεκριμένων χημικών ενώσεων, αφού πρώτα είχε αποδειχθεί, στις πειραματικές δοκιμές, η αντιβιοεπιστρωτική τους δράση. Η συμπεριφορά των κυπρίδων μελετάται ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια από την επιστημονική κοινότητα, προκειμένου να βρεθεί ένας φιλικός τρόπος αποφυγής της εγκατάστασης τους στα ύφαλα των πλοίων, και όχι μόνο. Είναι λοιπόν σημαντική η συμβολή της παρούσας διδακτορικής διατριβής στην ανάπτυξη μεθοδολογίας αξιολόγησης της συμπεριφοράς των οργανισμών που προκαλούν βιοεπίστρωση υπό την παρουσία αντιβιοεπιστρωτικών χημικών ενώσεων.

Κεφάλαιο 2

Υλικά & Μέθοδοι

2.1 Εκχύλιση και απομόνωση των μεταβολιτών

Η εκχύλιση και απομόνωση των ενώσεων έγινε από το Τμήμα Φαρμακευτικής του ΕΚΠΑ στον Τομέα Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων. Οι ενώσεις laurene, debromoallolaurinterol acetate, allolaurinterol acetate, filiformin, τρία διτερπένια της οικογένειας dactylomelane και graciosallene απομονώθηκαν από το Γαστερόποδο Aplysia depilans Gmelin, 1791 (Gastropoda: Heterobranchia: Aplysiida: Aplysiidae, (MolluscaBase, 2019), του οποίου η συλλογή έγινε στη Σκύρο (Ελλάδα), σε βάθος 2-4 m, τον Αύγουστο του 2011 (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016). Το Σεπτέμβριο του 2011 στο νησί της Τήνου και σε βάθος 0,5-2 m, έγινε η συλλογή του Ροδοφύκους Laurencia microcladia, από το οποίο απομονώθηκαν οι ενώσεις isolaurenisol και obtusenol (περιοχή Αγ. Κυριακής), και του Laurencia obtuse από το οποίο απομονώθηκαν οι ενώσεις iso-laurenisol, obtusallene Ι, και chondrioallene (Harizani, 2013). Τον Μάιο του 2014 στην Κεφαλονιά (περιοχή κόλπος Βάτσα) σε βάθος 0,5-2 m έγινε συλλογή του είδους Laurencia glandulifera από το οποίο απομονώθηκαν οι ενώσεις laurinterol, epibrasilenol, 4-hydroxy-5-brasilene, neorogioldiol, O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol kaulaurencienyne (Konidaris, 2015). Οι ενώσεις perforenol, perforenone A, perforatone, obtusenol και 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene απομονώθηκαν από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους Laurencia (Laurencia sp.), τα οποία συλλέχθηκαν στον κόλπο της Πρέβεζας τον Ιούλιο του 2010 σε βάθος 2-3 m (Giannaropoulou, 2013). Η ένωση deoxyparguerol 16-acetate απομονώθηκε τον Ιανουάριο του 2008 από το Γαστερόποδο Aplysia fasciata, το οποίο συλλέχθηκε στον κόλπο του Alfacs, Delta de l'Ebre, Tarragona (Ισπανία), σε βάθος 1–1,5 m, (Ioannou et al., 2009). Τέλος, η ένωση (3E)-laurenyne απομονώθηκε από το Ροδοφύκος Laurencia chondrioides, το οποίο συλλέχθηκε στους Αγ. Θεοδώρους (Κεφαλονιά) σε βάθος 1–2 m, τον Αύγουστο του 2010 (Kokkotou et al., 2014).

Οι μεταβολίτες σύμφωνα με τα φυσικά και φασματοφωτομετρικά χαρακτηριστικά τους και σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία αναγνωρίστηκαν ως: laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), *iso*-laurenisol (4),filiformin (5), laurinterol (6), epibrasilenol (7), 4-hydroxy-5-brasilene (8), perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12), obtusenol (13), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), deoxyparguerol 16-acetate (15), τρία διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (16–18), neorogioldiol (19), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (20), *(3E)*-laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene I (24), και chondrioallene (25).

2.2 Συλλογή ατόμων A. amphitrite

Η συλλογή ενήλικων ατόμων του είδους A. amphitrite (Cirripedia, Balanidae) έγινε από προβλήτες στη περιοχή του Μικρολίμανου και του Φλοίσβου (Αθήνα). Τα ζώα μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του εργαστηρίου καθαρίστηκαν από επιβιωτές με μια μαλακή βούρτσα και αφού έγινε η αναγνώριση του είδους τοποθετήθηκαν σε γυάλινα ενυδρεία (20 L) με 200 μm-φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό στους 27 °C και με φωτοπερίοδο 12:12 Η:Ν (Ημέρα/Νύχτα). Ως καθημερινή τροφή των Θυσανόποδων χρησιμοποιήθηκαν ναύπλιοι Artemia sp. St.I (Ομοταξία: Branchiopoda) και κύτταρα του Διατόμου Skeletonema costatum (Ομοταξία: Bacillariophyceae), σε συγκέντρωση 6,2 x 10⁴ κύτταρα/ml), ενώ αλλαγές νερού γίνονταν κάθε δεύτερη μέρα. Τα ώριμα Θυσανόποδα, προκειμένου να απελευθερώσουν τους ναύπλιους, υπόκειντο σε στρες, συνήθως με έκθεση στον αέρα για 24 ώρες ή τοποθέτηση σε γλυκό νερό για περίπου 5 ώρες. Ύστερα επανατοποθετούνταν σε θαλασσινό νερό με θερμοστάτη στους 26-27 °C, με αεραντλία σε χαμηλή ένταση και με λίγη τροφή Chaetoceros gracilis (Διάτομο). Το ενυδρείο τοποθετούνταν σε σκοτεινό δωμάτιο με φωτεινή πηγή (λάμπα) ακριβώς δίπλα του προκειμένου να συγκεντρωθούν οι ναύπλιοι και να συλλεχθούν με τη βοήθεια πιπέττας Pasteur. Μετά τη συλλογή τους οι ναύπλιοι τοποθετούνταν σε γυάλινα ποτήρια ζέσεων 2 ή 3 L με 0,7 μm GF/F (Whatman)-φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό σε πυκνότητα περίπου 1-2 άτομα/ml με πολύ χαμηλό αερισμό. Η συντήρηση τους γινόταν στους 27 °C, με φωτοπερίοδο 12:12 Η:Ν και ως καθημερινή τροφή κύτταρα του Διατόμου Chaetoceros gracilis (Ομοταξία: Bacillariophyceae) σε συγκέντρωση 2×10⁵ κύτταρα/ml. Ακολουθώντας αυτές τις συνθήκες οι ναύπλιοι μεταμορφώνονταν σε κυπρίδες σε 5 ημέρες περίπου. Προτού να χρησιμοποιηθούν σε πειράματα οι κυπρίδες συλλέγονταν με τη βοήθεια πιπέττας Pasteur και τοποθετούνταν στο ψυγείο στους 4 °C για μία ημέρα. Στα πειράματα εγκατάστασης χρησιμοποιούνταν μόνο οι κυπρίδες που είχαν έντονη κινητικότητα και είχαν στο σώμα τους κύστες ελαίου, ως ένδειξη ότι έχουν επαρκή ενεργειακά αποθέματα.

2.3 Βιοδοκιμές εγκατάστασης του είδους A. amphitrite

Για τα πειράματα αυτά τοποθετήθηκαν 10 κυπρίδες/οπή σε αποστειρωμένες πλάκες πολυστυρενίου 24 οπών (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) σε 2 ml τεχνητού θαλασσινού νερού/οπή (ASW), αλατότητας 25‰, зų διάφορες συγκεντρώσεις (0,01, 0,1, 1, 10, 100 μΜ) των δευτερογενών μεταβολιτών (Πίνακας 3.1). Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα (ν=120 κυπρίδες/μεταβολίτη). Τα διαλύματα των μεταβολιτών ήταν σε καθαρή μεθανόλη (MeOH) (Scharlab, Barcelona, Spain) και οι αραιώσεις γινόντουσαν σε 0,7 μm (GF/F, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) φιλτραρισμένο θαλασσινό νερό έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση της μεθανόλης στο διάλυμα να είναι 2,5%. Στη συνέχεια οι πλάκες καλύπτονταν με Parafilm[®] για την αποφυγή εξάτμισης και τοποθετούνταν για επώαση στους 25 °C χωρίς φως για 3 ημέρες. Η συμπεριφορά των ζώων καταγράφονταν κάθε μέρα για 3 συνεχόμενες ημέρες, με τη βοήθεια στερεοσκοπίου. Οι κυπρίδες που είχαν εκτεταμένα τα θωρακοπόδια τους ή δεν κουνιόντουσαν καθόλου μετά από όχληση με τη χρήση μυτερής αιχμής, καταγράφονταν ως νεκρές (Mortality). Τα άτομα που είχαν μεταμορφωθεί και εγκατασταθεί αναφέρονται ως εγκατεστημένα (Settlement). Τα υπόλοιπα καταγράφονταν ως «μη μεταμορφωμένα» (No metamorphosis) δηλαδή αυτά που στο τέλος του πειράματος ήταν ζωντανά αλλά ακόμα με τη μορφή κυπρίδας. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως ποσοστό ατόμων που εγκαταστάθηκαν, ή «μη μεταμορφωμένων» ατόμων ή νεκρών ατόμων, από το συνολικό αριθμό κυπρίδων/οπή. Από τα πειράματα αυτά υπολογίστηκαν οι τιμές 50% παρεμπόδισης της μεταμόρφωσης (EC₅₀) της εγκατάστασης (IC₅₀) και της θνησιμότητας (LC₅₀).

2.4 Πειράματα τοξικότητας έναντι του είδους Artemia sp.

Τα πειράματα βραχυπρόθεσμης τοξικότητας με τους ναυπλίους Artemia sp. (Carballo et al., 2002; Vanhaecke et al., 1981) έγιναν με σκοπό τον προσδιορισμό της τοξικότητας των δευτερογενών μεταβολιτών. Η εκκόλαψη των αυγών της Artemia sp. πραγματοποιήθηκε σε τεχνητό θαλασσινό νερό (ASW, 35 ‰) χρησιμοποιώντας 0,5 γρ. αυγών του είδους. Αρχικά τα αυγά του είδους τοποθετούνται σε κωνική φιάλη με 1,5 L γλυκό νερό. Προστίθεται πέτρα αερισμού για έντονο αερισμό και για περίπου 1- 1,5 ώρα. Αυτή είναι η φάση της ενυδάτωσης. Στη συνέχεια η αερόπετρα αφαιρείται, και το περιεχόμενο της κωνικής φιάλης διηθείται σε δίχτυ 44 μm. Όλα τα αυγά μεταφέρονται σε κωνική φιάλη που περιέχει 70 ml χλωρίνη και 0,6 ml NaOH (32%). Σε

αυτό το σημείο ξεκινάει η φάση της αποκελύφωσης. Τα αυγά βρίσκονται μέσα στην κωνική φιάλη και αναδεύονται με το χέρι ώσπου το διάλυμα να πάρει ένα πορτοκαλί χρώμα. Η διαδικασία της αποκελύφωσης είναι μια σειρά εξώθερμων χημικών αντιδράσεων. Κατά τη διάρκεια της παρατηρούμε συνεχώς την αύξηση της θερμοκρασίας του νερού. Τέλος τα αυγά πάλι διηθούνται σε δίχτυ (44 μm) και ξεπλένονται πολύ καλά με γλυκό νερό προκείμενου να απομακρυνθούν τα υπολείμματα χλωρίνης. Ακολουθεί μεταφορά τους σε κωνική φιάλη, που περιέχει 1,5 L θαλασσινό νερό 38,5‰ ± 0,5, αποστειρωμένο και διηθημένο και μια αερόπετρα για να διατηρεί τα αυγά σε κίνηση. Η φιάλη τοποθετείται στους 23 °C με φωτοπερίοδο 15:9 Η:Ν για μια μέρα. Μετά από 24 ώρες γίνεται η συλλογή των ναυπλίων.

Οι δοκιμασίες τοξικότητας διεξήχθησαν σε 3 ανεξάρτητα πειράματα σε αποστειρωμένες πλάκες πολυστυρενίου 24 οπών (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) με 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση (0,01, 0,1, 1, 10, 100 μM) ανά πείραμα. Δέκα ναύπλιοι/οπή (v=120 ναύπλιοι *Artemia sp./*μεταβολίτη) μεταφέρθηκαν με πιπέττα Pasteur στις πλάκες ενώ κάθε οπή περιείχε 2 ml τεχνητό θαλασσινό νερό και 50 μl διάλυμα μεθανόλης-μεταβολίτη. Οι δοκιμές ελέγχου έγιναν με 50 μl μεθανόλη. Οι πλάκες επωάστηκαν στο σκοτάδι στους 25 ± 1 °C για 48 ώρες. Η αξιολόγηση της θνησιμότητας γινόταν καθημερινά καταγράφοντας τον αριθμό των ατόμων χωρίς μετακίνηση των σωματικών τους εξαρτημάτων μέσα σε 10 δευτερόλεπτα και εκφράζεται ως ποσοστό του συνολικού αριθμού των αξιολογηθέντων ατόμων για κάθε συγκέντρωση.

2.5 Πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου Chaetoceros gracilis

Chaetoceros То Διάτομο gracilis Schütt (στέλεχος CCMP1315) καλλιεργούνταν σε αποστειρωμένο τεχνητό θαλασσινό νερό με θρεπτικό διάλυμα F\2 (βλέπε ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) το οποίο περιέχει τα απαραίτητα ιχνοστοιχεία, μέταλλα και βιταμίνες (Guikkard & Ryther, 1962; Smith et al., 1993). Το μικροφύκος καλλιεργούνταν σε 100 ml θρεπτικό στους 27 °C με αερισμό. Η πυκνότητα των κυττάρων παρακολουθούνταν καθημερινά ενώ για τα πειράματα χρησιμοποιούνταν καλλιέργεια με πυκνότητα >1x10⁵ κύτταρα/ml. Προκειμένου να διαπιστωθεί η τοξικότητα των δευτερογενών μεταβολιτών, ύστερα από 96 ώρες, δείγματα των 0,9 ml από κάθε συγκέντρωση αναμειγνύονταν με 0,1 ml Lugol έτσι ώστε να γίνει καταμέτρηση της πυκνότητας του πληθυσμού. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση (0,01, 0,1, 1, 10, 100 μΜ) ανά πείραμα και θεωρούνταν επιτυχή εφόσον ο πληθυσμός στο μάρτυρα μετά τις 96 ώρες ήταν ≧

2 x10⁵ κύτταρα/ml. Ο προσδιορισμός του ποσοστού αναστολής αύξησης (EC₅₀) του πληθυσμού γίνεται από τη μέση τιμή κυττάρων για κάθε συγκέντρωση.

2.6 Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1

Η RTL-W1 κυτταρική σειρά είναι μια μη-τροποποιημένη κυτταρική σειρά προερχόμενη από το ήπαρ ιριδίζουσας πέστροφας, η οποία μάλιστα έχει ήδη χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε πειράματα τοξικότητας (Kienzler at al., 2012). Η κυτταρική σειρά δημιουργήθηκε από το ήπαρ ενός ενήλικου ατόμου ιριδίζουσας πέστροφας με πρωτεολυτική διάσπαση τμημάτων του ήπατος (Lee et al., 1993). Τα κύτταρα RTL-W1 καλλιεργήθηκαν σε φλάσκες καλλιέργειας των 75 cm² (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) στους 20 °C σε θρεπτικό μέσο Leibovitz (L-15, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) συμπληρωμένο με 5% εμβρυικό βόειο ορό (FBS) και 1% L-γλουταμίνη, σε επωαστήρα χωρίς CO₂. Για τα πειράματα προσδιορισμού της κυτταροτοξικότητας διαφόρων συγκεντρώσεων, των προηγουμένως, δοκιμασμένων δευτερογενών μεταβολιτών, τα κύτταρα τοποθετήθηκαν σε πυκνότητα 3 x 10⁴ κύτταρα/οπή σε πλάκα ιστοκαλλιέργειας 96 οπών (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) σε 100 μl θρεπτικού μέσου καλλιέργειας/οπή για δύο ημέρες πριν από την έναρξη των πειραμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα κυτταροτοξικότητας:

1) Η φθορισμομετρική / χρωμομετρική δοκιμασία βιωσιμότητας κυττάρων με τη χρήση ρεσαζουρίνης (alamar blue/resazurin) (O'Brien et al., 2000) για την εκτίμηση της μεταβολικής ικανότητας και της μιτοχονδριακής λειτουργίας,

2) Η δοκιμασία κρυσταλλικού ιώδους (crystal violet) βιωσιμότητας κυττάρων για έμμεση ποσοτικοποίηση κυτταρικού θανάτου (Feoktistova et al., 2016) και

3) Η δοκιμασία ουδέτερου ερυθρού (natural red) για τον προσδιορισμό της λυσοσωμικής δραστηριότητας των κυττάρων (Repetto et al., 2008).

Δύο ημέρες μετά την τοποθέτηση των κυττάρων στα πλακίδια, οι καλλιέργειες επωάστηκαν με διάφορες συγκεντρώσεις (0,01, 0,1, 1, 10, 100 μM) επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών στους 20 °C για 48 ώρες πριν την αξιολόγηση της βιωσιμότητας των κυττάρων. Η τελική συγκέντρωση διαλύτη (MeOH), ανά οπή σε όλο το πείραμα ήταν 2,5% v/v, μια συγκέντρωση που βρέθηκε να είναι μη τοξική για τα κύτταρα.

Για την πρώτη δοκιμασία **(1)** (O'Brien et al., 2000), μετά από 48 ώρες επώασης με κάθε δευτερογενή μεταβολίτη, το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας αναρροφήθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο νερό ddH₂0.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας πλύσης των κυττάρων προστέθηκαν 100 μί/οπή αραιωμένης ρεσαζουρίνης (5% v/v) σε μέσο καλλιέργειας υπό στείρες συνθήκες στους 20 °C για 4 ώρες. Για τη δεύτερη δοκιμασία (2) (Feoktistova et al., 2016), μετά από 48 ώρες επώασης με κάθε δευτερογενή μεταβολίτη, το μέσο καλλιέργειας αναρροφήθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο νερό ddH20. Η τελική έκπλυση αναρροφήθηκε και προστέθηκαν σε κάθε οπή 50 μl 0,5% (w/v) διάλυμα χρώσης κρυσταλλικού ιώδους (20% MeOH σε ddH20) ενώ ακολούθησε επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε αναδευτήρα πάγκου με συχνότητα 20 ταλαντώσεις ανά λεπτό. Το διάλυμα χρώσης στη συνέχεια αναρροφήθηκε και η πλάκα πλύθηκε τέσσερις φορές με στείρο αποστειρωμένο διπλά απιονισμένο νερό και αφέθηκε να στεγνώσει στον αέρα χωρίς το καπάκι του για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 200 μl μεθανόλης σε κάθε οπή και η πλάκα επωάστηκε με το καπάκι της για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου σε ταλαντωτή πάγκου με συχνότητα 20 ταλαντώσεων ανά λεπτό. Τέλος για τη (3) δοκιμασία (Repetto et al., 2008), μετά από 48 ώρες επώασης με κάθε δευτερογενή μεταβολίτη, το μέσο καλλιέργειας αναρροφήθηκε και τα κύτταρα ξεπλύθηκαν δύο φορές με ρυθμιστικό διάλυμα PBS (phosphate-buffered saline, pH 7.4. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ). Τα κύτταρα στη συνέχεια επωάστηκαν με 100 μΙ διαλύματος χρώσης ουδέτερου ερυθρού (33 μg/ml) σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας στους 20 °C για 60 λεπτά ακολουθούμενο από έκπλυση με 100 μl σταθεροποιητικού διαλύματος (φορμαλδεΰδη 0,5% (v/v) και 1% (w/v) CaCl₂ σε απεσταγμένο νερό). Μετά από 1 λεπτό το σταθεροποιητικό διάλυμα απομακρύνθηκε και τα κύτταρα επωάστηκαν με 100 μl διαλύματος απόχρωσης του ουδέτερου ερυθρού (1% (v/v) οξικού οξέος και 50% (v/v) αιθανόλης σε απεσταγμένο νερό) επί 10 λεπτά σε ταλαντωτή πάγκου με συχνότητα 40 ταλαντώσεων ανά λεπτό.

Η απορρόφηση διαβάστηκε σε 570 nm για τη (1) και (2) δοκιμασία και στα 540 nm για τη (3) δοκιμασία, με τη χρήση του Tecan infinite M200 Pro microplate reader. Για κάθε δοκιμασία και κάθε δευτερογενή μεταβολίτη, πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον τέσσερα ανεξάρτητα πειράματα δόσης-απόκρισης με τρεις επαναλήψεις. Οι υπολογισμοί έγιναν χρησιμοποιώντας λεπτομερείς τύπους (AbCam, Cambridge, UK) και τα αποτελέσματα αναλύθηκαν με το λογισμικό GraphPad Prism v.6.

[43]

2.7 Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς ΗΕΚ 293

Η κυτταρική σειρά HEK 293, ανθρώπινα εμβρυικά νεφρικά κύτταρα, αποκτήθηκε από την ATCC (ATCC® CRL-1573TM). Η καλλιέργεια των κυττάρων γινόταν σε φλάσκες 75 cm² (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) στους 37 °C (5% CO₂) σε θρεπτικό μέσο DMEM (Biosera) μαζί με 10% εμβρυικό βόειο ορό (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) και 1% L-γλουταμίνη. Όλες οι συνθήκες δοκιμασιών και τα πρωτόκολλα ήταν ίδια με αυτά που περιεγράφηκαν παραπάνω για τα κύτταρα RTL-W1 με την εξαίρεση ότι οι επωάσεις διεξήχθησαν στους 37 °C (5% CO₂).

2.8 Πειράματα τοξικότητας έναντι θαλάσσιων βακτηριακών στελεχών

Η ικανότητα των επιλεγμένων μεταβολιτών να αναστέλλουν την ανάπτυξη των βακτηρίων εκτιμήθηκε με τη χρήση πέντε θαλάσσιων βακτηριακών στελεχών που εμπλέκονται στο σχηματισμό θαλάσσιου βιοφίλμ (Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis. Bacillus thuringiensis, Pseudomonas putita και Pseudomonas pseudoalcaligenes). Τα βακτηριακά στελέχη διατηρήθηκαν σε τρυβλία με ειδικό θρεπτικό άγαρ (άγαρ θαλάσσης Zobel, pH = 7,3, ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ) (Zobel, 1941). Οι αποστειρωμένοι δίσκοι χαρτιού διηθήσεως (4 mm) (GF/F, Whatman) εμβαπτίστηκαν με 40 μΙ από διαδοχικές αραιώσεις του εκάστου εξετασθέντος μεταβολίτη, αφέθηκαν να ξηραθούν σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία με το άγαρ, τα οποία εμβολιάστηκαν με ένα μόνο βακτηριακό στέλεχος. Τα τρυβλία επωάστηκαν για 24 ώρες στους 25 °C. Η αναστολή της ανάπτυξης των θαλάσσιων βακτηρίων προσδιορίστηκε με μέτρηση της ζώνης αναστολής σε χιλιοστά γύρω από το δίσκο του διηθητικού χαρτιού. Ως θετικός και αρνητικός έλεγχος, χρησιμοποιήθηκαν η πενικιλίνη G (40 μl 0,5 M) και ο διαλύτη (Μεθανόλη, 40 μl) αντίστοιχα σε κάθε δοκιμασία, ενώ έλεγχος έγινε και σε σκέτο θαλασσινό νερό το οποίο χρησιμοποιήθηκε για την δημιουργία του θρεπτικού υποστρώματος.

2.9 Μελέτες πεδίου για τον υπολογισμό της αντιβιοεπιστρωτικής ενεργότητας της Βρωμοσφαιρόλης

2.9.1 Προετοιμασία μεταλλικών δοκιμίων

Για να έχουμε μια πρώτη ένδειξη της ικανότητας διαφόρων υφαλοχρωμάτων αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την και εμφάνιση βιοεπίστρωσης χρησιμοποιήθηκαν νανοφορείς οξειδίου δισθενούς χαλκού (CuO), οξειδίου ψευδαργύρου (ZnO) και νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) σε συνδυασμό με ή χωρίς τη φυσική χημική ένωση Βρωμοσφαιρόλη, σε μια πιλοτική κατασκευή που περιγράφεται στη συνέχεια. Για την κατασκευή των δοκιμίων χρησιμοποιήθηκε ναυπηγική λαμαρίνα προδιαγραφών διαστάσεων 2 x 2,5 m και βάρους 240 kg και κόπηκαν δείγματα (δοκίμια) διαστάσεων (40 x 21 x 6 mm) στα οποία εφαρμόστηκαν οι διαφορετικοί παράγοντες. Ως μέτρο σύγκρισης της αντιβιοεπιστρωτικής ικανότητας των υλικών χρησιμοποιήθηκαν και ήδη εμπορικά διαθέσιμα αντιβιοεπιστρωτικά προϊόντα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν: 1) Ο αντιβιοεπιστρωτικός παράγοντας SEA-NINE™211 (αναφερόμενος παρακάτω ως Sea9-211) που είναι ένας γρήγορα βιοδιασπόμενος αντιβιοεπιστρωτικός παράγοντας που αποτελείται από τη δραστική χημική ένωση 4.5-dichloro-2-octyl-4-isothiazolin-3-one με βάση διαλύτη το ξυλένιο και χρησιμοποιείται σε τελική συγκέντρωση 3-10% με τελική συγκέντρωση της δραστικής ουσίας σε 1-3%. 2) Το εμπορικό προϊόν ECOMAR AF 2000 που είναι μια αντιβιοεπιστρωτική αυτο-καθαριζόμενη βαφή με σύνθεση καλυπτόμενη από πνευματικά δικαιώματα. 3) Το εμπορικό προϊόν Ecoloflex SPC 200 που είναι μια αντιβιοεπιστρωτική βαφή με σύσταση 38,9% w/w οξείδιο μονοσθενούς χαλκού και 3,88% w/w πυριθειόνη του ψευδαργύρου (zinc pyrithione).

Η σύσταση των 14 ειδών δοκιμίων ήταν η ακόλουθη:

- 1. Μικρσφαίρες CuO 5%w/w
- 2. Μικρσφαίρες CuO 5%w/w + Βρωμοσφαιρόλη (12%)
- 3. Μικρσφαίρες CuO 5%w/w + Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) 0,1% w/w
- Μικρσφαίρες CuO 5%w/w + Βρωμοσφαιρόλη (12%) + Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) 0,1% w/w
- 5. Μικρσφαίρες CuO 5%w/w + SEA- NINE™211 (Sea9-211)
- 6. ECOMAR AF 2000 + SEA- NINE™211 (Sea9-211)
- 7. Ecoloflex SPC 200
- 8. Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w
- 9. Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w + Βρωμοσφαιρόλη (12%)
- 10. Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w + Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) 0,1% w/w

- 11. Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w + Βρωμοσφαιρόλη (12%) + Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) 0.1% w/w
- **12.** Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w + SEA- NINE™211 (Sea9-211)
- 13. Μικρσφαίρες CuO 5%w/w + Μικρσφαίρες ZnO 8%w/w + SEA- NINE™211 (Sea9-211)
- 14. ECOMAR AF 2000 + Νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) 0,1% w/w

Οι 14 διαφορετικοί συνδυασμοί δοκιμάσθηκαν σε πολλές επαναλήψεις με τη χρήση διαφορετικών δοκιμίων για κάθε περίπτωση. Όλα τα δοκίμια μετά την αφαίρεσή τους από τη θάλασσα αξιολογήθηκαν (ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση). Να σημειωθεί ότι δεν πραγματοποιήθηκε επιφανειακή επεξεργασία των δοκιμίων.

2.9.2 Κατασκευή πόντισης των δοκιμίων

Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε μία ειδική κατασκευή (τορπίλη) (Εικόνα 2.1) η οποία είχε ως σκοπό την προσομοίωση της κίνησης ενός πλοίου ενώ ποντίστηκαν στο θαλάσσιο περιβάλλον στην περιοχή του Πειραιά (Μικρολίμανο) σε 4 χρόνους, με έναρξη στις 14 Φλεβάρη του 2014. Είχε συνολικό μήκος 2,45 m και αποτελείτο από τρία βασικά διαιρούμενα μέρη, ακολουθώντας την ροή κίνησης του νερού: α) προστατευτικό καπάκι, β) κορμός, γ) κυκλοφορητής (παροχή 2280 λίτρα/ώρα). Στο εσωτερικό της τορπίλης τοποθετήθηκαν τα δοκίμια (διαστάσεων 40 x 21 x 6 mm) ενώ μέσω του κυκλοφορητή εξασφαλιζόταν η συνεχής κίνηση του νερού και στις δύο πλευρές των δοκιμίων. Ο κυκλοφορητής είχε τοποθετηθεί με συστολή στον κορμό και με τέτοιον τρόπο ώστε να δέχεται νερό από το εσωτερικό του κορμού και να το προωθεί στο περιβάλλον ώστε να αποφευχθεί ο τραυματισμός ή η θανάτωση του φυτο- και ζωοπλαγκτού πριν την είσοδό του και την επαφή με τα δοκίμια. Το προστατευτικό καπάκι καθώς και ο κορμός της κατασκευής αποτελείτο από πλαστική σωλήνα PVC Φ160. Στο καπάκι υπήρχε προστατευτικό δίχτυ ώστε να αποφεύγεται η είσοδος αντικειμένων στην κατασκευή που θα είχε ως αποτέλεσμα την διακοπή της ροής του νερού στο εσωτερικό της ενώ στο εσωτερικό του κορμού είχαν τοποθετηθεί πέντε σωλήνες οδηγοί PVC Φ50 και στο τέλος η βάση στήριξης του κυκλοφορητή. Για την εισαγωγή των δοκιμίων χρησιμοποιήθηκαν επίσης σωλήνες PVC Φ40 (σωλήνες δοκιμίων) οι οποίοι κόπηκαν κατά μήκος της διαμέτρου τους. Εν συνεχεία τα δοκίμια τοποθετήθηκαν σε σειρά και εφαπτόμενα, κάθετα στην τομή και με τέτοια σειρά ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Τα δύο μέρη των σωλήνων που έφεραν τα δοκίμια επανενώθηκαν (με ταινία) συγκρατώντας τα δοκίμια στο εσωτερικό τους.

Κάθε σωλήνας δοκιμίων αντιστοιχεί σε ένα σωλήνα οδηγό. Η κατασκευή παρείχε τη δυνατότητα παραλαβής δεδομένων (74 δοκίμια/σωλήνα) με μέγιστο πέντε διαφορετικές χρονικές στιγμές από τον αρχικό χρόνο.

Για να διατηρηθεί σταθερή η ροή στο εσωτερικό της δεξαμενής, σε κάθε χρονική στιγμή, κάθε φορά που αφαιρείτο ένας σωλήνας δοκιμίων γινόταν αντικατάστασή του με παρόμοιο σωλήνα που έφερε μεταλλική ράβδο αντίστοιχου μήκους και πάχους με εκείνη των δοκιμίων. Η στήριξη της τορπίλης γινόταν με δύο συρματόσχοινα τα οποία ήταν τοποθετημένα στο 1/3 και στα 2/3 του μήκους της κατασκευής και στηριγμένα με τσιμέντο στο εσωτερικό του κορμού ώστε να προσφέρουν μια στιβαρή στήριξη. Η χρήση τσιμέντου στο εσωτερικό του κορμού εξυπηρετούσε ταυτόχρονα και στη μείωση της ταλάντωσης της τορπίλης για λόγους ασφαλείας. Από τα συρματόσχοινα ξεκινούσαν σχοινιά ιστιοπλοΐας μεγάλου μήκους που παρείχαν την δυνατότητα πόντισης της τορπίλης στο επιθυμητό κάθε φορά βάθος. Η κατασκευή δοκιμάστηκε για τη λειτουργία της σε πιλοτική μορφή ώστε να επιβεβαιωθεί η ορθότητα και ασφάλεια λειτουργίας της και να διευθετηθούν μικρές τεχνικές ατέλειες.



Εικόνα 2.1 (α) κατασκευή σωλήνων οδηγών, (β) τοποθέτηση σωλήνων οδηγών στο εσωτερικό του κορμού, (γ) τοποθέτηση συρματόσχοινων στήριξης, (δ) ολοκλήρωση κατασκευής, (ε) παραλαβή δοκιμίων, (ζ) τοποθέτηση δοκιμίων, (η) κλείσιμο σωλήνα δοκιμίων, (θ) τελική εικόνα σωλήνα με δοκίμια, (ι) ολοκλήρωση τοποθέτησης σωλήνων δοκιμίων, (κ) επιτυχής ολοκλήρωση διαδικασίας πόντισης, (λ) διαδικασία ανέλκυσης, (μ) αφαίρεση καπακιού, (ν) παραλαβή πρώτης σειράς δοκιμίων, (ξ) άνοιγμα πρώτου σωλήνα δοκιμίων, (ο) πρώτη σειρά δοκιμίων, (π) τοποθέτηση δοκιμίων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό.

2.9.3 Ανάλυση δοκιμίων

Ύστερα από 2 πιλοτικές εφαρμογές λειτουργίας της κατασκευής σε συνθήκες πεδίου, η κατασκευή ποντίστηκε στις 14 Φεβρουαρίου 2014. Η πρώτη δειγματοληψία έγινε στις 17 Μαρτίου 2014, η δεύτερη στις 11 Απριλίου 2014, η τρίτη στις 15 Μαΐου 2014 και η τέταρτη στις 12 Ιουνίου 2014.

Συνολικά είχαν ποντιστεί 5 σειρές δοκιμίων, αναλύθηκαν όμως μόνο οι 4 καθώς η κατασκευή βγήκε ένα μήνα νωρίτερα από το αναμενόμενο ύστερα από πρόβλημα που εντοπίστηκε στην κυκλοφορία του νερού στο εσωτερικό της.

Αμέσως μετά την απομάκρυνση των δοκιμίων από την κατασκευή (σε κάθε δειγματοληψία), το κάθε δοκίμιο τοποθετούνταν ξεχωριστά σε δοκιμαστικό σωλήνα (50 ml) με αποστειρωμένο θαλασσινό νερό και μεταφέρονταν στο εργαστήριο για την άμεση επεξεργασία τους. Πριν την έναρξη οποιασδήποτε ανάλυσης γινόταν μια απλή οπτική παρατήρηση των δοκιμίων προκειμένου να διαπιστωθεί η καλή ή όχι κατάσταση τους. Στη συνέχεια ακολουθούσε η ανάλυση του πληθυσμού των προκαρυωτικών οργανισμών, κατόπιν η εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης και στο τέλος η ταξινομική ανάλυση των οργανισμών που είχαν εγκατασταθεί.

2.9.3.1 Εκτίμηση προκαρυωτικών οργανισμών

Πριν να ξεκινήσει η επεξεργασία, τα δοκίμια ξεπλένονται ελαφρά με αποστειρωμένο νερό προκειμένου να φύγει το αιωρούμενο οργανικό υλικό από την επιφάνεια τους.

Για την ανάλυση του πληθυσμού των προκαρυωτικών οργανισμών, το 1/3 της επιφάνειας των δοκιμίων αφαιρείτο με αποστειρωμένο νυστέρι και η συνολική ποσότητα του υλικού αναλύεται αμέσως σύμφωνα με τη μέθοδο διαδοχικών αραιώσεων (σε αποστειρωμένο θαλασσινό νερό). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, δείγματα (n>3) από κάθε δοκίμιο αραιώθηκαν κατά 10 φορές και επιστρώθηκαν σε στερεό θρεπτικό υλικό μέχρι την αραίωση που δεν έδινε καμμιά αποικία προκαρυωτικού οργανισμού μετά από καλλιέργεια. Για να παρασκευασθούν τα τρυβλία χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υλικό Ζοbel Marine Agar (μέθοδος παρασκευής στο Παράρτημα).

Μετά την επίστρωση των τρυβλίων με το δείγμα, τοποθετήθηκαν στους 28 °C για 2 ημέρες. Κατόπιν ακολουθούσε η καταμέτρηση των αποικιών που εμφανίστηκαν με τη χρήση στερεοσκοπίου.

[49]
2.9.3.2 Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης

Η ολική πρωτεΐνη εκτιμήθηκε μετά από αφαίρεση με αποστειρωμένη λεπίδα του 1/3 του επιφανειακού στρώματος του δοκιμίου και μεταφορά του σε δοκιμαστικό σωλήνα. Η μικρή ποσότητα θαλασσινού νερού αναμίχθηκε με 5x ρυθμιστικό διάλυμα RIPA (Παράρτημα) έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος να είναι 1x. Κατόπιν τα δείγματα υποβλήθηκαν σε 3 κύκλους κατεργασίας με διαδοχική τοποθέτηση σε -80 °C για 15 λεπτά και 37 °C για 2 λεπτά και κατόπιν φυγοκεντρήθηκαν σε 12.000 xg για 15 λεπτά στους 4 °C. Δείγμα από το υπερκείμενο διάλυμα υποβλήθηκε σε μέτρηση ολικής πρωτεΐνης σύμφωνα με τη μέθοδο Lowry et al. 1951, χρησιμοποιώντας το *RC DC*TM Protein Assay kit της εταιρείας Bio-Rad (Ca, USA) με χρήση αλβουμίνης ορού αγελάδος (BSA) ως πρότυπο για τη δημιουργία της καμπύλης αναφοράς.

2.9.3.3 Ταξινομική ανάλυση εδραίων οργανισμών

Για την ποιοτική και ποσοτική εκτίμηση της παρουσίας ασπόνδυλων ευκαρυωτικών οργανισμών, το υπόλοιπο 1/3 του δείγματος, εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 4% φορμαλδεΰδης ουδετεροποιημένης με οξείδιο του βορίου (Steedman, 1976) που έχει την ικανότητα να διαπερνά τα κύτταρα ευκαρυωτικών οργανισμών και να σταθεροποιεί τους ιστούς. Για τη μελέτη των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε το στερεοσκόπιο ΟΡΤΙΚΑ LAB2 της εταιρίας ΟΡΤΙΚΑ με δυνατότητα μεγέθυνσης μέχρι 40x ενώ για την αναγνώριση των ασπόνδυλων οργανισμών σε επίπεδο οικογένειας χρησιμοποιήθηκαν ταξινομικές κλείδες (Razouls & Durand, 1971).

2.10 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος

Κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε συλλογή όλων των αναπτυξιακών σταδίων του *Α. amphitrite.* Πιο συγκεκριμένα, έγινε συλλογή όλων των σταδίων του ναυπλίου (όπως έχουν αναφερθεί από τον Shanks, 2001), ελεύθερων και προσκολλημένων κυπρίδων, νεαρών και ενήλικων εδραίων ατόμων.

Τα αναπτυξιακά στάδια συλλέχθηκαν σε αποστειρωμένα μικροσωληνάρια. Στη συνέχεια, διεξαγόταν η εξής διαδικασία:

- Ξέπλυμα δειγμάτων 2 φορές με διπλά απιονισμένο νερό και αποθήκευση τους στους -80 °C.
- Για τη διεξαγωγή του πειράματος, σε κάθε δείγμα προστέθηκε διάλυμα RIPA με αναλογία 1μl RIPA/1 ζώο ή 0,5μl RIPA/1 ζώο
- III. Σπάσιμο κυττάρων με εφαρμογή υπερήχων 2 βαθμών εμβέλειας για 30 δευτερόλεπτα τρεις φορές με ενδιάμεσα διαλείμματα 2 λεπτών και 30 δευτερολέπτων. Η παραπάνω διαδικασία πραγματοποιούνταν σε πάγο για αποφυγή αποδιάταξης της πρωτεΐνης SIPC λόγω αύξησης της θερμοκρασίας από την εφαρμογή των υπερήχων.
- IV. Φυγοκέντρηση δειγμάτων στους 4 °C, 15.000g για 10 λεπτά.
- V. Χρήση του υπερκείμενου στο πείραμα.

2.10.1 Μονοκλωνικό και πολυκλωνικό αντίσωμα

Προκειμένου να ελεγχθεί εάν η ανασυνδυασμένη SIPC έχει παρόμοια 'συμπεριφορά' με την ενδογενή πρωτεΐνη SIPC του είδους *Α. amphitrite*, κατά την ηλεκτροφόρηση (SDS-PAGE), στα πλαίσια του προγράμματος MARIPAINTS και της διδακτορικής διατριβής της κ. Κοτσίρη, παράχθηκε ειδικό πολυκλωνικό αντίσωμα σε κουνέλια. Το αντίσωμα αυτό δημιουργήθηκε από την εταιρεία GenScript (Piscataway, NJ) εναντίον του πεπτιδίου (N- IHKELKGGTERGGE-C) που βρίσκεται μεταξύ των αμινοξέων 1186-1199 της SIPC (GenBank, αριθμός καταχώρησης: AAR33079.1) και έχει >90% ομοιότητα με όλες τις άλλες 7 γνωστές πρωτεΐνες του Γένους Amphibalanus.

Προκειμένου να αυξηθεί η ευαισθησία της μεθόδου, σε συνεργασία με τον Δρ. Δημήτρη Βασιλάκο, δημιουργήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης SIPC των Θυσανόποδων. Μονοκλωνικά αντισώματα έναντι του πεπτιδίου SIPC παρήχθησαν σύμφωνα με μια τροποποιημένη μέθοδο των Koehler και Milstein (Koehler and Milstein, 1975). Εν συντομία, πέντε ποντίκια BALB/c ηλικίας 5 εβδομάδων ανοσοποιήθηκαν ενδοπεριτοναϊκά (ί.ρ.) με 25 μg πεπτιδίου SIPC συζευγμένο με KLH (σύνθεση πεπτιδίων και σύζευξη από την εταιρεία GenScript, Piscataway, NJ). Όλες οι ανοσοποιήσεις και η χειραγώγηση των ζώων ήταν σύμφωνες με τις κατευθυντήριες γραμμές για την φροντίδα των ζώων όπως ορίζεται στην οδηγία 2010/63 / ΕΕ της ΕΕ. Μετά από 5 κύκλους ανοσοποίησης, τα ποντίκια θυσιάστηκαν και τα σπληνοκύτταρα συλλέχθηκαν και συντήχθηκαν με την κυτταρική σειρά P3X63Ag8.653 (ATCC® CRL1580[™]) σύμφωνα με το πρωτόκολλο σύντηξης των Koehler και Milstein, 1975. Οι θετικοί κλώνοι και η εξειδίκευση των αντισωμάτων προσδιορίστηκαν με ανοσοαποτύπωση και ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (Western blot, ELISA). Προκειμένου να βρεθούν αυτοί οι κλώνοι που δεσμεύονται καλύτερα στη πρωτεΐνη SIPC έγινε δοκιμή των διαφορετικών κλώνων του μονοκλωνικού αντισώματος με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western.

2.10.2 Ανάλυση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου (SDS-PAGE)

Ο διαχωρισμός και η αναγνώριση των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε ακολουθώντας τη μέθοδο του Laemmli (Laemmli, 1970), με βάση το μοριακό τους βάρος, με ηλεκτροφόρηση σε κάθετο πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου παρουσία δωδεκυλοθειικού νατρίου (SDS). Παράλληλα με τα προς εξέταση δείγματα, πραγματοποιούνταν ανάλυση μίγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους, που χρησιμοποιούνται ως μάρτυρες μοριακών μεγεθών. Πριν από την ανάλυση σε μονοδιάστατα (1-D) πηκτώματα, τα δείγματα επωάστηκαν με 250 mM DTT και αραιώθηκαν σε διάλυμα φόρτωσης δείγματος. Τα πηκτώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 8% (ακρυλαμίδιο: δισακρυλαμίδιο / 30:0.8). Στα δείγματα των κυττάρων, που χρησιμοποιήθηκαν ως θετικοί μάρτυρες, φορτώνονταν 10 μg πρωτεϊνης/διαδρομή και διαφορετικός αριθμός ατόμων ανά διαδρομή από τα εκχυλίσματα. Οι ηλεκτροφορήσεις πραγματοποιούνταν στη συσκευή Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-rad) σε διάλυμα ηλεκτροφόρησης πρωτεϊνών (Running buffer) υπό σταθερή τάση 130 V σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου 3 ώρες.

2.10.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών (Western blotting)

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών προετοιμάστηκε ένα σύστημα στυπώματος με την εξής σειρά: ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού, δύο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, το πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου, ένα κομμάτι νιτροκυτταρίνης (Whatman), το οποίο έχει τις διαστάσεις του πηκτώματος, δυο φύλλα διηθητικού χαρτιού Whatmann 3MM, ένα λεπτό φύλλο σφουγγαριού. Το σύστημα στυπώματος τοποθετήθηκε στην ειδική συσκευή μεταφοράς έτσι ώστε η νιτροκυτταρίνη να βρίσκεται στην άνοδο. Η μεταφορά των πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε με ρεύμα σταθερής τάσης 100 V για 90 λεπτά στους 4 °C. Εάν χρησιμοποιούνται έγχρωμοι μάρτυρες μοριακών βαρών, η μεταφορά από το πήκτωμα στη μεμβράνη μπορεί να ελεγχθεί έμμεσα εξαιτίας της παρουσίας της χρωστικής.

2.10.4 Ανοσοενζυμική ανίχνευση των πρωτεϊνών

Μετά τη μεταφορά, η μεμβράνη της νιτροκυτταρίνης επωάζεται με διάλυμα 5% (w/v) BSA διαλυμένη σε TBST, υπό ανάδευση, για 45 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη διαδικασία αυτή, γίνεται δέσμευση πάνω στη μεμβράνη των ελεύθερων θέσεων, στις οποίες δεν έχουν μεταφερθεί πρωτεΐνες, οπότε παρεμποδίζεται η μη ειδική πρόσδεση των αντισωμάτων στις θέσεις αυτές. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το πρώτο αντίσωμα anti-SIPC αραιωμένο 1:1000 σε διάλυμα 5% (w/v) BSA σε TBST. Η επώαση πραγματοποιήθηκε υπό ανάδευση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά την επώαση με το πρώτο αντίσωμα, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBST διάρκειας 5 λεπτών περίπου η κάθε μία. Ακολουθεί επώαση της μεμβράνης με το δεύτερο-συζευγμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP)-αντίσωμα anti-rabbit (1:1000, Cell Signaling Technology), για 1 ώρα, σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, πραγματοποιούνται τρεις διαδοχικές πλύσεις με TBST διάρκειας 5 min περίπου. Ακολουθεί επώαση της νιτροκυτταρίνης στο ρυθμιστικό διάλυμα εμφάνισης υποστρώματος 20x LumiGLO® Reagent και 20x Peroxide (Cell Signaling Technology), ακολουθώντας τις οδηγίες του κατασκευαστή. Με τον τρόπο αυτό οι ζώνες των πρωτεϊνών, που έχουν προσδέσει ειδικά το αντίσωμα, εμφανίζονται μετά από 2-3 λεπτά επώασης. Εξαιτίας του ότι, το ανωτέρω σύστημα στηρίζεται στη χημειοφωταύγεια η νιτροκυτταρίνη εμφανίζεται και φωτογραφίζεται σε εξειδικευμένο μηχάνημα (Alpha Innotech FluorChem 8800 Imaging System) με τη χρήση του λογισμικού FluorChem.

2.10.5 Ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) με πολυκλωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα για την πρωτεΐνη SIPC

Όπως αναφέρεται και στην Εισαγωγή, υπάρχουν διάφορα είδη μεθόδων ELISA (άμεση, έμμεση, sandwich κτλ), όμως στη συγκεκριμένη μελέτη ακολουθήθηκε η ανταγωνιστική μέθοδος ELISA.

Πιο συγκεκριμένα, στην ανταγωνιστική μέθοδο ELISA σε κάθε οπή έχει προσκολληθεί αντιγόνο και έπειτα, προστίθεται διάλυμα 1^{ου} αντισώματος έναντι του αντιγόνου και δείγματος. Αργότερα, γίνεται επώαση με 2° αντίσωμα, ειδικό για το 1° αντίσωμα, το οποίο είναι προσδεμένο με ένζυμο. Όσο περισσότερο αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα, αυτό θα προσδεθεί στο 1° αντίσωμα, με αποτέλεσμα λιγότερο 1° αντίσωμα να υπάρχει για να προσδεθεί στο αντιγόνο που έχει προσκολληθεί στην οπή , και κατ' επέκταση λιγότερο 2° αντίσωμα θα προσδεθεί στο 1° που έχει απομείνει δεσμευμένο στην οπή. Επομένως, με την εισαγωγή κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος, θα πάρουμε μικρότερη τιμή απορρόφησης (πιο ανοιχτό χρώμα) όσο περισσότερο είναι το αντιγόνο στο δείγμα.

Η μέθοδος ELISA πραγματοποιήθηκε σε ειδική προσροφητική πλάκα 96 οπών (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) σύμφωνα με την εξής διαδικασία (βλέπε και **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ**):

Αρχικά γινόταν επώαση με 100 μΙ/οπή ρυθμιστικού διαλύματος επίστρωσης (0,01 μg/ml πεπτιδίου SIPC), στους 4 °C για όλο το βράδυ. Την επόμενη ημέρα ακολουθούσε ξέπλυμα της πλάκας (το ξέπλυμα πάντα γινόταν τρεις φορές με 200 μl/οπή PBS-Tween 0.05%) και επώαση με 200 μl/well ρυθμιστικού διαλύματος παρεμποδισης (3% Gelatin), στους 25 °C, με ανάδευση της πλατφόρμας επώασης 100 rpm για 90 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της επώασης ακολουθούσε ξέπλυμα της πλάκας και επώαση με 50 μl 1° αντίσωμα (πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό anti-SIPC, Kotsiri et al., 2018) σε αραίωση 1:1000 (για το πολυκλωνικό αντίσωμα) και 1:100 (για το μονοκλωνικό αντίσωμα) σε BSA 5% (τελική αραίωση στο πηγαδάκι για το πολυκλωνικό 1:2000 και για το μονοκλωνικό 1:200) μαζί με 50 μΙ δείγματος στους 25 °C, με ανάδευση της πλατφόρμας επώασης 100 rpm για 90 λεπτά. Έπειτα ακολουθούσε ξέπλυμα της πλάκας και τέλος επώαση με 100 μl/οπή 2^{ου} αντισώματος (goat anti-rabbit HRP-linked με αραίωση 1:6000 για το πολυκλωνικό αντίσωμα και antimousse HRP-linked με αραίωση 1:1000 για το μονοκλωνικό, σε BSA 5%) (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), στους 25 °C, με ανάδευση της πλατφόρμας επώασης 100 rpm για 60 λεπτά. Μετά την ολοκλήρωση της δεύτερης επώασης ακολουθούσε ξέπλυμα της πλάκας, ενώ τελικό στάδιο ήταν η επώαση με

TMB (100 μl/πηγαδάκι) για 15 λεπτά, με ελαφρά ανάδευση και διακοπή της αντίδρασης με H₂SO₄ 0,1 M (100 μl/πηγαδάκι). Ακολουθούσε μέτρηση της απορρόφησης στα 450 nm σε κατάλληλη συσκευή ανάγνωσης απορρόφησης.

Για την δημιουργία της πρότυπης καμπύλης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα γνωστής συγκέντρωσης πεπτιδίου SIPC. Επιπλέον, σε κάθε μέτρηση υπήρχε θετικός (blank, BL) και αρνητικός (total, TL) μάρτυρας. Στο θετικό μάρτυρα γίνεται προσθήκη 100 μl PBS (χωρίς αντίσωμα) και δεν προστίθεται 2° αντίσωμα ενώ στον αρνητικό μάρτυρα γίνεται επώαση με 50 μl 1° αντίσωμα και 50 μl PBS και προστίθενται 100 μl 2° αντίσωμα. Όλα τα δείγματα (θετικός και αρνητικός μάρτυρας, πρότυπης και άγνωστα) τοποθετούνταν στις οπές εις διπλούν.

2.10.6 Μελέτη συμπεριφοράς των κυπρίδων κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος παρουσία δευτερογενών μεταβολιτών

Για να εξετασθεί η συμπεριφορά διερεύνηση μιας επιφάνειας από τις κυπρίδες του A. amphitrite παρουσία επιλεγμένων μεταβολιτών, διεξήχθησαν βιοδοκιμές εγκατάστασης με τη προσθήκη 10 κυπρίδων/οπή (σε αποστειρωμένη πλάκα πολυστυρενίου 24 οπών (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) που περιείχε τον δευτερογενή μεταβολίτη διαλυμένο σε αποστειρωμένο τεχνητό θαλασσινό νερό (25 ‰) (2 ml τελικός όγκος/οπή). Αυτά τα πειράματα επαναλήφθηκαν 2 φορές με 3 επαναλήψεις ανά πείραμα. Οι πλάκες καλύφθηκαν με Parafilm[®] για να αποφευχθεί η εξάτμιση και επωάστηκαν στους 25 °C μακριά από οποιαδήποτε πηγή φωτός για 24 ώρες. Στη συνέχεια, καταμετρήθηκαν και απομακρύνθηκαν όλες οι εγκατεστημένες και μη εγκατεστημένες κυπρίδες και αναρροφήθηκαν τα 2 ml διαλύματος από κάθε οπή. Στη συνέχεια οι οπές επωάστηκαν με 5% BSA σε TBST (25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια, αφού επωάστηκαν πρώτα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-SIPC (Kotsiri et al., 2018) σε αραίωση 1: 100 σε TBST με 5% BSA, ξεπλύθηκαν με TBST (3x5 λεπτά) και επωάστηκαν με αντίσωμα HRP-conjugated anti-mouse (1:1000 σε TBST με 5% BSA, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. Οι οπές κατόπιν ξεπλυθήκαν με TBST (3 x 5 λεπτά) ενώ ανιχνεύθηκε η παρουσία αντιγόνου χρησιμοποιώντας το κιτ χημειοφωταύγειας 20x LumiGLO® (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) σε ένα σύστημα φωτογράφησης, το Bio-Rad ChemiDoc XRS + Gel. Για να μετρηθεί η σχετική ένταση των ανοσοαντιδραστικών κηλίδων σε αυτή τη μορφή ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, οι εικόνες αναλύθηκαν με τα πρόγραμμα ImageJ 1.52k (NIH, Bethesda, MD, USA) και

η ένταση των κηλίδων εκτιμήθηκε χρησιμοποιώντας τον τύπο: Προσαρμοσμένη ένταση (IntDen) = IntDen της πειραματικής περιοχής ενδιαφέροντος (ROI)—(ROI υπόβαθρου × ROI πειραματικής περιοχής). Τα δεδομένα εξήχθησαν και αναλύθηκαν στατιστικά με το λογισμικό GraphPad Prism v.6 με δίπλευρη κατανομή t-tests (p = 0,05) και διόρθωση κατά Welch.

2.11 Στατιστική Ανάλυση

Για την εκτίμηση των EC₅₀ ή IC₅₀ οι υπολογισμοί έγιναν με τη χρήση του λογισμικού GraphPad Prism v.6. Όλα τα δεδομένα προσαρμόστηκαν σε μια καμπύλη σύμφωνα με τις ακόλουθες εξισώσεις για την ομαλοποιημένη απόκριση: Y=100/(1+10^((X-LogIC₅₀))) ή Y=100/(1+10^((LogEC₅₀-X))) ανάλογα με την τάση της καμπύλης.

Κεφάλαιο 3

Αποτελέσματα

3. Αποτελέσματα

Δεδομένου ότι η αντιβιοεπιστρωτική δράση αρκετών δευτερογενών μεταβολιτών από είδη του Γένους *Laurencia* έχει ήδη αναγνωριστεί, και δίνοντας πρωταρχική έμφαση στην αντιβιοεπιστρωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από Ροδοφύκη του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia*, σχεδιάσαμε μια αυστηρή διαδικασία προοδευτικού αντιβιοεπιστρωτικού ελέγχου καθώς και ελέγχου του προφίλ τοξικότητας τους.

3.1 Μεταβολίτες που απομονώθηκαν από Ροδοφύκη του Γένους Laurencia και Γαστερόποδα του Γένους Aplysia

Οι χημικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής χωρίζονται σε τρείς μεγάλες ομάδες όπως φαίνονται στον Πίνακα 3.1. Τα σεσκιτερπένια, διτερπένια και τους μη τερπενικούς C₁₅ κυκλικούς αιθέρες (C₁₅ ακετογενίνες).

Τα σεσκιτερπένια (3 μονάδες ισοπρενίου, 15 άνθρακες) και τα διτερπένια (4 μονάδες ισοπρενίου, 20 άνθρακες) ανήκουν σε μία ευρύτερη οικογένεια ενώσεων τα τερπενοειδή ή ισοπρενοειδή, τα οποία αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία φυσικών προϊόντων που προέρχονται από μονάδες ισοπρενίου, που συνδέονται μεταξύ τους με πολλούς συνδυασμούς. Τα περισσότερα τερπενοειδή έχουν πολυκυκλική δομή και διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τον βασικό σκελετό. Περίπου το 60% των γνωστών φυσικών προϊόντων ανήκουν στην κατηγορία των τερπενοειδών (Firn, 2010) ενώ παράγονται από τα φυτά, τους μύκητες, τα φύκη, τα βακτήρια και τα ζώα.

Τα τερπενοειδή προκύπτουν από τη συνένωση μονάδων ισοπρενίου το οποίο έχει πέντε άτομα άνθρακα. Η βασική κατηγοριοποίηση τους βασίζεται στον αριθμό των ανθράκων του βασικού τους χημικού σκελετού, (π.χ. μονοτερπένια, διτερπένια) και συγκεκριμένα του αριθμού των μονάδων ισοπρενίου που τα αποτελούν. Εκτός από άνθρακα και υδρογόνο, τα τερπενοειδή συχνά περιέχουν άτομα οξυγόνου.

Τα σεσκιτερπένια αποτελούν τη μεγαλύτερη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από είδη του γένους *Laurencia* και συχνά έχουν ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις. Πολύ συχνά απαντώνται σεσκιτερπένια τσαμιγκρανικού τύπου (chamigrane), όπως η ελατόλη (elatol, **12**) από το φύκος *Laurencia elata* (Sims et al., 1974), η οποία έχει επιδείξει αντιβακτηριακή (Vairappan, 2003; Vairappan et al. 2009), κυτταροτοξική (Dias et al. 2005; Campos et al. 2012), αντιτρυπανοσωμική (Veiga Santos et al. 2010; Desoti et al. 2012) και αντιλεϊσμανική δράση (Dos Santos et al. 2010; Da Silva et al. 2011). Η περφορατόνη (perforatone,
11) έχει απομονωθεί από το φύκος *Laurencia perforata* (González et al. 1985).

Στην κατηγορία μη τερπενικοί C₁₅ κυκλικοί αιθέρες (C₁₅ ακετογενίνες) περιλαμβάνονται ενώσεις γραμμικές ή με διαφορετικού μεγέθους αιθερικούς δακτυλίους που συνήθως διαθέτουν μία συζευγμένη βινυλοακετυλενική ή βρωμοαλλενική πλευρική αλυσίδα. Οι περισσότερες είναι αλογονωμένες με το βρώμιο ή το χλώριο να κυριαρχούν σαν αλογόνα. **Πίνακας 3.1** Μεταβολίτες που απομονώθηκαν από τα Γένη *Laurencia* και *Aplysia.* Στην παρένθεση αναγράφεται ο αντιπροσωπευτικός αριθμός κάθε μεταβολίτη.

Σεσκιτερπένια	Διτερπένια	(C15) ακετογενίνες
laurene (1)	3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-	(3E)-laurenyne
	isopimar-9(11)-ene (14)	(21)
debromoallolaurinterol	deoxyparguerol 16-acetate (15)	laurencienyne
acetate (2)		(22)
allolaurinterol acetate (3)	διτερπένια της οικογένειας	graciosallene
	dactylomelane (16, 17, 18)	(23)
iso-laurenisol (4)	neorogioldiol (19)	obtusallene I
		(24)
filiformin (5)	O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-	chondrioallene
	dihydrorogiol-3,11-diol (20)	(25)
laurinterol (6)		
epibrasilenol (7)		
4-hydroxy-5-brasilene (8)		
perforenol (9)		
perforenone A (10)		
perforatone (11)		
elatol (12)		
obtusenol (13)		

Μεταβολίτης laurene (1)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₀ **Μοριακό Βάρος** 200.32 g/mol

Ο μεταβολίτης **laurene (1)** απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη ο οποίος μετά τις πειραματικές δοκιμές με τις κυπρίδες του *A. amphitrite* δεν προχώρησε σε περαιτέρω πειράματα καθώς δεν φαίνεται να είχε κάποια ανασταλτική δράση στην εγκατάσταση των κυπρίδων, και παρόλο που δεν ήταν τοξική ως χημική ένωση, με ένα υψηλό LC₅₀ (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2α), ο θεραπευτικός του λόγος (TR) ήταν πολύ μικρός (Πίνακας 3.4).



Μεταβολίτης debromoallolaurinterol acetate (2)

Μοριακός τύπος C₁₇H₂₂O₂ **Μοριακό Βάρος** 258.36 g/mol

Ο μεταβολίτης **debromoallolaurinterol acetate (2)** επίσης απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Πρόκειται για ένα μεταβολίτη ο οποίος μετά τις πειραματικές δοκιμές με τις κυπρίδες του *A. amphitrite* δεν προχώρησε σε περαιτέρω πειράματα καθώς παρουσίασε μια μέτρια ανασταλτική δράση ως προς την εγκατάσταση των κυπρίδων, είχε πάρα πολύ υψηλό LC₅₀ (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2α), και ο θεραπευτικός του λόγος ήταν μικρός (Πίνακας 3.4).



Μεταβολίτης allolaurinterol acetate (3)

Ο μεταβολίτης **allolaurinterol acetate (3)** απομονώθηκε επίσης από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Ούτε αυτός ο μεταβολίτης προχώρησε σε περαιτέρω πειράματα μετά τις πειραματικές δοκιμές με τις κυπρίδες του *Α. amphitrite,* καθώς ενώ παρουσίασε μια σχετικά καλή ανασταλτική δράση ως προς την εγκατάσταση των κυπρίδων, είχε υψηλό LC₅₀ (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2α), και ο θεραπευτικός του λόγος ήταν πάνω από 50 (Πίνακας 3.4). Μάλιστα, συγκρινόμενος συνολικά με τα αποτελέσματα της Βρωμοσφαιρόλης δεν θεωρήθηκε πολλά υποσχόμενος ως προς την αντιβιοεπιστρωτική του δράση.

Μεταβολίτης iso-laurenisol (4)



Η απομόνωση του μεταβολίτη *iso-laurenisol* (4) έγινε από τα Ροδοφύκη *Laurencia microcladia,* και *Laurencia obtuse* (Harizani, 2013).

Ο μεταβολίτης αυτός παρουσίασε μια πολύ καλή ανασταλτική δράση με μια ήπια τοξικότητα (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2α) και με καλά αποτελέσματα, συγκρίνοντας τα με αυτά της Βρωμοσφαιρόλης. Για το λόγο αυτό συνέχισε στο επόμενο πειραματικό στάδιο στα πειράματα με την *Artemia sp.*. Δυστυχώς, στα πειράματα αυτά αποδείχτηκε εξαιρετικά τοξική ένωση μετά τις πρώτες 24 ώρες του πειράματος και γι' αυτό απορρίφθηκε (Πίνακας 3.5).

Μεταβολίτης filiformin (5)



Μοριακός τύπος C₁₅H₁₉BrO **Μοριακό Βάρος** 295.21 g/mol

Ο μεταβολίτης filiformin (5) απομονώθηκε επίσης από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Ο μεταβολίτης αυτός ανήκει στην κατηγορία μεταβολιτών που επηρεάζουν τη συμπεριφορά των κυπρίδων. Αυτό φάνηκε από τα συνολικά του αποτελέσματα αλλά ιδιαίτερα από τον λόγο IC₅₀/EC₅₀ (Πίνακας 3.4), και γι' αυτό το λόγο απορρίφθηκε από περαιτέρω πειράματα.

Μεταβολίτης laurinterol (6)



Μοριακός τύπος C₁₅H₁₉BrO **Μοριακό Βάρος** 295.21 g/mol

Ο μεταβολίτης **laurinterol (6)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος του είδους *Laurencia glandulifera* (Konidaris, 2015).

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στον Πίνακα 3.2β, πρόκειται για ένα τοξικό μεταβολίτη με ένα αρκετά χαμηλό LC₅₀ στις 72 ώρες, καθώς και με ένα όχι ικανοποιητικό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4). Για τους λόγους αυτούς απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Μεταβολίτης epibrasilenol (7)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₆Ο **Μοριακό Βάρος** 222.36 g/mol

Ο μεταβολίτης **epibrasilenol (7)** απομονώθηκε επίσης από το Ροδοφύκος *Laurencia glandulifera* (Konidaris, 2015).

Ο μεταβολίτης αυτός απορρίφθηκε καθώς δεν παρουσίασε καλή παρεμπόδιση εγκατάστασης των κυπρίδων αντιβιοεπιστρωτικό προφίλ, με ένα αρκετά χαμηλό TR (Πίνακας 3.4) και τιμές LC₅₀ και EC₅₀ (Πίνακας 3.2β και γ) σχεδόν ολόιδιες για τις πρώτες 2 ημέρες.

Μεταβολίτης 4-hydroxy-5-brasilene (8)



Ο μεταβολίτης **4-hydroxy-5-brasilene (8)** απομονώθηκε επίσης από το είδος *Laurencia glandulifera* (Konidaris, 2015).

Ο μεταβολίτης αυτός απορρίφθηκε καθώς δεν παρουσίασε καλή παρεμπόδιση εγκατάστασης των κυπρίδων, έχοντας ένα πάρα πολύ χαμηλό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4) και με πολύ κοντινές τιμές LC₅₀ και EC₅₀ (Πίνακας 3.2β και γ) για τις πρώτες 2 ημέρες.





Μοριακός τύπος C₁₅H₂₃Br₂ClO **Μοριακό Βάρος** 414.6 g/mol

Ο μεταβολίτης **perforenol (9)** απομονώθηκε από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους *Laurencia (Laurencia sp.*) (Giannaropoulou, 2013).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με εξαιρετική δράση ως παρεμποδιστής εγκατάστασης των κυπρίδων, παρόμοια με αυτή της Βρωμοσφαιρόλης, καθώς και ένα εξαιρετικό οικοτοξικό προφίλ, αφού είναι από τους λίγους μεταβολίτες που έφτασε μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών.

Σύμφωνα με το πρώτα αποτελέσματα από τις βιοδοκιμές εγκατάστασης με τις κυπρίδες, πρόκειται για μια χημική ένωση μη τοξική (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2γ) με έναν αρκετά ικανοποιητικό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4), η οποία δεν επηρεάζει την συμπεριφορά των κυπρίδων (Πίνακας 3.4).

Στη συνέχεια περνώντας στις επόμενες πειραματικές δοκιμές με το Καρκινοειδές Artemia sp., ο μεταβολίτης αυτός παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα LC₅₀ συγκριτικά με τους υπόλοιπους μεταβολίτες που μελετήθηκαν (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5α).

Έτσι συνέχισε στην επόμενη πειραματική δοκιμή με το Διάτομο *C. gracilis*, επιδεικνύοντας για άλλη μια φορά πολύ καλά αποτελέσματα με ένα αρκετά υψηλό EC₅₀ και μάλιστα πολύ καλύτερο από αυτό της Βρωμοσφαιρόλης (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6α).

Συνέχεια είχαν λοιπόν οι πειραματικές δοκιμές με τις κυτταρικές σειρές RTL-W1 και HEK293. Όσον αφορά τα αποτελέσματα μιτοχονδριακής δραστηριότητας και λυσοσωμικής λειτουργίας για την κυτταρική σειρά RTL-W1, ήταν εξαιρετικά καθώς ο μεταβολίτης αυτός δεν επηρεάζει καθόλου τις κυτταρικές αυτές λειτουργίες, ενώ όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα τα αποτελέσματα είναι καλύτερα από αυτά της Βρωμοσφαιρόλης, με ένα EC₅₀ αρκετά ικανοποιητικό (Πινακας 3.7, Σχήμα 3.7α). Τα πράγματα αλλάζουν λίγο για την κυτταρική σειρά ΗΕΚ293. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια επίδραση του μεταβολίτη στην λυσοσωμική δραστηριότητα των κυττάρων, η κυτταρική βιωσιμότητα είναι εξαιρετική, ενώ πιο χαμηλή τιμή ΕC₅₀ παρουσιάζει η μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων (Πίνακας 3.8, Σχήμα 3.8α). Σε σύγκριση με τη Βρωμοσφαιρόλη, και οι δυο μεταβολίτες έχουν αποδεκτή κυτταροτοξική δράση. Έτσι ο μεταβολίτης **perforenol (9)** πέρασε στα τελικά πειράματα με τις δοκιμές στα βακτηριακά στελέχη. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2) δεν παρουσίασε καμία τοξική δράση σε κανένα από τα βακτηριακά στελέχη.

Μεταβολίτης perforenone A (10)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₂O **Μοριακό Βάρος** 234.33 g/mol

Ο μεταβολίτης **perforenone A (10)** απομονώθηκε από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους *Laurencia (Laurencia sp.*) (Giannaropoulou, 2013).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με μία περίεργη δράση ως προς την αναστολή εγκατάστασης των κυπρίδων ανά 24ωρο, όπου στις 48 ώρες το IC₅₀ έπεσε (κατά 8 περίπου φορές) για να αυξηθεί ξανά, περίπου 7 φορές, στις 72 ώρες (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1γ). Σε συνδυασμό και με τον χαμηλό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4) ο μεταβολίτης αυτό κρίθηκε ακατάλληλος για περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Μεταβολίτης perforatone (11)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₂Br₂O **Μοριακό Βάρος** 378.14 g/mol

Ο μεταβολίτης **perforatone (11)** απομονώθηκε επίσης από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους *Laurencia (Laurencia sp.*) (Giannaropoulou, 2013).

Ο μεταβολίτης αυτός παρουσίασε μια εξαιρετική ανασταλτική δράση εγκατάστασης των κυπρίδων (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1γ) με μια πολύ αποδεκτή τοξικότητα (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2γ). Για αυτό το λόγο πέρασε στην επόμενη φάση πειραματικών δοκιμών με το Καρκινοειδές *Artemia sp.* Παρουσιάζοντας και σε αυτά τα πειράματα μια καλή δράση, σίγουρα όχι τόσο καλή όσο της Βρωμοσφαιρόλης (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5α), ο μεταβολίτης αυτός πέρασε στις επόμενες δοκιμές με το Διάτομο *C. gracilis*, όπου ενώ τα αποτελέσματα του ήταν αρκετά καλά, σχεδόν ίδια με αυτά της Βρωμοσφαιρόλης (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6α) δεν προχώρησε στις επόμενες πειραματικές διαδικασίες καθώς εμφάνιζε ταύτιση με την τοξικότητα της Βρωμοσφαιρόλης (του μεταβολίτη σύγκρισης) έναντι του Διατόμου *C. gracilis*, ενώ άλλοι μεταβολίτες είχαν καλύτερη συμπεριφορά.

Μεταβολίτης elatol (12)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₂BrClO **Μοριακό Βάρος** 333.69 g/mol

Ο μεταβολίτης **elatol (12)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia microcladia* (Harizani, 2013).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με πολύ καλή ανασταλτική δράση εγκατάστασης των κυπρίδων (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1γ) και με έναν πολύ καλό θεραπευτικό λόγο σχετικά κοντά με αυτόν της Βρωμοσφαιρόλης (Πίνακας 3.4). Προχωρώντας στα πειράματα με το Καρκινοειδές *Artemia sp.*, ο μεταβολίτης αυτός αποκλείστηκε λόγω πολύ υψηλής τοξικότητας στις 48 ώρες (Πίνακας 3.5, Σχήμα 5α).

Μεταβολίτης obtusenol (13)



Μοριακός τύπος C₁₅H₂₆Br₂O₂ **Μοριακό Βάρος** 398.17 g/mol

Ο μεταβολίτης **obtusenol (13)** απομονώθηκε από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους *Laurencia (Laurencia sp.*) (Giannaropoulou, 2013).

Ο μεταβολίτης αυτός αποκλείστηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές καθώς, ενώ είχε καλή ανασταλτική δράση (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1δ), παρουσίασε μια περίεργη συμπεριφορά τοξικότητας με έντονες διακυμάνσεις ανά 24ωρο (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2δ).

Μεταβολίτης



3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14)

Ο μεταβολίτης **3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14)** απομονώθηκε από μη πλήρως ταυτοποιημένα είδη του Γένους *Laurencia (Laurencia sp.*) (Giannaropoulou, 2013).

Ο μεταβολίτης αυτός προχώρησε στις επόμενες πειραματικές δοκιμές με το καρκινοειδές Artemia sp., καθώς είχε μια πολύ καλή ανασταλτική δράση εγκατάστασης των κυπρίδων (Πίνακας 3.1, Σχήμα 3.1δ), και πολύ καλό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4). Και στην επόμενη πειραματική δοκιμή είχε αρκετά καλά αποτελέσματα, με μια πολύ ήπια τοξική δράση (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5β), γι' αυτό και προχώρησε στα πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου *C. gracilis*. Εκεί δυστυχώς έδειξε μια αρκετά τοξική δράση (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6β) και γι' αυτό απορρίφθηκε.



Μεταβολίτης deoxyparguerol 16-acetate (15)

Ο μεταβολίτης **deoxyparguerol 16-acetate (15)** απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia fasciata* (Ioannou et al., 2009).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη που ενώ είχε ήπια τοξικότητα (Πίνακας 3.2γ, Σχήμα 3.2δ) παρουσίασε έντονες αυξομειώσεις ανά 24ωρο στις τιμές IC₅₀ (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1δ), κάτι που οδήγησε στην απόρριψη του.

Μεταβολίτης διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (16)



Μοριακός τύπος C₂₀H₃₄BrClO₂ **Μοριακό Βάρος** 421.84 g/mol

Ο μεταβολίτης **(16)** που ανήκει στην οικογένεια **dactylomelane** απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Ο μεταβολίτης αυτός απορρίφθηκε καθώς παρουσίασε μια περίεργη δράση αναστολής εγκατάστασης των κυπρίδων ανά συγκέντρωση (Σχήμα 3.1ε). Πιο συγκεκριμένα, όσο αυξάνονται οι χαμηλές συγκεντρώσεις αυξάνεται και το ποσοστό εγκατάστασης των κυπρίδων αντί να μειώνεται. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να εξαφανίζεται στα 10 μΜ ενώ στα 100 μΜ παρατηρείται 100% θνησιμότητα στις 72 ώρες.

Μεταβολίτης διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (17)



Ο μεταβολίτης (17) που ανήκει στην οικογένεια dactylomelane απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Ο μεταβολίτης αυτός απορρίφθηκε καθώς παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά με τον μεταβολίτη (16) που επίσης ανήκει στην οικογένεια dactylomelane. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1ε όσο αυξάνεται η συγκέντρωση αυξάνεται και το ποσοστό εγκατάστασης των κυπρίδων ενώ το φαινόμενο αυτό φαίνεται να σταματάει στα 10 μΜ.

Μεταβολίτης διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18)



Μοριακός τύπος C₂₀H₃₃BrO₂ **Μοριακό Βάρος** 385.38 g/mol

Ο μεταβολίτης **(18)** που ανήκει στην οικογένεια **dactylomelane** απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Παρόλο που ο μεταβολίτης αυτός ανήκει στην ίδια οικογένεια με τους μεταβολίτες (16) και (17), δεν παρουσίασε την ίδια περίεργη συμπεριφορά επαγωγής εγκατάστασης των κυπρίδων στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Αντίθετα, πρόκειται για έναν από τους μεταβολίτες που είχε πολύ καλές τιμές IC₅₀ (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1ε), πολύ ήπια τοξικότητα (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2ε) και υψηλό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4), ενώ έφτασε μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών.

Στα πειράματα τοξικότητας έναντι των ναυπλίων Artemia sp., επέδειξε μια πολύ ήπια τοξικότητα, σταθερή στις 24 και 48 ώρες (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5β), ενώ στη συνέχεια στα πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου *C. gracilis* είχε μια ήπια τοξικότητα (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6β), εντός ορίων, με αποτέλεσμα να περάσει στο επόμενο στάδιο δοκιμασιών.

Συνέχεια είχαν οι πειραματικές δοκιμές με τις κυτταρικές σειρές RTL-W1 και ΗΕΚ293. Όσον αφορά τα αποτελέσματα μιτοχονδριακής δραστηριότητας και λυσοσωμικής λειτουργίας για την κυτταρική σειρά RTL-W1, ήταν εξαιρετικά καθώς ο μεταβολίτης αυτός δεν επηρεάζει τις κυτταρικές αυτές λειτουργίες, ενώ όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα τα αποτελέσματα ήταν πολύ κοντά με αυτά της Βρωμοσφαιρόλης, με ένα EC₅₀ αρκετά ικανοποιητικό (Πίνακας 3.7, Σχήμα 3.7β).

Τα πράγματα αλλάζουν λίγο για την κυτταρική σειρά ΗΕΚ293. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια επίδραση του μεταβολίτη στην λυσοσωμική δραστηριότητα των κυττάρων και στην κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ πιο χαμηλή τιμή ΕC₅₀ παρουσιάζει στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων (Πίνακας 3.8, Σχήμα 3.8β). Καθώς τα

αποτελέσματα είναι εντός ορίων περνά στα τελικά πειράματα με τις δοκιμές στα βακτηριακά στελέχη όπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2) δεν παρουσίασε καμία τοξική δράση σε κανένα από τα στελέχη βακτηρίων.

Μεταβολίτης neorogioldiol (19)



Μοριακός τύπος C₂₀H₃₂Br₂O₂ **Μοριακό Βάρος** 464.28 g/mol

Ο μεταβολίτης **neorogioldiol (19)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia* glandulifera (Konidaris, 2015).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με πολύ καλά αποτελέσματα στις βιοδοκιμές εγκατάστασης των κυπρίδων, με καλή αναστολή εγκατάστασης (Πίνακας 3.2α, Σχήμα 3.1ε), πάρα πολύ υψηλές τιμές LC₅₀ (Πίνακας 3.2β, Σχήμα 3.2ε) και βέβαια έναν αρκετά υψηλό και πολλά υποσχόμενο θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4). Μάλιστα πρόκειται επίσης για έναν από τους μεταβολίτες που έφτασε μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών.

Στη συνέχεια των πειραματικών δοκιμών έναντι των ναυπλίων Artemia sp., επέδειξε μια πολύ ήπια τοξικότητα, η οποία μάλιστα φαίνεται να ελαχιστοποιείται στις 48 ώρες (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5β). Η ίδια σχεδόν κατάσταση φαίνεται να ισχύει και στα πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου *C. gracilis* (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6β). Συνέχεια είχαν λοιπόν οι πειραματικές δοκιμές με τις κυτταρικές σειρές RTL-W1 και ΗΕΚ293. Όσον αφορά τα αποτελέσματα μιτοχονδριακής δραστηριότητας και λυσοσωμικής λειτουργίας για την κυτταρική σειρά RTL-W1, ήταν εξαιρετικά καθώς ο μεταβολίτης αυτός δεν επηρεάζει τις κυτταρικές αυτές λειτουργίες, ενώ όσον αφορά την κυτταρική βιωσιμότητα τα αποτελέσματα είναι καλύτερα από αυτά της

Βρωμοσφαιρόλης, με ένα EC₅₀ αρκετά ικανοποιητικό (Πίνακας 3.7, Σχήμα 3.7γ). Τα πράγματα αλλάζουν λίγο για την κυτταρική σειρά HEK293. Δεν φαίνεται να υπάρχει κάποια επίδραση του μεταβολίτη στην λυσοσωμική δραστηριότητα των κυττάρων και στην κυτταρική βιωσιμότητα, ενώ πολύ πιο χαμηλή τιμή EC₅₀ παρουσιάζει στη μιτοχονδριακή δραστηριότητα των κυττάρων (Πίνακας 3.8, Σχήμα 3.8γ). Καθώς τα αποτελέσματα είναι εντός ορίων περνά στα τελικά πειράματα με τις δοκιμές στα στελέχη βακτηρίων όπου σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.2) δεν παρουσίασε καμία τοξική δράση σε κανένα από τα στελέχη βακτηρίων.

Μεταβολίτης

O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (20)



Μοριακός τύπος C₂₀H₃₂Br₂O₂ **Μοριακό Βάρος** 464.28 g/mol

Ο μεταβολίτης **O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (20)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia glandulifera* (Konidaris, 2015).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη του οποίου η δράση φαίνεται να είναι σχεδόν ίδια για όλες τις συγκεντρώσεις (Σχήμα 3.1ε) με διαφορά τα 100 μΜ όπου υπάρχει 100% θνησιμότητα από τις 24 πρώτες ώρες (Σχήμα 3.2ε). Για το λόγο αυτό απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Μεταβολίτης (3E)-laurenyne (21)



Μοριακός τύπος C₁₅H₁₉ClO **Μοριακό Βάρος** 250.76 g/mol

Ο μεταβολίτης **(3E)-laurenyne (21)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia chondrioides* (Kokkotou et al., 2014).

Ο μεταβολίτης αυτός φαίνεται να έχει κάποια περίεργη επίδραση στη συμπεριφορά των κυπρίδων, και αυτό φαίνεται από το λόγο IC₅₀/EC₅₀, όπου έχει και την υψηλότερη τιμή ανάμεσα σε όλους τους μεταβολίτες (Πίνακας 3.4). Μάλιστα τα 10 μΜ (Σχήμα 3.1στ) φαίνεται να επάγουν την εγκατάσταση των κυπρίδων. Για τους παραπάνω λόγους απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Μεταβολίτης laurencienyne (22)



Μοριακός τύπος C₁₇H₂₃BrCl₂O₃ **Μοριακό Βάρος** 426.17 g/mol

Ο μεταβολίτης **laurencienyne (22)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia glandulifera* (Konidaris, 2015).

Πρόκειται για έναν μεταβολίτη με πολύ καλά αποτελέσματα στις βιοδοκιμές εγκατάστασης των κυπρίδων, με καλή αναστολή εγκατάστασης (Πίνακας 3.1), πολύ καλές τιμές LC₅₀ (Πίνακας 3.2) και βέβαια έναν αρκετά υψηλό θεραπευτικό λόγο (Πίνακας 3.4). Με αυτά τα ιδιαίτερα καλά αποτελέσματα προχώρησε στην επόμενη πειραματική δοκιμασία έναντι των ναυπλίων *Artemia sp.*, όπου παρουσίασε μια ήπια τοξικότητα, η οποία μάλιστα φαίνεται να ελαττώνεται στις 48 ώρες (Πίνακας 3.5). Δυστυχώς ο μεταβολίτης αυτός ήταν αρκετά πιο τοξικός για το Διάτομο *C. gracilis* και γι' αυτό απορρίφθηκε από τις επόμενες πειραματικές δοκιμές (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6β).

Μεταβολίτης graciosallene (23)



Ο μεταβολίτης graciosallene (23) απομονώθηκε από το Γαστερόποδο *Aplysia depilans* (Petraki et al., 2015; Petraki, 2016).

Πρόκειται για έναν μη τοξικό μεταβολίτη του οποίου όμως η δράση φαίνεται να είναι σχεδόν ίδια για όλες τις συγκεντρώσεις (Σχήμα 3.1στ) και για το λόγο αυτό απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.
Μεταβολίτης obtusallene I (24)



Ο μεταβολίτης **obtusallene I (24)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia obtuse* (Harizani, 2013).

Πρόκειται για έναν μη τοξικό μεταβολίτη ο οποίος δε φαίνεται να έχει κάποια ανασταλτική δράση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ στα 10 μΜ φαίνεται να προτρέπει τις κυπρίδες να εγκατασταθούν (Σχήμα 3.1στ) και για το λόγο αυτό απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

Μεταβολίτης chondrioallene (25)



Ο μεταβολίτης **chondrioallene (25)** απομονώθηκε από το Ροδοφύκος *Laurencia obtuse* (Harizani, 2013).

Όπως και ο μεταβολίτης **obtusallene I (24)** έτσι και αυτός είναι ένας μη τοξικός μεταβολίτης ο οποίος όμως δε φαίνεται να έχει κάποια ανασταλτική δράση στις χαμηλές συγκεντρώσεις ενώ στα 10 μΜ φαίνεται να προτρέπει τις κυπρίδες να εγκατασταθούν (Σχήμα 3.1στ) και για το λόγο αυτό απορρίφθηκε από περαιτέρω πειραματικές δοκιμές.

3.2 Βιοδοκιμές εγκατάστασης του είδους A. amphitrite

Αρχικά έγινε χρήση όλων των δευτερογενών μεταβολιτών (1-25, Πίνακας 3.1) που απομονώθηκαν από το γένος *Laurencia*, καθώς και από Γαστερόποδα του γένους *Aplysia*, σε βιοδοκιμές εγκατάστασης με τη χρήση του βασικού οργανισμού μοντέλου, τις κυπρίδες του Θυσανόποδου *Amphibalanus amphitrite*. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται αναλυτικά στους Πίνακες 3.2α-γ, 3.3 & 3.4 και Σχήματα 3.1α-στ, 3.2α-στ και 3.3α-στ.

Αρκετοί δευτερογενείς μεταβολίτες είχαν τιμή ΕC₅₀ για αναστολή εγκατάστασης που βρισκόταν στα επίπεδα των μΜ. Μερικοί μεταβολιτες όπως οι laurinterol (6), 4hydroxy-5-brasilene (8) και elatol (12) παρουσίασαν υψηλή τοξικότητα έναντι των κυπρίδων (Πίνακας 3.2α και Σχήμα 3.1β, γ), ενώ οι obtusallene I (24) και chondrioallene (25) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις προέτρεπαν τις κυπρίδες να εγκατασταθούν (Πίνακας 3.2α και Σχήμα 3.1στ). Ο λόγος Εγκατάστασης προς Μη Μεταμόρφωση (Settlement, IC_{50} / No Metamorphosis, EC_{50}) στις 72 ώρες (Πίνακας 3.4) υπολογίσθηκε προκειμένου να εκτιμηθεί οποιαδήποτε ανεπιθύμητη δράση των μεταβολιτών έναντι της συμπεριφοράς των κυπρίδων (Kotsiri et al., 2018), με τις filiformin (5) και (3E)-laurenyne (21) να παρουσιάζουν πολύ υψηλές τιμές. Η Βρωμοσφαιρόλη, ένα βρωμιούχο διτερπένιο που απομονώθηκε από το Ροδοφύκος Sphaerococcus coronopifolius (Piazza et al., 2011) και το οποίο χρησιμοποιείται στην παρούσα μελέτη ως θετικός μάρτυρας, παρουσίασε παρόμοιο προφίλ εγκατάστασης με αυτό που έχει αναφερθεί στο παρελθόν από τους Piazza et al. (2011), όμως η παρουσία της είχε επίσης ως αποτέλεσμα την αναστολή μεταμόρφωσης των κυπρίδων σε εδραίους οργανισμούς (Πίνακας 3.3, 3.4 και Σχήμα 3.4).

Με τη Βρωμοσφαιρόλη ως σημείο αναφοράς οκτώ μεταβολίτες, *iso*-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol (12), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxyisopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22), ικανοποιούσαν το κριτήριο τιμής IC₅₀ για αναστολή εγκατάστασης των κυπρίδων ως <μΜ (Πίνακας 3.2α). Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia.* Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) ατόμων που εγκαταστάθηκαν από το συνολικό αριθμό κυπρίδων/οπή εκτεθειμένα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα.

Πίνακας 3.2α: Τιμές IC₅₀ για την Εγκατάσταση των κυπρίδων του *A. amphitrite* ύστερα από έκθεση στους μεταβολίτες για 24, 48 και 72 ώρες (hrs). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Όλες οι συγκεντρώσεις είναι σε (μΜ). Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν το φαινόμενο προτροπής εγκατάστασης συμβολίζονται με αστερίσκο (*). ND: Δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση.

Δευτερονενείς Μεταβολίτες	ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ (ΙC50)		
	24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	27,900	14,640	16,210
2	2,020	18,110	19,770
3	1,040	1,800	2,000
4	0,120	0,180	0,340
5	2,260	5,450	12,870
6	2,420	2,220	1,270
7	17,490	17,69	10,280
8	15,830	17,49	6,950
9	0,520	0,660	0,500
10	5,240	0,662	4,660
11	0,003	0,002	0,002
12	0,089	0,073	0,042
13	1,490	1,060	1,020
14	0,011	0,065	0,028
15	2,840	7,020	5,370
16	1,420	1,960	2,200
17	0,634	0,806	1,190
18	0,046	0,076	0,316
19	0,400	0,915	0,756
20	2,570	2,890	3,320
21	3,210	7,370	0,575
22	0,025	0,043	0,055
23	0,237	9,180	9,700
24*	ND	9,490	207,500
25*	62,720	55,620	75,420



Σχήμα 3.1α Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), *iso*-laurenisol (4).



Σχήμα 3.1β Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (**5**), laurinterol (**6**), epibrasilenol (**7**), 4-hydroxy-5-brasilene (**8**).



Σχήμα 3.1γ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12).



Σχήμα 3.1δ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (**13**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**), deoxyparguerol 16-acetate (**15**), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (**16**).



Σχήμα 3.1ε Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (**17–18**), neorogioldiol (**19**), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (**20**).



Σχήμα 3.1στ Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών *(3E)*-laurenyne **(21)**, laurencienyne **(22)**, graciosallene **(23)**, obtusallene I **(24)**, and chondrioallene **(25)**.

Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia.* Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) νεκρών ατόμων από το συνολικό αριθμό κυπρίδων/οπή εκτεθειμένα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα.

Πίνακας 3.2β: Τιμές LC₅₀ για την Θνησιμότητα των κυπρίδων του *A. amphitrite* ύστερα από έκθεση στους μεταβολίτες για 24, 48 και 72 ώρες (hrs). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Όλες οι συγκεντρώσεις είναι σε (μΜ). Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν το φαινόμενο προτροπής εγκατάστασης συμβολίζονται με αστερίσκο (*). ND: Δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση.

Δευτερονενείς Μεταβολίτες.	ΘΝΗΣΙΜΟΤΗΤΑ(LC ₅₀)		
,,,,,,, _	24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	26,010	229,800	29,460
2	>1000	790,200	191,200
3	66,060	382,200	269,200
4	3,550	2,980	2,800
5	33,140	ND	ND
6	12,310	5,290	2,310
7	24,750	23,420	24,960
8	7,760	7,380	5,930
9	76,230	116,400	49,140
10	28,830	28,490	28,750
11	56,140	38,420	ND
12	0,327	0,194	0,061
13	29,810	848,700	8,150
14	1,960	3,610	3,540
15	31,710	33,350	34,650
16	>1000	>1000	>1000
17	ND	ND	>1000
18	26,240	26,310	20,340
19	412,900	365,800	573,100
20	ND	ND	138,300
21	0,575	1,120	18,630
22	6.860	10.110	71.340
23	ND	ND	ND
24*	259.800	527.500	527.500
25*	643,000	624,600	618,200



Σχήμα 3.2α Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), iso-laurenisol (4).



Σχήμα 3.2β Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (**5**), laurinterol (**6**), epibrasilenol (**7**), 4-hydroxy-5-brasilene (**8**).



Σχήμα 3.2γ Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12).



Σχήμα 3.2δ Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (**13**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**), deoxyparguerol 16-acetate (**15**), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (**16**).



Σχήμα 3.2ε Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (**17–18**), neorogioldiol (**19**), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (**20**).



Σχήμα 3.2στ Αποτελέσματα Θνησιμότητας (Mortality) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών (3E)-laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene I (24), and chondrioallene (25).

Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *Α. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia.* Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) μη μεταμορφωμένων ατόμων από το συνολικό αριθμό κυπρίδων/οπή εκτεθειμένα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα.

Πίνακας 3.2γ: Τιμές EC₅₀ για την Μη Μεταμόρφωση των κυπρίδων του *A. amphitrite* ύστερα από έκθεση στους μεταβολίτες για 24, 48 και 72 ώρες (hrs). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον **Πίνακα 3.1**. Όλες οι συγκεντρώσεις είναι σε (μΜ). Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν το φαινόμενο προτροπής εγκατάστασης συμβολίζονται με αστερίσκο (*). ND: Δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση.

Δευτερονενείς Μεταβολίτες.	ΜΗ ΜΕΤΑΜΟΡΦΩΣΗ (ΕС₅₀)		
mereke level2 mereker ne3.	24 hrs	48 hrs	72 hrs
1	37,990	ND	ND
2	43,990	38,240	36,470
3	ND	80,930	109,200
4	10,350	12,380	5,850
5	27,010	0,001	0,287
6	28,330	10,850	14,980
7	25,410	21,680	53,240
8	6,810	5,010	5,420
9	38,170	47,360	57,810
10	39,290	71,050	57,170
11	0,003	0,002	ND
12	0,396	0,250	0,066
13	46,350	64,680	78,930
14	6,420	5,150	7,720
15	63,630	55,090	72,960
16	58,340	49,090	58,460
17	0,057	0,921	100,600
18	45,360	50,370	48,510
19	52,800	57,890	70,410
20	46,980	11,280	10,050
21	7,420	18,160	0,001
22	0,008	0,010	58,660
23	0,276	10,310	11,240
24*	0,058	63,060	163,400
25*	47,070	42,750	53,270



Σχήμα 3.3α Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του A. amphitrite παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), *iso*-laurenisol (4).



Σχήμα 3.3β Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών filiformin (5), laurinterol (6), epibrasilenol (7), 4-hydroxy-5-brasilene (8).



Σχήμα 3.3γ Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12).



Σχήμα 3.3δ Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών obtusenol (**13**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**), deoxyparguerol 16-acetate (**15**), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (**16**).



Σχήμα 3.3ε Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (**17-18**), neorogioldiol (**19**), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (**20**).



Σχήμα 3.3στ Αποτελέσματα Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών (*3E*)-laurenyne (**21**), laurencienyne (**22**), graciosallene (**23**), obtusallene I (**24**), and chondrioallene (**25**).

Αποτελέσματα Εγκατάστασης (Settlement), Θνησιμότητας (Mortality) και Μη Μεταμόρφωσης (No Metamorphosis) κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων Βρωμοσφαιρόλης που έχει απομονωθεί από το Ροδοφύκος *Sphaerococcus coronopifolius.* Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) νεκρών ατόμων από το συνολικό αριθμό κυπρίδων/οπή εκτεθειμένα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα.

Πίνακας 3.3: Τιμές IC₅₀ για την Εγκατάσταση, LC₅₀ για τη Θνησιμότητα και EC₅₀ για την Μη Μεταμόρφωση των κυπρίδων του *Α. amphitrite,* ύστερα από έκθεση στην Βρωμοσφαιρόλη για 24, 48 και 72 ώρες (hrs). Όλες οι συγκεντρώσεις είναι σε (μΜ).

Βρωμοσφαιρόλη	24hrs	48hrs	72hrs
Εγκατάσταση (IC ₅₀)	0,580	0,624	0,836
Θνησιμότητα (LC₅₀)	17,900	4,570	2,500
Μη Μεταμόρφωση (EC ₅₀)	0,450	0,267	0,561



Σχήμα 3.4 Αποτελέσματα πειραμάτων εγκατάστασης των κυπρίδων του *A. amphitrite* παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων της Βρωμοσφαιρόλης.

Πίνακας 3.4: Τιμές Θεραπευτικού λόγου (TR) και λόγου Εγκατάσταση/Μη Μεταμόρφωση των κυπρίδων του *A. amphitrite* ύστερα από έκθεση στους μεταβολίτες για 72 ώρες (hrs). Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1. Όλες οι συγκεντρώσεις είναι σε (μΜ). Οι μεταβολίτες που παρουσίασαν το φαινόμενο προτροπής εγκατάστασης συμβολίζονται με αστερίσκο (*). ND: Δεν ήταν δυνατή η εκτίμηση.

Δευτερογενείς Μεταβολίτες	Θεραπευτικός λόγος 72 hrs (TR=LC₅₀/IC₅₀)	Εγκατάσταση/ Μη Μεταμόρφωση 72 hrs ΙC₅₀/EC₅₀
1	1,82	ND
2	9,67	0,54
3	134,60	0,02
4	8,24	0,06
5	ND	44,84
6	1,82	0,08
7	2,43	0,19
8	0,85	1,28
9	98,28	0,01
10	6,17	0,08
11	ND	ND
12	1,45	0,64
13	7,99	0,01
14	126,43	0,00
15	6,45	0,07
16	>1000	0,04
17	>1000	0,01
18	64,37	0,01
19	758,07	0,01
20	41,66	0,33
21	32,40	575,00
22	1297,0	0,00
23	ND	0,86
24*	2,54	1,27
25*	8,20	1,42
Βρωμοσφαιρόλη	2,99	1,49

3.3 Πειράματα τοξικότητας έναντι του είδους Artemia sp.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, *iso*-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol (12), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιοτης οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22), πληρούσαν τα κριτήρια αποκλεισμού, όπως περιγράφονται αναλυτικά στην εισαγωγή, και αξιολογήθηκαν ως έχοντες εν δυνάμει υποσχόμενη αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι των κυπρίδων του *A. amphitrite.* Μαζί λοιπόν με την Βρωμοσφαιρόλη (Πίνακας 3.2α-γ & 3.3), δοκιμάστηκαν στη συνέχεια σε πειράματα τοξικότητας έναντι των ναυπλίων *Artemia sp.* σε 24 ώρες και 48 ώρες έκθεσης (Πίνακας 3.5).

Αυτά τα πειράματα τοξικότητας διεξήχθησαν προκειμένου να προσδιοριστεί ποιος από τους επιλεγμένους δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσιάζει οποιαδήποτε τοξικότητα έναντι άλλου ασπόνδυλου οργανισμού αποκλείοντας αυτούς που είναι τοξικοί μετά τις 48 ώρες. Επίσης κριτήριο αποκλεισμού ήταν η αύξηση > 10 φορές στην τιμή LC₅₀ μεταξύ των χρονικών σημείων 24 ωρών και 48 ωρών. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η *iso*-laurentisol (4) και η elatol (12) δεν πέρασαν αυτό το κριτήριο και επομένως αποκλείστηκαν από οποιαδήποτε περαιτέρω δοκιμή. Η Βρωμοσφαιρόλη δεν παρουσίασε καμία τοξικότητα (Πίνακας 3.5, Σχήμα 3.5α-β).

Τα αποτελέσματα (Σχήμα 3.5α-β), είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) νεκρών ατόμων από το συνολικό αριθμό ναυπλίων *Artemia sp.*/οπή εκτεθειμένα σε 6 διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση ανά πείραμα.

Πίνακας 3.5: Τιμές LC₅₀ (μM) των δευτερογενών μεταβολιτών από τα πειράματα τοξικότητας έναντι των ναυπλίων *Artemia* sp. σε 24 ώρες και 48 ώρες έκθεσης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον **Πίνακα 3.1**

Δευτερογενείς Μεταβολίτες	Artemia sp.		
	24 hrs	48 hrs	
4	21,11	0,74	
9	283,20	189,00	
11	10,05	1,57	
12	6,59	0,37	
14	34,19	15,13	
18	34,88	38,05	
19	31,53	303,80	
22	3,07	9,63	
Βρωμοσφαιρόλη	>1000	>1000	



Σχήμα 3.5α Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών *iso*-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol (12),που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Artemia* sp.



Σχήμα 3.5β Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων Βρωμοσφαιρόλης και των δευτερογενών μεταβολιτών 3,15-dibromo-7,16-dihydroxyisopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19), laurencienyne (22) που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Artemia* sp.

3.4 Πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου Chaetoceros gracilis

Οι μεταβολίτες perforenol (9), perforatone (11), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxyisopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22), κρίθηκαν κατάλληλοι, πάλι σύμφωνα με τα κριτήρια αποκλεισμού όπως περιγράφονται αναλυτικά στην Εισαγωγή, για να συνεχίσουν στην επόμενη πειραματική δοκιμή προσδιορισμού τοξικότητας έναντι του Διατόμου *Chaetoceros gracilis*.

Ως βασικό κριτήριο εγκυρότητας της ανάλυσης έπρεπε ο αριθμός των κυττάρων του αρνητικού μάρτυρα μετά από 96 ώρες να είναι ≥ 2 x 10⁵ κύτταρα/mL (ASTM 2012), ενώ ως κριτήριο αποκλεισμού έπρεπε ο μεταβολίτης να μην έχει χαμηλότερη ή κοντινή τιμή EC₅₀ από την Βρωμοσφαιρόλη, η οποία αποδείχθηκε ότι είναι ένας πολύ ισχυρός αναστολέας της ανάπτυξης του *Chaetoceros gracilis*. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η perforatone (**11**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**) και laurencienyne (**22**) δεν πέρασαν αυτό το κριτήριο και επομένως αποκλείστηκαν από οποιαδήποτε περαιτέρω δοκιμή (Πίνακας 3.6, Σχήμα 3.6α-β).

Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση (6 συνολικά) ανά πείραμα.

Πίνακας 3.6: Τιμές EC₅₀ (μΜ) επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών από τα πειράματα τοξικότητας έναντι του Διατόμου *Chaetoceros gracilis*, ύστερα από 96 ώρες έκθεσης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1

Δευτερογενείς Μεταβολίτες	<i>Chaetoceros gracilis</i> 96 hrs
9	49,81
11	4,52
14	1,61
18	10,71
19	352,40
22	2,15
Βρωμοσφαιρόλη	4,34



Σχήμα 3.6α Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (**9**), perforatone (**11**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (**18**) που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Chaetoceros gracilis*.



Σχήμα 3.6β Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων Βρωμοσφαιρόλης και των δευτερογενών μεταβολιτών neorogioldiol (**19**), laurencienyne (**22**), που έχουν απομονωθεί από είδη Ροδοφυκών του Γένους *Laurencia* και Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* έναντι του είδους *Chaetoceros gracilis*.

3.5 Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1

Σε αυτή τη φάση πειραμάτων προχώρησαν οι μεταβολίτες perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και neorogioldiol (19), ενώ εφαρμόστηκαν τρεις διαφορετικές δοκιμές κυτταροτοξικότητας σε μια προσπάθεια εντοπισμού πιθανών τρόπων δράσης μέσω των οποίων κάθε δευτερογενής μεταβολίτης επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων, προϋπόθεση για οποιαδήποτε εφαρμογή αυτών των δευτερογενών μεταβολιτών (Qian et al., 2013).

Τα αποτελέσματα έδειξαν (Πίνακας 3.7, Σχήμα 3.7α-δ) ότι κανένας από τους δευτερογενείς μεταβολίτες δεν είχε επίδραση στη λυσοσωμική δραστικότητα και/ή στον γενικό μεταβολισμό και τη μιτοχονδριακή δραστηριότητα αυτής της κυτταρικής σειράς. Η δοκιμασία κρυσταλλικού ιώδους έδειξε ότι δύο από τους δευτερογενείς μεταβολίτες παρουσίασαν τιμή EC₅₀ στις χαμηλότερες μικρομοριακές συγκεντρώσεις, ενώ το διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane **18** και η Βρωμοσφαιρόλη παρουσίασαν τιμή EC₅₀ σε υπο-μικρομοριακή συγκέντρωση. Δεδομένου ότι κανένας από αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες δεν αποδείχθηκε πιο τοξικός από τη Βρωμοσφαιρόλη ή

Τα αποτελέσματα στο **Σχήμα 3.7α-δ** είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) κυτταρική βιωσιμότητα ή κυτταροτοξικότητα. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση (6 συνολικά) ανά πείραμα. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά, απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και τέλος της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Πίνακας 3.7: Τιμές EC₅₀ (μΜ) επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών από τα πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1, ύστερα από 48 ώρες έκθεσης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1

/	RTL-W1		
Δευτερογενείς Μεταβολίτες	Μιτοχονδριακή δραστηριότητα	Κυτταρική βιωσιμότητα	Λυσοσωμική δραστηριότητα
9	>1000	15,970	>1000
18	>1000	0,456	138,200
19	>1000	12,810	>1000
Βρωμοσφαιρόλη	>1000	0,575	143,700



Σχήμα 3.7α Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του δευτερογενή μεταβολίτη perforenol **(9)** έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.



Σχήμα 3.7β Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του διτερπενίου της οικογένειας dactylomelane **(18)** έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και τέλος της κυτταρικής βιωσιμότητας.


Σχήμα 3.7γ Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του δευτερογενή μεταβολίτη neorogioldiol **(19)** έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.



Σχήμα 3.7δ Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων της Βρωμοσφαιρόλης έναντι της κυτταρικής σειράς RTL-W1. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.

3.6 Πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς ΗΕΚ293

Δοκιμάζοντας τους ίδιους δευτερογενείς μεταβολίτες, perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και neorogioldiol (19), όπως και στην κυτταρική γραμμή RTL-W1 και χρησιμοποιώντας τις ίδιες δοκιμές κυτταροτοξικότητας, παρατηρήσαμε (Πίνακας 3.8, Σχήμα 3.8α-δ) ότι στην περίπτωση της κυτταρικής σειράς HEK293 το διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και η neorogioldiol (19) ήταν πολύ επιλεκτικοί και επηρέασαν σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις τη μιτοχονδριακή λειτουργία και τον μεταβολισμό, σε αντίθεση με την κυτταρική σειρά RTL-W1. Αντίθετα, η λυσοσωμική δραστηριότητα δεν επηρεάστηκε από την παρουσία των εξεταζόμενων μεταβολιτών (Πίνακας 3.8). Η δοκιμασία κρυσταλλικού ιώδους (Πίνακας 3.8) έδειξε ότι η perforenol (9) μαζί με τη Βρωμοσφαιρόλη είχαν ελαφρά κυτταροτοξική δράση.

Τα αποτελέσματα **Σχήμα 3.8α-δ** είναι εκφρασμένα ως ποσοστό (%) κυτταρική βιωσιμότητα ή κυτταροτοξικότητα. Τα πειράματα επαναλήφθηκαν 3 φορές ενώ έγιναν 4 επαναλήψεις ανά συγκέντρωση (6 συνολικά) ανά πείραμα. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά ,απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και τέλος της κυτταρικής βιωσιμότητας.

Πίνακας 3.8: Τιμές EC₅₀ (μΜ) επιλεγμένων δευτερογενών μεταβολιτών από τα πειράματα τοξικότητας έναντι της κυτταρικής σειράς HEK 293, ύστερα από 48 ώρες έκθεσης. Οι δευτερογενείς μεταβολίτες αντιστοιχούν στην αρίθμηση που φαίνεται στον Πίνακα 3.1.

Λεμτερονενείς	HEK293					
Μεταβολίτες	Μιτοχονδριακή δραστηριότητα	Κυτταρική βιωσιμότητα	Λυσοσωμική δραστηριότητα			
9	10,780	81,100	>1000			
18	0,225	>1000	>1000			
19	0,062	434,100	>1000			
Βρωμοσφαιρόλη	57,610	97,120	340,400			



Σχήμα 3.8α Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του μεταβολίτη perforenol (9) έναντι της κυτταρικής σειράς ΗΕΚ293. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.



Σχήμα 3.8β Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του διτερπένιου της οικογένειας dactylomelane (18) έναντι της κυτταρικής σειράς HEK293. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.



Σχήμα 3.8γ Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων του μεταβολίτη neorogioldiol **(19)** έναντι της κυτταρικής σειράς HEK293. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.



Σχήμα 3.8δ Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας διαφορετικών συγκεντρώσεων της Βρωμοσφαιρόλης έναντι της κυτταρικής σειράς ΗΕΚ 293. Δεξιόστροφα ξεκινώντας από πάνω αριστερά απεικονίζονται τα αποτελέσματα της μιτοχονδριακής λειτουργίας, της λυσοσωμικής δραστηριότητας και κάτω της κυτταρικής βιωσιμότητας.

3.7 Πειράματα τοξικότητας έναντι θαλάσσιων στελεχών βακτηρίων

Εφόσον οι μεταβολίτες perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και neorogioldiol (19), δεν παρουσίασαν τοξικότητα έναντι των κυτταρικών σειρών, εκτιμήθηκε η δραστικότητα τους, μαζί με και της Βρωμοσφαιρόλης, έναντι πέντε θαλάσσιων στελεχών βακτηρίων που έχουν εντοπιστεί σε βιοφιλμ, Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis, Bacillus thuringiensis, Pseudomonas putita και Pseudomonas pseudoalcaligenes.

Λόγω του ότι και στις τρεις επαναλήψεις τα αποτελέσματα ήταν ίδια, πάρθηκαν φωτογραφικά δεδομένα μόνο μίας εκ των τριών επαναλήψεων τα οποία απεικονίζονται στην **Εικόνα 3.1.** Με σειρά λοιπόν από πάνω προς τα κάτω διακρίνονται τα πειραματικά τρυβλία με τους μεταβολίτες perforenol (**9**), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (**18**) neorogioldiol (**19**), Βρωμοσφαιρόλη καθώς και ο αρνητικός (μεθανόλη, MeOH) και θετικός μάρτυρας (πενικιλίνη). Τα τρυβλία χωρίστηκαν στα 4 (ένα τεταρτημόριο/συγκέντρωση: 0.1, 1, 10, 100 μM) ενώ οι αποστειρωμένοι δίσκοι (4 mm, GF/F; Whatman), εμβαπτίστηκαν με 40 μL δείγματος/μεταβολίτη και τοποθετήθηκαν σε κάθε τεταρτημόριο, αφού πρώτα είχε γίνει εμβολιασμός των τρυβλίων με το στέλεχος των βακτηρίων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.1) σε κανένα τρυβλίο, πλην του θετικού μάρτυρα, δεν παρατηρήθηκε ζώνη αναστολής ανάπτυξης βακτηρίων γύρω από το φίλτρο, οδηγώντας μας έτσι στο συμπέρασμα ότι κανένας από τους μεταβολίτες δεν είχε κάποια επίδραση στην ανάπτυξη των βακτηριακών στελεχών.



Εικόνα 3.1 Αποτελέσματα εκτίμησης τοξικότητας, με σειρά από πάνω προς τα κάτω, διαφορετικών συγκεντρώσεων (0.1, 1, 10, 100 μM) των μεταβολιτών perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) neorogioldiol (19), Βρωμοσφαιρόλη καθώς και ο αρνητικός (Μεθανόλη, MeOH) και θετικός μάρτυρας (πενικιλίνη).

3.8 Ανάλυση των δοκιμίων από τις μελέτες πεδίου για τον υπολογισμό της αντιβιοεπιστρωτικής ενεργότητας της Βρωμοσφαιρόλης

Όπως αναφέρεται και στο Κεφάλαιο 2, πέντε σειρές δοκιμίων ποντίστηκαν στο θαλάσσιο περιβάλλον, αναλύθηκαν όμως μόνο οι 4 καθώς τα πειράματα έληξαν ένα μήνα νωρίτερα από το αναμενόμενο ύστερα από πρόβλημα που εντοπίστηκε στην κυκλοφορία του νερού στο εσωτερικό της κατασκευής. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα



Εικόνα 3.2 Εδραίοι οργανισμοί που έχουν εγκατασταθεί και κατασκευής πόντισης των

3.2, μετά από 4 μήνες, ένας αρκετά υψηλός αριθμός εδραίων οργανισμών είχαν εγκατασταθεί και αναπτυχθεί στο στόμιο της κατασκευής με αποτέλεσμα τη μη σωστή κυκλοφορία του νερού στο εσωτερικό της και τη συσσώρευση ανόργανης ύλης (λάσπη) πάνω στα δοκίμια.

Η επεξεργασία των δοκιμίων ξεκινούσε άμεσα, μετά την μεταφορά τους στο εργαστήριο, αρχικά με μια απλή οπτική παρατήρηση των δοκιμίων προκειμένου να διαπιστωθεί η καλή ή όχι κατάσταση τους.

Μια βασική παρατήρηση είχε να κάνει με αναπτυχθεί στο στόμιο της την κατάσταση της επιφάνειας και του χρώματος των δοκιμίων, τα οποία όπως αναφέρεται και στο δοκιμίων ύστερα από 4 μήνες. Κεφάλαιο 2, λόγω του ότι δεν είχαν υποστεί κάποια επιφανειακή επεξεργασία, παρουσίαζαν αυξημένη τραχύτητα, ενώ μετά την εμβάπτιση των δοκιμίων στο θαλασσινό νερό παρατηρήθηκαν χρωματικές διαφοροποιήσεις της

επιφάνειας των υφαλοχρωμάτων που οφείλονται στην απομάκρυνση των

υδατοδιαλυτών συστατικών του υφαλοχρώματος (χρωστικές, π.χ. Fe₂O₃).

3.8.1 Εκτίμηση προκαρυωτικών οργανισμών

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 3.3, στην επιφάνεια όλων των πειραματικών δοκιμίων δημιουργήθηκε βιοφιλμ. Μια πιο λεπτομερής παρατήρηση των δεδομένων

από το **Σχήμα 3.9** οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην εμφάνιση βιοφιλμ ανά μήνα σε σχέση με τα δοκίμια τα οποία έφεραν Οξείδιο του Ψευδαργύρου και Οξείδιο του Χαλκού. Πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι ο συνδυασμός Οξειδίου του Χαλκού, Βρωμοσφαιρόλης και νανοσωλήνων άνθρακα έδωσε σε διάστημα 1 μηνός τη μικρότερη ανάπτυξη προκαρυωτικών οργανισμών σε σχέση με όλα τα άλλα δείγματα.



Εικόνα 3.3 Πειραματικά δοκίμια από την πρώτη δειγματοληψία δοκιμίων.



Σχήμα 3.9 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη προκαρυωτικών οργανισμών στα δοκίμια. Τα αποτελέσματα είναι εκφρασμένα σε λογαριθμικές τιμές ανά μήνα.

3.8.2 Εκτίμηση ολικής πρωτεΐνης

Η ολική πρωτεΐνη (Σχήμα 3.10) φαίνεται ότι ξεκίνησε με ανοδική πορεία σε όλα τα δείγματα, η οποία όμως μειώθηκε στον 4° μήνα της δειγματοληψίας. Επίσης παρατηρείται μια αυξημένη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα που περιείχαν ψευδάργυρο σε σχέση με τα δείγματα που είχαν χαλκό. Πρέπει να επισημάνουμε ότι ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος Ecoflex SPC 200 το οποίο εμφανίζει σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης στον 1° μήνα δειγματοληψίας ενώ οι επακόλουθες τιμές είναι σημαντικά μειωμένες.



Σχήμα 3.10 Ποσότητα ολικής πρωτεΐνης (μgr) ανά μήνα, στους διαφορετικούς συνδυασμούς υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν στα δοκίμια.

3.8.3 Ταξινομική ανάλυση εδραίων οργανισμών

Όσον αφορά την ταξινομική μελέτη των δειγμάτων, οι κυρίαρχοι οργανισμοί των δοκιμίων ήταν οι Πολύχαιτοι, με τα Βρυόζωα και τους Σπόγγους να ακολουθούν, ενώ πιο σπάνια ήταν η εμφάνιση των Δίθυρων με τελευταία στη σειρά τα Θυσανόποδα. Στην Εικόνα 3.4, δεξιόστροφα και ξεκινώντας από πάνω αριστερά, βλέπουμε αυγά από Γαστερόποδα, Βρυόζωο μαζί με Πολύχαιτους, Σπόγγους και τέλος ένα Θυσανόποδο.



Εικόνα 3.4 Ασπόνδυλοι οργανισμοί που καταγράφηκαν στα πειραματικά δοκίμια. Από επάνω αριστερά και δεξιόστροφα: 1) Αυγά Μαλακίου, 2) Βρυόζωο και Πολύχαιτος, αποικίες Σπόγγων και ακμαίο Θυσανόποδο (Μεγέθυνση x40, Πρωτοπαπά Μ.).

Συγκεκριμένα όσον αφορά τους Πολύχαιτους, η παρουσία Βρωμοσφαιρόλης βελτίωσε τη συμπεριφορά των υποστρωμάτων σε σχέση με την παρουσία μικροσφαιριδίων χαλκού ή ψευδαργύρου, οι νανοσωλήνες είχαν χειρότερη συμπεριφορά από τη Βρωμοσφαιρόλη αλλά η συνδυαστική χρήση και των δύο έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα μόνο στην περίπτωση του χαλκού. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, δεν ήταν καλύτερα από τους 2 αρνητικούς μάρτυρες (Ecomar AF 2000, Sea9-211 και Ecoflex SPC 200) **(Σχήμα 3.11-3.15)**.



Σχήμα 3.11 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Πολυχαίτων στα δοκίμια.



Σχήμα 3.12 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Σπόγγων στα δοκίμια.



Σχήμα 3.13 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Βρυόζωων στα δοκίμια.



Σχήμα 3.14 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Δίθυρων στα δοκίμια.



Σχήμα 3.15 Ικανότητα των διαφορετικών συνδυασμών υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη Θυσανόποδων στα δοκίμια.

Αναφορικά με την εγκατάσταση προνυμφικών μορφών Σπόγγων, η παρουσία Βρωμοσφαιρόλης βελτίωσε τη συμπεριφορά των υποστρωμάτων σε σχέση με την παρουσία μικροσφαιριδίων μόνο του χαλκού, οι νανοσωλήνες είχαν χειρότερη συμπεριφορά από τη Βρωμοσφαιρόλη αλλά η συνδυαστική χρήση και των δύο έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα μόνο στην περίπτωση του χαλκού και πάλι. Τα αποτελέσματα, ωστόσο, δεν ήταν καλύτερα από τους 2 αρνητικούς μάρτυρες (Ecomar AF 2000 + Sea9-211 και Ecoflex SPC 200) (Σχήμα 3.12). Αναφορικά με την εγκατάσταση προνυμφικών μορφών Βρυοζώων, η παρουσία Βρωμοσφαιρόλης δεν φαίνεται να αποτρέπει την εγκατάσταση των οργανισμών αυτών και το ίδιο ισχύει σε όλους τους άλλους συνδυασμούς υποστρωμάτων με εξαίρεση τους 2 αρνητικούς μάρτυρες (Ecomar AF 2000 + Sea9-211 και Ecoflex SPC 200) (Σχήμα 3.13). Τα αποτελέσματα σχετικά με την εγκατάσταση Διθύρων Μαλακίων (Σχήμα 3.14) είναι ενδιαφέροντα αναφορικά με τη συμπεριφορά του ψευδαργύρου και της Βρωμοσφαιρόλης ή των νανοσωλήνων άνθρακα αφού απέτρεψαν την εγκατάσταση τέτοιων οργανισμών ενώ δεν συνέβη το ίδιο στην περίπτωση του χαλκού. Και στην περίπτωση αυτή οι 2 αρνητικοί μάρτυρες (Ecomar AF 2000 + Sea9-211 και Ecoflex SPC 200) συμπεριφέρθηκαν καλύτερα από πολλούς άλλους συνδυασμούς. Ακριβώς αντίθετα αποτελέσματα σχετικά με τη συμπεριφορά του ψευδαργύρου και της Βρωμοσφαιρόλης καταγράφηκαν στην περίπτωση των Θυσανόποδων (Σχήμα 3.15) όπου φαίνεται επίσης ότι δεν υπάρχει προσθετική αξία στη χρήση νανοσωλήνων και Βρωμοσφαιρόλης για την αποτροπή εγκατάστασης τους.

3.8.4 Εκτίμηση του χρόνου εμφάνισης βιοεπίστρωσης

Στον Πίνακα 3.9 δίνονται η μέση τιμή εγκατάστασης και ο χρόνος διπλασιασμού, σε μήνες, για τους διαφορετικούς οργανισμούς που καταγράφηκαν πάνω στα δοκίμια. Για τα Θυσανόποδα δεν έγινε δυνατόν να υπολογιστούν οι παραπάνω τιμές και αυτό δείχνει ότι τα δεδομένα που καταγράψαμε για τα Θυσανόποδα έχουν μια τυχαία πιθανότητα εμφάνισης.

Συμπερασματικά φαίνεται πως η Βρωμοσφαιρόλη δεν αποτρέπει την εγκατάσταση άλλων ειδών όπως οι Πολύχαιτοι, ενώ εμφανίζει εξειδίκευση σχετικά με τα Θυσανόποδα. Οι νανοσωλήνες άνθρακα συνδυάζονται καλύτερα με τον ψευδάργυρο για την αποτροπή εγκατάστασης όλων των ειδών που καταγράφηκαν με εξαίρεση τους Σπόγγους. Η Βρωμοσφαιρόλη εμφανίζει επιλεκτικότητα σχετικά με την αποτροπή εγκατάστασης των Θυσανόποδων ενώ οι συνδυασμοί της με νανοσφαιρίδια χαλκού ή ψευδαργύρου δίνουν μια συμπεριφορά αποτροπής εγκατάστασης που εξαρτάται από τον οργανισμό. Η προσθετική χρήση νανοσφαιριδίων χαλκού και ψευδαργύρου με επίστρωση βάσης (SEA9-211) μάλλον ακυρώνει το ένα ως προς το άλλο και δεν υπάρχει προσθετική αξία χρήσης.

Επίσης, από τις μέσες τιμές εγκατάστασης συμπεραίνουμε ότι η Βρωμοσφαιρόλη σε νανοσφαιρίδια χαλκού εμφάνισε χρόνο ενεργής δράσης 2 μήνες για τους Πολύχαιτους και τα Βρυόζωα, 2.5 μήνες για τα Δίθυρα Μαλάκια και πάνω από 4 μήνες για τους Σπόγγους και τα Θυσανόποδα. Από την άλλη μεριά, από τις μέσες τιμές εγκατάστασης συμπεραίνουμε ότι η Βρωμοσφαιρόλη σε νανοσφαιρίδια ψευδαργύρου εμφάνισε χρόνο ενεργής δράσης 3 μήνες για τους Πολύχαιτους, 2 μήνες για τους Σπόγγους, 4 μήνες για τα Δίθυρα Μαλάκια, 1.5 μήνες για τα Θυσανόποδα και πάνω από 4 μήνες για τα Βρυόζωα. **Πίνακας 3.9** Μέση τιμή (σε μήνες) εγκατάστασης για τους Πολύχαιτους, τα Βρυόζωα, τους Σπόγγους και τα Δίθυρα Μαλάκια που εντοπίστηκαν στη δοκιμή πεδίου. Η μέγιστη διάρκεια της δοκιμής πεδίου ήταν 4 μήνες.

Πολύχαιτοι		Βρυόζωα		Σπόγγοι		Δίθυρα	
Μέση Τιμή (Μήνες)	Χρόνος Διπλασιασμού (Μήνες)	Μέση Τιμή (Μήνες)	Χρόνος Διπλασιασμού (Μήνες)	Μέση Τιμή (Μήνες)	Χρόνος Διπλασιασμού (Μήνες)	Μέση Τιμή (Μήνες)	Χρόνος Διπλασιασμού (Μήνες)
2,43	1,68	1,15	0,80	2,93	2,03	4,77	3,31
1,58	1,09	6,95	4,82	-	-	1,74	1,21
2,27	1,57	2,71	1,88	-	-	1,97	1,37
0,56	0,39	3,94	2,73	-	-	2,86	1,98
1,08	0,75	10,40	7,21	3,17	2,20	2,18	1,51
1,84	1,28	-	-	1,15	0,80	1,76	1,22
0,92	0,64	-	-	3,86	2,67	-	-
2,45	1,70	4,67	3,24	-	-	-	-
2,30	1,59	2,54	1,76	6,20	4,30	4,77	3,31
1,11	0,77	0,81	0,56	-	-	2,17	1,50
1,99	1,38	3,21	2,22	1,19	0,82	-	-
0,99	0,69	1,35	0,93	27,43	19,02	-	-
-	-	-	-	-	-	-	-
	Πολ <u>Mέση Τιμή</u> (<u>Μήνες</u>) 2,43 1,58 2,27 0,56 1,08 1,84 0,92 2,45 2,30 1,11 1,99 0,99 - - -	Πολύχαιτοι Χρόνος Διπλασιασμού (Μήνες) Δίπλασιασμού (Μήνες) 2,43 1,68 1,58 1,09 2,27 1,57 0,56 0,39 1,08 0,75 1,84 1,28 0,92 0,64 2,45 1,70 2,30 1,59 1,11 0,77 1,99 1,38 0,92 0,69	Πολύχαιτοι Βρ Χρόνος Μέση Τιμή Διπλασιασμού Μέση Τιμή 2,43 1,68 1,15 1,58 1,09 6,95 2,27 1,57 2,71 0,56 0,39 3,94 1,08 0,75 10,40 1,84 1,28 - 0,92 0,64 - 2,45 1,70 4,67 2,30 1,59 2,54 1,11 0,77 0,81 1,99 1,38 3,21 0,99 0,69 1,35 - - -	ΠολύχαιτοιΒρυόζωαΜέση ΤιμήΔιπλασιασμούΜέση ΤιμήΔιπλασιασμού(Μήνες)ΔιπλασιασμούΜέση ΤιμήΔιπλασιασμού2,431,681,150,801,581,096,954,822,271,572,711,880,560,393,942,731,080,7510,407,211,841,280,920,642,451,704,673,242,301,592,541,761,110,770,810,561,991,383,212,220,990,691,350,931,991,383,212,220,990,691,350,93	ΠολύχαιτοιΒρυόζωαΣηχρόνοςχρόνοςχρόνοςΜέση ΤιμήΔιπλασιασμούΜέση ΤιμήΔιπλασιασμούΜέση Τιμή(Μήνες)(Μήνες)Μέση ΤιμήΔιπλασιασμούΜέση ΤιμήΜέση Τιμή2,431,681,150,802,931,581,096,954,82-2,271,572,711,88-0,560,393,942,73-1,080,7510,407,213,171,841,283,862,451,704,673,24-2,301,592,541,766,201,110,770,810,56-1,991,383,212,221,190,990,691,350,9327,43	Πολύχαιτοι χρόνος (Μήνες)Βρυόζωα χρόνος (Μήνες)Σπόγγοι χρόνος (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Μέση Τιμή μάση ΤιμήςΔιπλασιασμού (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)2,431,681,150,802,932,031,581,096,954,822,271,572,711,880,560,393,942,731,080,7510,407,213,172,201,841,281,150,800,920,64-3,862,672,301,592,541,766,204,301,110,770,810,561,991,383,212,221,190,820,990,691,350,9327,4319,02	ΠολύχαιτοιΒρυόζωαΣπόγγοιΛρόνος ΧρόνοςΧρόνος Μέση ΤιμήΔιπλασιασμού (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Διπλασιασμού (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Μέση Τιμή (Μήνες)Μεση Τιμή (Μηνες)Μεση Τιμή (Μηνες)Μεση Τιμή (Μαής)Μεση Τιμή (Μαής)Μεση Τιμή (Μαής)Μεση Τιμή (Μαής)<

3.9 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος 3.9.1 Ανοσοαποτύπωση της πρωτεΐνης SIPC

Στην Εικόνα 3.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του ανοσοαποτυπώματος κατά Western για αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC από το πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit anti-SIPC χρησιμοποιώντας δείγματα από εκχύλισμα από δύο διαφορετικά στάδια ναυπλίων (ναύπλιος St IV και St V, 50 άτομα/στάδιο), από 400 κυπρίδες, από μόλις εγκατεστημένες κυπρίδες (50 άτομα) και με θετικό μάρτυρα υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων Sf9 που αποδεδειγμένα εκκρίνουν την SIPC (διδακτορική διατριβή Κοτσίρη Μ., 2018). Κάθε διαδρομή περιέχει 20 μΙ υπερκείμενο δείγμα. Παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική φωτογραφία ανοσοαποτυπώματος κατά Western.



Εικόνα 3.5 Αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC από το πολυκλωνικό αντίσωμα rabbit anti-SIPC. Διαδρομές 1. εκχύλισμα από στάδιο ναυπλίου St IV, 2. εκχύλισμα από στάδιο ναυπλίου St V, 3. εκχύλισμα από 400 κυπρίδες, 4. εκχύλισμα από μόλις εγκατεστημένες κυπρίδες, 5-7. υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων Sf9 που εκκρίνουν την SIPC. Κάθε διαδρομή περιέχει 20 μΙ υπερκείμενο δείγμα. Παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική φωτογραφία ανοσοαποτυπώματος κατά Western (n=3).

Όπως φαίνεται από την (Εικόνα 3.5) παρόλο που χρησιμοποιήθηκε ένας αρκετά υψηλός αριθμός ατόμων, ιδιαίτερα κυπρίδων, το σήμα που έδινε το πολυκλωνικό αντίσωμα στα ανοσοαποτυπώματα κατά Western, όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως, ήταν πάρα πολύ αδύναμο. Το σύνολο των ανοσοαντιδρώντων ζωνών καταγράφηκε αποκλειστικά στο στάδιο της κυπρίδας, ενώ στα στάδια του ναυπλίου (5-6) και στα μόλις εγκατεστημένα άτομα κυπρίδας δεν ανιχνεύθηκε καμία ζώνη (Εικόνα 3.5).

Γι' αυτό το λόγο δημιουργήθηκε ένα μονοκλωνικό αντίσωμα (mAb) υψηλής ειδικότητας το anti-SIPC mouse κλώνος 1C4. Το μονοκλωνικό αντίσωμα δημιουργήθηκε εναντίον του ίδιου επιτόπου με αυτό του πολυκλωνικού αντισώματος που εντοπίζεται στο καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης SIPC. Το μονοκλωνικό αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε ανοσοαποτυπώματα κατά Western για την αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC σε εκχύλισμα κυπρίδων *A. amphitrite* (Εικόνα 3.6 & 3.7). (Η πειραματική διαδικασία εκχύλισης και αναγνώρισης της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC Εικόνα 3.7 πραγματοποιήθηκε από την Μαρία Πρωτοπαπά και παράλληλα αποτέλεσε υποστηρικτικό κομμάτι της διδακτορικής διατριβής της κ. Κοτσίρη, στα πλαίσια συνεργασίας στο πρόγραμμα MARIPAINTS, ενώ τα αποτελέσματα έχουν δημοσιευθεί στο Kotsiri et al., 2018a)

Τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.6), έδειξαν ότι το μονοκλωνικό αντίσωμα έδωσε σήμα υψηλής έντασης από μόλις 20 και 5 κυπρίδες περίπου στα ~96 kDa, κάτι που συνάδει με τη βιβλιογραφία (Dreanno et al., 2006c), σύμφωνα με την οποία η πρωτεΐνη SIPC υπάρχει σε πρωτεολυτικά κομμάτια των 88- και 98-kDa, και μικρότερης έντασης στις ζώνες μικρότερου μοριακού βάρους και στη ζώνη των ~210 kDa.

Όπως φαίνεται στα αποτελέσματα από εκχυλίσεις που έγιναν σε περισσότερα αναπτυξιακά στάδια (Εικόνα 3.7) το σύνολο των ανοσοαντιδρώντων ζωνών καταγράφηκε αποκλειστικά στο στάδιο της κυπρίδας, ενώ στο στάδιο του ναυπλίου (1-6) δεν ανιχνεύθηκε καμία ζώνη.

Η ύπαρξη πρωτεολυτικών θραυσμάτων (Matsumura et al., 1998; Dreanno et al., 2006a; Ferrier et al., 2016) στην ενδογενή πρωτεΐνη SIPC κάνει ουσιαστικά αδύνατη την απομόνωσή της από ομογενοποιημένες κυπρίδες και τη χρήση της σε βιοδοκιμές. Το αντιγονικό πεπτίδιο βρίσκεται στο καρβοξυτελικό άκρο της SIPC (Matsumura et al., 1998), επομένως το πρωτεολυτικό θράυσμα των 96 kDa που ανιχνεύεται από το μονοκλωνικό αντίσωμα πιθανόν να βρίσκεται στο άκρο αυτό.



Εικόνα 3.6 Αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC σε εκχυλίσματα ζώων *Α. amphitrite,* από το μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-SIPC. Διαδρομή 1. Πρωτεΐνες γνωστού μοριακού βάρους (Ladder), 2. υπερκείμενο καλλιέργειας κυττάρων Sf9 που εκκρίνουν την πρωτεΐνη SIPC 3-5. διαφορετικές αραιώσεις του κλώνου 1C4 του μονοκλωνικού αντισώματος, 6. εκχύλισμα από 20 κυπρίδες και 7. εκχύλισμα από 5 κυπρίδες. Κάθε διαδρομή περιέχει 20 μl υπερκείμενο δείγμα. Παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική φωτογραφία ανοσοαποτυπώματος κατά Western (n=3).



Εικόνα 3.7 Αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC σε εκχυλίσματα ζώων *Α. amphitrite*, από το μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-SIPC. Διαδρομές 1-6. Ναύπλιοι σταδίων 1 έως 6, 7. Κυπρίδες σταδίου 1, 8-10. Εδραίοι 1ης-2ης-3ης μέρας. Κάθε διαδρομή περιέχει 10 μg συνολική πρωτεΐνη από τα διαφορετικά αναπτυξιακά στάδια. Παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική φωτογραφία ανοσοαποτυπώματος κατά Western (n=3).

3.9.2 Ανταγωνιστική ενζυμική ανοσοπροσροφητική μέθοδος (ELISA) με πολυκλωνικό και μονοκλωνικό αντίσωμα

Σκοπός ανάπτυξης της μεθόδου ELISA ήταν η ποιοτική και μετέπειτα ποσοτική αξιολόγηση του πολυκλωνικού και του μονοκλωνικού αντισώματος ως προς την ανίχνευση της πρωτεΐνης SIPC μετά την εναπόθεση της σε κάποια επιφάνεια, στην προκειμένη περίπτωση σε πλάκα 24 οπών.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της πρότυπης καμπύλης (Σχήμα 3.16) για το κάθε ένα αντίσωμα ξεχωριστά φαίνεται πως το μονοκλωνικό αντίσωμα έχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία με EC₅₀ μόλις 0,43 ng\oπή εν αντιθέσει με το πολυκλωνικό με μόλις 25,35 ng\oπή.



A. Πολυκλωνικό αντίσωμα				
LogEC ₅₀	1,40			
HillSlope	-1,42			
EC	25,35			
50	ng/well			
R square	0,974			



Σχήμα 3.16 Αποτελέσματα πρότυπης καμπύλης του πολυκλωνικού (Α) και του μονοκλωνικού (Β) αντισώματος.

3.10 Έλεγχος συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος

Προκειμένου να γίνει έλεγχος της επίδρασης των δευτερογενών μεταβολιτών perforenol (9) και Βρωμοσφαιρόλη στη συμπεριφορά των κυπρίδων *A. amphitrite* κατά τη προσπάθεια εγκατάστασης τους σε ένα υπόστρωμα, εκτελέστηκαν τροποποιημένα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western. Αρχικά έγιναν αρκετές προσπάθειες, χωρίς τη χρήση μεταβολιτών, χρησιμοποιώντας το πολυκλωνικό αντίσωμα. Όπως φαίνεται όμως στην Εικόνα 3.9 τα αποτελέσματα δεν ήταν καθόλου ενθαρρυντικά. Στην αριστερή εικόνα φαίνεται το αποτέλεσμα ανοσοαποτύπωσης σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης από κυπρίδες (2 άτομα) με σκέτο θαλασσινό νερό ενώ στην δεξιά το αποτέλεσμα από το θετικό μάρτυρα, δηλαδή σκέτο θαλασσινό νερό χωρίς κυπρίδες. Προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι αξιοποιήσιμα θα έπρεπε ο θετικός μάρτυρας να δώσει ολοκάθαρη εικόνα χωρίς καθόλου ενθαρρυντικά και γι' αυτό στα πειράματα ελέγχου συμπεριφοράς κυπρίδων χρησιμοποιήθηκε αποκλειστικά το μονοκλωνικό αντίσωμα, το οποίο ήδη από τα προηγούμενα πειράματα είχε δώσει πολύ θετικά



Εικόνα 3.8 Έλεγχος συμπεριφοράς εξερεύνησης του υποστρώματος από τις κυπρίδες με ανοσοαποτύπωμα κατά Western με το πολυκλωνικό αντίσωμα. Δεξιά: κυπρίδες με σκέτο θαλασσινό νερό Αριστερά: σκέτο θαλασσινό νερό.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα (Εικόνα 3.9) από τα τροποποιημένα πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, οι συγκεντρώσεις perforenol (9) και Βρωμοσφαιρόλης (τιμές EC₅₀ από τα πειράματα τοξικότητας) δεν παρουσίασαν καμία στατιστικά σημαντική επίδραση (p > 0.05) στην εναπόθεση της πρωτεΐνης SIPC στην επιφάνεια των πλακών. Η Βρωμοσφαιρόλη, ακόμα και σε συγκέντρωση 10 μM, και σε σύγκριση με τα αποτελέσματα του θετικού μάρτυρα (ASW), δεν φάνηκε να επηρεάζει τη συμπεριφορά των κυπρίδων στην εναπόθεση της πρωτεΐνης SIPC (Εικόνα 3.9).





Κεφάλαιο 4

Συζήτηση

4. Συζήτηση

4.1 Πειραματικές δοκιμές στο εργαστήριο

Η ανακάλυψη θαλάσσιων φυσικών προϊόντων με αντιβιοεπιστρωτική δράση δεν είναι κάτι καινούριο στο χώρο της έρευνας, μάλιστα ειδικότερα για τα Θυσανόποδα έχουν αυξηθεί οι αναφορές για την ποικιλία των δευτερογενών μεταβολιτών που εμποδίζουν την εγκατάσταση τους (Dahms & Dobretsov, 2017; Almeida & Vasconcelos, 2015; Dahms & Hellio, 2009; Qian et al., 2009, 2015;Almeida et al., 2007). Οι έρευνες για τη βιοδραστικότητα και τις οικολογικές λειτουργίες των δευτερογενών μεταβολιτών από τα Ροδοφύκη του γένους *Laurencia* έχουν αυξηθεί εκθετικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες, ενώ έχουν προστεθεί περισσότερες από 1.000 ενώσεις σε έναν συνεχώς αυξανόμενο κατάλογο απομονωμένων μεταβολιτών (Harizani et al. 2016; MarinLit 2019).

Στο πλαίσιο ενδιαφέροντος για την ανακάλυψη βιοενεργών μεταβολιτών από θαλάσσιους οργανισμούς, εξετάστηκαν 25 ενώσεις που απομονώθηκαν από είδη του γένους *Laurencia* και *Aplysia*, συμπεριλαμβανομένων **13 σεσκιτερπένιων** (laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), *iso*-laurenisol (4), filiformin (5), laurinterol (6), epibrasilenol (7), 4-hydroxy-5-brasilene (8), perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12), obtusenol (13)), 7 διτερπενίων (3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), deoxyparguerol 16-acetate (15), τρία διτερπένια της οικογένειας dactylomelane (16–18), neorogioldiol (19), O11,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (20)) και 5 μη τερπενικοί C₁₅ κυκλικοί αιθέρες (*(3E)*-laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene I (24), και chondrioallene (25)), με στόχο την εκτίμηση τόσο της πιθανής αντιβιοεπιστρωτικής τους δράσης όσο και του οικοτοξικού τους προφίλ.

Παρόλο που υπάρχει ένας σημαντικός αριθμός δημοσιεύσεων που αναφέρουν μερικούς από αυτούς τους μεταβολίτες να έχουν απομονωθεί από είδη Γαστερόποδων του Γένους *Aplysia* (Nocchi et al., 2017; Pereira et al., 2016; Petraki et al., 2015; Ioannou et al., 2009; Findlay & Li, 2002), είναι γνωστό ότι αυτά τα φυτοφάγα είδη Μαλακίων δείχνουν ιδιαίτερη διατροφική προτίμηση στα Ροδοφύκη (Rogers et al., 1995). Πιο συγκεκριμένα φαίνεται πως έχουν την ικανότητα αποθήκευσης βιοενεργών μεταβολιτών, προερχόμενα από τα Ροδοφύκη, σε έναν εξειδικευμένο πεπτικό αδένα (Pereira et al., 2016; Rogers et al., 1995).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία για τους δευτερογενείς μεταβολίτες από είδη *Laurencia* (Alves et al., 2018; Blunt et al., 2017; Chouldhary et al., 2017; Harizani et al., 2016), μπορούν να παρατηρηθούν δύο ζητήματα: Το πρώτο είναι η ανάγκη για την αναγνώριση των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώνονται από κάθε είδος της *Laurencia* ως μέσο ταυτοποίησης των ειδών της *Laurencia* και της βιογεωγραφικής εμφάνισης αυτών των μεταβολιτών. Μια τέτοια απόπειρα, που πρωτοξεκίνησε από τους Fenical και Norris το 1975 και είναι γνωστή ως χημειοταξονομική ή Μεταβολομική (Sutour et al., 2017), βασίζεται στον εντοπισμό συγκεκριμένων χημικών ενώσεων που υπάρχουν σε ένα είδος ενώ απουσιάζουν εντελώς ή δεν κατανέμονται καλά σε άλλα είδη (Sutour et al., 2017; Machado et al., 2016; Vairappan et al., 2014; Kokkotou et al., 2014). Επίσης μπορεί να συσχετιστεί με την αλληλούχιση DNA (Sutour et al., 2017) για την ασφαλή αντιστοίχιση της παρουσίας συγκεκριμένου προφίλ μεταβολιτών σε ένα συγκεκριμένο είδος.

Το δεύτερο αφορά την εκτίμηση της βιολογικής και φαρμακευτικής δραστικότητας των δευτερογενών μεταβολιτών από τα είδη Laurencia έναντι ποικίλων μοντέλων οργανισμών κάτι το οποίο, απ' όσο γνωρίζω, αυτή είναι η πρώτη μελέτη που επιχειρεί κάτι τέτοιο. Έχοντας επικεντρωθεί στην αντιβιοεπιστρωτική δράση των δευτερογενών μεταβολιτών που απομονώθηκαν από τα είδη του Γένους Laurencia έναντι της εγκατάστασης των κυπρίδων του είδους A. amphitrite, επιχειρήθηκε να προσδιοριστεί εάν μερικοί από τους υποψήφιους δευτερογενείς μεταβολίτες, παρουσιάζουν τοξική δράση έναντι άλλων θαλάσσιων οργανισμών, κάτι το οποίο θα καθιστούσε αυτούς τους μεταβολίτες ακατάλληλους για αντιβιοεπιστρωτικές εφαρμογές (Piazza et al., 2011). Με τη συγκριτική αξιολόγηση αυτών των μεταβολιτών με την ήδη γνωστή αντιβιοεπιστρωτική δράση της Βρωμοσφαιρόλης (Piazza et al., 2011), από το Ροδοφύκος Sphaerococcus coronopifolius, επιχειρήθηκε εδώ μια ολοκληρωμένη αξιολόγηση της πιθανής αντιβιοεπιστρωτικής δράσης μιας ποικιλίας δευτερογενών μεταβολιτών του Γένους Laurencia καθώς επίσης και ο προσδιορισμός πολλών από αυτών των μεταβολιτών ως εχόντων την ίδια ή και καλύτερη αντιβιοεπιστρωτική δράση από αυτή της Βρωμοσφαιρόλης.

Από πολύ παλιά οι επιστήμονες έχουν ανακαλύψει ότι χημικές ενώσεις με διαφορετική δομή μπορούν να έχουν παρόμοια ενεργότητα (Martin, 1940, 1942), ενώ μικρές αλλαγές στη χημική δομή μιας ένωσης μπορούν να προκαλέσουν αλλαγές στην ενεργότητα της (Pereira, 2016). Για παράδειγμα σύμφωνα με τους Wessels et al. (2000) η ένωση 8-acetylcaespitol, η οποία διαφέρει από την caespitol μόνο στην ακετυλική ομάδα, στις ίδιες πειραματικές δοκιμές με την caespitol δεν παρουσίασε καμία δράση.

Οι μεταβολίτες της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι χωρισμένοι σε τρεις ομάδες, τα σεσκιτερπένια, διτερπένια και τους μη τερπενικούς C₁₅ κυκλικούς αιθέρες (C₁₅ ακετογενίνες), με μεγάλες διαφορές στις δομές τους. Κάνοντας μια

σύγκριση μεταξύ ομάδας-ενεργότητας υπήρξαν μεταβολίτες που **ανήκαν στην ίδια ομάδα** και παρουσίασαν παρόμοια ή διαφορετική ενεργότητα καθώς και μεταβολίτες που δεν ανήκαν στην ίδια ομάδα και επίσης παρουσίασαν παρόμοια ή διαφορετική ενεργότητα. Άρα, όσον αφορά τον τρόπο δράσης, φαίνεται πως δεν έχει κάποια σημασία αν μια χημική ένωση ανήκει στην ίδια ή σε διαφορετική ομάδα.

Από τους μεταβολίτες που ανήκουν στην ίδια ομάδα και παρουσίασαν παρόμοια δράση ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι μεταβολίτες obtusallene I (24), και chondrioallene (25), C₁₅ ακετογενίνες, οι οποίοι έχουν διαφορετική δομή με ένα χλώριο και ένα παραπάνω βρώμιο η obtusallene I (24), και παρόλα αυτά παρουσίασαν την ίδια δράση, αφού σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρεμπόδισης εγκατάστασης των κυπρίδων προτρέπουν και δεν αναστέλλουν την εγκατάσταση τους. Ένα εξαιρετικά περίεργο φαινόμενο το οποίο χρήζει περαιτέρω μελέτης στο μέλλον. Ποιο σηματοδοτικό μονοπάτι των κυπρίδων επηρεάζεται άραγε με αποτέλεσμα μερικοί φυσικοί μεταβολίτες να επάγουν την εγκατάσταση?

Παρόμοια δράση παρουσίασαν τα διτερπένια (18) της οικογένειας dactylomelane και neorogioldiol (19). Με μια πολύ διαφορετική δομή και με ένα βρώμιο και δύο φαινολικούς δακτυλίους παραπάνω η neorogioldiol (19), οι δυο αυτοί μεταβολίτες παρουσίασαν παρόμοια ενεργότητα. Με διαφορές στο μοριακό τύπο, οι δυο αυτοί μεταβολίτες παρουσίασαν παρόμοια δράση όχι μόνο μεταξύ τους αλλά και με τη Βρωμοσφαιρόλη, η οποία έχει ένα βρώμιο παραπάνω από το διτερπένιο (18) της οικογένειας dactylomelane, ενώ υστερεί σε μια φαινόλη από την neorogioldiol (19). Επίσης η neorogioldiol (19) και ο μεταβολίτες παρουσίασαν παρόμοια ζοτερεί στο μοριακό τύπο την neorogioldiol (19). Επίσης η neorogioldiol (19) και ο μεταβολίτες παρουσίασαν παρόμοια ζοτατο με διαφορετική δομή και παρουσίασαν παρόμοια ενεργότητα, με καλύτερη δράση αυτή της neorogioldiol (19). Ομοίως, οι μεταβολίτες epibrasilenol (7) και 4-hydroxy-5-brasilene (8), οι οποίοι ανήκουν στα σεσκιτερπένια, έχουν ίδιο μοριακό τύπο αλλά διαφορετική δομή, με διαφορετική θέση πρόσδεσης του υδροξυλίου, και παρουσίασαν παρόμοια ενεργότητα.

Αντίθετα με προηγουμένως, από τους μεταβολίτες που ανήκουν στην ίδια ομάδα αλλά παρουσίασαν διαφορετική δράση, τα σεσκιτερπένια *iso*-laurenisol (**4**), filiformin (**5**) και laurinterol (**6**) παρόλο που έχουν τον ίδιο μοριακό τύπο, έχουν διαφορετική δομή, με άλλη θέση πρόσδεσης του βρωμίου στην *iso*-laurenisol (**4**) και την έλλειψη μιας υδροξυλικής ομάδας στον μεταβολίτη filiformin (**5**). Αυτές οι διαφορές στις δομές φαίνεται να οδήγησαν και στη διαφορετική ενεργότητα των τριών αυτών μεταβολιτών. Η *iso*-laurenisol (**4**) παρουσίασε μια εξαιρετική ανασταλτική δράση εγκατάστασης των κυπρίδων, συγκρινόμενη πάντα με τους άλλους δύο

[155]

κάποια ιδιαίτερη αντιβιοεπιστρωτική δράση και τον μεταβολίτη filiformin (5) ο οποίος φαίνεται ότι είχε κάποια επίδραση στη συμπεριφορά των κυπρίδων.

Ένα άλλο παράδειγμα είναι τα διτερπένια (16), (17) και (18) που ενώ ανήκουν στην ίδια οικογένεια (dactylomelane) και παρουσίασαν διαφορετική δράση. Υψηλότερη παρεμπόδιση εγκατάστασης κυπρίδων αλλά και καλύτερο οικοτοξικό προφίλ παρουσίασε το διτερπένιο (18) σε αντίθεση με τα διτερπένια (16) και (17). Γι' αυτό άλλωστε ο μεταβολίτης (18) έφτασε μέχρι το τέλος των πειραματικών δοκιμών. Οι τρείς αυτοί μεταβολίτες χαρακτηρίζονται από μικρές διαφορές στη δομή τους, στις οποίες πιθανά να οφείλεται και η διαφορετική τους δράση. Οι μεταβολίτες (16) και (17) διαφέρουν σε δύο σημεία, στη θέση πρόσδεσης του ενός υδροξυλίου, στο μεταβολίτη (16) ο μεταβολίτης (17) έχει ένα βρώμιο, ενώ στη θέση πρόσδεσης του χλωρίου στο μεταβολίτη (16) ο μεταβολίτης (17) έχει ένα υδροξύλιο. Σε αντίθεση με τον μεταβολίτη (18) ο οποίος δεν έχει καθόλου χλώριο, έχει μόνο ένα βρώμιο και ένα υδροξύλιο ενώ μια άλλη βασική διαφορά είναι η ύπαρξη ενός ατόμου οξυγόνου.

Μια άλλη περίπτωση είναι οι μεταβολίτες perforenol (9) και perforenone A (10), δυο σεσκιτερπενια με παρόμοια δομή και διαφορετική δράση. Η perforenol (9), με ένα εξαιρετικό προφίλ όπως αποδείχθηκε, σε αντίθεση με την perforenone A η οποία, όπως αναλύθηκε στο Κεφάλαιο 3, παρουσίασε μία περίεργη δράση ως προς την αναστολή εγκατάστασης των κυπρίδων ανά 24ωρο. Αυτή η διαφορά πιθανά να οφείλεται στην ύπαρξη 2 βρωμίων και ενός χλωρίου στην perforenol (9) σε αντίθεση με την perforenone A (10) η οποία δεν έχει κανένα αλογόνο.

Από την άλλη μεριά, μεταβολίτες που ανήκουν σε διαφορετικές ομάδες αλλά έχουν παρόμοια ενεργότητα ήταν οι perforenol (9) και Βρωμοσφαιρόλη, ένα σεσκιτερπένιο και ένα διτερπένιο αντίστοιχα, οι οποίοι παρουσίασαν μια εξαιρετική αντιβιοεπιστρωτική δράση. Αλλά και οι οι perforenol (9) με τους μεταβολίτες (18) της οικογένειας dactylomelane και neorogioldiol (19). Ίσως η ύπαρξη ενός χλωρίου στην perforenol (9) να κάνει τη διαφορά, παρ' όλα αυτά και οι τρείς μεταβολίτες, με τόσο διαφορετικές δομές, έδωσαν εξαιρετικά αποτελέσματα, και είναι μια απόδειξη του πόσο δύσκολο είναι τελικά να αποδώσει κάποιος τη δράση ενός μεταβολίτη στην δομή του.

Στις δοκιμές στο εργαστήριο, αρχικά αξιολογήθηκε η ανασταλτική δράση εγκατάστασης των 25 δευτερογενών μεταβολιτών ενάντια στις κυπρίδες του Θυσανόποδου *A. amphitrite*. Με τη συγκριτική αξιολόγηση της αντιβιοεπιστρωτικής δράσης αυτών των μεταβολιτών έναντι της ήδη καθιερωμένης αντιβιοεπιστρωτικής δράσης της Βρωμοσφαιρόλης, εντοπίστηκαν αρκετές από αυτές ως έχουσες ίση ή καλύτερη αντιβιοεπιστρωτική δράση από τη Βρωμοσφαιρόλη (Πίνακας 3.2). Οι οκτώ πιο ισχυροί μεταβολίτες, *iso*-laurenisol (4), perforenol (9), perforatone (11), elatol

[156]

(12), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22) εφόσον πληρούσαν τα βασικά κριτήρια αποκλεισμού, όπως αναλύθηκε στην Εισαγωγή, αξιολογήθηκαν για την τοξικότητά τους στο Καρκινοειδές Artemia sp.. Οι μεταβολίτες perforenol (9), perforatone (11), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (14), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18), neorogioldiol (19) και laurencienyne (22), κρίθηκαν κατάλληλοι, πάλι σύμφωνα με τα κριτήρια αποκλεισμού όπως περιγράφονται αναλυτικά στην Εισαγωγή, για να συνεχίσουν στην επόμενη πειραματική δοκιμή προσδιορισμού τοξικότητας έναντι του Διατόμου Chaetoceros gracilis. Ενώ οι μεταβολίτες perforenol (9), διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane (18) και neorogioldiol (19) αξιολογήθηκαν για την τοξικότητα τους έναντι μιας κυτταρικής σειράς πέστροφας, μιας κυτταρικής σειράς ανθρώπου καθώς και 5 βακτηριακών στελεχών (Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis, Bacillus thuringiensis, Pseudomonas putita και Pseudomonas pseudoalcaligenes) που εμπλέκονται στο φαινόμενο της θαλάσσιας βιοεπίστρωσης (Πίνακας 3.3), προσπαθώντας να αποκλείσουμε οποιαδήποτε τοξικότητα έναντι άλλων θαλάσσιων οργανισμών μηστόχων, που θα καθιστούσαν αυτούς τους μεταβολίτες ακατάλληλους για εφαρμογές κατά της βιοεπίστρωσης. Μεταξύ των μεταβολιτών που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη, η perforenol (9), η οποία από άλλες επιστημονικές ομάδες έχει απομονωθεί από τα είδη Laurencia perforata και Laurencia chondrioides (Kokkotou et al., 2014; Gonzalez et al., 1978), έδειξε ισχυρή αντιβιοεπιστρωτική δράση και ελάχιστη τοξικότητα.

Για αρκετούς δευτερογενείς μεταβολίτες που αξιολογήθηκαν σε αυτή τη μελέτη έχει αποδειχθεί στο παρελθόν η κυτταροτοξική τους δράση έναντι ανθρώπινων ή άλλων κυτταρικών σειρών Θηλαστικών. Παραδείγματος χάριν, η allolaurinterol acetate (3) (Appleton et al., 2001; Schmitz et al., 1982; Kazlauskas et al. 1976) σε πειράματα in vitro είναι κυτταροτοξική έναντι της λεμφοκυτταρικής λευχαιμίας σε ποντίκια (κυτταρικής σειράς P388) με EC₅₀ = 40 μg/ml (Schmitz et al., 1982) και IC₅₀ \geq 74 μM (Appleton et al., 2001) ενώ έχει αναφερθεί ήπια κυτταροτοξικότητα έναντι της μη κακοήθους κυτταρικής σειράς BSC-1 (Appleton et al., 2001). Η *iso*-laurenisol (4) (Kladi et al., 2006; Findlay & Li, 2002; Crews & Selover, 1986; Suzuki & Kurosawa, 1979; Irie et al., 1969a) και perforenone A (10) (Kokkotou et al., 2014; Kladi et al., 2006; Wright et al., 2003) έχουν αποδειχθεί και στην κυτταρική σειρά CHO (Kladi et al., 2006). Η laurinterol (6) (Oguri et al., 2017; Kladi et al., 2006; Irie et al., 1969b) είναι κυτταροτοξική έναντι μιας ποικιλίας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών καρκινικών κυτταρικών σειρών καρκινικών σειρών (Kladi et al., 2006). Η elatol (12) (Diaz-

[157]
Marrero et al., 2012; Lang et al., 2012; Vairappan et al., 2001) και δυο διτερπένια της οικογένειας dactylomelane **(17-18)** (Petraki et al., 2015), είναι επίσης κυτταροτοξικές έναντι μιας μεγάλης ποικιλίας ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών. Τέλος η Βρωμοσφαιρόλη έχει κυτταροτοξική δράση σε μια ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών (Rodrigues et al., 2015; Smyrniotopoulos et al., 2010; Rosa et al., 1988).

Επίσης για τους συγκεκριμένους μεταβολίτες έχουν αναφερθεί και άλλες τοξικές δράσεις. Μερικοί από τους μεταβολίτες που δοκιμάστηκαν, όπως η allolaurinterol acetate (3) (Appleton et al., 2001; Schmitz et al., 1982; Kazlauskas et al 1976), *iso*-laurenisol (4) (Tsukamoto et al., 2005), laurinterol (6) (Vairappan et al., 2014, 2004, 2001) και elatol (12) (Diaz-Marrero et al., 2012; Lang et al., 2012; Vairappan et al., 2014, 2001), αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων. Επίσης η elatol (12) έχει ανασταλτική δράση στην ανάπτυξη Πρωτόζωων (da Silva Macado et al., 2011; Dos Santos et al., 2010) καθώς και ανασταλτική δράση έναντι στην εγκατάσταση των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* (De Nys et al., 1996). Η Βρωμοσφαιρόλη (Rodrigues et al., 2015; Smyrniotopoulos et al., 2010; Rosa et al., 1988) είναι τοξική έναντι του είδους *Artemia salina* με LC₅₀ = 17.9 μg/ml (Rosa et al., 1988) και έχει αναφερθεί ότι έχει ανασταλτική δράση έναντι της εγκατάστασης των κυπρίδων του είδους *A. amphitrite* με EC₅₀=0.23 μM (Piazza et al., 2011).

Τέλος, δεν έχει αναφερθεί ακόμη καμία βιολογική δραστικότητα για τις laurene (1) (Findlay & Li, 2002; Kazlauskas et al 1976), debromoallolaurinterol acetate (2) (Irie et al., 1969), perforenol (9) (Kokkotou et al., 2014; Gonzalez et al., 1978), obtusenol (13) (Kokkotou et al., 2014; Findlay & Li, 2002; Imre et al., 1981; Gonzalez et al., 1981) obtusallene I (24) (Kokkotou et al., 2014, Öztunç et al., 1991; Cox et al., 1982), chondrioallene (25) (Kokkotou et al., 2014) και perforatone (11) (Kokkotou et al., 2014) al., 2014; Coll et al., 1989; Gonzalez et al., 1975). Δεν έχει εντοπιστεί βιολογική δραστικότητα για την (3E)-laurenyne (21) (Ola et al. 2010; Ioannou et al., 2009) αν και έχει αναφερθεί ότι η (3Z)-laurenyne (Kokkotou et al., 2014; Falshaw et al., 1980) είναι τοξική για το είδος Artemia salina με EC₅₀ 460 μM (Takahashi et al., 2002). Επίσης έχει βρεθεί ότι προκαλεί παύση λήψης τροφής στα χρυσόψαρα (Manzo et al., 2005) και αναστολή ανάπτυξης βακτηρίων (Takahashi et al., 2002). Δεν υπάρχει καμία αναφορά για την neorogioldiol (19) (Kokkotou et al., 2014, Iliopoulou et al., 2003; Guelle et al., 2000), αν και έχει αναφερθεί ότι η neorogioldiol Β έχει αντιφλεγμονώδη δράση έναντι μακροφάγων κυττάρων (Daskalaki et al., 2019) και κυτταροτοξική δράση έναντι ποικίλων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Iliopoulou et al., 2003). H 4-hydroxy-5-brasilene (8) (loannou et al., 2009; König et al., 1994; Amico et al., 1991) δεν παρουσιάζει κυτταροτοξική δράση έναντι κυτταρικής σειράς καρκινικών κυττάρων ούτε ανασταλτική δράση έναντι της ανάπτυξης του

[158]

Ακροσυμπλεγματικού, *Plasmodium falciparum* (Ioannou et al., 2009; König et al., 1994). Τέλος το διτερπένιο της οικογένειας dactylomelane **(16)** βρέθηκε ότι δεν έχει κυτταροτοξική δράση σε μια ποικιλία ανθρώπινων καρκινικών κυτταρικών σειρών (Petraki et al., 2015).

Μια εκτεταμένη βιβλιογραφική έρευνα αποκάλυψε ότι μεταξύ των μεταβολιτών που προέρχονται από την *Laurencia*, μόνο οι omaezallene (Umezawa et al., 2014) και 2,10-dibromo-3-chloro-7-chamigrene (Al-Lihaibi et al., 2015) έχουν παρουσιάσει ουσιαστικά χαμηλές τιμές EC₅₀ και αξίζουν να ληφθούν υπόψη για αντιβιοεπιστρωτικές εφαρμογές. Στην παρούσα μελέτη δείχθηκε ότι η perforenol **(9)** μπορεί επίσης να συμπεριληφθεί σε αυτή τη μικρή λίστα δευτερογενών μεταβολιτών με ισχυρή αντιβιοεπιστρωτική δράση.

Δεδομένου ότι αρκετοί δευτερεύοντες μεταβολίτες που προέρχονται από είδη Laurencia έχουν αντιβιοεπιστρωτική δράση έναντι του Θυσανόποδου A. amphitrite, προτείνεται ότι η ικανότητα των ειδών Laurencia να αποτρέπουν τη βιοεπίστρωση προέρχεται από την ταυτόχρονη παρουσία διαφόρων μεταβολιτών, ενώ οποιαδήποτε εφαρμογή αυτών των μεταβολιτών για την αντιμετώπιση της βιοεπίστρωσης δεν είναι αναγκαίο να βασίζεται στην αποκλειστική χρήση του καθενός από αυτά.

4.2 Πειραματικές δοκιμές στο πεδίο

Στα πλαίσια αυτής της διδακτορικής διατριβής προέκυψε ένας μεγάλος αριθμός δεδομένων σχετικά με την προτίμηση εγκατάστασης διαφορετικών ειδών μακρο-οργανισμών στα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα στο πεδίο με τη χρήση της Βρωμοσφαιρόλης. Συμπερασματικά, κανένας συνδυασμός υφαλοχρωμάτων και αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων δεν ήταν ικανός να αποτρέψει πλήρως τη δημιουργία του φαινομένου της βιοεπίστρωσης. Ακόμη και οι αρνητικοί μάρτυρες (χρώματα του εμπορίου) παρουσίασαν βιοεπίστρωση.

Η εγκατάσταση προκαρυωτικών οργανισμών, δηλαδή η εμφάνιση βιοφίλμ, ήταν το πρώτο πράγμα που μελετήθηκε. Βιοφίλμ παρατηρήθηκε σε όλα τα δοκίμια ακόμη και στους αρνητικούς μάρτυρες. Η εμφάνιση του έγινε από το πρώτο μήνα εμπότισης της κατασκευής στο πεδίο ενώ η παρουσία προκαρυωτικών οργανισμών συνεχώς αύξανε μέχρι τον 4° μήνα που διήρκησε το πείραμα. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η εμφάνιση βιοφίλμ ήταν κάτι που είχε παρατηρηθεί και σε προκαταρκτικά πιλοτικά πειράματα που διήρκησαν για μία ή δύο εβδομάδες (δεδομένα που δεν εμφανίζονται) ενώ συνδέεται άμεσα, όπως αναλύθηκε στην

[159]

Εισαγωγή, με την κατοπινή εμφάνιση βιοεπίστρωσης από ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Οι D' souza & Bhosle (2003) χαρακτηριστικά αναφέρουν την εμφάνιση βιοφίλμ σε μόλις 5 ημέρες από την πόντιση μεταλλικών δοκιμίων στο θαλάσσιο περιβάλλον. Μια πιο λεπτομερής παρατήρηση των δεδομένων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι ο χαλκός έχει καλύτερη βιοκτόνο δράση σε σχέση με τον ψευδάργυρο αναφορικά με την ταχύτητα ανάπτυξης των προκαρυωτικών οργανισμών. Η τοξικότητα του χαλκού, έχει παρατηρηθεί και σε προηγούμενες μελέτες (Canning-Clode et al., 2011; D'Souza and Bhosle, 2003).

Όσον αφορά τα αποτελέσματα ολικής πρωτεΐνης των δειγμάτων υπήρχε μια αρχική αύξηση της ποσότητας της σε όλα τα δείγματα η οποία όμως μειώθηκε στον 4° μήνα της δειγματοληψίας. Σύμφωνα με εργαστηριακές μελέτες που έχουν γίνει σε καλλιέργειες Διατόμων, βακτηρίων και φυσικών πληθυσμών φυτοπλαγκτού, είναι γνωστό ότι παράγουν χαμηλότερη ποσότητα υδατανθράκων και υψηλότερη ποσότητα πρωτεϊνών κατά τη φάση πρώιμης λογαριθμικής ανάπτυξης (Myklestad, 1977, Hitchcock, 1978), ενώ κύτταρα Διατόμων σε στατική φάση ανάπτυξης παράγουν υψηλότερες ποσότητες υδατανθράκων και χαμηλότερες ποσότητες πρωτεϊνών. Επομένως, είναι πιθανό η σχετική κατανομή των πρωτεϊνών στα παρόντα δείγματα να αντικατοπτρίζει την επίδραση της φάσης ανάπτυξης των μικροοργανισμών. Επίσης είναι πιθανό η διαφορά αυτή να οφείλεται στην αυξημένη παρουσία προκαρυωτικών οργανισμών στα δείγματα του πρώτου μηνός όπως φαίνεται και στην Εικόνα 3.3. Και εδώ παρατηρείται μια αυξημένη συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα που περιείχαν ψευδάργυρο σε σχέση με τα δείγματα που είχαν χαλκό. Πρέπει να επισημανθεί ότι ενδιαφέρουσα είναι η περίπτωση του εμπορικού σκευάσματος Ecoflex SPC 200 το οποίο εμφανίζει στατιστικά σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης στον 1° μήνα δειγματοληψίας ενώ οι επακόλουθες τιμές είναι σημαντικά μειωμένες. Επειδή δεν ήταν γνωστή η σύσταση του παραπάνω εμπορικού σκευάσματος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας, πιθανά η υψηλή συγκέντρωση ολικής πρωτεΐνης που καταγράφηκε να αποτελεί ένδειξη ότι οι χημικές ενώσεις που περιέχει το δείγμα επηρεάζουν τη μέτρηση της ολικής πρωτεΐνης σε αυτά. Σαν επακόλουθο, η χαμηλές μετρήσεις των επόμενων μηνών δείχνουν ότι οι υποτιθέμενες αυτές χημικές ενώσεις εκλούστηκαν από το δείγμα και δεν επηρεάζουν πλέον τις μετρήσεις. Τέλος, η παρουσία χαμηλών ποσοτήτων ολικής πρωτεΐνης στα δείγματα του 4^{ου} μήνα πιθανά να αποτελούν ένδειξη της παρουσίας ανόργανων συστατικών στα δείγματα με ταυτόχρονη αποδόμηση της οργανικής ύλης από τους προκαρυωτικούς οργανισμούς.

Τα αποτελέσματα αναφορικά με τους μακρο-οργανισμούς που εγκαταστάθηκαν στα δοκίμια ήταν αναμενόμενα και συμφωνούν με παλαιότερες

αναφορές (Canning-Clode et al., 2011; Jelic-Mrcelic et al., 2006). Σημαντική διαπίστωση εδώ ότι οι Πολύχαιτοι παρουσίασαν, σε σχέση με τα άλλα είδη, τη μεγαλύτερη ικανότητα εγκατάστασης. Ειδικότερα όμως οι Πολύχαιτοι (Serpulidae) και τα Θυσανόποδα έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά ανθεκτικοί οργανισμοί ως προς τους αντιβιοεπιστρωτικούς παράγοντες καθώς επίσης παρουσιάζουν πολύ υψηλές τιμές αφθονίας σε περιοχές με υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού υλικού (Mayer- Pinto & Junqueira, 2003).

Η ανάλυση των αποτελεσμάτων των δοκιμών πεδίου δείχνει ότι δεν υπάρχει ένας ξεχωριστός συνδυασμός αντιβιοεπιστρωτικών παραγόντων που να δίνει διακριτά καλά αποτελέσματα για όλο το εύρος των οργανισμών που εντοπίστηκαν. Επίσης, η παρουσία βιοφίλμ ή η συνολική ποσότητα πρωτεΐνης, όπως αναλύθηκαν προηγουμένως, δεν φαίνεται να έχουν καμία επίπτωση στη διαφορική ικανότητα των οργανισμών να εγκατασταθούν σε ένα υπόστρωμα. Σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ακόμη και οι αρνητικοί μάρτυρες εμφάνισαν βιοφίλμ προκαρυωτικών οργανισμών μέσα σε ένα μήνα από την εφαρμογή τους στο πεδίο και αυτή η παρουσία προκαρυωτικών οργανισμών συνεχώς αύξανε μέχρι τον 4° μήνα που διήρκησε το πείραμα. Όπως προκύπτει, η εμφάνιση βιοφίλμ γίνεται πολύ γρήγορα, με εμφάνιση πληθυσμών βακτηρίων σε υψηλή συγκέντρωση μέσα σε 1 εβδομάδα. Επειδή οι τιμές αυτών των πληθυσμών αρχίζουν να πέφτουν όταν εμφανίζονται οι πρώτοι μακρο-οργανισμοί συμπεραίνω ότι η δημιουργία βιοφίλμ είναι αυτή που

4.3 Πειράματα μελέτης συμπεριφοράς των κυπρίδων του είδους *Α. amphitrite* κατά τη διαδικασία εξερεύνησης υποστρώματος

Η βιοεπίστρωση αποτελεί παγκόσμιο πρόβλημα τόσο για τις ναυτιλιακές επιχειρήσεις, όσο για το περιβάλλον. Ένα πλήθος οργανισμών τείνει να εγκαθίσταται στα ύφαλα σκαφών και πλοίων, με αποτέλεσμα να αυξάνεται κατά πολύ το βάρος τους και κατ' επέκταση η αντίσταση στη πλεύση. Αυτό δεν έχει μόνο οικονομικό αντίκτυπό (Callow, 1996; Champ, 2000; Yebra et al., 2004; Whelan & Regan, 2006; Schultz, 2007; de Nys & Guenther, 2009; Jones, 2009; Schultz et al., 2011; Fitridge et al., 2012; Chapman & Regan, 2012) αλλά έχει και περιβαλλοντικό, καθώς το πλοίο καταναλώνει περισσότερα καύσιμα εξαιτίας της αύξησης του βάρους του (Abbott et al., 2000; Anonymous, 2014). Σαφώς δεν πρέπει να ξεχνάμε και άλλο ένα πρόβλημα που σχετίζεται με τη βιοεπίστρωση και αυτό είναι η εξάπλωση δυνητικά ξενικών

ειδών (Noël et al., 1997; Apte et al., 2000; Lewis et al., 2003; Minchin et al., 2003; Minchin & Gollasch, 2003; Yebra et al., 2004; Gollasch, 2006).

Κύριοι οργανισμοί που συμμετέχουν στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης και που έχουν μελετηθεί αρκετά (Laresson & Høeg, 2002; Clare et al., 2009; Favi et al., 2012; Kamino, 2013) αποτελούν τα Θυσανόποδα. Τα Θυσανόποδα είναι θαλάσσιοι ασπόνδυλοι οργανισμοί με τρία κύρια αναπτυξιακά στάδια του ναύπλιου, της κυπρίδας και του εδραίου ατόμου. Ο ναύπλιος αποτελεί ελεύθερη μορφή που κολυμπά, ενώ το στάδιο της κυπρίδας κολυμπά έως ότου να βρει μια κατάλληλη επιφάνεια για να εγκατασταθεί, να μεταμορφωθεί και να αναπτυχθεί σε εδραίο άτομο. Η διερευνητική συμπεριφορά των κυπρίδων (Crisp, 1984) είναι περίπλοκη και ελάχιστα κατανοητή. Η κυπρίδα ελέγχει διάφορους παράγοντες πριν να εγκατασταθεί, όπως την υφή και τη χημεία του υποστρώματος ή την παρουσία συνυπαρχόντων ενηλίκων ατόμων ή κυπρίδων. Κάποια στιγμή όμως, καθώς η κυπρίδα έχει πεπερασμένα ενεργειακά αποθέματα (Walker, 1995), τελικά εγκαθίσταται (Lucas et al., 1979; Satuito et al., 1996). Η μόνιμη προσκόλληση στο υπόστρωμα γίνεται εκκρίνοντας ένα υλικό πρόσδεσης από τις κεραίες της (Walker, 1971; Okano et al, 1996; 1998). Υποκινούμενες από μια επιστημονική περιέργεια προκειμένου να αποκαλυφθεί ο φυσικός μηχανισμός προσκόλλησης, οι πρόσφατες εξελίξεις στον μοριακό χαρακτηρισμό του υλικού πρόσδεσης των κυπρίδων έχουν δείξει την ποικιλομορφία των βιολογικών συγκολλητικών συστατικών. Από όσους οργανισμούς έχουν μελετηθεί μέχρι και σήμερα, το μοριακό σύστημα προσκόλλησης των Θυσανόποδων είναι μοναδικό (Kamino 2010a).

Κατά τη διαδικασία εξερεύνησης ενός υποστρώματος τα Θυσανόποδα εναποθέτουν στις επιφάνειες συστατικά που επάγουν την ευρεία αποίκησης τους, καθώς προσελκύουν άλλες κυπρίδες που αναζητούν επιφάνεια για να εγκατασταθούν (Crisp & Meadows, 1962). Κύριο συστατικό αυτών των εναποθέσεων αποτελεί η πρωτεΐνη SIPC (Settlement inducing protein complex).

Η πρωτεΐνη SIPC φαίνεται να έχει έναν διττό τρόπο δράσης στις κυπρίδες, αυτόν της πρόκλησης αλλά και της αποφυγής της εγκατάστασης. Η απόκριση των Θυσανόποδων στο διττό αυτό ρόλο της SIPC, δείχνει ότι η συμπεριφορά εγκατάστασης τους και επομένως η αναπαραγωγική επιτυχία τους ορίζεται από κάποιο σήμα μεταξύ των ατόμων του ίδιου είδους. Αν το σήμα που λάβει μια κυπρίδα κατά τη διάρκεια αναζήτησης του κατάλληλου υποστρώματος είναι έντονο, δηλαδή ανιχνευθεί υψηλή συγκέντρωση SIPC, τότε θα προτιμήσει κάποιο άλλο υπόστρωμα προς εγκατάσταση, προκειμένου να αποφευχθεί ο ανταγωνισμός για τους διαθέσιμους πόρους αλλά και η θήρευσή τους. Αν όμως το σήμα που λάβει μια κυπρίδα είναι ασθενές, δηλαδή ανιχνευθεί χαμηλή συγκέντρωση SIPC, τότε θα

[162]

εγκατασταθεί μόνιμα προκειμένου να αναπτυχθεί και να αναπαραχθεί, αφού και οι πιθανότητες να προστατευθεί από τους θηρευτές είναι περισσότερες (Kotsiri et al. 20118a).

Έχουν περάσει σχεδόν 60 χρόνια από τότε που περιεγράφηκε για πρώτη φορά ο μηχανισμός εγκατάστασης των Θυσανόποδων σε μια επιφάνεια καθώς και οι χημικές διαδικασίες που περιλαμβάνει. Αρχικά μελετήθηκε το είδος Elminius modestus, ενώ στη συνέχεια οι μελέτες επικεντρώθηκαν σε δύο είδη, το Semibalanus balanoides και το Balanus amphitrite γνωστό πλέον ως Amphibalanus amphitrite (Clare & Matsumura, 2013). Λόγω της ευκολίας μελέτης και της οικονομικής σημασίας του ως βιοεπιστρωτικού οργανισμού, το τελευταίο είδος έχει αποκτήσει ιδιαίτερη σημασία τα τελευταία χρόνια.

Οι μελέτες για την ανάπτυξη της αντιβιοεπιστρωτικής τεχνολογίας εκτείνονται σε διάφορους ερευνητικούς τομείς, όπως βιολογία, χημεία, επιστήμη υλικών, επιστήμη διεπαφών, βιοχημεία, επιστήμη πρωτεϊνών, μηχανική, φυσιολογία και περιβαλλοντική επιστήμη. Η διεπιστημονική φύση των μελετών έχει καταστήσει δύσκολη την κατανόηση της βιολογικής αυτής λειτουργίας (Kamino 2013). Μέχρι σήμερα έχουν γίνει αρκετές μελέτες για την εφαρμογή μεθόδων αντιβιοεπίστρωσης, χωρίς τη θανάτωση των οργανισμών, οι οποίες βασίζονται σε μόρια που σχετίζονται με φυσικές ενώσεις που παράγονται από θαλάσσιους οργανισμούς (Aldred & Clare 2008; Qian et al. 2010b; Pinori et al. 2011).

Οι Matsumura et al. (1998) ήταν οι πρώτοι που εντόπισαν την ύπαρξη της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC, την οποία πρώτοι υπέθεσαν ότι υπάρχει οι Crisp and Meadows (1962). Όπως αναφέρεται στη δημοσίευση των Dreanno et al. (2006a), η οποία αποτέλεσε πηγή έμπνευσης για τα πειράματα μας, το υλικό πρόσδεσης που εκκρίνεται από τις κυπρίδες κατά τη διαδικασία εξερεύνησης ενός υποστρώματος, γνωστά ως πρωτεϊνικά αποτυπώματα/ίχνος της SIPC (footprints), μπορεί να εμφανιστεί με μια πολύ απλή τεχνική χρώσης με κυανό του Coomassie (Coomassie Brilliant Blue) (Walker & Yule, 1984). Στην παρούσα διδακτορική διατριβή περιγράφεται για πρώτη φορά ένα διαφορετικό πρωτόκολλο αποτύπωσης των footprints χωρίς τη χρήση Coomassie Brilliant Blue και χωρίς τη χρήση μεμβράνης νιτροκυτταρίνης, ενώ είναι μια πρώτη προσπάθεια μελέτης της συμπεριφοράς των κυπρίδων παρουσία χημικών ενώσεων με αποδεδειγμένη αντιβιοεπιστρωτική δράση.

Στη προσπάθεια προσδιορισμού, τόσο ποιοτικά όσο και ποσοτικά την πρωτεΐνη SIPC που εναπόθεσαν οι κυπρίδες κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, εκτελέστηκαν πειράματα ανοσοαποτύπωσης κατά Western, και πειράματα ανταγωνιστικής ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής μεθόδου ELISA. Για τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ένα πολυκλωνικό rabbit anti-SIPC (GenScript), και στη

[164]

συνέχεια ένα μονοκλωνικό αντίσωμα mouse anti-SIPC, ενώ σημαντικό αποτέλεσμα των πειραματικών αυτών διαδικασιών ήταν η αξιολόγηση των δύο αντισωμάτων, με το πολυκλωνικό αντίσωμα να παρουσιάζει μικρή ευαισθησία μεθόδου σε αντίθεση με το μονοκλωνικό.

Η SIPC είναι μια γλυκοπρωτεΐνη που δρα ως φερορμόνη που επάγει την αποίκηση του ιδίου είδους κυπρίδων σε μια επιφάνεια (Crisp & Meadows 1963; Clare & Matsumura 2000). Αυτή η γλυκοπρωτεΐνη εκφράζεται σε όλο το σώμα της κυπρίδας, παρόλα αυτά, για άγνωστο ακόμα λόγο, εκκρίνεται από τα θωρακοπόδια. Στα πειράματα ανοσοαποτύπωσης των footprints των κυπρίδων παρόλο που και τα δύο αντισώματα έδωσαν μια εικόνα μόνο αυτή του μονοκλωνικού αντισώματος ήταν αποδεκτή ως αποτέλεσμα. Εφόσον το υλικό πρόσδεσης εκκρίνεται από την επιφάνεια του δίσκου του θωρακοπόδιου (Nott & Foster 1969; Yule & Walker 1985), η ανοσοαποτύπωση μπορεί να αντιστοιχεί σε αντίδραση με αυτήν την έκκριση. Αυτό βέβαια είναι και λογικό δεδομένου ότι περιοχές στην μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που κυπρίδες δείχνουν έχουν διερευνηθεί από τις πολλά íχvŋ μετά τηv ανοσοαποτύπωση, τα οποία είναι ουσιαστικά οι εκκρίσεις από τις κεραίες κατά τη διάρκεια εξερεύνησης της επιφάνειας (Walker & Yule 1984).

Μέχρι σήμερα υπήρχε το ερώτημα του κατά πόσον η πρωτεϊνική αυτή έκκριση των κυπρίδων μπορεί να προσκολληθεί σε μια επιφάνεια όπως για παράδειγμα το γυαλί και για πόσο καιρό μπορεί να μείνει στην επιφάνεια αυτή. Όπως αναφέρει η Dreanno et al. (2006) ίσως να μην υπάρχουν τα κατάλληλα πρωτόκολλά ακόμα. Πάντως τα footprints του είδους *Semibalanus balanoides* διατηρούν την ικανότητα προτροπής εγκατάστασης των κυπρίδων του ίδιου είδους έως και 3 εβδομάδες, σε συνθήκες ροής φυσικού θαλασσινού νερού (Yule & Walker 1985). Το δικό μου πρωτόκολλο έρχεται να καλύψει αυτό το κενό καθώς με το μονοκλωνικό αντίσωμα anti-SIPC κατέστη δυνατός ο εντοπισμός των footprints των κυπρίδων και σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης αλλά και σε πλαστικό, χωρίς να έχει προηγηθεί κάποια επεξεργασία της επιφάνειας. Εδώ βέβαια προκύπτει το ερώτημα πόσο καιρό μπορεί να μείνει ενεργή η SIPC στην πλαστική επιφάνεια. Αυτό όμως αποτελεί ταυτόχρονα και μια πρόταση για μελλοντική έρευνα.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή, μέσω μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πρωτεϊνών, απέδειξε κάτι που ήταν ήδη γνωστό (Matsumura et al. 1998), ότι η πρωτεΐνη SIPC εντοπίζεται σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης του Θυσανόποδου. Και τα δύο αντισώματα (πολυκλωνικό και μονοκλωνικό) χρησιμοποιήθηκαν σε ανοσοαποτυπώματα κατά Western για την αναγνώριση της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC σε εκχυλίσματα διαφορετικών σταδίων του Θυσανόποδου *Α. amphitrite* με καλύτερα αποτελέσματα αυτών του μονοκλωνικού αντισώματος. Κανένα από τα δύο

[165]

αντισώματα δεν αναγνώρισε την πρωτεΐνη σε στάδια ναυπλίου, κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο καθώς έχει εντοπιστεί σε άλλες μελέτες με άλλα αντισώματα (Matsumura et al. 1998; Dreanno et al., 2006b) η ύπαρξη της πρωτεΐνης από το πρώτο κιόλας στάδιο ναυπλίου. Η ανικανότητα εντοπισμού της πρωτεΐνης SIPC σε στάδια ναυπλίου μέσω μεθόδου ανοσοαποτύπωσης πιθανά να αντικατοπτρίζει το όριο ευαισθησίας της μεθόδου. Το πολυκλωνικό αντίσωμα αναγνώρισε την πρωτεΐνη μόνο σε εκχύλισμα κυπρίδων, ενώ το μονοκλωνικό σε εκχύλισμα κυπρίδων αλλά και πρώτο εγκατεστημένων κυπρίδων από 1 έως και 3 ημερών.

Εφόσον ολοκληρώθηκαν τα πειράματα ποιοτικής αναγνώρισης της ενδογενούς πρωτεΐνης SIPC με τη μέθοδο ανοσοαποτύπωσης κατά Western, έγινε μια προσπάθεια εκτίμησης της ελάχιστης ποσότητας SIPC που μπορούν να ανιχνεύσουν τα δυο αντισώματα, το πολυκλωνικό και το μονοκλωνικό. Για το λόγο αυτό έγινε ανάπτυξη μιας ανταγωνιστικής ενζυμικής ανοσοπροσροφητικής μεθόδου ELISA. Ουσιαστικά πρόκειται για μια βιοχημική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της παρουσίας ενός αντισώματος ή αντιγόνου σε ένα δείγμα, με βασική αρχή της μεθόδου την ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος, ενώ το βασικότερο πλεονέκτημα της είναι η υψηλή ευαισθησία και η επαναληψιμότητα της. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα το μονοκλωνικό αντίσωμα παρουσίασε μεγαλύτερη ευαισθησία δηλαδή μπορεί να εντοπίσει χαμηλότερη ποσότητα πρωτεΐνης SIPC σε ένα δείγμα απ' ότι το πολυκλωνικό. Αυτό το αποτέλεσμα ήταν αναμενόμενο, καθώς τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν προκαθορισμένη ειδικότητα προς έναν αντιγονικό επίτοπο σε αντίθεση με τα πολυκλωνικά που είναι προϊόν πολλών διαφορετικών κλώνων και κατά συνέπεια αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους του ίδιου αντιγόνου (Growther, 2000). Πουθενά ως σήμερα δεν έχει αναφερθεί η ανάπτυξη μιας τέτοιας μεθόδου για την ανίχνευση της πρωτεΐνης SIPC ενώ οι συγκεκριμένες πειραματικές δοκιμές βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη με απώτερο σκοπό την ανίχνευση της φυσικής πρωτεΐνης από δείγματα πεδίου.

Ως τελική πειραματική δοκιμασία για την ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής αποτέλεσε η μελέτη της συμπεριφοράς των κυπρίδων κατά τη διαδικασία εξερεύνησης μιας επιφάνειας παρουσία δύο μεταβολιτών, της perforenol (9) και της Βρωμοσφαιρόλης, των οποίων καλό οικοτοξικό προφίλ και αντιβιοεπιστρωτική δράση είχε προηγουμένως αποδειχθεί στις πειραματικές δοκιμές στο εργαστήριο.

Η αντιβιοεπιστρωτική δράση της Βρωμοσφαιρόλης ήταν γνωστή από προηγούμενες μελέτες (Piazza et al., 2011), ενώ διαπιστώθηκε και στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Σε αντίθεση με την χημική ένωση perforenol (9) για την οποία η πρώτη αναφορά για την αντιβιοεπιστρωτική της δράση έγινε στη δημοσίευση

Protopapa et al. (2019) στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα οι δύο αυτές χημικές ενώσεις πληρούν ένα σημαντικό κριτήριο, αυτό της εφαρμογής μεθόδων αντιβιοεπίστρωσης χωρίς τη θανάτωση των οργανισμών (Aldred & Clare 2008; Qian et al. 2010b; Pinori et al. 2011). Η συμπεριφορά των κυπρίδων παρουσία των χημικών ενώσεων δεν άλλαξε, συγκρινόμενη με το θετικό μάρτυρα, ενώ φαίνεται πως συνέχισαν την εξερεύνηση της επιφάνειας της πλάκας χωρίς, κατά μέσο όρο, να εγκατασταθούν.

Μάλιστα, όπως φαίνεται στην **Εικόνα 3.10**, χαρακτηριστικό της συμπεριφοράς των κυπρίδων είναι η προτίμηση για εξερεύνηση, και τελικά εγκατάσταση, της περιμέτρου του πυθμένα των οπών των πλακιδίων και όχι μιας λείας και μεγάλης επιφάνειας, όπως είναι ο πυθμένας τους. Επιπλέον, είναι χαρακτηριστικό ότι δεν εναποθέτουν σχεδόν καθόλου πρωτεΐνη σε αυτό το τμήμα της πλάκας. Αυτή η συμπεριφορά-προτίμηση των κυπρίδων είχε παρατηρηθεί και στα πειράματα μελέτης τοξικότητας των δευτερογενών μεταβολιτών, χωρίς όμως να είναι γνωστό που έχει εναποτεθεί η πρωτεΐνη SIPC.

Ο λόγος που επιλέγουν αυτό το σημείο στην πλάκα δεν είναι γνωστός. Όπως έχει αναλυθεί στην Εισαγωγή, το αν κάποιο υπόστρωμα είναι κατάλληλο για εγκατάσταση καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, παραδείγματος χάριν το βάθος, ο φωτισμός, το υλικό της επιφάνειας κτλ. Στη συγκεκριμένη περίπτωση όμως είναι και κάτι άλλο που προφανώς επηρεάζει τις κυπρίδες αλλά δεν είναι ευδιάκριτο σε εμάς. Τα πειράματα γίνονται σε καινούριες πλάκες, σε σκοτάδι σε σταθερή θερμοκρασία και χωρίς κάποια κίνηση. Άρα αυτό που φαίνεται να τους αρέσει είναι η κλίση της επιφάνειας που δημιουργείται περιμετρικά του πυθμένα των οπών.

Η προτίμηση μιας επιφάνειας με κλίση από μια επίπεδη επιφάνεια έχει παρατηρηθεί και σε άλλους θαλάσσιους οργανισμούς. Συγκεκριμένα οι Carleton & Sammarco (1987) παρατήρησαν ότι η επιτυχία εγκατάστασης των κοραλλιών κρύβεται στη κλίση της επιφάνειας. Επίσης έχει παρατηρηθεί η σημασία της σκίασης σε μια επιφάνεια (Crisp & Barnes 1954, Crisp 1961) που μπορεί να δημιουργηθεί και λόγω κλίσης της, προκειμένου να εγκατασταθούν οι κυπρίδες των Θυσανόποδων. Ο Wethey (1986) σε πειραματικές δοκιμές με Θυσανόποδα παρατήρησε ότι τα Θυσανόποδα επέλεγαν να εγκατασταθούν σε επιφάνειες με την ίδια φωτοσκίαση.

[166]

Συμπεράσματα και προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής είναι τα εξής:

- Ο μεταβολίτης perforenol (9) παρουσίασε την καλύτερη αντιβιοεπιστρωτική δράση και το καλύτερο οικοτοξικό προφίλ.
- Είναι αναγκαία η ολιστική αξιολόγηση των δευτερογενών μεταβολιτών, προερχόμενων από φυσικά προϊόντα, όπως έγινε στην παρούσα μελέτη.
- Σημαντική η συμβολή της παρούσας μελέτης στην ανάπτυξη μεθοδολογίας αξιολόγησης της συμπεριφοράς των κυπρίδων που προκαλούν βιοεπίστρωση υπό την παρουσία αντιβιοεπιστρωτικών χημικών ενώσεων.
- Ο συνδυασμός χημικών ενώσεων και τεχνολογιών κατεργασίας του υποστρώματος ίσως να είναι η καλύτερη λύση για την αντιμετώπιση της βιοεπίστρωσης.

Ο έλεγχος της βιοεπίστρωσης αποτελεί μια από τις μεγαλύτερες ερευνητικές προκλήσεις της θαλάσσιας βιοτεχνολογίας (Yebra et al. 2004) ενώ αποτελεί κομμάτι εξαιρετικού ενδιαφέροντος της Γαλάζιας Ανάπτυξης της Ευρωπαϊκής Ένωσης και πιο συγκεκριμένα αφορά το κομμάτι της Γαλάζιας Βιοτεχνολογίας. Η απαγόρευση (2008) λόγω τοξικότητας των χρησιμοποιούμενων βαφών παρεμπόδισης βιοεπίστρωσης (Yebra et al. 2004), έχει κάνει αναγκαία την εύρεση βιοαποικοδομήσιμων και φιλικών προς το περιβάλλον υλικών (Armstrong et al. 2000) αλλά και νέων τεχνολογιών που θα βοηθήσουν στην αντιμετώπιση του φαινομένου της βιοεπίστρωσης (Briand 2009).

Μέχρι σήμερα η προσπάθεια ποσοτικού προσδιορισμού της βιοεπίστρωσης δεν αποτελεί σημαντικό τμήμα των ερευνητικών προσπαθειών λόγω της ανυπαρξίας σαφών και καθορισμένων βιοδεικτών μέτρησης της βιοεπίστρωσης. Αυτό όμως έρχεται να αλλάξει με την μεθοδολογία που προτείνεται στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Η κλωνοποίηση του γονιδίου που κωδικοποιεί την πρωτεΐνη (SIPC), και η κοσμοπολίτικη παρουσία του *Α. amphitrite*, αλλά και ειδών του ίδιου Γένους, σε όλες σχεδόν της θαλάσσιες περιοχές, κάνει εφικτή τη χρήση βιοχημικών μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιοεπίστρωσης χρησιμοποιώντας ως βιοδείκτη συσσωρευτικής εμφάνισης της βιοεπίστρωσης τον εντοπισμό της πρωτεΐνης SIPC σε υποστρώματα στο θαλάσσιο περιβάλλον. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία βρίσκεται σε εξέλιξη και αποτελεί σημαντικό κομμάτι μελλοντικής έρευνας.

Συνοψίζοντας, στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής 3VIV3 μελέτη του οικοτοξικού προφίλ 25 φυσικών δευτερογενών μεταβολιτών με σκοπό την εύρεση κάποιου ή κάποιων με την καλύτερη αντιβιοεπιστρωτική δράση. Παράλληλα όμως προτείνει μια νέα μέθοδο αξιολόγησης των χημικών ενώσεων, που πιθανά να χρησιμοποιηθούν ως αντιβιοεπιστρωτικές χημικές ενώσεις, προκειμένου να μελετηθούν αλλαγές στη συμπεριφορά των κυπρίδων παρουσία αυτών. Τέλος με την ολοκλήρωση της μεθόδου ELISA θα επιτευχθεί η δημιουργία μιας καινοτόμου πειραματικής διάταξης (συστοιχία) γρήγορου εντοπισμού της πρωτεΐνης SIPC σε οποιαδήποτε υποστρώματα εμποτισμένα στη θάλασσα, ενώ ο ποσοτικός προσδιορισμός της παρουσίας της πρωτεΐνης αυτής θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βιοδείκτης συσσωρευτικής εμφάνισης της βιοεπίστρωσης γενικότερα. Με δεδομένο την κοσμοπολίτικη παρουσία του είδους αυτού και τη στοχαστική εξερεύνηση των επιφανειών που προτίθεται να εγκατασταθεί, θα μπορούμε με τη μέθοδο αυτή να υπολογίσουμε την ποσοτική διάσταση της γενικότερης βιοεπίστρωσης σε οποιαδήποτε επιφάνεια μέσα σε διάστημα 1 ημέρας από ένα πολύ μικρό δείγμα από την επιφάνεια αυτή. Είναι πολύ πιθανό μια αντίστοιχη μέθοδος να μπορεί να επιτευχθεί και για άλλους οργανισμούς που εμπλέκονται στο φαινόμενο της βιοεπίστρωσης.

Κεφάλαιο 5

Βιβλιογραφία

- Abarzua, S., & Jakubowski, S. (1995). Biotechnological investigation for the prevention of biofouling. I. Biological and biochemical principles for the prevention of biofouling. *Marine Ecology Progress Series*, *123*, 301–312.
- Abbott, A., Abel, P. D., Arnold, D. W., & Milne, A. (2000). Cost-benefit analysis of the use of TBT: the case for a treatment approach. *The Science of the Total Environment*, *258*(1-2), 5–19.
- Aldred, N.; Alsaab, A.; Clare, A. S. (2018). Quantitative analysis of the complete larval settlement process confirms Crisp's model of surface selectivity by barnacles. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 285.
- Aldred, N., & Clare, A. S. (2014). Mini-review: impact and dynamics of surface fouling by solitary and compound ascidians. *Biofouling*, *30*(3), 259–70.
- Aldred N, Clare AS. (2008). The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle resistant marine coatings. Bio- fouling. 24:351–363.
- Al-Lihaibi, S. S.; Abdel-Lateff, A.; Alarif, W. M.; Nogata Y.; Ayyad S.N.; T., O., Potent antifouling metabolites form Red Sea organisms. Asian J. Chem. 2015, 27, 2252–2256.
- Almeida, E.; Diamantino, T. C.; de Sousa, O., Marine paint (2007). The particular case of antifouling paints. Progress in Organic Coatings, 59, (1), 2-20.
- Almeida, J. R.; Vasconcelos, V. (2015). Natural antifouling compounds:
 Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion.
 Biotechnology Advances, 33, (3), 343-357.
- Alves, C.; Silva, J.; Pinteus, S.; Gaspar, H.; Alpoim, M. C.; Botana, L. M.; Pedrosa, R.,
 (2018). From Marine Origin to Therapeutics: The Antitumor Potential of Marine
 Algae-Derived Compounds. *Frontiers in pharmacology*, 9, 777-777.
- Amico, V.; Caccamese, S.; Neri, P.; Russo, G.; Foti, M., (1991). Brasilane-type sesquiterpenoids from the mediterranean red alga Laurencia obtusa. *Phytochemistry*, 30, (6), 1921-1927.
- Amin, S. A., Parker, M. S., & Armbrust, E. V. (2012). Interactions between diatoms and bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(3), 667–84.
- Anil, A. C., Chiba, K., Okamoto, K. & Kurokura, H. (1995). Influence of temperature and salinity on larval development of Balanus amphitrite : implications in fouling ecology. Mar. Ecol. Prog. Ser. 118, 159–166.
- Anonymous. (2003). *Ambient aquatic life water quality criteria for tributyltin* (p. 138). Washington D.C.
- Anonymous. (2014). 2013 Greenhouse gas emissions: final figures. Statistical release.

- Appleton, D. R.; Babcock, R. C.; Copp, B. R., (2001). Novel tryptophan-derived dipeptides and bioactive metabolites from the sea hare Aplysia dactylomela. *Tetrahedron*, 57, (51), 10181-10189.
- Apolinario, M., & Coutinho, R. (2009). Understanding the biofouling of offshore and deep-sea structures. In C. Hellio & D. Yebra (Eds.), *Advances in marine antifouling coatings and technologies* (1st ed., pp. 132–147). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Apte, A., Holland, B. S., Godwin, L. S., & Gardner, J. P. A. (2000). Jumping ship : a stepping stone event mediating transfer of a non-indigenous species via a potentially unsuitable environment. *Biological Invasions*, *2*, 75–79.
- Arrhenius, A., Backhaus, T., Grönvall, F., Junghans, M., Scholze, M., & Blanck, H.
 (2006). Effects of three antifouling agents on algal communities and algal reproduction: mixture toxicity studies with TBT, Irgarol, and Sea-Nine.
 Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 50(3), 335–45.
- ASTM. (2012). Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae. E1218-04; American Society for Testing and Material (ASTM) International: West Conshohocken, PA, USA.
- Bacchetti De Gregoris, T., Khandeparker, L., Anil, A. C., Mesbahi, E., Burgess, J.
 G., & Clare, A. S. (2012). Characterisation of the bacteria associated with barnacle, *Balanus amphitrite*, shell and their role in gregarious settlement of cypris larvae. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *413*, 7–1
- Bakker, D. P., Busscher, H. J., van Zanten, J., de Vries, J., Klijnstra, J. W., & van der Mei, H. C. (2004). Multiple linear regression analysis of bacterial deposition to polyurethane coatings after conditioning film formation in the marine environment. *Microbiology (Reading, England)*, *150*(Pt 6), 1779– 84.
- Bandara, N., Zeng, H., & Wu, J. (2012). Marine mussel adhesion: biochemistry, mechanisms, and biomimetics. *Journal of Adhesion Science and Technology*, *27*(18-19), 2139–2162.
- Beech, I. B., Smith, J. R., Steele, A. A., Penegar, I., & Campbell, S. A. (2002). The use of atomic force microscopy for studying interactions of bacterial biofilms with surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 23(2-3), 231–247.
- Beech, I. B., Sunner, J. A., & Hiraoka, K. (2005). Microbe-surface interactions in biofouling and biocorrosion processes. *International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 8*(3), 157–68.

- Bernard, F. J.; Lane, C. E., Early settlement and metamorphosis of the barnacle Balanus amphitrite niveus. Journal of Morphology 1962, 110, (1), 19-39.
- Berntsson, K. M., Jonsson, P. R., Lejhall, M., & Gatenholm, P. (2000). Analysis of behavioural rejection of micro-textured surfaces and implications for recruitment by the barnacle *Balanus improvisus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 251(1), 59–83.
- Bhosale, S. H.; Nagle, V. L.; Jagtap, T. G., (2002). Antifouling Potential of SomeMarine Organisms from India Against Species of Bacillus andPseudomonas. Marine Biotechnology, 4, (2), 111-118.
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Keyzers, R. A.; Munro, M. H. G.; Prinsep, M. R., (2017). Marine natural products. *Natural Product Reports*, 34, (3), 235-294.
- Bowen, J., Pettitt, M. E., Kendall, K., Leggett, G. J., Preece, J. A., Callow, M. E., & Callow, J. A. (2007). The influence of surface lubricity on the adhesion of *Navicula perminuta* and *Ulva linza* to alkanethiol self-assembled monolayers. Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society, 4(14), 473–7.
- Briand, J.-F., (2009). Marine antifouling laboratory bioassays: an overview of their diversity. Biofouling, 25, (4), 297-311.
- Bullard, S. G., Davis, C. V, & Shumway, S. E. (2013). Seasonal patterns of ascidian settlement at an aquaculture facility in the Damariscotta River, Maine. *Journal* of Shellfish Research, 32(2), 255–264.
- Burgess, J. G., Boyd, K. G., Armstrong, E., Jiang, Z., Yan, L., Berggren, M., May, U.,
 Pisacane, A., Granmo, A., & Adams, D. R. (2003). The development of a marine natural product-based antifouling paint. Biofouling, 19 Suppl, 197–205.
 - Busalmen, J. P., Vázquez, M., & de Sánchez, S. R. (2002). New evidences on the catalase mechanism of microbial corrosion. Electrochimica Acta, 47(12), 1857–1865.
- Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. (2012). How do bacteria know they are on a surface and regulate their response to an adhering state? *PLoS Pathogens*, *8*(1), e1002440.
- Caccamese, S.; Azzolina, R.; Duesler, E. N.; Paul, I. C.; Rinehart, K. L., (1980). Laurencienyne, a new acetylenic cyclic ether from the marine red alga laurencia obtusa. Tetrahedron Letters, 21, (24), 2299-2302.
- Cahill, P., Heasman, K., Jeffs, A., Kuhajek, J., & Mountfort, D. (2012). Preventing ascidian fouling in aquaculture: screening selected allelochemicals for antimetamorphic properties in ascidian larvae. *Biofouling*, *28*(1), 39–49.
- Callow, J. A., & Callow, M. E. (2006). Biofilms. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, *42*(1985), 141–69.

- Callow, M. E. (1996). Ship-fouling: the problem and method of control. Biodeterioration Abstracts, 10, 411–421.
- Callow, M. E., & Callow, J. A. (2002). Marine biofouling: a sticky problem. *Biologist* (London, England), 49(1), 10–4.
- Campos A., Souza C.B., Lhullier C., Falkenberg M., Schenkel E.P., Ribeirodo-Valle R.M., Siqueira J.M. (2012). Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae Laurencia microcladia. J. Pharm. Pharmacol., 64, 1146-1154.
- Cao, S., Wang, J., Li, D., & Chen, D. (2013). Ecological and social modeling for migration and adhesion pattern of a benthic diatom. *Ecological Modelling*, 250, 269–278.
- Carballo, J. L.; Hernández-Inda, Z. L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M. D., (2002). A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. BMC biotechnology, 2, 17-17.
- Carbery, K., Owen, R., Frickers, P. E., Otero, E., & Readman, J. W. (2006). Contamination of Caribbean coastal waters by the antifouling herbicide Irgarol 1051. Marine Pollution Bulletin, 52(6), 635–44.
- Carleton, J. H., Sammarco, P. W. (1987). Effects of substratum irregularity on success of coral settlement: quantification by geomorphological techniques. Bull. mar. Sci.40:80-98
- Chambers, L. D., Stokes, K. R., Walsh, F. C., & Wood, R. J. K. (2006). Modern approaches to marine antifouling coatings. Surface and Coatings Technology, 201(6), 3642–3652.
- Champ, M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. The Science of the Total Environment, 258(1-2), 21–71.
- Chapman, J., & Regan, F. (2012). Nanofunctionalized superhydrophobic antifouling coatings for environmental sensor applications-advancing deployment with answers from nature. Advanced Engineering Materials, 14(4), B175–B184.
- Chiovitti, A., Dugdale, T. M., & Wetherbee, R. (2006). Diatom adhesives: molecular and mechanical properties. In A. Smith & J. Callow (Eds.), Biological Adhesives (pp. 79–103). Springer-Verlag, Berlin.
- Chiovitti, A., Heraud, P., Dugdale, T. M., Hodson, O. M., Curtain, R. C. A., Dagastine,R. R., Wood, B. R., & Wetherbee, R. (2008). Divalent cations stabilize the aggregation of sulfated glycoproteins in the adhesive nanofibers of the biofouling diatom Toxarium undulatum. Soft Matter, 4(4), 811.

- Choudhary, A.; Naughton, L. M.; Montanchez, I.; Dobson, A. D. W.; Rai, D. K., (2017). Current Status and Future Prospects of Marine Natural Products (MNPs) as Antimicrobials. Mar Drugs, 15, (9).
- Chung, H. C., Lee, O. O., Huang, Y.-L., Mok, S. Y., Kolter, R., & Qian, P.-Y. (2010). Bacterial community succession and chemical profiles of subtidal biofilms in relation to larval settlement of the polychaete *Hydroides elegans*. The ISME Journal, 4(6), 817–28.
- Clare, A. S., & Aldred, N. (2009). Surface colonisation by marine organisms and its impact on antifouling research. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 46–79). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Clare, A. S. (1998). Towards nontoxic antifouling. *Marine Biotechnology*, 6(1), 3–6.
- Clare, A. S., Freet, R. K. & McClary Jr, M. (1994). On the antennular secretion of the cyprid of Balanus amphitrite amphitrite, and its role as a settlement pheromone.J. Mar. Biol. Assoc. 74, 243–250.
- Clare, A. S.; Rittschof, D.; Costlow, J. D., (1992). Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. Journal of Experimental Zoology, 262, (4), 436-440.
- Coelho, M. R., Langston, W. J., & Bebianno, M. J. (2006). Effect of TBT on *Ruditapes decussatus* juveniles. *Chemosphere*, *63*(9), 1499–505.
- Coll, J.; Skelton, B.; White, A.; Wright, A., Tropical Marine Algae. V.(1989). The Structure Determination of Two Novel Sesquiterpenes From the Red Alga
 <l>Laurencia tenera</l>
 (Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). Aust.
 J. Chem., 42, (10), 1695-1703.
- Costlow, J. D.,(1956). Shell development in Balanus improvisus Darwin. Journal of Morphology, 99, (2), 359-415.
- Coutts, A. D. M., Piola, R. F., Taylor, M. D., Hewitt, C. L., & Gardner, J. P. A. (2010). The effect of vessel speed on the survivorship of biofouling organisms at different hull locations. Biofouling, 26(5), 539–53.
- Cox, P. J.; Imre, S.; Islimyeli, S.; Thomson, R. H. (1982). Obtusallene I, a new halogenated allene from Laurencia Obtusa. Tetrahedron Letters, 23, (5), 579-580.
- Crews, P.; Selover, S. J.(1986). Comparison of the sesquiterpenes from the seaweed Laurencia pacifica and its epiphyte Erythrocystis saccata. Phytochemistry, 25, (8), 1847-1852.

- Crisp D. J., (1984) Overview of research on marine invertebrate larvae, 1940-1980. In: Costlow J D, Tipper R C (eds) Marine Biodeterioration: an Interdisciplinary Study. Naval Institute Press, Annapolis, MD, pp 103-12
- Crisp, D. J. & Meadows, P. S. (1963). Adsorbed Layers: The Stimulus to Settlement in Barnacles. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 158, 364–387.
- Crisp, D. J. & Meadows, P. S (1962). The Chemical Basis of Gregariousness in Cirripedes. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 156, 500–520.
- Crisp, D. J. (1961). Territorial behaviour In barnacle settlement. J. exp. Biol. 38. 429-446
- Crisp, D. J., Barnes, H. (1954). The orientation and distribution of barnacles at settlement with particular reference to surface contour J. Anim. Ecol. 23: 142-162
- Da Silva Machado, F. L.; Pacienza-Lima, W.; Rossi-Bergmann, B.; de Souza Gestinari,
 L. M.; Fujii, M. T.; Campos de Paula, J.; Costa, S. S.; Lopes, N. P.; Kaiser, C.
 R.; Soares, A. R. (2011). Antileishmanial Sesquiterpenes from the Brazilian
 Red Alga Laurencia dendroidea. Planta Med, 77, (07), 733-735.
- Dafforn, K. A., Lewis, J. A., & Johnston, E. L. (2011). Antifouling strategies: History and regulation, ecological impacts and mitigation. *Marine Pollution Bulletin*, 62(3), 453–465.
- Dahl, B., & Blanck, H. (1996). Toxic effects of the antifouling agent Irgarol 1051 on periphyton communities in coastal water microcosms. *Marine Pollution Bulletin*, 32(4), 342–350.
- Dahms, H.; Dobretsov, S. (2017). Antifouling Compounds from Marine Macroalgae. Marine Drugs, 15, (9), 265.
- Dahms, H. U.; Hellio, C., (2009). 12 Laboratory bioassays for screening marine antifouling compounds. In Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies, Woodhead Publishing: pp 275-307.
- Dahms, H.-U., Dobretsov, S., & Qian, P.-Y. (2004). The effect of bacterial and diatom biofilms on the settlement of the bryozoan Bugula neritina. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 313(1), 191–209.
- Da Silva M., Fernanda L., Pacienza-Lima W., Rossi-Bergmann B., de Souza G.L.M.,
 Fujii M.T., Campos de P.J., Costa S.S., Lopes N.P., Kaiser C.R., Soares A.R.
 (2011). Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga Laurencia dendroidea. Planta Med., 77, 733-735.
- Daskalaki, M. G.; Vyrla, D.; Harizani, M.; Doxaki, C.; Eliopoulos, A. G.; Roussis, V.; Ioannou, E.; Tsatsanis, C.; Kampranis, S. C. (2019). Neorogioltriol and Related Diterpenes from the Red Alga Laurencia Inhibit Inflammatory Bowel Disease in

Mice by Suppressing M1 and Promoting M2-Like Macrophage Responses. Marine Drugs, 17, (2), 97.

- Daume, S., Brand-Gardner, S., & Woelkerling, W. J. (1999). Preferential settlement of abalone larvae: diatom films vs. non-geniculate coralline red algae. Aquaculture, 174(3-4), 243–254.
- De Brito, L. V. R., Coutinho, R., Cavalcanti, E. H. S., & Benchimol, M. (2007). The influence of macrofouling on the corrosion behaviour of API 5L X65 carbon steel. Biofouling, 23(3-4), 193–201.
- De Nys, R., & Guenther, J. (2009). The impact and control of biofouling in marine finfish aquaculture. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 177–221). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- De Nys, R.; Leya, T.; Maximilien, R.; Afsar, A.; Nair, P. S. R.; Steinberg, P. D. (1996). The need for standardised broad scale bioassay testing: A case study using the red alga Laurencia rigida. Biofouling, 10, (1-3), 213-224.
- Decho, A. W. (2000). Microbial biofilms in intertidal systems: an overview. Continental Shelf Research, 20(10-11), 1257–1273.
- Desoti V.C., Lazarin-Bidoia D., Sudatti D.B., Pereira R.C., Alonso A., Ueda-Nakamura T., Dias F.B.P., Nakamura C.V., Silva Sde O. (2012). Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by mitochondria dysfunction. Mar. drugs, 10, 1631-1646
- Dias T., Brito I., Moujir L., Paiz N., Darias J., Cueto M. (2005). Cytotoxic sesquiterpenes from Aplysia dactylomela. J. Nat. Prod., 68, 1677-1679.
- Díaz-Marrero, A.-R.; de la Rosa, J. M.; Brito, I.; Darias, J.; Cueto, M. (2012). Dactylomelatriol, a Biogenetically Intriguing Omphalane-Derived Marine Sesquiterpene. Journal of Natural Products, 75, (1), 115-118.
- Dimartino, S., Lir, I., Haber, M., & Azhari, A. (2013). Characterization of biomimetic adhesives from the red alga *Gracilaria conferta* for biomedical applications. In R. Santos, N. Aldred, S. Gorb, & P. Flammang (Eds.), Biological and Biomimetic Adhesives : Challenges and Opportunities (pp. 117–131). RSC Publishing.
- Dobretsov, S. (2010). Marine Biofilms. In Biofouling (pp. 123–136). Wiley-Blackwell.
- Dobretsov, S., & Qian, P.-Y. (2002). Effect of bacteria associated with the green alga *Ulva reticulata* on marine micro- and macrofouling. Biofouling, 18(3), 217–228.
- Dobretsov, S., & Railkin, A. I. (1996). Effects of substrate features on settling and attachment of larvae in blue mussel *Mytilus edulis* (Mollusca, Filibranchia). Zoologichesky Zhurnal, 75(4), 499–506.

- Dos Santos, A. O.; Veiga-Santos, P.; Ueda-Nakamura, T.; Filho, B. P.; Sudatti, D. B.; Bianco, E. M.; Pereira, R. C.; Nakamura, C. V.(2010). Effect of elatol, isolated from red seaweed Laurencia dendroidea, on Leishmania amazonensis. Mar Drugs, 8, (11), 2733-43.
- Dreanno, C.; Kirby, R. R.; Clare, A. S. (2007). Involvement of the barnacle settlementinducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 351, (1), 276-282.
- Dreanno, C.; Kirby, R. R.; Clare, A. S. (2006a) Smelly feet are not always a bad thing: the relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. Biology Letters, 2, (3), 423-425.
- Dreanno, C.; Kirby, R. R.; Clare, A. S. (2006b) Locating the barnacle settlement pheromone: spatial and ontogenetic expression of the settlement-inducing protein complex of Balanus amphitrite. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 2006, 273, (1602), 2721-2728.
- Dreanno, C.; Matsumura, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Hirota, H.; Kirby, R. R.; Clare, A. S. (2006c) An α2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle Balanus amphitrite. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103, (39), 14396-14401.
- Dugdale, T. M., Willis, A., & Wetherbee, R. (2006). Adhesive modular proteins occur in the extracellular mucilage of the motile, pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Biophysical Journal, 90(8), L58–60.
- Dürr, S., & Watson, D. I. (2010). Biofouling and antifouling in aquaculture. In Biofouling (pp. 267–287). Wiley-Blackwell.
- Dworjanyn, S. A.; De Nys, R.; Steinberg, P. D.(1999). Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga Delisea pulchra. Marine Biology, 133, (4), 727-736.
- Elkin, C., & Marshall, D. J. (2007). Desperate larvae: influence of deferred costs and habitat requirements on habitat selection. Marine Ecology Progress Series, 335, 143–153.
- Eulin, A., & Le Cohu, R. (1998). Epilithic diatom communities during the colonization of artificial substrates in the River Garonne (France). Comparison with the natural communities. Archiv Für Hydrobiologie, 143(1), 79–106.
- Falshaw, C. P.; King, T. J.; Imre, S.; Islimyeli, S.; Thomson, R. H. (1980). Laurenyne, a new acetylene from Laurencia obtusa: crystal structure and absolute configuration. Tetrahedron Letters, 21, (51), 4951-4954.
- Fattom, A., & Shilo, M. (1984). Hydrophobicity as an adhesion mechanism of benthic cyanobacteria. Applied and Environmental Microbiology, 47(1), 135–43.

- Favi, P. M., Yi, S., Lenaghan, S. C., Xia, L., & Zhang, M. (2012). Inspiration from the natural world: from bio-adhesives to bio-inspired adhesives. Journal of Adhesion Science and Technology, 28(3-4), 290–319.
- Fenical, W. (1993). Chemical studies of marine bacteria: developing a new resource. Chemical Reviews, 93(5), 1673–1683.
- Fenical, W.; Norris, J. N., (1975). CHEMOTAXONOMY IN MARINE ALGAE: CHEMICAL SEPARATION OF SOME LAURENCIA SPECIES (RHODOPHYTA) FROM THE GULF OF CALIFORNIA1. Journal of Phycology, 11, (1), 104-108
- Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M., Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. Cold Spring Harbor Protocols 2016, 2016, (4), pdb.prot087379.
- Fieller, E. C., The Biological Standardization of Insulin. J R Statist Soc 1940, 7, 1-64.
- Findlay, J. A.; Li, G. (2002). Novel terpenoids from the Sea Hare Aplysia punctata. Canadian Journal of Chemistry, 80, (12), 1697-1707.
- Firn, R. (2010). Nature's Chemicals. Oxford: Biology.
- Fitridge, I., Dempster, T., Guenther, J., & de Nys, R. (2012). The impact and control of biofouling in marine aquaculture: a review. Biofouling, 28(7), 649–69.
- Flemming, H.-C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the "house of biofilm cells". Journal of Bacteriology, 189(22), 7945–7.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews*. Microbiology, 8(9), 623–33.
- Fletcher, M., & Pringle, J. H. (1985). The effect of surface free energy and medium surface tension on bacterial attachment to solid surfaces. Journal of Colloid and Interface Science, 104(1), 5–14.
- Fletcher, R. L., & Callow, M. E. (1992). The settlement, attachment and establishment of marine algal spores. British Phycological Journal, 27(3), 303–329.
- Flöthe, C. R., John, U., & Molis, M. (2014). Comparing the relative importance of waterborne cues and direct grazing for the induction of defenses in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. PloS One, 9(10), e109247.
- Garcia-Davis, S.; Sifaoui, I.; Reyes-Batlle, M.; Viveros-Valdez, E.; Pinero, J. E.; Lorenzo-Morales, J.; Fernandez, J. J.; Diaz-Marrero, A. R. (2018). Anti-Acanthamoeba Activity of Brominated Sesquiterpenes from Laurencia johnstonii. Marine Drugs, 16, (11), 12.
- Garg, A., Jain, A., & Bhosle, N. B. (2009). Chemical characterization of a marine conditioning film. International Biodeterioration & Biodegradation, 63(1), 7–11.

- Gatidou, G., Thomaidis, N. S., & Zhou, J. L. (2007). Fate of Irgarol 1051, Diuron and their main metabolites in two UK marine systems after restrictions in antifouling paints. Environment International, 33(1), 70–7.
- Giacomazzi, S., & Cochet, N. (2004). Environmental impact of Diuron transformation: a review. Chemosphere, 56(11), 1021–32.
- Gollasch, S. (2006). Overview on introduced aquatic species in European navigational and adjacent waters. Helgoland Marine Research, 60(2), 84–89.
- Gong, A.-j.; Gong, L.-I.; Yao, W.-c.; Ge, N.; Lu, L.-x.; Liang, H. (2015). Aplysin induces apoptosis in glioma cells through HSP90/AKT pathway. Experimental Biology and Medicine, 240, (5), 639-644.
- Gonzalez, A. G.; Ciccio, J. F.; Rivera, A. P.; Martin, J. D. (1985). New halogenated diterpenes from the red alga Laurencia perforata. The Journal of Organic Chemistry, 50, (8), 1261-1264.
- González, A. G.; Martín, J. D.; Pérez, C.; Ramírez, M. A.; Ravelo, F. (1981). Total synthesis of obtusenol. Tetrahedron Letters, 22, (50), 5071-5072.
- Gonzalez, A. G.; Aguiar, J. M.; Darias, J.; Gonzalez, E.; Martin, J. D.; Martin, V. S.;
 Perez, C.; Fayos, J.; Martinezripoll, M. (1978). MARINE NATURALPRODUCTS FROM ATLANTIC ZONE .20. PERFORENOL, A NEW
 POLYHALOGENATED SESQUITERPENE FROM LAURENCIAPERFORATA. Tetrahedron Letters, (41), 3931-3934.
- González, A. G.; Aguiar, J. M.; Martín, J. D.; Norte, M. (1975). Three new sesquiterpenoids from the marine alga laurencia perforata. Tetrahedron Letters, 16, (29), 2499-2502.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. The Journal of general virology, 36, (1), 59-74.
- Greer, S. P., & Amsler, C. D. (2002). Light boundaries and the coupled effects of surface hydrophobicity and light on spore settlement in the brown alga *Hincksia irregularis* (Phaeophyceae). Journal of Phycology, 38(1), 116–124.
- Gribble, G. (2015). Biological Activity of Recently Discovered Halogenated Marine Natural Products. Marine Drugs, 13, (7), 4044.

Growther J. L (2000). The ELISA Guidebook, Springer, Vol. 149

Guella, G.; Pietra, F. (2000). A New-Skeleton Diterpenoid, New Prenylbisabolanes, and Their Putative Biogenetic Precursor, from the Red Seaweed Laurencia microcladia from II Rogiolo: Assigning the Absolute Configuration when Two Chiral Halves are Connected By Single Bonds. Helvetica Chimica Acta, 83, (11), 2946-2952.

- Guardiola, F. A., Cuesta, A., Meseguer, J., & Esteban, M. A. (2012). Risks of using antifouling biocides in aquaculture. International Journal of Molecular Sciences, 13(2), 1541–60.
- Guillard, R. R. L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates.
 In Culture of Marine Invertebrate Animals: Proceedings 1st Conference on Culture of Marine Invertebrate Animals Greenport, Smith, W. L.; Chanley, M. H., Eds. Springer US: Boston, MA,; pp 29-60.
- Hadfield, M. G., & Paul, V. J. (2001). Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine-invertebrate larvae. In J. McClintock & B. Baker (Eds.), Marine Chemical Ecology (Vol. 20015660, pp. 431–461). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Hammann, M., Wang, G., Rickert, E., Boo, S. M., & Weinberger, F. (2013). Invasion success of the seaweed *Gracilaria vermiculophylla* correlates with low palatibility. Marine Ecology Progress Series, 486, 93–103.
- Harder, T., Lam, C., & Qian, P.-Y. (2002). Induction of larval settlement in the polychaete *Hydroides elegans* by marine biofilms: an investigation of monospecific diatom films as settlement cues. Marine Ecology Progress Series, 229, 105–112.
- Harder, T., & Yee, L. H. (2009). Bacterial adhesion and marine fouling. In C. Hellio &D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 113–132). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. (2016). The Laurencia Paradox: An Endless Source of Chemodiversity. In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102, Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J. i., Eds. Springer International Publishing: Cham,; pp 91-252.
- Harrowven, D. C.; Lucas, M. C.; Howes, P. D. (2001). The synthesis of a natural product family: from debromoisolaurinterol to the aplysins. Tetrahedron, 57, (4), 791-804.
- Hay, C. H. (1990). The dispersal of sporophytes of Undaria pinnatifida by coastal shipping in New Zealand, and implications for further dispersal of Undaria in France. British Phycological Journal, 25(4), 301–313.
- Hay, M. E. (1996). Marine chemical ecology: what's known and what's next? Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 200(1-2), 103–134.
- Haynes, D., Ralph, P., Prange, J., & Dennison, B. (2000). The impact of the herbicideDiuron on photosynthesis in three species of tropical seagrass. MarinePollution Bulletin, 41(7-12), 288–293.

- Hellio, C., Lebret, K., & Thabard, M. (2009a). Algae as marine fouling organisms: adhesion damage and prevention. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 80–112). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Hellio, C., Maréchal, J.-P., da Gama, B. A. P., Pereira, R. C., & Clare, A. S. (2009b).
 Natural marine products with antifouling activities. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advanced drug delivery reviews (1st ed., pp. 572–622). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Hellio, C.; Tsoukatou, M.; Marechal, J.-P.; Aldred, N.; Beaupoil, C.; Clare, A. S.; Vagias, C.; Roussis, V. (2005). Inhibitory Effects of Mediterranean Sponge Extracts and Metabolites on Larval Settlement of the Barnacle Balanus amphitrite. Marine Biotechnology, 7, (4), 297-305.
- Hellio, C.; Simon-Colin, C.; Clare, A.; Deslandes, E. (2004). Isethionic Acid and Floridoside Isolated from the Red Alga, Grateloupia turuturu, Inhibit Settlement of Balanus amphitrite Cyprid Larvae. Biofouling, 20, (3), 139-145.
- Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufossé, L.; Le Gal, Y.; Bourgougnon, N. (2001). Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: potential use for environmentally friendly antifouling paints. Marine Environmental Research, 52, (3), 231-247.
- Henderson, P. (2010). Fouling and antifouling in other industries Power stations, desalination plants – Drinking water supplies and sensors. In *Biofouling* (pp. 288–305). Wiley-Blackwell.
- Higgins, M. J., Crawford, S. A., Mulvaney, P., & Wetherbee, R. (2002). Characterization of the adhesive mucilages secreted by live diatom cells using atomic force microscopy. *Protist*, 153(1), 25–38.
- Higgs, M. D.; John Faulkner, D., A diterpene from Laurencia obtusa. Phytochemistry 1982, 21, (3), 789-791.
- Holm, E. R. (2012). Barnacles and biofouling. *Integrative and Comparative Biology*, *52*(3), 348–55.
- Hori, F., & Matsumoto, S. (2010). Bacterial adhesion: From mechanism to control. Biochemical Engineering Journal, 48(3), 424–434.
- Huggett, M. J., Williamson, J. E., de Nys, R., Kjelleberg, S., & Steinberg, P. D. (2006).
 Larval settlement of the common Australian sea urchin *Heliocidaris erythrogramma* in response to bacteria from the surface of coralline algae.
 Oecologia, 149(4), 604–19.
- Hurlbut, C. J. (1993). The adaptive value of larval behavior of a colonial ascidian. Marine Biology, 115(2), 253–262.

- Hwang, G., Kang, S., El-Din, M. G., & Liu, Y. (2012). Impact of conditioning films on the initial adhesion of *Burkholderia cepacia*. Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces, 91, 181–8.
- Ianora, A., Bentley, M. G., Caldwell, G. S., Casotti, R., Cembella, A. D., Engström-Öst, J., Halsband, C., Sonnenschein, E. C., Legrand, C., Llewellyn, C. A., Paldavičienë, A., Pilkaityte, R., Pohnert, G., Razinkovas, A., Romano, G., Tillmann, U., & Vaiciute, D. (2011). The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: an emerging field. Marine Drugs, 9(9), 1625–48.
- Iliopoulou, D.; Mihopoulos, N.; Vagias, C.; Papazafiri, P.; Roussis, V. (2003). Novel Cytotoxic Brominated Diterpenes from the Red Alga Laurencia obtusa. The Journal of Organic Chemistry, 68, (20), 7667-7674.
- Iliopoulou, D.; Vagias, C.; Galanakis, D.; Argyropoulos, D.; Roussis, V. (2002). Brasilane-type sesquiterpenoids from Laurencia obtusa. Org. Lett., 4, (19), 3263-3266.
- Imre, S. A., Z. (1997). Secondary metabolites from the red alga Laurencia obtusa. Die Pharmazie, 52, (11), 883-885.
- Imre, S.; Islimyeli, S.; Öztunç, A.; Thomson, R. H. (1981). Obtusenol, a sesquiterpene from Laurencia obtusa. *Phytochemistry* 20, (4), 833-834.
- Irie, T.; Fukuzawa, A.; Izawa, M.; Kurosawa, E. (1969). Laurenisol, a new sesquiterpenoid containing bromine from Laurencia nipponica yamada. Tetrahedron Letters, 10, (17), 1343-1346.
- Irie, T.; Suzuki, T.; Yasunari, Y.; Kurosawa, E.; Masamune, T. (1969). Laurene, a sesquiterpene hydrocarbon from Laurencia species. Tetrahedron, 25, (2), 459-68.
- Ioannou, E.; Nappo, M.; Avila, C.; Vagias, C.; Roussis, V., (2009). Metabolites from the Sea Hare Aplysia fasciata. Journal of Natural Products 72, (9), 1716-1719.
- Ishii, T.; Nagamine, T.; Nguyen, B. C. Q.; Tawata, S. (2017). Insecticidal and Repellent Activities of Laurinterol from the Okinawan Red Alga Laurencia nidifica. Rec. Nat. Prod., 11, (1), 63-68.
- Joint, I., Tait, K., Callow, M. E., Callow, J. A., Milton, D. L., Williams, P., & Cámara, M. (2002). Cell-to-cell communication across the prokaryote-eukaryote boundary. Science (New York, N.Y.), 298(5596), 1207.
- Joint, I., Tait, K., & Wheeler, G. L. (2007). Cross-kingdom signalling: exploitation of bacterial quorum sensing molecules by the green seaweed Ulva. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 362(1483), 1223–33.

- Jones, G. (2009). The battle against marine biofouling: a historical review. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 17–45). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Kamino K. (2010). Molecular design of barnacle cement in comparison with those of mussel and tubeworm. J Adhes. 86:96–110.
- Kamino, K. (2013). Mini-review: barnacle adhesives and adhesion. Biofouling, 29(6), 735–49.
- Kazlauskas, R.; Murphy, P. T.; Quinn, R. J.; Wells, R. J. (1976). NEW LAURENE DERIVATIVES FROM LAURENCIA-FILIFORMIS. Aust. J. Chem., 29, (11), 2533-2539.
- Kienzler, A.; Tronchère, X.; Devaux, A.; Bony, S. (2012). Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. Toxicology in Vitro, 26, (3), 500-510.
- Kladi, M.; Xenaki, H.; Vagias, C.; Papazafiri, P.; Roussis, V. (2006). New cytotoxic sesquiterpenes from the red algae Laurencia obtusa and Laurencia microcladia. Tetrahedron, 62, (1), 182-189.
- Kobayashi, N., & Okamura, H. (2002). Effects of new antifouling compounds on the development of sea urchin. Marine Pollution Bulletin, 44(8), 748–751.
- Koehler, G., and C. Milstein. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibodies of predefined specificity. Nature 256:495–497
- Kokkotou, K.; Ioannou, E.; Nomikou, M.; Pitterl, F.; Vonaparti, A.; Siapi, E.; Zervou, M.;
 Roussis, V. (2014). An integrated approach using UHPLC–PDA–HRMS and
 2D HSQC NMR for the metabolic profiling of the red alga Laurencia:
 Dereplication and tracing of natural products. Phytochemistry, 108, 208-219.
- König, G. M.; Wright, A. D.; Sticher, O.; Angerhofer, C. K.; Pezzuto, J. M. (1994).
 Biological Activities of Selected Marine Natural Products. Planta Med, 60, (06), 532-537.
- Konstantinou, I. K., & Albanis, T. A. (2004). Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. Environment International, 30(2), 235–48.
- Kotsiri, M.; Protopapa, M.; Roumelioti, G.-M.; Economou-Amilli, A.; Efthimiadou, E. K.; Dedos, S. G. (2018a). Probing the settlement signals of Amphibalanus amphitrite. Biofouling, 34, (5), 492-506.
- Kotsiri, M.; Protopapa, M.; Mouratidis, S.; Zachariadis, M.; Vassilakos, D.; Kleidas, I.; Samiotaki, M.; Dedos, S. G. (2018b). Should I stay or should I go? The

settlement-inducing protein complex guides barnacle settlement decisions. The Journal of Experimental Biology, 221, (22), jeb185348.

- Knight-Jones, E. (1953). Laboratory experiments on gregariousness during setting in Balanus balanoides and other barnacles. J. Exp. Biol. 30, 584–598.
- Krone, R., Gutow, L., Joschko, T. J., & Schröder, A. (2013). Epifauna dynamics at an offshore foundation - Implications of future wind power farming in the North Sea. Marine Environmental Research, 85, 1–12.
- Kubanek, J.; Jensen, P. R.; Keifer, P. A.; Sullards, M. C.; Collins, D. O.; Fenical, W. (2003). Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences, 100, (12), 6916-6921.
- Kurata, K.; Taniguchi, K.; Agatsuma, Y.; Suzuki, M. (1998). Diterpenoid feedingdeterrents from Laurencia saitoi. Phytochemistry 47, (3), 363-369.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. Nature. 227, 680–685.
- Lagersson, N., & Høeg, J. T. (2002). Settlement behavior and antennulary biomechanics in cypris larvae of *Balanus amphitrite* (Crustacea: Thecostraca: Cirripedia). Marine Biology, 141(3), 513–526.
- Lang, K. L.; Silva, I. T.; Zimmermann, L. A.; Lhullier, C.; Manalich Arana, M. V.; Palermo, J. A.; Falkenberg, M.; Simoes, C. M.; Schenkel, E. P.; Duran, F. J., (2012). Cytotoxic activity of semi-synthetic derivatives of elatol and isoobtusol. Mar Drugs, 10, (10), 2254-64.
- Langhamer, O., Haikonen, K., & Sundberg, J. (2010). Wave power—Sustainable energy or environmentally costly? A review with special emphasis on linear wave energy converters. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 14(4), 1329–1335.
- Lau, S. C. K., Thiyagarajan, V., Cheung, S. C. K., & Qian, P.-Y. (2005). Roles of bacterial community composition in biofilms as a mediator for larval settlement of three marine invertebrates. Aquatic Microbial Ecology, 38, 41–51.
- Lau, S. C. K., Thiyagarajan, V., & Qian, P.-Y. (2003). The bioactivity of bacterial isolates in Hong Kong waters for the inhibition of barnacle (*Balanus amphitrite* Darwin) settlement. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 282(1-2), 43–60.
- Lau, S. C. K.; Qian, P. Ä. (2000). Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle Balanus amphitrite amphitrite darwin. Biofouling, 16, (1), 47-58.

- Le Pape, O., Guérault, D., & Désaunay, Y. (2004). Effect of an invasive mollusc, American slipper limpet *Crepidula fornicata*, on habitat suitability for juvenile common sole *Solea solea* in the Bay of Biscay. Marine Ecology Progress Series, 277, 107–115.
- Lee, A. K., & Newman, D. K. (2003). Microbial iron respiration: impacts on corrosion processes. Applied Microbiology and Biotechnology, 62(2-3), 134–9.
- Lee, J. S., Ray, R. I., Lemieux, E. J., Falster, A. U., & Little, B. J. (2004). An evaluation of carbon steel corrosion under stagnant seawater conditions. Biofouling, 20(4-5), 237–47.
- Lee, J.-W., Nam, J.-H., Kim, Y.-H., Lee, K.-H., & Lee, D.-H. (2008). Bacterial communities in the initial stage of marine biofilm formation on artificial surfaces. Journal of Microbiology (Seoul, Korea), 46(2), 174–82.
- Lee, L. E.; Clemons, J. H.; Bechtel, D. G.; Caldwell, S. J.; Han, K. B.; Pasitschniak-Arts, M.; Mosser, D. D.; Bols, N. C. (1993). Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. Cell biology and toxicology, 9, (3), 279-94.
- Lejars, M., Margaillan, A., & Bressy, C. (2012). Fouling release coatings: a nontoxic alternative to biocidal antifouling coatings. Chemical Reviews, 112(8), 4347–90.
- Levine, J. M., & Murrell, D. J. (2003). The community-level consequences of seed dispersal patterns. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 34(1), 549–574.
- Lewis, P. N., Hewitt, C. L., Riddle, M., & McMinn, A. (2003). Marine introductions in the Southern Ocean: an unrecognised hazard to biodiversity. Marine Pollution Bulletin, 46(2), 213–23.
- Li, C.-J., & Trost, B. M. (2008). Green chemistry for chemical synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(36), 13197–202.
- Liaqat, I., Bachmann, R. T., & Edyvean, R. G. J. (2014). Type 2 quorum sensing monitoring, inhibition and biofilm formation in marine microrganisms. Current Microbiology, 68(3), 342–51.
- Lowery, C. A., Dickerson, T. J., & Janda, K. D. (2008). Interspecies and interkingdom communication mediated by bacterial quorum sensing. Chemical Society Reviews, 37(7), 1337–46.
- Lowry O. H et al.(1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, J Biol Chem 193, 265–275

- Lucas, M. I.; Walker, G.; Holland, D. L.; Crisp, D. J. (1979). An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of Balanus balanoides (Crustacea: Cirripedia). Marine Biology, 55, (3), 221-229.
- Machado, F. L.; Duarte, H. M.; Gestinari, L. M.; Cassano, V.; Kaiser, C. R.; Soares, A.
 R. (2016). Geographic Distribution of Natural Products Produced by the Red
 Alga Laurencia dendroidea J. Agardh. Chemistry & biodiversity, 13, (7), 84551.
- McKey, D. (1979). The distribution of secondary compounds within plants. Herbivorestheir interaction with secondary plant metabolites, 55-134.
- Maggs, C. A., & Callow, M. E. (2003). Algal Spores. In eLS. John Wiley & Sons, Ltd.
- Manzo, E.; Ciavatta, M. L.; Gavagnin, M.; Puliti, R.; Mollo, E.; Guo, Y.-W.; Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Cimino, G. (2005). Structure and absolute stereochemistry of novel C15-halogenated acetogenins from the anaspidean mollusc Aplysia dactylomela. Tetrahedron, 61, (31), 7456-7460.
- Martin, J. T. (1942). The problem of the-evaluation of rotenone- containing plants. VI. The toxicity of 1-111iptone and of poisons applied jointly, with further observations on the rotenone equivalent method of assessing the toxicity of derris root. Annals of Applied Biology, 29, 69-81.
- Martin, J. T. (1940). The problem of the evaluation of rotenone- containing plants. V. The relative toxicities of different species of derris. Annals of Applied Biology, 27, 274-294.
- Matsumura, K.; Mori, S.; Nagano, M.; Fusetani, N. (1998a). Lentil lectin inhibits adult extract-induced settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. Journal of Experimental Zoology, 280, (3), 213-219.
- Matsumura, K., Nagano, M., Kato-yoshinaga, Y., Yamazaki, M., Clare, A. S., Fusetani, N., Matsumural, K., Naganol, M. & Kato-yoshinagal, Y(1998b). Immunological studies on the settlement- inducing protein complex (SIPC) of the barnacle Balanus amphitrite and its possible involvement in larva-larva interactions. R. Soc. 265, 1825–1830.
- Matsumura, K., Nagano, M. & Fusetani, N. (1998c) Purification of a Larval Settlement-Inducing Protein Complex (SIPC) of the Barnacle , Balanus amphitrite. J. Exp. Zool. 213–219.
- Mieszkin, S., Callow, M. E., & Callow, J. A. (2013). Interactions between microbial biofilms and marine fouling algae: a mini review. Biofouling, 29(9), 1097–113.
- Mieszkin, S., Martin-Tanchereau, P., Callow, M. E., & Callow, J. A. (2012). Effect of bacterial biofilms formed on fouling-release coatings from natural seawater and

Cobetia marina, on the adhesion of two marine algae. Biofouling, 28(9), 953–68.

- Minchin, D., & Gollasch, S. (2003). Fouling and ships' hulls: how changing circumstances and spawning events may result in the spread of exotic species. Biofouling, 19 Suppl(770172261), 111–22.
- Miron, G., Walters, L. J., Tremblay, R., & Bourget, E. (2000). Physiological condition and barnacle larval behavior: a preliminary look at the relationship between TAG/DNA ratio and larval substratum exploration in *Balanus amphitrite*. Marine Ecology Progress Series, *198*, 303–310
- Mishra, B. B.; Tiwari, V. K. (2011). Natural products: An evolving role in future drug discovery. European Journal of Medicinal Chemistry, 46, (10), 4769-4807.
- Molino, P. J., & Wetherbee, R. (2008). The biology of biofouling diatoms and their role in the development of microbial slimes. Biofouling, 24(5), 365–79.
- Moryl, M., Kaleta, A., Strzelecki, K., Różalska, S., & Różalski, A. (2014). Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. Acta Biochimica Polonica, 61(1), 133–9.
- Motulsky, H. (2014). Intuitive biostatistics a nonmathematical guide to statistical thinking. 3rd ed. ed.; Oxford University Press: New York.
- Murai, R., Sugimoto, A., Tanabe, S., & Takeuchi, I. (2008). Biomagnification profiles of tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPT) in Japanese coastal food webs elucidated by stable nitrogen isotope ratios. Chemosphere, 73(11), 1749–56.
- Murai, A., 1.12 (1999). Biosynthesis of Cyclic Bromoethers from Red Algae. In Comprehensive Natural Products Chemistry, Barton, S. D.; Nakanishi, K.; Meth-Cohn, O., Eds. Pergamon: Oxford, pp 303-324
- Natrah, F. M. I., Bossier, P., Sorgeloos, P., Yusoff, F. M., & Defoirdt, T. (2014). Significance of microalgal-bacterial interactions for aquaculture. *Reviews in* Aquaculture, 6(1), 48–61.
- Nell, J. A., & Chvojka, R. (1992). The effect of bis-tributyltin oxide (TBTO) and copper on the growth of juvenile Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley) and Pacific oysters *Crassostrea gigas* Thunberg. Science of The Total Environment, 125, 193–201.
- Nocchi, N.; Soares, A. R.; Souto, M. L.; Fernández, J. J.; Martin, M. N.; Pereira, R. C. (2017). Detection of a chemical cue from the host seaweed Laurencia dendroidea by the associated mollusc Aplysia brasiliana. PLOS ONE, 12, (11), e0187126.

- Noël, P. Y., Tardy, E., & d'Udekem d'Acoz, C. (1997). Will the crab *Hemigrapsus* penicillatus invade the coasts of Europe? Comptes Rendus de l'Académie Des Sciences - Series III - Sciences de La Vie, 320(9), 741–745.
- O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F., Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. European Journal of Biochemistry 2000, 267, (17), 5421-5426.
- Oguri, Y.; Watanabe, M.; Ishikawa, T.; Kamada, T.; Vairappan, C.; Matsuura, H.; Kaneko, K.; Ishii, T.; Suzuki, M.; Yoshimura, E.; Nogata, Y.; Okino, T. (2017). New Marine Antifouling Compounds from the Red Alga Laurencia sp. *Marine Drugs*, 15, (9), 267.
- Okamura, H. (2000). Fate and ecotoxicity of the new antifouling compound Irgarol 1051 in the aquatic environment. Water Research, 34(14), 3523–3530.
- Okano K, Shimizu K, Satuito C G, Fusetani N (1998). Enzymatic isolation and culture of cement secreting cells from cypris larvae of the barnacle Megabalanus rosa. Biofouling 12: 149-159
- Okano K, Shimizu K, Satuito C G, Fusetani N (1996). Visualization of cement exocytosis in the cypris cement gland of the barnacle Megabalanus rosa. J Exp Biol 199: 2131-2137
- Okoro, H. K., Fatoki, O. S., Adekola, F. A., Ximba, B. J., Snyman, R. G., & Opeolu, B. (2011). Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 213. (D. M. Whitacre, Ed.) (Vol. 213, pp. 27–54). New York, NY: Springer New York.
- Ola, A. R. B.; Babey, A.-M.; Motti, C.; Bowden, B. F., Aplysiols CE, (2010) Brominated Triterpene Polyethers from the Marine Alga Chondria armata and a Revision of the Structure of Aplysiol B. *Aust. J. Chem.*, 63, (6), 907-914.
- Öztunç, A.; Imre, S.; Lotter, H.; Wagner, H. (1991). Two C15 bromoallenes from the red alga Laurencia obtusa. Phytochemistry, 30, (1), 255-257.
- Paradas, W. C., & Amado Filho, G. M. (2007). Are metals of antifouling paints transferred to marine biota? Brazilian Journal of Oceanography, *55*(1), 51–56.
- Paul, N. A.; Nys, R. d.; Steinberg, P. D. (2006). Chemical defence against bacteria in the red alga Asparagopsis armata: linking structure with function. Marine Ecology Progress Series, 306, 87-101.
- Pereira, R. B.; Andrade, P. B.; Valentão, P. (2016). Chemical Diversity and Biological Properties of Secondary Metabolites from Sea Hares of Aplysia Genus. Marine Drugs, 14, (2), 39.
- Pereira, M., & Ankjaergaard, C. (2009). Legislation affecting antifouling products. InC.Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 240–260). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.

- Petraki, A.; Ioannou, E.; Papazafiri, P.; Roussis, V.(2015). Dactylomelane Diterpenes from the Sea Hare Aplysia depilans. Journal of Natural Products, 78, (3), 462-467.
- Petrone, L., Easingwood, R., Barker, M. F., & McQuillan, A. J. (2011). In situ ATR-IR spectroscopic and electron microscopic analyses of settlement secretions of Undaria pinnatifida kelp spores. Journal of the Royal Society, Interface, 8(56), 410–22.
- Phang, I. Y.; Chaw, K. C.; Choo, S. S. H.; Kang, R. K. C.; Lee, S. S. C.; Birch, W. R.; Teo, S. L. M.; Vancso, G. J. (2009). Marine biofouling field tests, settlement assay and footprint micromorphology of cyprid larvae of Balanus amphitrite on model surfaces. Biofouling, 25, (2), 139-147.
- Piazza, V.; Roussis, V.; Garaventa, F.; Greco, G.; Smyrniotopoulos, V.; Vagias, C.;
 Faimali, M. (2011). Terpenes from the Red Alga Sphaerococcus coronopifolius
 Inhibit the Settlement of Barnacles. Marine Biotechnology, 13, (4), 764-772.
- Pinori E, Berglin M, Brive LM, Hulander M, Dahlström M, Elwing H. (2011). Multiseasonal barnacle (Balanus improvi- sus) protection achieved by trace amounts of a macrocyclic lactone (ivermectin) included in rosin-based coatings. Bio- fouling. 27:941–953.
- Piola, R. F., & Johnston, E. L. (2007). Pollution reduces native diversity and increases invader dominance in marine hard-substrate communities. Diversity and Distributions, 14(2), 329–342.
- Ponasik, J. A., Conova, S., Kinghorn, D., Kinney, W. A., Rittschof, D., & Ganem, B. (1998). Pseudoceratidine, a marine natural product with antifouling activity: synthetic and biological studies. Tetrahedron, 54(25), 6977–6986.
- Poulsen, N., Kröger, N., Harrington, M. J., Brunner, E., Paasch, S., & Buhmann, M. T. (2014). Isolation and biochemical characterization of underwater adhesives from diatoms. Biofouling, 30(4), 513–23.
- Qian, P.-Y.; Li, Z.; Xu, Y.; Li, Y.; Fusetani, N. (2015). Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. Biofouling, 31, (1), 101-122.
- Qian, P.-Y.; Chen, L.; Xu, Y. (2013). Mini-review: Molecular mechanisms of antifouling compounds. Biofouling, 29, (4), 381-400.
- Qian, P.-Y., Wong, Y. H., & Zhang, Y. (2010a). Changes in the proteome and phosphoproteome expression in the bryozoan *Bugula neritina* larvae in response to the antifouling agent butenolide. Proteomics, 10(19), 3435–46.
- Qian, P.-Y., Xu, Y., & Fusetani, N. (2010b). Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. Biofouling, 26(2), 223–34.

- Qian, P.-Y.; Xu, Y.; Fusetani, N., Natural products as antifouling compounds: recent progress and future perspectives. Biofouling 2009, 26, (2), 223-234.
- Qian, P.-Y., Thiyagarajan, V., Lau, S. C. K., & Cheung, S. C. K. (2003). Relationship between bacterial community profile in biofilm and attachment of the acorn barnacle *Balanus amphitrite*. Aquatic Microbial Ecology, 33, 225–237.
- Raimondi, P. T. (1988). Settlement Cues and Determination of the Vertical Limit of an Intertidal Barnacle. Ecol. Soc. 69, 400–407.
- Ralston, E., & Swain, G. W. (2009). Bioinspiration The solution for biofouling control? Bioinspiration & Biomimetics, 4(1), 015007.
- Raveendran, T. V, & Limna Mol, V. P. (2009). Natural product antifoulants. Current Science, 97(4), 508–520.
- Readman, J. W. (2006). Development, occurrence and regulation of antifouling paint biocides: historical review and future trends. In I. Konstantinou (Ed.), Antifouling Paint Biocides (Vol. 50, pp. 1–15). Springer Berlin Heidelberg.
- Reis, V. M.; Oliveira, L. S.; Passos, R. M. F.; Viana, N. B.; Mermelstein, C.; Sant'Anna,
 C.; Pereira, R. C.; Paradas, W. C.; Thompson, F. L.; Amado-Filho, G. M.;
 Salgado, L. T. (2013). Traffic of Secondary Metabolites to Cell Surface in the
 Red Alga Laurencia dendroidea Depends on a Two-Step Transport by the
 Cytoskeleton. PLOS ONE, 8, (5), e63929.
- Ren, D.; Sims, J. J.; Wood, T. K. (2002). Inhibition of biofilm formation and swarming of Bacillus subtilis by (5Z)-4-bromo-5-(bromomethylene)-3-butyl-2(5H)-furanone. Letters in Applied Microbiology, 34, (4), 293-299.
- Repetto, G.; del Peso, A.; Zurita, J. L. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. Nature Protocols, 3, 1125.
- Rittschof, D.; Lai, C.-H.; Kok, L.-M.; Teo, S. L.-M. (2003). Pharmaceuticals as antifoulants: Concept and principles. Biofouling, 19, (sup1), 207-212.
- Rittschof, D.; Branscomb, E. S.; Costlow, J. D. (1984). Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacles, Balanus amphitrite Darwin. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 82, (2), 131-146.
- Rittschof, D.; Clare, A. S.; Gerhart, D. J.; Mary, S. A.; Bonaventura, J. (1992). Barnacle in vitro assays for biologically active substances: Toxicity and Settlement inhibition assays using mass cultured Balanus amphitrite amphitrite darwin. Biofouling, 6, (2), 115-122.
- Rochfort, S.; Capon, R. (1996). Parguerenes Revisited: New Brominated Diterpenes From the Southern Australian Marine Red Alga <I>Laurencia Filiformis</I>. Aust. J. Chem., 49, (1), 19-26.

- Rodrigues, D.; Alves, C.; Horta, A.; Pinteus, S.; Silva, J.; Culioli, G.; Thomas, O. P.; Pedrosa, R. (2015). Antitumor and antimicrobial potential of bromoditerpenes isolated from the red alga, Sphaerococcus coronopifolius. Mar Drugs, 13, (2), 713-26.
- Rogers, C. N.; Steinberg, P. D.; de Nys, R. (1995). Factors associated with oligophagy in two species of sea hares (Mollusca: Anaspidea). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 192, (1), 47-73.
- Rosa, S. d.; Stefano, S. d.; Scarpelli, P.; Zavodnik, N. (1988). Terpenes from the red alga Sphaerococcus coronopifolius of the north Adriatic Sea. *Phytochemistry*, 27, (6), 1875-1878.
- Rousseau, F.; Gey, D.; Kurihara, A.; A. Maggs, C.; Martin-Lescanne, J.; Payri, C.; De Reviers, B.; R. Sherwood, A.; Gall, L. (2017). Molecular phylogenies support taxonomic revision of three species of Laurencia (Rhodomelaceae, Rhodophyta), with the description of a new genus.; Vol. 2017.
- Salgado, L. T.; Viana, N. B.; Andrade, L. R.; Leal, R. N.; da Gama, B. A. P.; Attias, M.; Pereira, R. C.; Amado Filho, G. M. (2008). Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga Laurencia obtusa. Journal of Structural Biology, 162, (2), 345-355.
- Salta, M., Wharton, J. A., Blache, Y., Stokes, K. R., & Briand, J.-F. (2013). Marine biofilms on artificial surfaces: structure and dynamics. Environmental Microbiology.
- Satuito C G, Shimizu K, Natoyama K, Yamazaki M, Fusetani N (1996). Age-related settlement success by cyprids of the barnacle Balanus amphitrite, with special reference to consumption of cyprid storage protein. Mar Biol 127: 125-13
- Schmitz, F. J.; Michaud, D. P.; Schmidt, P. G. (1982). Marine natural products: parguerol, deoxyparguerol, and isoparguerol. New brominated diterpenes with modified pimarane skeletons from the sea hare Aplysia dactylomela. Journal of the American Chemical Society, 104, (23), 6415-6423.
- Schoenwaelder, M. E. A. (2002) The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. Vol. 41, p 125-139.
- Schultz, M. P. (2007). Effects of coating roughness and biofouling on ship resistance and powering. Biofouling, 23(5-6), 331–41.
- Schultz, M. P., Bendick, J. A., Holm, E. R., & Hertel, W. M. (2011). Economic impact of biofouling on a naval surface ship. Biofouling, 27(1), 87–98.
- Shanks, Alan (2001). An identification guide to the larval marine invertebrates of the pacific northwest, Arthropoda cirripedia barnacles p.155-161.

- Sims J.J., Lin G.H.Y., Wing R.M.(1974). Marine Natural Products X: Elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga Laurencia elata. Tetrahedron Lett., 39, 3487-3490.
- Smyrniotopoulos, V.; Vagias, C.; Bruyère, C.; Lamoral-Theys, D.; Kiss, R.; Roussis, V. (2010). Structure and in vitro antitumor activity evaluation of brominated diterpenes from the red alga Sphaerococcus coronopifolius. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 18, (3), 1321-1330.
- Stallard, M. O. (1978). Fenical, W.; Kittredge, J. S., The brasilenols, rearranged sesquiterpene alcohols isolated from the marine opisthobranch *Aplysia Brasiliana*. Tetrahedron, 34, (14), 2077-2081.
- Steinberg, P. D.; De Nys, R. (2002). Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. Journal of Phycology, 38, (4), 621-629.
- Sudatti, D. B.; Rodrigues, S. V.; Coutinho, R.; Da Gama, B. A. P.; Salgado, L. T.; Amado Filho, G. M.; Pereira, R. C. (2008). Transport and defensive role of elatol at the surface of the red seaweed Laurencia obtuse (Ceramiales, Rhodophyta). Journal of Phycology, 44, (3), 584-591.
- Sun, J.; Shi, D.; Ma, M.; Li, S.; Wang, S.; Han, L.; Yang, Y.; Fan, X.; Shi, J.; He, L. (2005). Sesquiterpenes from the Red Alga Laurencia tristicha. Journal of Natural Products, 68, (6), 915-919.
- Sutour, S.; Esselin, H.; Bighelli, A.; Casanova, J.; Le Gall, L.; Tomi, F. (2017) Discrimination and Characterization of Two Mediterranean Species from the Laurencia Complex (Rhodomelacea) Using an NMR-Based Metabolomic Approach. Chemistry & biodiversity, 14, (11), e1700226.
- Suzuki, M.; Kurosawa, E. (1979). Halogenated Sesquiterpene Phenols and Ethers from the Red Alga Laurencia glandulifera Kützing. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 52, (11), 3349-3351.
- Swain, G. W., Herpe, S., Ralston, E., & Tribou, M. (2006). Short-term testing of antifouling surfaces: the importance of colour. Biofouling, 22(5-6), 425–9.
- Takahashi, Y.; Daitoh, M.; Suzuki, M.; Abe, T.; Masuda, M. (2002). Halogenated Metabolites from the New Okinawan Red Alga Laurencia yonaguniensis. Journal of Natural Products, 65, (3), 395-398.
- Thiyagarajan, V.; Harder, T.; Qian, P.-Y. (2002) Effect of the physiological condition of cyprids and laboratory-mimicked seasonal conditions on the metamorphic successes of Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 274, (1), 65-74.
- Thomas K.V. and Brooks S. (2010). The environmental fate and effects of antifouling paint biocides. Biofouling Vol. 26, No. 1, 73–88

- Thomas, K. V. (2009). The use of broad-spectrum organic biocides in marine antifouling paint. In C. Hellio & D. M. Yebra (Eds.), Advances in marine antifouling coatings and technologies (1st ed., pp. 522–553). Cambridge, UK: Woodhead Publishing.
- Thomas, K. V, McHugh, M., Hilton, M., & Waldock, M. J. (2003). Increased persistence of antifouling paint biocides when associated with paint particles. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 123(1), 153–61.
- Thomas, K. V, McHugh, M., & Waldock, M. J. (2002). Antifouling paint booster biocides in UK coastal waters: inputs, occurrence and environmental fate. *The Science of the Total Environment*, 293(1-3), 117–27.
- Tolhurst, L. E., Barry, J., Dyer, R. A., & Thomas, K. V. (2007). The effect of resuspending sediment contaminated with antifouling paint particles containing Irgarol 1051 on the marine macrophyte *Ulva intestinalis*. Chemosphere, 68(8), 1519–24.
- Tsukamoto, S.; Yamashita, Y.; Ohta, T. (2005). New cytotoxic and antibacterial compounds isolated from the sea hare, Aplysia kurodai. Marine Drugs, 3, (2), 22-28.
- Umezawa, T.; Oguri, Y.; Matsuura, H.; Yamazaki, S.; Suzuki, M.; Yoshimura, E.;
 Furuta, T.; Nogata, Y.; Serisawa, Y.; Matsuyama-Serisawa, K.; Abe, T.;
 Matsuda, F.; Suzuki, M.; Okino, T. (2014). Omaezallene from Red Alga
 Laurencia sp.: Structure Elucidation, Total Synthesis, and Antifouling Activity.
 Angewandte Chemie, 126, (15), 3990-3993.
- Umezawa, T.; Oguri, Y.; Matsuura, H.; Yamazaki, S.; Suzuki, M.; Yoshimura, E.;
 Furuta, T.; Nogata, Y.; Serisawa, Y.; Matsuyama-Serisawa, K.; Abe, T.;
 Matsuda, F.; Suzuki, M.; Okino, T. (2014). Omaezallene from Red Alga
 Laurencia sp.: Structure Elucidation, Total Synthesis, and Antifouling Activity.
 Angewandte Chemie International Edition, 53, (15), 3909-3912.
- Underwood, G. J. C. (2005). Microalgal microphytobenthic biofilms in shallow coastal waters: How important are species? Proceedings of the California Academy of Sciences, 56(1-17), 162–169.
- Vairappan, C. S., Zanil, I.I. & Kamada, T. (2014). Structural diversity and geographical distribution of halogenated secondary metabolites in red algae, Laurencia nangii Masuda (Rhodomelaceae, Ceramiales), in the coastal waters of North Borneo Island. J Appl Phycol., 26, (2), 1189-1198.
- Vairappan C.S., Anangdan S.P., Matsunaga S. (2009). Diet-derived halogenated metabolite from the sea hare Aplysia parvula. Malays J.Sci., 28, 269-273.
- Vairappan, C. S.; Kawamoto, T.; Miwa, H.; Suzuki, M. (2004). Potent Antibacterial Activity of Halogenated Compounds against Antibiotic-Resistant Bacteria. Planta Med, 70, (11), 1087-1090.
- Vairappan C.S. (2003) Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae Laurencia majuscula (Rhodomelaceae, Ceramiales).
 Biomol. Eng., 20, 255-259.
- Vairappan, C. S.; Daitoh, M.; Suzuki, M.; Abe, T.; Masuda, M.(2001). Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian Laurencia species. Phytochemistry, 58, (2), 291-297.
- Van Dolah, F. M. (2000). Marine algal toxins: origins, health effects, and their increased occurrence. Environmental Health Perspectives, 108 Suppl, 133–41.
- Vanhaecke, P.; Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P. (1981). Proposal for a shortterm toxicity test with Artemia nauplii. Ecotoxicology and environmental safety, 5, (3), 382-7.
- Van Loosdrecht, M. C. M., Lyklema, J., Norde, W., & Zehnder, A. J. (1990). Influence of interfaces on microbial activity. Microbiological Reviews, 54(1), 75–87.
- Vázquez-Sánchez, D., Cabo, M. L., Ibusquiza, P. S., & Rodríguez-Herrera, J. J. (2014). Biofilm-forming ability and resistance to industrial disinfectants of *Staphylococcus aureus* isolated from fishery products. Food Control, 39, 8–16.
- Veiga-Santos P., Pelizzaro-Rocha K.J., Santos A.O., Ueda-Nakamura T., Dias Filho
 B.P., Silva S.O., Sudatti D.B., Bianco E.M., Pereira R.C., Nakamura C.V.
 (2010). In vitro anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed
 Laurencia dendroidea. Parasitology, 137, 1661-1670
- Vreeland, V., Waite, J. H., & Epstein, L. (1998). Minireview Polyphenols and oxidases in substratum adhesion by marine algae and mussels. Journal of Phycology, 34(1), 1–8.
- Walker G (1995). Larval settlement: historical and future perspectives. In: Schram F R, Hoeg, J T (eds) New Frontiers in Barnacle Evolution. A A Balkema, Rotterdam, pp 69-85.
- Walker, G. & Yule, A. B. (1984). The temporary adhesion of barnacle cyprids: effects of some differing surface characteristics. J. Mar. Biol. Ass. UK64, 429–439.
- Walker G. (1971). A study of the cement apparatus of the cypris larva of the barnacle, Balanus balanoides. Mar Biol 9: 205
- Wang, B.-G.; Gloer, J. B.; Ji, N.-Y.; Zhao, J.-C. (2013). Halogenated Organic Molecules of Rhodomelaceae Origin: Chemistry and Biology. Chemical Reviews, 113, (5), 3632-3685.

- Wessels, M.; Konig, G.M.; Wright, A.D. (2000). New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare Aplysia dactylomela from Tenerife. J. Nat. Prod., 63, 920–928.
- Wethey, D. S. (1986). Ranking of settlement cues by barnacle larvae: influence of surface contour. Bull. mar. Sci. 39: 393-400
- Whelan, A., & Regan, F. (2006). Antifouling strategies for marine and riverine sensors. Journal of Environmental Monitoring, 8(9), 880–6.
- Willis, A., Eason-Hubbard, M., Hodson, O. M., Maheswari, U., Bowler, C., & Wetherbee, R. (2014). Adhesion molecules from the diatom *Phaeodactylum*
- Wright, A. D.; Goclik, E.; König, G. M. (2003). Three New Sesquiterpenes from the Red Alga Laurencia perforata. Journal of Natural Products, 66, (3), 435-437.
- Wohlgemuth, R. (2009). The locks and keys to industrial biotechnology. *New* Biotechnology, 25(4), 204–13.
- Xue, M.; Liu, Y.; Lyu, R.; Ge, N.; Liu, M.; Ma, Y.; Liang, H. (2017). Protective effect of aplysin on liver tissue and the gut microbiota in alcohol-fed rats. PLOS ONE, 12, (6), e0178684.
- Yamamura, S.; Hirata, Y. (1963). Structures of aplysin and aplysinol, naturally occurring bromo-compounds. Tetrahedron, 19, (10), 1485-1496.
- Yang, X. X.; Su, Y. Z.; Tan, J.; Cai, C. E.; He, P. M.; Jia, R. (2018). A new dimeric sesquiterpene and other related derivatives from the marine red alga Laurencia okamurai. Biochem. Syst. Ecol., 79, 57-59.
- Yang, J.-L., Li, X., Liang, X., Bao, W.-Y., Shen, H.-D., & Li, J.-L. (2014). Effects of natural biofilms on settlement of plantigrades of the mussel *Mytilus coruscus*. *Aquaculture*, 424-425, 228–233.
- Yebra, D. M., Kiil, S., & Dam-Johansen, K. (2004). Antifouling technology past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings*, *50*(2), 75–104.
- Yebra, D. M., Kiil, S., Dam-Johansen, K., & Weinell, C. E. (2005). Reaction rate estimation of controlled-release antifouling paint binders: Rosin-rased systems. *Progress in Organic Coatings*, 53(4), 256–275.
- Young, D. N.; Howard, B. M.; Fenical, W. (1980). Sucellular localization of brominated secondary metabolites in the red alga Laurencia snyderae. Journal of Phycology, 16, (2), 182-185.
- Yu, X., Yan, Y., & Gu, J.-D. (2007). Attachment of the biofouling bryozoan *Bugula neritina* larvae affected by inorganic and organic chemical cues. International Biodeterioration & Biodegradation, 60(2), 81–89.

- Yule, A. B. & Walker, G. (1985). Settlement of Balanus Balanoides: The Effect of Cyprid Antennular Secretion. J. mar. biol. Ass. U.K. 65, 707–712.
- Zapata, M., Silva, F., Luza, Y., Wilkens, M., & Riquelme, C. E. (2007). The inhibitory effect of biofilms produced by wild bacterial isolates to the larval settlement of the fouling ascidia *Ciona intestinalis* and *Pyura praeputialis*. Electronic Journal of Biotechnology, 10(1), 117–126.
- Zhang, T.-T., Zheng, C.-Y., Hu, W., Xu, W.-W., & Wang, H.-F. (2009). The allelopathy and allelopathic mechanism of phenolic acids on toxic *Microcystis aeruginosa*. Journal of Applied Phycology, *22*(1), 71–77.
- Zimmer, R. K., Fingerut, J. T., & Zimmer, C. A. (2009). Dispersal pathways, seed rains, and the dynamics of larval behavior. *Ecology*, *90*(7), 1933–47.
- Zobell, C. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J Mar Res., 4, 42–75.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Α. ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	
10x PBS Buffer	Για 1 L, προσθήκη 80 gr NaCl, 2gr KCl, 14,4 gr Na ₂ HPO ₄ , 2,4gr KH ₂ PO ₄ σε περίπου 800 ml ddH ₂ O. Ανάδευση και προσθήκη HCl 1 M (ή NaOH αν pH<7) μέχρι pH 7,4. Έπειτα, προσθήκη ddH ₂ O μέχρι το 1 lt. Αποστείρωση.
10x TBS Buffer	Για 1 L, προσθήκη 80 g NaCl, 2 gr KCl, 30 g Tris base σε περίπου 800 ml ddH ₂ O. Ανάδευση και προσθήκη HCl 1M (ή NaOH αν pH<7)μέχρι pH 7,4. Έπειτα, προσθήκη ddH ₂ O μέχρι το 1 L Αποστείρωση.
PBS (1x)-Tween 0.05% & 0.1%	Για 500 ml PBS 1x προσθήκη 50 ml PBS 10X σε 450 ml ddH ₂ O. Προσθήκη 250 μ l ή 500 μ l Tween σε PBS 1X για παρασκευή 500 ml PBS- Tween 0.05% και 0.1% αντίστοιχα. Ανάδευση.
TBS (1x)-Tween 0.1%	Για 500 ml TBS 1x προσθήκη 50 ml TBS 10X σε 450 ml ddH ₂ O. Προσθήκη 250 μ l ή 500 μ l Tween σε TBS 1X για παρασκευή 500 ml TBS- Tween 0.05% και 0.1% αντίστοιχα. Ανάδευση.
SDS (Sodium dodecyl sulfate) 10%	Για 100 ml προσθήκη 10 gr SDS σε 100 ml ddH₂O. Ανάδευση. Φιλτράρισμα με σύριγγα.
Methanol 20%	Για 100 ml προσθήκη 20 ml Μεθανόλης σε 80 ml ddH₂O. Ανάδευση.
0.5M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) pH 8	Για 100 ml προσθήκη 18,61 gr EDTA σε 80 ml ddH ₂ O. Πεχαμέτρηση, προσθέτοντας NaOH μέχρι pH 8.0. Προσθήκη ddH ₂ O μέχρι τα 100 ml. Φιλτράρισμα με σύριγγα.

1M Tris/HCl pH 7.6	Για 250 ml, προσθήκη 30,275 gr Tris σε 100 ml ddH ₂ O.			
	Ανάδευση. Προσθήκη HCl 1 Μ (περίπου 15 ml) μέχρι			
	pH 7,6. Προσθήκη ddH₂Ο μέχρι 250 ml.			
1M NaCl	Για 5 ml προσθήκη 0,2922 gr NaCl σε 5 ml ddH ₂ O.			
	Ανάδευση. (1 mol NaCl → 58,44 gr)			

 Για παρασκευή 30 ml RIPA, προσθήκη 300 μl Triton

 100%, 1500 μl 1M Tris pH 7,6, 4,5 ml 1 M NaCl, 120 μl

 RIPA (Lysis and Extraction Buffer)

 and Extraction Buffer)

 ανάδευση και προσθήκη ddH₂O

 μέχρι τα 30 ml.

 Φυλάσσεται στους 4 °C.

 BSA (Bovine
 Serum
 Για 50 ml, προσθήκη 2,5 gr BSA σε περίπου 40 ml PBS

 Albumin) 5% σε PBS (ή
 (ή TBS)-Tween 0.1%. Ελαφρά ανάδευση και προσθήκη

 TBS)-Tween 0.1%
 Τween 20 μέχρι τα 50 ml. Φυλάσσεται στους -20 °C.

Blocking buffer Gelatin 3% σε PBS 1x buffer ^Για 20 ml προσθήκη 0,6 gr gelatin σε 20 ml PBS 1X. Επώαση στους 60 °C για περίπου 45 λεπτά, με ενδιάμεσες αναδεύσεις.

 Coating
 buffer
 Για 10 ml, προσθήκη 10 μl πεπτιδίου SIPC 0,01 mg/ml

 0.01μg/ml
 πεπτίδιο
 (10 μg/ml) σε 9,990 μl PBS 1X. Φυλάσσεται στους

 SIPC σε PBS 1x buffer
 20°C.

Cia 100 ml 2 M H2SO4 προσθήκη 10,661 ml 18 M H2SO42M & 0.1M H2SO4Cia 88,339 ml ddH2O. Για 100ml 0,1 MH2SO4 προσθήκη5 ml από 2 M H2SO4 σε 95 ml ddH2O.

Acrylamide gel 8%	Για 10 ml (1 gel) προσθήκη 4,65 ml ddH ₂ O, 2,65 ml acrylamide mix 30%, 2,5 ml 1,5 M Tris (pH 8,8), 100 μl SDS 10%, 100 μl APS (ammonium persulfate) 10%, και 6 μl TEMED.
Stacking gel	Για 3 ml (1 gel) προσθήκη 2,05 ddH ₂ O, 0,5 ml acrylamide mix 30%, 375 μl 1,0M Tris (pH 6,8), 30 μl SDS 10%, 30 μl APS, και 3 μl TEMED.
Running buffer	Για 1 L προσθήκη 14 gr Glycine, 3 gr Tris και 10 ml SDS 10% σε 990 ml ddH₂O. Ανάδευση.
Transfer buffer	Για 500 ml προσθήκη 7 gr Glycine, 1,5 gr Tris και 100 ml Methanol 20% σε 400 ml ddH₂O. Ανάδευση.
Sample buffer (Laemmli buffer 4x)	Για 10 ml προσθήκη 4 ml glycerol 100%, 2,4 ml 1Μ Tris/HCl pH 6,8, 0,8 gr SDS, 4 mg μπλε βρωμοφαινόλης σε 3,1ml ddH ₂ O. Ανάδευση. Φυλάσσεται στους -20 °C.
1M DTT (Dithiothreitol)	Για 10 ml προσθήκη 1,54 gr DTT σε 10 ml ddH ₂ O. Ανάδευση. Φιλτράρισμα με σύριγγα. Φυλάσσεται στους -20 °C σε aliquots.

Β. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

1. TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine)

- Παρασκευή stock solution με προσθήκη 10 mg σκόνης TMB σε 1 ml DMSO (Dimethyl sulfoxide). Ελαφρά ανάδευση. Φυλάσσεται στους 4°C.
- ii. Παρασκευή 200 ml ρυθμιστικού διαλύματος (working solution) Citrate/Acetate pH 6,0. Αρχικά, γίνεται προσθήκη 1,3608 gr οξικού νατρίου (Sodium Acetate) σε 100 ml ddH₂O και στη συνέχεια, ανάδευση, για την παρασκευή διαλύματος οξικού νατρίου 0,1 Μ. Έπειτα, γίνεται παρασκευή διαλύματος κιτρικού οξέος 0,1 M (100 ml) με προσθήκη 2,1015 gr κιτρικού οξέος σε 100ml ddH₂O και ανάδευση. Έγινε πεχαμέτρηση των 100 ml του διαλύματος οξικού νατρίου 0,1 M με ταυτόχρονη προσθήκη σταγόνων κιτρικού οξέος 0,1 M μέχρι pH 6,0. Τέλος, γίνεται προσθήκη ddH₂O μέχρι τα 200 ml. Το ρυθμιστικό διάλυμα φυλάσσεται στους -20°C.
- Την ημέρα εκτέλεσης του πειράματος γίνεται αραίωση 1:100 του stock solution στο ρυθμιστικό διάλυμα. Για 10 ml τελικού διαλύματος TMB, γίνεται προσθήκη 100 μl stock solution σε 9,900 μl ρυθμιστικού. Λίγο πριν την προσθήκη του TMB στο πείραμα, γίνεται προσθήκη 2-4 μl H₂O₂ στα 10 ml του τελικού διαλύματος TMB.

2. Substrate solution Western

Για 2 ml, παρασκευάζεται 1800 μl ddH₂O + 100 μl αντιδραστηρίου A + 100 μl αντιδραστηρίου B.

Γ. Western Blot

- Παρασκευή gel ακρυλαμίδης 8% και stacking gel. Προσθήκη του TEMED στο τέλος, λίγο πριν την εισαγωγή των gel στη συσκευή.
- Τοποθέτηση gel 8% ανάμεσα στις πλάκες ηλεκτροφόρησης, αφήνοντας χώρο για το stacking gel.
- 3. Προσθήκη 0,5-1 ml ισοπροπανόλης, για την απομάκρυνση τυχόν φυσαλίδων.
- Αφού πήξει το gel, γίνεται αφαίρεση της ισοπροπανόλης και προσθήκη του stacking gel. Τοποθέτηση χτενιού πάνω στο stacking για να δημιουργηθούν οι θέσεις τοποθέτησης των δειγμάτων.
- 5. Προετοιμασία δειγμάτων με τον εξής τρόπο: 40 μΙ δείγματος + 10 μΙ Sample buffer (4x) + 10 μΙ DTT. Ανάλογα με τη ποσότητα δείγματος που χρησιμοποιείται, διαμορφώνεται κατάλληλα και η ποσότητα sample buffer και DTT που θα προστεθεί.
- Αφού πήξει το stacking, γίνεται αφαίρεση του χτενιού. Τοποθέτηση πλακών στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Προσθήκη ποσότητας Running buffer που εξαρτάται από τον αριθμό των gels.
- 7. Εισαγωγή δειγμάτων στις θέσεις που δημιουργήθηκαν από το χτένι. Προσθήκη δείγματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (4 μl), αρνητικού κοντρόλ (C-, RIPA + sample buffer + DTT) και θετικού κοντρόλ (C+, δείγμα από κύτταρα + sample buffer + DTT). Εφαρμογή τάσης 130 Volt για περίπου 90 λεπτά.
- 8. Όταν τελειώσει η ηλεκτροφόρηση, γίνεται αφαίρεση του gel από τις πλάκες.
- 9. Σε κατάλληλη συσκευή semi-dry transfer, γίνεται τοποθέτηση με την εξής σειρά: δύο διαβρεγμένα με transfer buffer φύλλα Whatman, μία μεμβράνη νιτροκυττάρινης, το gel, άλλα δύο διαβρεγμένα με transfer buffer φύλλα Whatman. Για ένα gel γίνεται εφαρμογή τάσης 90mA, ενώ για δύο gels 180mA για περίπου 90 λεπτά.
- 10. Ξέπλυμα τρεις φορές για 5 λεπτά κάθε φορά με TBS-Tween 0,1%.
- Επώαση σε blocking buffer (BSA 5% TBS-Tween 0,1%) στους 4°C, για ένα βράδυ.
- Αφαίρεση blocking, προσθήκη 1^{ου} αντισώματος. Επώαση στους 25°C, για 1 ώρα, με ελαφρά ανάδευση.
- 13. Ξέπλυμα τρεις φορές για 5 λεπτά κάθε φορά με TBS-Tween 0,1%.
- Επώαση με 2° αντίσωμα π.χ. anti-mouse HRP, στους 25°C, για 1 ώρα, με ελαφρά ανάδευση.
- 15. Ξέπλυμα τρεις φορές για 5 λεπτά κάθε φορά με TBS-Tween 0.1%.

- 16. Προετοιμασία διαλύματος υποστρώματος (Substrate solution).
- 17. Προσθήκη 1ml διαλύματος υποστρώματος ανά μεμβράνη νιτροκυτταρίνης και εμφάνιση αποτελεσμάτων.

Δ. Zobel Marine Agar

<u>Για 1L Zobel Marine Agar:</u> Peptic digest of animal tissue: 5,0gr, Yeast extract: 1,0 gr, Ferric citrate: 0,1 gr, Sodium chloride: 19,45 gr, Magnesium chloride: 8,8 gr, Sodium sulphate: 3,24 gr, Calcium chloride: 1,8 gr, Potassium chloride: 0,55 gr, Sodium bicarbonate: 0,16 gr, Potassium bromide: 0,08 gr, Strontium chloride: 0,034 gr, Boric acid: 0,022 gr, Sodium silicate: 0,004 gr, Sodium fluorate: 0,0024 gr, Ammonium nitrate: 0,0016 gr, Disodium phosphate: 0,008 gr, Agar: 15,0 gr

Συμπληρώνουμε απιονισμένο νερό μέχρι το 1 L

Τελικό pH (στους 25°C) 7,6±0,2

Ε. Παρασκευή θρεπτικού διαλύματος F\2

Αρχικά παρασκευάζουμε χωριστά τα τρία διαλύματα

Διάλυμα 1
 Προσθέτουμε σε 1 L: αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού
 Na₂EDTA (EDTA, di-sodium salt): 45 gr
 H₃BO₃ (Boric acid): 33,6 gr
 NaNO₃ ή KNO₃ (Sodium nitrate): 100 g ή 116 gr
 MnCl₂·4H₂O (Manganese chloride): 0,36 gr
 FeCl₃·6H₂O (Ferric chloride): 1,3 gr
 Θερμαίνουμε και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι τελική διάλυση.

• Διάλυμα 2

Проσθέτουμε σε 100 ml αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού ZnCl₂ (Zinc chloride): 2,1 gr CoCl₂·6H₂O (Cobalt chloride): 2 gr (NH₄)₆Mo₇O₂·4H₂O (Ammonium molybdate): 0,9 gr CuSO₄·5H₂O (Cupric sulfate): 2 gr HCl (Concentrated): 10 mL Θερμαίνουμε και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι τελική διάλυση.

Διάλυμα 3

Προσθέτουμε σε 100 ml απεσταγμένου ή απιονισμένου νερού Na₂SiO₃·5H₂O: 4 gr Θερμαίνουμε και αναδεύουμε με μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι τελική διάλυση.

Αφού έχουν φτιαχτεί και τα τρία διαλύματα, προσθέτουμε στο Διάλυμα 1, 1 mL από το Διάλυμα 2 και 2 mL από το Διάλυμα 3.

Όλα τα διαλύματα αποστειρώνονται για 30 λεπτά στους 120° C (αυτόκαυστο) και αποθηκεύονται στους ±4° C (ψυγείο).



Article Evaluation of Antifouling Potential and Ecotoxicity of Secondary Metabolites Derived from Red Algae of the Genus Laurencia

Maria Protopapa ¹ Manto Kotsiri ¹, Sofoklis Mouratidis ¹, Vassilios Roussis ², Efstathia Ioannou ^{2,*} and Skarlatos G. Dedos ^{1,*}

- ¹ Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 15784 Athens, Greece; mariaprot@hotmail.com (M.P.); madokot@yahoo.gr (M.K.); aesofos@gmail.com (S.M.)
- ² Section of Pharmacognosy and Chemistry of Natural Products, Department of Pharmacy, National and Kapodistrian University of Athens, Panepistimiopolis Zografou, 15771 Athens, Greece; roussis@pharm.uoa.gr
- * Correspondence: eioannou@pharm.uoa.gr (E.I.); sdedos@biol.uoa.gr (S.G.D.); Tel.: +30-210-727-4913 (E.I.); +30-210-727-4705 (S.G.D.)

Received: 2 November 2019; Accepted: 15 November 2019; Published: 16 November 2019



Abstract: Red algae of the genus *Laurencia* are known to biosynthesize and secrete an immense variety of secondary metabolites possessing a spectrum of biological activities against bacteria, invertebrates and mammalian cell lines. Following a rigorous cross-species screening process, herein we report the antifouling potential of 25 secondary metabolites derived from species of the genus *Laurencia*, as well as the thorough evaluation of the ecotoxicity of selected metabolites against non-target marine arthropods and vertebrate cell lines. A number of these secondary metabolites exhibited potent antifouling activity and performed well in all screening tests. Our results show that perforenol (9) possesses similar antifouling activity with that already described for bromosphaerol, which is used herein as a benchmark.

Keywords: Laurencia; red algae; biofouling; ecotoxicity; Amphibalanus amphitrite; barnacles; perforenol

1. Introduction

Owing to their co-evolution with living organisms and the environment, natural products offer increased specificity and efficiency towards their targets as a means of increasing the fitness and survival of the organism which produces them [1–3]. Marine organisms are no exception to this rule, producing an astonishing array of natural products with diverse biological activities [1–3]. A characteristic example in the marine environment is the *Laurencia* paradox [4], referring to species of red algae belonging to the genus *Laurencia* that biosynthesize a constantly increasing number of new secondary metabolites, which to date exceeds 1,000 chemical entities, with structural and functional diversity [5]. Red algae of the genus *Laurencia* have been a rich source of structurally diverse and unique secondary metabolites with both attractant and deterring activity against a variety of marine organisms [4,5], which in turn has triggered the interest of researchers towards the evaluation of the isolated metabolites as naturally-occurring chemical compounds with antifouling activity against marine fouling invertebrates.

Although the biosynthetic mechanisms of their secondary metabolites are incompletely understood and proposed to be mediated by haloperoxidases [6] and lactoperoxidases [7] due to the presence of high proportions of brominated, chlorinated and lactone-containing metabolites [4,5,8], their chloroplast is proposed to play a role in the synthesis of their secondary metabolites [6]. Structures within the cells of red algae, mostly localized close to or at the surface cell layer [6], act as storage vesicles for



secondary metabolites that help these cells avoid autotoxicity [9] from the metabolites they produce. These subcellular structures can occupy the whole cell, such as in the case of gland or vesicle cells [10], or can be refractive vesicles, such as the *corps en cerise* [6,11] and the physodes [12]. Irrespective of the intracellular structural form, the transport and exocytosis of the secondary metabolites is much better understood [13] than their biosynthetic pathways [4,8], being shown to occur via actin microfilaments and microtubule-mediated exocytosis [6]. Membranous tubular connections [6] or stalk-like structure connections [14] have been proposed to assist transport of the vesicle content to the thallus surface and thus elicit chemical defense against marine bacteria [14,15] or elicit chemical attraction for the herbivorous marine gastropod mollusk *Aplysia brasiliana* [16]. Despite the fact that results from in-vitro experiments have shown that the thallus surface concentrations of secondary metabolites, such as elatol [17,18], are low enough to elicit a chemical defense against fouling organisms, the presence of bromine and chlorine in subcellular vesicles is evidence compelling enough to suggest that an increase in fouling pressure and programmed cell death events can cause exudation of metabolites and concomitantly elicit chemical defense [6].

Understanding the distribution of surface-active molecules of red algae in situ and their chemical, biological and ecological consequences have been the pursuit of several studies [19], where the focus has been either on the behaviour of sea hares of the genus *Aplysia* feeding on *Laurencia* red algae and the subsequent use of the *Laurencia* secondary metabolites by the sea hares [16], or the documented settlement deterrence activity of *Laurencia* secondary metabolites against barnacle species or other marine invertebrates and bacteria [18–20].

Barnacle species, and especially the cyprids of the model organism *Amphibalanus amphitrite*, due to the already established protocols for settlement bioassays [21–23], have become one of the most frequently used animals to evaluate the antifouling activity of isolated secondary metabolites or synthetic compounds [18,20,23–26]. To establish a gregarious mode of settlement, *A. amphitrite* cyprids deposit a protein named Settlement Inducing Protein Complex (SIPC) which acts as a pheromone cue for their conspecifics to settle nearby and sexually reproduce [27–32].

Besides the use of *A. amphitrite* cyprids, as a model fouling invertebrate in laboratory bioassays of the efficacy of new antifouling formulations, other key biofouling organisms, such as bacteria, microalgae, fungi, macroalgae and other invertebrates, have also been used [17,33–36]. Providing thorough and rigorous evaluation of the antifouling potential and ecotoxicity of natural compounds has always been the critical point in any documented endeavor to identify new and useful chemical compounds [37]. Not without their limitations [17], such laboratory bioassays offer versatility and ease of assessment when several different compounds have to be tested against a variety of organisms. Several authoritative reviews [33,37,38] have proposed selection and evaluation criteria in the screening of potential antifouling compounds, such as the therapeutic ratio of > 50 [38]. However, the absence of any concrete knowledge on the mode of action of antifouling compounds against biofouling organisms [39] makes it difficult to put forth a single molecule as satisfying all the antifouling and ecotoxicity criteria that have been proposed.

With these limitations in mind and adhering to already proposed evaluation criteria for antifouling compounds [37,38], we screened 25 secondary metabolites isolated from *Laurencia* species, as well as *Aplysia* species feeding on the red algae, aiming to assess both their antifouling potential and their ecotoxicity profile. We followed a strict elimination protocol that relied first on the assessment of the settlement inhibitory activity of these metabolites against cyprids of *A. amphitrite*, followed by the evaluation of their toxicity against *Artemia salina*, *Chaetoceros gracilis*, a trout and a human cell line, as well as species of fouling marine bacteria and concluding with the assessment of the surface exploration behaviour by the cyprids of the shortlisted secondary metabolites.

2. Results

Given that a number of secondary metabolites from *Laurencia* species have already been identified as possessing antifouling activity, we designed a rigorous progressive testing procedure in which

a number of compounds isolated from *Laurencia* and *Aplysia* species were tested and progressively eliminated in a successive series of model organisms to assess their potential use as antifouling compounds, as well as their ecotoxicity profile.

2.1. Evaluation of Settlement Inhibition of Amphibalanus amphitrite

Initially, we evaluated 25 secondary metabolites isolated from species of the genus *Laurencia*, as well as sea hares of the genus *Aplysia* feeding on them (**1–25**, Figure1) in settlement bioassays with the model barnacle species *A. amphitrite*. The cumulative results are shown in Table1and Supplementary Figures S1–S3.



Figure 1. Chemical structures of compounds **1–25** isolated from *Laurencia* and *Aplysia* species that were evaluated in the present study and of bromosphaerol that was used as a benchmark.

Secondary Metabolite		IC ₅₀ Settlement			LC ₅₀ Mortality		N	EC ₅₀ o Metamorpho	sis	Therapeutic Ratio (TR = LC50/IC50)	Settlement/No Metamorphosis Ratio IC50/EC50
-	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	72 h	72 h
1	27.90	14.64	16.21	26.01	229.80	29.46	37.99	ND	ND	1.82	ND
2	2.02	18.11	19.77	>1000	790.20	191.20	43.99	38.24	36.47	9.67	0.54
3	1.04	1.80	2.00	66.06	382.20	269.20	ND	80.93	109.2	134.60	0.02
4	0.12	0.18	0.34	3.55	2.98	2.80	10.35	12.38	5.85	8.24	0.06
5	2.26	5.45	12.87	33.14	ND	ND	27.01	0.001	0.287	ND	44.84
6	2.42	2.22	1.27	12.31	5.29	2.31	28.33	10.85	14.98	1.82	0.08
7	17.49	17.69	10.28	24.75	23.42	24.96	25.41	21.68	53.24	2.43	0.19
8	15.83	17.49	6.95	7.76	7.38	5.93	6.81	5.01	5.42	0.85	1.28
9	0.520	0.660	0.500	76.23	116.4	49.14	38.17	47.36	57.81	98.28	0.01
10	5.24	0.662	4.66	28.83	28.49	28.75	39.29	71.05	57.17	6.17	0.08
11	0.003	0.002	0.002	56.14	38.42	ND	0.003	0.002	ND	ND	ND
12	0.089	0.073	0.042	0.327	0.194	0.061	0.396	0.250	0.066	1.45	0.64
13	1.49	1.06	1.02	29.81	848.7	8.15	46.35	64.68	78.93	7.99	0.01
14	0.011	0.065	0.028	1.96	3.61	3.54	6.42	5.15	7.72	126.43	0.00
15	2.84	7.02	5.37	31.71	33.35	34.65	63.63	55.09	72.96	6.45	0.07
16	1.42	1.96	2.20	>1000	>1000	>1000	58.34	49.09	58.46	>1000	0.04
17	0.634	0.806	1.19	ND	ND	>1000	0.057	0.921	100.60	>1000	0.01
18	0.046	0.076	0.316	26.24	26.31	20.34	45.36	50.37	48.51	64.37	0.01
19	0.400	0.915	0.756	412.9	365.8	573.1	52.80	57.89	70.41	758.07	0.01
20	2.57	2.89	3.32	ND	ND	138.3	46.98	11.28	10.05	41.66	0.33
21	3.21	7.37	0.575	0.575	1.12	18.63	7.42	18.16	0.001	32.40	575.00
22	0.025	0.043	0.055	6.86	10.11	71.34	0.008	0.010	58.66	1297.0	0.00
23	0.237	9.18	9.70	ND	ND	ND	0.276	10.31	11.24	ND	0.86
24 *	ND	9.49	207.50	259.8	527.5	527.5	0.058	63.06	163.4	2.54	1.27
25 *	62.72	55.62	75.42	643	624.6	618.2	47.07	42.75	53.27	8.20	1.42
Bromosphaerol	0.580	0.624	0.836	17.90	4.57	2.50	0.450	0.267	0.561	2.99	1.49

Table 1. IC_{50} , LC_{50} and EC_{50} values (in μ M) for settlement, mortality and metamorphosis inhibition of the cyprids of *A. amphitrite* after exposure for 24, 48 and 72 h to the tested secondary metabolites.

Secondary metabolites that had a settlement stimulating effect are shown by an asterisk (*). ND: An EC_{50} could not be determined. Detailed graphs of each dose response curve for each secondary metabolite are shown in Figure S1 (settlement), Figure S2 (mortality) and Figure S3 (no metamorphosis). Data for bromosphaerol are shown in Figure S4.

Several metabolites displayed EC₅₀ values for settlement inhibition in the lower micromolar range. Some of them, such as laurinterol (6), 4-hydroxy-5-brasilene (8) and elatol (12) had an obvious toxic effect on cyprids (Table1 and Supplementary Figure S2), while obtusallene I (24) and chondrioallene (25) had a settlement-stimulating activity at the higher concentrations tested (Table1 and Supplementary Figure S1). Settlement to no metamorphosis ratio at 72 h (Table1) was calculated to identify whether any metabolite had an undesirable developmental effect on the cyprids [23], with filiformin (5) and (*3E*)-laurenyne (21) scoring very high on this test. Bromosphaerol, a brominated diterpene (Figure 1) isolated from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* [24] and used in the current study as a positive control, showed a similar settlement-inhibiting profile, as previously reported [24], but its presence also resulted in a large percentage of animals not progressing to metamorphosis (Table1 and Supplementary Figure S4).

With bromosphaerol serving as a benchmark, eight compounds (4, 9, 11, 12, 14, 18, 19, and 22) were satisfying the criterion of consistently displaying sub-micromolar EC_{50} values for settlement inhibition of barnacle cyprids (Table1).

2.2. Evaluation of Toxicity Against Artemia salina

The eight secondary metabolites that were evaluated as having potentially promising antifouling activity against *A. amphitrite* (Table1), as well as bromosphaerol, were subsequently tested in *A. salina* nauplii toxicity assays at 24 and 48 h of exposure (Table2). These toxicity assays were conducted to identify if any of the selected metabolites exhibit toxicity towards another invertebrate organism and eliminate those that confer toxicity after longer exposure times (i.e. at 48 h). The exclusion criterion was a >10-fold increase in the EC₅₀ value between the 24 h and 48 h time points. The results showed that iso-laurenisol (**4**) and elatol (**12**) did not pass this criterion and were therefore eliminated from further testing. Bromosphaerol did not show any toxicity against *A. salina* nauplii (Table2and Supplementary Figure S5).

2.3. Evaluation of Toxicity against Chaetoceros gracilis

For phytoplankton growth toxicity assays, the criterion for assay validity was that the cell count of the negative control after 96 h should be $\geq 2 \times 10^5$ cells/mL [40]. The exclusion criterion was that a metabolite should exhibit a lower EC₅₀ value than bromosphaerol, which proved to be a very potent inhibitor of *C. gracilis* growth. The results showed that perforatone (**11**), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene (**14**) and laurencienyne (**22**) did not pass this criterion and were therefore eliminated from further testing (Table2and Supplementary Figure S6).

2.4. Evaluation of Cytotoxicity Against RTL-W1 Cell Line

The RTL-W1 cell line is a non-transformed rainbow trout liver cell line established from the normal liver of an adult rainbow trout by proteolytic dissociation of liver fragments [41]. Shortlisting three metabolites, namely perforenol (9), the dactylomelane diterpene **18** and neorogioldiol (**19**), we employed three different cytotoxicity tests in an attempt to identify possible modes of action through which each secondary metabolite is affecting cell viability, a prerequisite for any downstream application of these compounds [39]. The results showed (Table2and Supplementary Figure S7) that none of the three tested metabolites had an effect on lysosomal activity and/or the general metabolism and mitochondrial activity of this trout liver cell line. The crystal violet assay showed that two of the tested metabolites had an EC₅₀ value at the lower micromolar concentrations (Table2), while compound **18** and bromosphaerol had sub-micromolar EC₅₀ values (Table2). Since none of these secondary metabolites proved to be more toxic than bromosphaerol or had an explicit toxic profile in all three assays, none was excluded from subsequent tests.

Secondary	ARTEM	IA salina	Chaetoceros gracilis		RTL-W1 Cell Lin	L-W1 Cell Line			HEK293 Cell Line	
Metabolite	24 h	48 h	96 h	Mitochondria Function	Cell Viability	Lysosome Activity	Mitochondria Function	Cell Viability	Lysosome Activity	
4	21.11	0.739	-	-	-	-	-	-	-	
9	283.20	189	49.81	>1000	15.97	>1000	10.78	81.10	>1000	
11	10.05	1.57	4.52	-	-	-	-	-	-	
12	6.59	0.373	-	-	-	-	-	-	-	
14	34.19	15.13	1.61	-	-	-	-	-	-	
18	34.88	38.05	10.71	>1000	0.456	138.2	0.225	>1000	>1000	
19	31.53	303.8	352.4	>1000	12.81	>1000	0.062	434.10	>1000	
22	3.07	9.63	2.15	-	-	-	-	-	-	
Bromosphaerol	>1000	>1000	4.34	>1000	0.575	143.7	57.61	97.12	340.40	

Table 2. EC_{50} values (in μ M) of selected secondary m	netabolites in various toxicity and cell viability assays.
---	--

Mitochondria function refers to the Alamar blue/Resazurin assay. Cell viability refers to the Crystal violet assay. Lysosome activity refers to the Neutral red assay. Detailed graphs of each dose response curve for each selected secondary metabolite are shown in Figure S5 (*A. salina* toxicity assay), Figure S6 (*C. gracilis* toxicity assay), Figure S7 (RTL-W1 cell line viability assays) and Figure S8 (HEK293 cell line viability assays).

2.5. Evaluation of Cytotoxicity against HEK293 Cell Line

The HEK293 cell line is a transformed human embryonic kidney cell line of epithelial origin [42]. Testing the same three metabolites (9, 18 and 19) as in the RTL-W1 cell line, using three different cytotoxicity tests, we observed (Table2and Supplementary Figure S8) that in the case of HEK293 cells, metabolite 18 and neorogioldiol (19) were very selective against mitochondrial function and metabolism, unlike the RTL-W1 cell line. On the contrary, lysosomal activity was not affected by the presence of any of the three tested metabolites (Table2). The crystal violet assay (Table2) showed that perforenol (9) and bromosphaerol exhibited mild cytotoxicity.

2.6. Evaluation of Growth of Marine Bacteria

The activity of perforenol (9), the dactylomelane diterpene (18) and neorogioldiol (19), as well as bromosphaerol was evaluated against five strains of marine bacteria known to exist in biofilms, namely, *Bacillus subtilis, Bacillus mojavensis, Bacillus thuringiensis, Pseudomonas putita* and *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. The results (Supplementary Figure S9) showed that none of these metabolites had any effect on the growth of the tested bacterial strains.

2.7. Effect of Perforenol and Bromosphaerol on the Settlement Exploration Behaviour of Amphibalanus amphitrite

Finally, in order to assess whether perforenol (9) and bromosphaerol had any effect or interfered with the settlement behaviour of cyprids of *A. amphitrite*, we carried out modified Western blot assays upon completion of the settlement bioassays with the barnacle cyprids. The results (Figure2) showed that concentrations of perforenol (9) and bromosphaerol at the EC₅₀ values had no statistically significant effect (p > 0.05) on the deposition of SIPC protein on the surface of the bioassay plates. Bromosphaerol, even at a concentration of 10 µM, did not affect deposition of SIPC by the cyprids relative to the control (ASW) (Figure2).



Figure 2. Evaluation of surface exploration activity of *A. amphitrite* cyprids in the presence of perforenol (9) and bromosphaerol. (**A**) A mouse anti-SIPC monoclonal antibody that can detect native SIPC deposited by cyprids of *A. amphitrite* on the surface of polystyrene tissue culture plates [28] was used in Western blots after *A. amphitrite* settlement bioassays in the presence of perforenol (9) and bromosphaerol or artificial sea water (ASW, serving as control). Sterile tissue culture plates were incubated at 25 °C without (blank) or with 10 cyprids each in 2 mL sterile ASW for 24 h in the presence or absence (ASW) of the indicated concentrations of perforenol (9) or bromosphaerol. Solutions and settled and non-settled cyprids were then removed and Western blots were carried out on the wells with a mouse anti-SIPC monoclonal antibody. The bright-field images for each treatment are shown alongside the corresponding immunostained images. A typical image of duplicate experiments is shown. (**B**) The intensity of the signals at the region of interest (ROI; i.e. each well), after subtraction of the mean value of the blank wells. Results of unpaired, two-tailed t-tests with Welch's correction, showed that none of the two tested compounds (p > 0.05) affected the adjusted integrated density of the detected immunoreactive signals.

3. Discussion

Although the concept of identifying marine natural products as antifouling agents is not new, reports on the variety of secondary metabolites that have antifouling potential against barnacle species has been increasing recently [33,34,37,39,43,44]. Research on the bioactivity and ecological functions of secondary metabolites from red algae of the genus *Laurencia* has been exponentially increasing in the last two decades, with more than 1,000 compounds added in an ever-increasing list of isolated metabolites [4,5].

In the framework of our ongoing interests in the discovery of bioactive metabolites from marine organisms of the East Mediterranean Sea, we screened 25 compounds isolated from *Laurencia* and *Aplysia* species, including 13 sesquiterpenes (**1–13**), 7 diterpenes (**14–20**) and 5 C₁₅ acetogenins (**21–25**), aiming to assess both their antifouling potential and their ecotoxicity profile. Initially, we evaluated the settlement inhibitory activity of these metabolites against cyprids of the barnacle *A. amphitrite*. By benchmarking the antifouling potential of these metabolites against the already established antifouling activity of bromosphaerol isolated from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* [24], we identified several of them as having equal or better antifouling activity than bromosphaerol (Table1). The eight most potent metabolites (**4**, **9**, **11**, **12**, **14**, **18**, **19**, and **22**) were sequentially evaluated for their toxicity against *A. salina*, *C. gracilis*, a trout and a human cell line, as well as five species of marine fouling bacteria (Table2), attempting to exclude any possessing toxicity against other marine non-target organisms that would render these metabolites unsuitable for antifouling applications. Among these, perforenol (**9**), originally isolated from *Laurencia perforata* and *Laurencia chondrioides* [45,46], displayed potent antifouling activity and minimal ecotoxicity.

An extensive literature search revealed that among *Laurencia*-derived metabolites, only omaezallene [20] and 2,10-dibromo-3-chloro-7-chamigrene [26] have exhibited substantially low EC_{50} values and deserve being considered for antifouling formulations. Herein, we showed that performed (9) can also be included in this short list of secondary metabolites with potent antifouling activity.

Since several secondary metabolites deriving from *Laurencia* species possess antifouling activity against the barnacle *A. amphitrite*, we propose that the ability of *Laurencia* species to deter fouling derives from the concurrent presence of several metabolites, while any antifouling application of these metabolites does not have to rely on the exclusive use of each one of them.

4. Materials and Methods

4.1. Extraction and Isolation of Metabolites

Compounds 1–3, 5, 16–18 and 23 were isolated from *Aplysia depilans* Gmelin, 1791 (Gastropoda: Heterobranchia: Aplysiida: Aplysiidae [47]), collected off Skyros Island, Greece, at a depth of 2-4 m, in August of 2011, as described by Petraki (2016) and Petraki et al. (2015) [48,49]. Compounds 4 and 13 were isolated from Laurencia microcladia, collected at the coastline of Ag. Kyriaki, in Tinos island, at a depth of 0.5-2 m, in September of 2011, while compounds 4, 24 and 25 were isolated from Laurencia *obtusa*, collected at the coastline of Ag. Sostis, in Tinos island, at a depth of 0.5–2 m, in September of 2011, as described by Harizani (2013) [50]. Compounds 6-8, 19, 20 and 22 were isolated from Laurencia glandulifera, collected at Vatsa bay, in Kefalonia island, at a depth of 0.5-2 m, in May of 2014, as described by Konidaris (2015) [51]. Compounds 9-11, 13 and 14 were isolated from Laurencia sp., collected at the gulf of Preveza, at a depth of 2–3 m, in July of 2010, as described by Giannaropoulou (2013) [52]. Compound **15** was isolated from *Aplysia fasciata*, collected in the Alfacs Bay, Delta de l'Ebre, Tarragona, Spain, at a depth of 1–1.5 m, in January of 2008, as described by Ioannou et al. (2009) [53]. Compound 21 was isolated from Laurencia chondrioides, collected at Ag. Theodoroi, in Kefalonia island, Greece, at a depth of 1–2 m, in August of 2010, as described by Kokkotou et al. (2014) [46]. Metabolites 1–25 were identified as laurene (1), debromoallolaurinterol acetate (2), allolaurinterol acetate (3), iso-laurenisol (4), filiformin (5), laurinterol (6), epibrasilenol (7), 4-hydroxy-5-brasilene (8), perforenol (9), perforenone A (10), perforatone (11), elatol (12), obtusenol (13), 3,15-dibromo-7,16-dihydroxy-isopimar-9(11)-ene

(14), deoxyparguerol 16-acetate (15), three previously reported dactylomelane diterpenes (16–18), neorogioldiol (19), *O*¹¹,15-cyclo-14-bromo-14,15-dihydrorogiol-3,11-diol (20), (3*E*)-laurenyne (21), laurencienyne (22), graciosallene (23), obtusallene I (24), and chondrioallene (25) by comparison of their spectroscopic and physical characteristics with those reported in the literature.

4.2. Rearing of Barnacles

Adult *A. amphitrite* (*Cirripedia*, Balanidae) were collected from boat docks at Port Mikrolimano and Floisvos, Athens, Greece. Animals were cleaned of epibionts with a small hard brush and meticulously identified as individuals of the species. Adult barnacles were kept in separate aerated glass tanks (20 L) containing 200-µm filtered natural seawater at 27 °C and a 12:12 L:D photoperiod. Tanks were fed with 24-h hatched *Artemia* sp. (*Branchiopoda*) nauplii and *Tetraselmis suecica* (*Chlorodendrophyceae*) and *Skeletonema costatum* (*Bacillariophyceae*) algae each day and seawater was changed on alternate days. Upon stress to induce oviposition (exposure to air for 24 h or immersion in fresh water for 5 h), adults were returned to seawater for larval release. Hatched nauplii were attracted to a point light source, collected and placed into a beaker containing 2 or 3 L of 0.7 µm GF/F (GE Healthcare, Little Chalfont, UK)-filtered natural seawater at a density of approximately 1–2 nauplii/mL with gentle aeration. Nauplii were maintained at 27 °C at a 12:12 L:D photoperiod on a diet of *C. gracilis* (*Bacillariophyceae*) provided at a density of 2 × 10⁵ cells/mL. Cultured in these conditions, nauplii metamorphosed to cyprids in 5 days. Aliquots of these cyprids were collected with a wide-mouthed Pasteur pipette and aged at 4 °C for 1 day prior to use in settlement assays. Only batches of cyprids that were active and had numerous oil cells, representing energy reserves, were used in settlement assays.

4.3. Amphibalanus amphitrite Settlement Bioassay

Assays were conducted by adding 10 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) with 2 mL of artificial sea water (ASW) (25%0) and various concentrations of the chemical compounds as listed in Table1. These experiments were repeated at least three times with four replicates for each concentration of any given compound (n = 120 cyprids/compound). Stock solutions for all compounds were prepared in methanol (Scharlab, Barcelona, Spain) and serial dilutions were prepared in 0.7 µm (GF/F, GE Healthcare, Little Chalfont, UK), filtered sea water to have a final concentration of 2.5% methanol in each assay solution. Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated at 25 °C away from any light source and examined after 24, 48 and 72 h. Each animal was inspected under a stereomicroscope and its condition was recorded. On each day, cyprids that did not move, had extended thoracopods and did not respond after a light touch with a Pasteur pipette, were regarded as dead. Both permanently attached and metamorphosed individuals were counted as settled or juveniles. The remainder were counted as 'no metamorphosis', i.e. animals that responded to light touch and were still cyprids at the end of the experiments with no overt signs of metamorphosis. Results were expressed as a percentage of animals that settled (settlement) or were inactive upon a light touch with a Pasteur pipette (mortality) or did not undergo settlement and metamorphosis (no metamorphosis) from the total number of animals placed in a well of a 24-well tissue culture plate. The IC₅₀ or EC₅₀ was determined as the concentration of each compound that resulted in 50% inhibition of the cyprids' settlement or metamorphosis, and LC_{50} was determined as the concentration of each compound that resulted in 50% mortality of the cyprids.

4.4. Artemia salina Toxicity Assay

The short-term toxicity assay with *A. salina* nauplii [54,55] was used to determine the toxicity of secondary metabolites. Hatching of *A. salina* nauplii was carried out in ASW (35%0) using 0.5 g of cysts incubated in 500 mL seawater at a temperature of 25 ± 1 °C and lateral illumination (1000 Lux). All cysts were kept in continuous suspension with aeration and 24 h later hatched larvae (instar I) were harvested. Toxicity assays were carried out in three independent experiments in 24-well plates

with four replicates of each tested concentration. Ten nauplii per well were transferred with a Pasteur pipette into the 24-well plates and each well was filled with 2 mL of ASW and 50 μ L of various concentrations of the tested compounds in methanol. Control treatments received 50 μ L of methanol. Plates were incubated in the dark at 25 ± 1 °C for 48 h. Mortality was assessed by recording the number of individuals with no movement of their appendages within 10 seconds and is expressed as the percentage of the total number of assessed individuals for each concentration.

4.5. Chaetoceros gracilis Toxicity Assay

The centric marine diatom *C. gracilis* Schütt (strain CCMP1315) was grown photoautotrophically in autoclaved artificial seawater (sea salts; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (30% o) supplemented with F/2 (half-strength medium *f* [56] as subsequently modified [57]) in 100 mL medium at 20 °C and with ambient air bubbled in the media. By monitoring cell density, an adjusted culture of >1 × 10⁶ cells/mL was used for the toxicity assays. At 96 h, a 0.9 mL aliquot of each treatment was sampled, mixed with 0.1 mL Lugol and cell density was counted. Experiments were assumed valid if cell count in the control after 96 h was $\ge 2 \times 10^6$ cells/mL.

4.6. RTL-W1 Cell Line Cytotoxicity Assay

The RTL-W1 cell line, a non-transformed rainbow trout liver cell line that has already been used in environmental toxicity assays [58], was established from the normal liver of an adult rainbow trout by proteolytic dissociation of liver fragments [41]. RTL-W1 cells were cultured in 75 cm² culture flasks (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) at 20 °C in Leibovitz's (L-15, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medium supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) and 1% L-glutamine in CO₂-free incubator. For the cytotoxicity assays of the selected secondary metabolites, cells were seeded at 3×10^4 cells/well density in a 96-well tissue culture plate (Orange Scientific Braine l'Alleud, Belgium) in 100 µL culture medium/well for 2 days before the assays. Three different cytotoxicity protocols were used: 1) The alamar blue/resazurin fluorometric/colorimetric cell viability assay [59] to assess the metabolic capacity and mitochondrial function; 2) the crystal violet cell viability assay for indirect quantification of cell death [60]; and 3) the neutral red cell proliferation assay for lysosomal activity [61]. Two days after seeding the cells, cultures were incubated with various concentrations of selected secondary metabolites at 20 °C for 48 h before cell viability was assessed. Final solvent (methanol) concentration per well in all experiments was 2.5% v/v, a concentration that was found to be non-toxic for the cells. For the alamar blue/resazurin fluorometric/colorimetric cell viability assay [59], 100 µL of 3 µg/100 µL Resazurin sodium salt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in incubation medium was added on each well and incubated under sterile conditions at 20 °C for 4 h. For the crystal violet cell viability assay [60], after 48 h of incubation with each secondary metabolite, the culture medium was aspirated and cells were washed twice with sterile dd. H₂O. The final wash was aspirated and 50 μ L of 0.5% (*w/v*) crystal violet staining solution (20% methanol in dd. H₂O) was added to each well followed by incubation for 20 min at room temperature on a bench rocker with a frequency of 20 oscillations per minute. The staining solution was then aspirated and the plate was washed four times with sterile dd. H_2O and left to air-dry without its lid for 3 h at room temperature. Next, 200 μ L of methanol was added to each well, and the plate was incubated with its lid on for 20 min at room temperature on a bench rocker with a frequency of 20 oscillations per minute. For the neutral red cell proliferation assay [61], after 48 h of incubation with each secondary metabolite, the culture medium was aspirated and cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). Cells were then incubated with 100 µL of a 40 µg/mL neutral red staining solution in culture medium at 20 °C for 4 h followed by two washes with 150 µL of PBS. Then cells were incubated with 100 µL neutral red destain solution (50% ethanol, 49% dd. H₂O, 1% glacial acetic acid) for 10 min on a bench rocker with a frequency of 80 oscillations per minute. Absorbance was read at 570 nm for alamar blue/resazurin and crystal violet and at 540 nm for neutral red using a Tecan infinite M200 Pro microplate reader. For each assay and each secondary metabolite, a minimum of four independent dose-response experiments

with three replicates each were carried out. Calculations were carried out using detailed formulas (AbCam, Cambridge, UK, and results were analyzed with GraphPad Prism v.6.

4.7. HEK 293 Cell Line Cytotoxicity Assay

HEK293 cells, a human embryotic kidney cell line, were obtained from ATCC (ATCC[®] CRL-1573^{$^{\text{M}}$}) at passage 37 of the original clone and used at passage 38. Cells were cultured routinely in 75 cm² culture flasks (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) at 37 °C (5% CO₂) in DMEM cell culture medium (Biosera) supplemented with 10% FBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and 1% L-glutamine. All assay conditions and protocols were identical to those described above for RTL-W1 cells with the exception that incubations were carried out at 37 °C.

4.8. Marine Bacteria Growth Assay

The ability of selected metabolites to inhibit the growth of bacteria was assessed using five strains of marine bacteria involved in marine surface biofilm formation, namely, *B. subtilis, B. mojavensis, B. thuringiensis, P. putita* and *P. pseudoalcaligenes*. Bacterial strains were maintained on Zobel marine agar plates [62]. Sterile filter paper discs (4 mm) (GF/F; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) were loaded with 40 μ L samples of serial dilutions of each tested metabolite, allowed to dry at room temperature and then placed on agar plates (Zobel marine agar, pH = 7.3), which were seeded with a single strain of bacteria. Plates were incubated for 24 h at 25 °C. Marine bacteria growth inhibition was determined by measuring the zone of inhibition in mm around the filter paper disc. As a positive and negative control, standard discs were loaded with 40 μ L of 0.5 M penicillin G (2 to 10 mm diameter) or solvent (40 μ L methanol), respectively.

4.9. Substrate Exploration Analysis by Amphibalanus amphitrite Cyprids

To test the substrate exploratory behaviour of A. amphitrite cyprids in the presence of selected metabolites, settlement bioassays were conducted by adding 10 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific, Braine l'Alleud, Belgium) containing 2 mL of ASW (25%0). These experiments were repeated twice with four replicates per experiment. Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated at 25 °C away from any light source for 24 h. Then, the 2 mL of ASW was aspirated from each well and all settled and nonsettled cyprids were counted and removed. Wells were then blocked by incubation with 5% BSA in TBST (25 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Wells were then incubated for 1 h at room temperature with the mouse anti-SIPC monoclonal antibody [28] at 1:100 dilution of the cloned cell line culture supernatant in TBST with 5% BSA, washed with TBST (3 × 5 min) and incubated with an HRP-conjugated anti-mouse antibody (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) for 1 h at room temperature. Wells were then washed with TBST (3 × 5 min) and immunostaining was detected using the 20 × LumiGLO[®] chemiluminescence kit (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in a Bio-Rad ChemiDoc XRS + Gel Photo Documentation System. To measure the relative intensity of immunoreactive spots on this format of Western blots, images were analyzed with ImageJ 1.52k (NIH, Bethesda, MD, USA), and the adjusted integrated density of the signals was calculated using the formula: Adjusted integrated density (IntDen) = IntDen of experimental region of interest (ROI) – (mean of background ROI × area of experimental ROI). Data were exported and statistically analyzed with GraphPad Prism v.6 using unpaired, two-tailed t-tests at p = 0.05, with Welch's correction.

4.10. Statistical Analysis

For EC₅₀ or IC₅₀ (the concentration that results in 50% stimulation or inhibition relative to the control) calculations in GraphPad Prism v.6, all data were fitted to the curve according to the following models for normalized response: $Y = 100/(1 + 10^{\circ}((X - \text{LogIC}_{50})))$ or $Y = 100/(1 + 10^{\circ}((\text{LogEC}_{50} - X)))$ depending on the trend of the curve.

5. Conclusions

Aiming to identify chemical compounds that can be used as antifouling agents against barnacles, while at the same time testing their ecotoxicity against non-target organisms, we singled out the sesquiterpene perforenol (9) as having potent antifouling activity. Perforenol (9) displayed settlement-inhibiting activity against *A. amphitrite* cyprids with an IC₅₀ value of about 0.5 μ M and, most crucially, did not interfere with the settlement seeking behavior of the cyprids of this species. Several other secondary metabolites, isolated from red algae of the genus *Laurencia* and sea hare species of the genus *Aplysia*, had antifouling activity against *A. amphitrite* cyprids but failed to pass our ecotoxicity tests against non-target organisms.

Supplementary Materials: The following are available online athttp: //www.mdpi.com/1660-3397/17/11/646/s1, Figures S1–S9: visual representation of the results of the various bioassays.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., V.R., E.I. and S.G.D.; Methodology, M.P., M.K., S.M., V.R., E.I. and S.G.D.; Software and Resources, M.P., V.R., E.I. and S.G.D.; Validation and Data Curation; M.P., M.K., V.R., E.I. and S.G.D; Formal Analysis, M.P., E.I. and S.G.D.; Investigation, M.P., M.K., S.M., E.I. and S.G.D.; Writing – Original Draft, S.G.D.; Writing – Review & Editing, M.P., V.R., E.I. and S.G.D; Visualization, M.P., E.I. and S.G.D; Supervision, Project Administration and Funding Acquisition, V.R., E.I. and S.G.D.

Funding: This research was supported by the project "Center for the study and sustainable exploitation of Marine Biological Resources" (CMBR, MIS 5002670) funded in the framework of the National Roadmap for Research Infrastructures and the project GSRT-EPANII-11SYN-5-1274 "MARIPAINTS" implemented under the "COOPERATION 2011" Action funded by the European Social Fund (ESF) and National Resources.

Acknowledgments: The authors thank Sylvie Bony (Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, CNRS, UMR 5023-LEHNA, USC INRA 1369, France) and Lucy Lee (Faculty of Science, University of Fraser Valley, Canada) for the kind donation of RTL-W1 cell line.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

- Alves, C.; Silva, J.; Pinteus, S.; Gaspar, H.; Alpoim, M.C.; Botana, L.M.; Pedrosa, R. From marine origin to therapeutics: The antitumor potential of marine algae-derived compounds. *Front. Pharmacol.* 2018, *9*, 777. [CrossRef]
- Mishra, B.B.; Tiwari, V.K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. *Eur. J. Med. Chem.* 2011, 46, 4769–4807. [CrossRef]
- 3. Gribble, G. Biological activity of recently discovered halogenated marine natural products. *Mar. Drugs* **2015**, *13*, 4044–4136. [CrossRef]
- 4. Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. The *Laurencia* paradox: An endless source of chemodiversity. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products;* Kinghorn, A.D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J.I., Eds.; Springer International: Basel, Switzerland, 2016; Volume 102, pp. 91–252.
- 5. MarinLit. A Database of the Marine Natural Products Literature. Available online:http://pubs.rsc.org/ marinlit/ (accessed on 30 September 2019).
- 6. Salgado, L.T.; Viana, N.B.; Andrade, L.R.; Leal, R.N.; Da Gama, B.A.P.; Attias, M.; Pereira, R.C.; Amado Filho, G.M. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa. J. Struct. Biol.* **2008**, *162*, 345–355. [CrossRef]
- 7. Murai, A. Biosynthesis of cyclic bromoethers from red algae. In *Comprehensive Natural Products Chemistry*; Barton, S.D., Nakanishi, K., Meth-Cohn, O., Eds.; Pergamon: Oxford, UK, 1999; pp. 303–324.
- 8. Wang, B.-G.; Gloer, J.B.; Ji, N.-Y.; Zhao, J.-C. Halogenated organic molecules of Rhodomelaceae origin: Chemistry and biology. *Chem. Rev.* **2013**, *113*, 3632–3685. [CrossRef]
- 9. McKey, D. The distribution of secondary compounds within plants. In *Herbivores. Their Interaction with Secondary Plant Metabolites;* Rosenthal, G., Janzen, D., Eds.; Academic Press: New York, NY, USA, 1979; pp. 55–134.
- 10. Dworjanyn, S.A.; De Nys, R.; Steinberg, P.D. Localisation and surface quantification of secondary metabolites in the red alga *Delisea pulchra*. *Mar. Biol.* **1999**, *133*, 727–736. [CrossRef]

- 11. Young, D.N.; Howard, B.M.; Fenical, W. Sucellular localization of brominated secondary metabolites in the red alga *Laurencia snyderae*. J. Phycol. **1980**, *16*, 182–185. [CrossRef]
- 12. Schoenwaelder, M.E.A. The occurrence and cellular significance of physodes in brown algae. *Phycologia* **2002**, *41*, 125–139. [CrossRef]
- Reis, V.M.; Oliveira, L.S.; Passos, R.M.F.; Viana, N.B.; Mermelstein, C.; Sant'anna, C.; Pereira, R.C.; Paradas, W.C.; Thompson, F.L.; Amado-Filho, G.M.; et al. Traffic of secondary metabolites to cell surface in the red alga *Laurencia dendroidea* depends on a two-step transport by the cytoskeleton. *PLoS ONE* 2013, *8*, e63929. [CrossRef][PubMed]
- 14. Paul, N.A.; Nys, R.D.; Steinberg, P.D. Chemical defence against bacteria in the red alga *Asparagopsis armata*: Linking structure with function. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **2006**, *306*, 87–101. [CrossRef]
- Kubanek, J.; Jensen, P.R.; Keifer, P.A.; Sullards, M.C.; Collins, D.O.; Fenical, W.Seaweed resistance to microbial attack: A targeted chemical defense against marine fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 6916–6921. [CrossRef] [PubMed]
- Nocchi, N.; Soares, A.R.; Souto, M.L.; Fernández, J.J.; Martin, M.N.; Pereira, R.C. Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliana*. *PLoS ONE* 2017, 12, e0187126. [CrossRef][PubMed]
- De Nys, R.; Leya, T.; Maximilien, R.; Afsar, A.; Nair, P.S.R.; Steinberg, P.D. The need for standardised broad scale bioassay testing: A case study using the red alga *Laurencia rigida*. *Biofouling* 1996, 10, 213–224. [CrossRef] [PubMed]
- Sudatti, D.B.; Rodrigues, S.V.; Coutinho, R.; Da Gama, B.a.P.; Salgado, L.T.; Amado Filho, G.M.; Pereira, R.C. Transport and defensive role of elatol at the surface of the red seaweed *Laurencia obtusa* (Ceramiales, Rhodophyta). J. Phycol. 2008, 44, 584–591. [CrossRef] [PubMed]
- 19. Steinberg, P.D.; De Nys, R. Chemical mediation of colonization of seaweed surfaces. J. Phycol. 2002, 38, 621–629. [CrossRef]
- 20. Umezawa, T.; Oguri, Y.; Matsuura, H.; Yamazaki, S.; Suzuki, M.; Yoshimura, E.; Furuta, T.; Nogata, Y.; Serisawa, Y.; Matsuyama-Serisawa, K.; et al. Omaezallene from red alga *Laurencia* sp.: Structure elucidation, total synthesis, and antifouling activity. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2014**, *53*, 3909–3912. [CrossRef]
- 21. Rittschof, D.; Branscomb, E.S.; Costlow, J.D. Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacles, *Balanus amphitrite* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **1984**, *82*, 131–146. [CrossRef]
- 22. Rittschof, D.; Clare, A.S.; Gerhart, D.J.; Mary, S.A.; Bonaventura, J. Barnacle in vitro assays for biologically active substances: Toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* darwin. *Biofouling* **1992**, *6*, 115–122. [CrossRef]
- 23. Kotsiri, M.; Protopapa, M.; Roumelioti, G.-M.; Economou-Amilli, A.; Efthimiadou, E.K.; Dedos, S.G. Probing the settlement signals of *Amphibalanus amphitrite*. *Biofouling* **2018**, *34*, 492–506. [CrossRef]
- 24. Piazza, V.; Roussis, V.; Garaventa, F.; Greco, G.; Smyrniotopoulos, V.; Vagias, C.; Faimali, M. Terpenes from the red alga *Sphaerococcus coronopifolius* inhibit the settlement of barnacles. *Mar. Biotechnol.* **2011**, *13*, 764–772. [CrossRef]
- 25. Clare, A.S.; Rittschof, D.; Costlow, J.D. Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. *J. Exp. Zool.* **1992**, 262, 436–440. [CrossRef]
- 26. Al-Lihaibi, S.S.; Abdel-Lateff, A.; Alarif, W.M.; Nogata, Y.; Ayyad, S.E.N.; Okino, T. Potent antifouling metabolites from Red Sea organisms. *Asian J. Chem.* **2015**, *27*, 2252–2256. [CrossRef]
- 27. Aldred, N.; Alsaab, A.; Clare, A.S. Quantitative analysis of the complete larval settlement process confirms Crisp's model of surface selectivity by barnacles. *Proc. R. Soc.* **2018**, *285*, 20171957. [CrossRef] [PubMed]
- 28. Kotsiri, M.; Protopapa, M.; Mouratidis, S.; Zachariadis, M.; Vassilakos, D.; Kleidas, I.; Samiotaki, M.; Dedos, S.G. Should I stay or should I go? The settlement-inducing protein complex guides barnacle settlement decisions. *J. Exp. Biol.* **2018**, *221*, jeb185348. [CrossRef] [PubMed]
- 29. Dreanno, C.; Kirby, R.R.; Clare, A.S. Locating the barnacle settlement pheromone: Spatial and ontogenetic expression of the settlement-inducing protein complex of *Balanus amphitrite*. *Proc. R. Soc.* **2006**, 273, 2721–2728. [CrossRef] [PubMed]
- 30. Dreanno, C.; Kirby, R.R.; Clare, A.S. Smelly feet are not always a bad thing: The relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. *Biol. Lett.* **2006**, *2*, 423–425. [CrossRef] [PubMed]

- Dreanno, C.; Matsumura, K.; Dohmae, N.; Takio, K.; Hirota, H.; Kirby, R.R.; Clare, A.S. An α2macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006, *103*, 14396–14401. [CrossRef] [PubMed]
- 32. Dreanno, C.; Kirby, R.R.; Clare, A.S. Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **2007**, *351*, 276–282. [CrossRef]
- 33. Dahms, H.; Dobretsov, S. Antifouling compounds from marine macroalgae. *Mar. Drugs* 2017, 15, 265. [CrossRef]
- Dahms, H.; Hellio, C. Laboratory bioassays for screening marine antifouling compounds. In *Advances in Marine Antifouling Coatings and Technologies*; Hellio, C., Yebra, D., Eds.; Woodhead: Cambridge, UK, 2009; pp. 275–307.
- 35. Briand, J.-F. Marine antifouling laboratory bioassays: An overview of their diversity. *Biofouling* **2009**, *25*, 297–311. [CrossRef]
- Hellio, C.; De La Broise, D.; Dufossé, L.; Le Gal, Y.; Bourgougnon, N. Inhibition of marine bacteria by extracts of macroalgae: Potential use for environmentally friendly antifouling paints. *Mar. Environ. Res.* 2001, 52, 231–247. [CrossRef]
- 37. Qian, P.-Y.; Li, Z.; Xu, Y.; Li, Y.; Fusetani, N. Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as antifouling compounds: 2009–2014. *Biofouling* **2015**, *31*, 101–122. [CrossRef] [PubMed]
- Qian, P.-Y.; Xu, Y.; Fusetani, N. Natural products as antifouling compounds: Recent progress and future perspectives. *Biofouling* 2009, 26, 223–234. [CrossRef] [PubMed]
- 39. Qian, P.-Y.; Chen, L.; Xu, Y. Mini-review: Molecular mechanisms of antifouling compounds. *Biofouling* **2013**, 29, 381–400. [CrossRef] [PubMed]
- 40. ASTM. *Standard Guide for Conducting Static Toxicity Tests with Microalgae.* E1218-04; American Society for Testing and Material (ASTM) International: West Conshohocken, PA, USA, 2012.
- 41. Lee, L.E.; Clemons, J.H.; Bechtel, D.G.; Caldwell, S.J.; Han, K.B.; Pasitschniak-Arts, M.; Mosser, D.D.; Bols, N.C. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biol. Toxicol.* **1993**, *9*, 279–294. [CrossRef]
- 42. Graham, F.L.; Smiley, J.; Russell, W.C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36*, 59–74. [CrossRef]
- 43. Almeida, E.; Diamantino, T.C.; De Sousa, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coat.* **2007**, *59*, 2–20. [CrossRef]
- 44. Almeida, J.R.; Vasconcelos, V. Natural antifouling compounds: Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 343–357. [CrossRef]
- 45. Gonzalez, A.G.; Aguiar, J.M.; Darias, J.; Gonzalez, E.; Martin, J.D.; Martin, V.S.; Perez, C.; Fayos, J.; Martinez-Ripoll, M. Perforenol, a new polyhalogenated sesquiterpene from *Laurencia perforata*. *Tetrahedron Lett.* **1978**, *19*, 3931–3934. [CrossRef]
- 46. Kokkotou, K.; Ioannou, E.; Nomikou, M.; Pitterl, F.; Vonaparti, A.; Siapi, E.; Zervou, M.; Roussis, V. An integrated approach using UHPLC-PDA-HRMS and 2D HSQC NMR for the metabolic profiling of the red alga *Laurencia*: Dereplication and tracing of natural products. *Phytochemistry* **2014**, *108*, 208–219. [CrossRef]
- 47. MolluscaBase. Aplysia depilans Gmelin, 1791, World Register of Marine Species. Available online: http://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=138754(accessed on 12 November 2019).
- 48. Petraki, A. Isolation and structure elucidation of secondary metabolites from the sea hare *Aplysia depilans*. Ph.D. Thesis, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, July 2016.
- 49. Petraki, A.; Ioannou, E.; Papazafiri, P.; Roussis, V. Dactylomelane diterpenes from the sea hare *Aplysia depilans*. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 462–467. [CrossRef] [PubMed]
- 50. Harizani, M. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from the Red Algae *Laurencia microcladia* and *Laurencia obtusa*. Master's Thesis, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, July 2013.
- 51. Konidaris, G. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from the Red Alga *Laurencia glandulifera*. Master's Thesis, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, December 2015.
- 52. Giannaropoulou, E. Isolation and Structure Elucidation of Secondary Metabolites from a Red Alga of the Genus *Laurencia*. Master's Thesis, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece, December 2013.

- 53. Ioannou, E.; Nappo, M.; Avila, C.; Vagias, C.; Roussis, V. Metabolites from the sea hare *Aplysia fasciata*. J. Nat. *Prod.* **2009**, 72, 1716–1719. [CrossRef] [PubMed]
- Carballo, J.L.; Hernández-Inda, Z.L.; Pérez, P.; García-Grávalos, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2002, 2, 17. [CrossRef] [PubMed]
- 55. Vanhaecke, P.; Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P. Proposal for a short-term toxicity test with *Artemia* nauplii. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1981**, *5*, 382–387. [CrossRef]
- 56. Guillard, R.R.; Ryther, J.H. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. *Can. J. Microbiol.* **1962**, *8*, 229–239. [CrossRef] [PubMed]
- 57. Smith, L.L.; Fox, J.M.; Granvil, D.R. Intensive algae culture techniques. In *CRC Handbook of Mariculture, Volume 1 Crustacean Aquaculture,* 2nd ed.; McVey, J.P., Ed.; CRC Press, Inc.: Boca Raton, FL, USA, 1993.
- Kienzler, A.; Tronchère, X.; Devaux, A.; Bony, S. Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicol. In Vitro* 2012, 26, 500–510. [CrossRef]
- 59. O'Brien, J.; Wilson, I.; Orton, T.; Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* **2000**, *267*, 5421–5426. [CrossRef]
- 60. Feoktistova, M.; Geserick, P.; Leverkus, M. Crystal Violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *4*. [CrossRef]
- 61. Repetto, G.; Del Peso, A.; Zurita, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 1125–1131. [CrossRef]
- 62. Zobell, C. Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. *J. Mar. Res.* **1941**, *4*, 42–75.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

RESEARCH ARTICLE



Should I stay or should I go? The settlement-inducing protein complex guides barnacle settlement decisions

Manto Kotsiri¹, Maria Protopapa¹, Sofoklis Mouratidis¹, Michael Zachariadis^{1,2}, Demetrios Vassilakos¹, Ioannis Kleidas¹, Martina Samiotaki³ and Skarlatos G. Dedos^{1,*}

ABSTRACT

Reproduction in barnacles relies on chemical cues that guide their gregarious settlement. These cues have been pinned down to several sources of settlement pheromones, one of which is a protein termed settlement-inducing protein complex (SIPC), a large glycoprotein acting as a pheromone to induce larval settlement and as an adhesive in surface exploration by the cyprids. Settlement assays in laboratory conditions with Amphibalanus (=Balanus) amphitrite cyprids in the presence of SIPC showed that cyprids exhibit settlement preference behaviour at lower concentrations of SIPC [half maximal effective concentration (EC₅₀)=3.73 nmol I^{-1}] and settlement avoidance behaviour at higher concentrations (EC₅₀=101 nmol I^{-1}). By using truncated fragments of SIPC in settlement assays, we identify that domains at the N-terminus of SIPC transduce settlement preference cues that mask the settlement avoidance cues transduced by domains at its C-terminus. Removing the N-terminal 600 amino acids from SIPC resulted in truncated fragments that transduced only settlement avoidance cues to the cyprids. From the sexual reproduction point of view, this bimodal response of barnacles to SIPC suggests that barnacles will settle gregariously when conspecific cues are sparse but will not settle if conspecific cues inform of overcrowding that will increase reproductive competition and diminish their reproductive chances.

KEY WORDS: Barnacles, *Amphibalanus amphitrite*, Settlementinducing protein complex, Gregarious settlement, Predation, Biofouling

INTRODUCTION

The reproductive behaviour of barnacles has always fascinated scientists, among them Charles Darwin (Darwin, 1854), partly because their sessile trait makes them adopt reproductive strategies that rely on proximity to conspecifics (Barnes and Barnes, 1977; Crisp and Meadows, 1962; Crisp, 1961), but also because these animals are model organisms for marine biofouling (Aldred and Clare, 2008; Rittschof and Cohen, 2004; Rittschof et al., 1984, 1992). The life cycle of these animals consists of the nauplius (larval) stage, the cyprid stage, in which the barnacle actively seeks

*Author for correspondence (sdedos@biol.uoa.gr)

Received 23 May 2018; Accepted 1 October 2018

a preferred substrate for settlement, after which it metamorphoses into a juvenile barnacle, and then the adult stage, in which it is capable of sexual reproduction (Høeg and Møller, 2006). Early observations on the surface exploration behaviour of barnacles (Yule and Walker, 1985; Yule and Crisp, 1983; Crisp and Meadows, 1962; Crisp, 1961) led to the discovery of the proteinaceous nature of the signals that these animals use to inform their conspecifics of their presence and thus increase their reproductive chances (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006c). Several earlier reports (see Rittschof and Cohen, 2004; Rittschof, 1990) and further research have shown that this reproductive strategy comes with a cost, because the same chemical cue acts as a potent feeding stimulant for a barnacle predator, the whelk *Acanthinucella spirata* (Zimmer et al., 2016).

Intense research efforts culminated in the discovery of settlementinducing protein complex (SIPC), a glycoprotein that induces conspecific larval settlement in Amphibalanus amphitrite (Darwin 1854) (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006a,b,c). Originally shown to comprise 3 subunits of 98, 88 and 76 kDa (Matsumura et al., 1998b), cloning of the cDNA that encodes for SIPC from A. *amphitrite* revealed that SIPC is a single protein of 1547 amino acids with a calculated molecular mass of 171.7 kDa (Dreanno et al., 2006c). It is firmly established that SIPC is an Nlinked glycan-containing protein and that glycans, such as mannose, can induce larval settlement behaviour (Pagett et al., 2012; Dreanno et al., 2006b; Thiyagarajan et al., 2002). Research on another barnacle species, Balanus glandula, has identified another orthologous protein termed MULTIFUNCin (Ferrier et al., 2016), which shares 78% nucleotide sequence identity with SIPC and is expressed as three subunits of 98, 88 and 76 kDa in addition to the 199 kDa of the full-length protein (Ferrier et al., 2016). Positivesettlement-directed purification of MULTIFUNCin and its subunits indicated that only the 199 kDa and the 98 kDa proteins were inducing settlement of the cyprids of this species (Ferrier et al., 2016). These authors reported failure to express MULTIFUNCin in Escherichia coli and Pichia pastoris heterologous systems (Ferrier et al., 2016). Another study, however, reported the expression of a recombinant SIPC from A. amphitrite in a baculovirus expression system (Zhang et al., 2016). This recombinant SIPC from

A. amphitrite was lacking its N-terminal signal peptide sequence, had an apparent molecular mass of around 200 kDa and did not induce cyprid settlement (Zhang et al., 2016). This inability of heterologously expressed *A. amphitrite* SIPC to induce settlement of the cyprids is in disagreement with results from another study, which showed that native SIPC, purified from *A. amphitrite* homogenates, induces cyprid settlement with a half maximal effective concentration (EC₅₀) of 102 nmol 1^{-1} (Pagett et al., 2012).

Throughout the extensive literature pertaining to the identification of SIPC or other orthologous proteins (Dreanno et al., 2007; Ferrier et al., 2016; Matsumura et al., 1998b), emphasis

¹Department of Biology, National and Kapodistrian University of Athens, Athens 15784, Greece. ²Institute of Biosciences and Applications, National Center for Scientific Research 'Demokritos', Agia Paraskevi, Athens 15310, Greece. ³Biomedical Sciences Research Center 'Alexander Fleming', Fleming 34, 16672 Vari, Greece.

M.K., 0000-0001-6949-8490; M.P., 0000-0002-9030-1469; S.M., 0000-0002-0388-3369; D.V., 0000-0003-2695-0795; I.K., 0000-0003-3232-0167; S.G.D., 0000-0002-0432-338X

is given to positive-settlement-directed purification, i.e. to identifying and reporting only subunits that exhibit a settlementinducing response; therefore, it is critical to note that such positivesettlement assay designs may not allow for the identification of any negative settlement cues. Therefore, comparing the results from B. glandula MULTIFUNCin (Ferrier et al., 2016) and the A. amphitrite SIPC (Pagett et al., 2012), there is ambiguity as to which of the SIPC subunits or the full-length protein exert the settlement behaviour. Is it the N-terminal 98 kDa subunit (Pagett et al., 2012; Ferrier et al., 2016; Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006c) that exerts the settlement cues? Are the post-translational modifications (PTMs) of SIPC, which are critical for its activity as a pheromone cue (Aldred and Clare, 2008; Matsumura et al., 1998b; Zhang et al., 2016; Dreanno et al., 2007, 2006a), solely responsible for its biological activity or is the reported EC₅₀ of 102 nmol l^{-1} (Pagett et al., 2012) of native SIPC a composite effect brought about by the simultaneous presence of all three subunits (Matsumura et al., 1998b)?

Attempting to answer these confounding questions, in this study we engineered, expressed and purified a recombinant form of SIPC from A. amphitrite as well as a systematic series of SIPC truncated fragments to identify whether SIPC, its putative subunits (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006a) or its PTMs (Pagett et al., 2012) are responsible for its biological activity. We engineered a recombinant form of SIPC and its truncated fragments to contain an N-terminal myc-tag and a C-terminal 6×His-tag to be able to detect and purify the full-length protein or its fragments from heterologous expression systems. By developing a systematic series of truncated SIPC fragments that were overexpressed and purified from heterologous expression systems, we were aiming to identify, in settlement bioassays of A. amphitrite cyprids (Rittschof et al., 1984, 1992), the minimal domain(s) that confer the species-specific biological activity of SIPC, be it protein domain(s) or domainspecific glycosylations (Pagett et al., 2012; Dreanno et al., 2007).

We show here that SIPC is a single glycoprotein, with a molecular mass substantially larger than its calculated molecular mass, that can transduce both settlement preference and settlement avoidance cues and thus guide a cyprid's decision to settle on a substrate or not. We also show that domains in the N-terminal 600 amino acids of SIPC, possibly through their extensive glycosylations, act as settlement preference cues. When these 600 amino acids are sequentially removed in recombinant truncated fragments of SIPC, the remaining domains of SIPC dose-dependently transduce only settlement avoidance cues. Although puzzling at a first impression, the settlement avoidance cues conferred by high concentrations of the full-length recombinant SIPC may serve to reduce reproductive competition (Crisp, 1961) by conspecifics or may actually be a covert predator avoidance strategy (Zimmer et al., 2016).

MATERIALS AND METHODS Animals

Adult A. amphitrite (Cirripedia, Balanidae) were collected from boat docks at Port Mikrolimano and Floisvos, Athens, Greece. Animals were cleaned of epibionts with a small hard brush and meticulously identified as individuals of the species (Bernard and Lane, 1962; Costlow, 1956). Adult barnacles were kept in separate aerated glass tanks (20 1) containing 200-µm-filtered natural seawater at 27°C and a 12 h:12 h light:dark photoperiod. Tanks were fed 24-h-hatched Artemia sp. (class: Branchiopoda) nauplii and Tetraselmis suecica (class: Chlorodendrophyceae) and Skeletonema costatum (class: Bacillariophyceae) algae each day, and seawater was changed on alternate days. Upon stress to induce oviposition (24 h exposure to air or immersing in fresh water for 5 h), adults were returned to seawater for larval release. Hatched nauplii were attracted to a point light source, collected and placed into a beaker containing 2 or 3 l of 0.7 μ m GF/F (Whatman)-filtered natural seawater at a density of approximately 1–2 nauplii ml⁻¹ with gentle aeration. Nauplii were maintained at 27°C at a 12 h:12 h light:dark photoperiod on a diet of *Chaetoceros gracilis* (class: Bacillariophyceae) provided at a density of 2×10⁵ cells ml⁻¹ (Matsumura et al., 1998a; Thiyagarajan et al., 2002). Cultured in these conditions, nauplii metamorphosed to cyprids in 5 days. Aliquots of these cyprids were collected with a wide-mouthed Pasteur pipette and aged at 4°C (Phang et al., 2009) for 1 day prior to use in settlement assays. Only batches of cyprids that were active and had numerous oil cells, representing energy reserves (Lucas et al., 1979), were used in settlement assays (Rittschof et al., 1984, 1992).

Construction of recombinant SIPC and truncated SIPC fragments

We obtained a plasmid containing the full-length cDNA of the A. amphitrite SIPC gene cloned in pCR4-TOPO (Dreanno et al., 2006c) (Thermo Fisher Scientific). The full-length cDNA was sequenced and then transferred as an EcoRI (NEB) fragment into pENTR1a (Thermo Fisher Scientific). The sequencing results revealed differences between the obtained clone and the original cDNA deposited in GenBank (acc. no.: AAR33079.1; see Tables S1-S3). Differences were also observed between this clone and the nucleotide and amino acid sequence of SIPC deposited by Zhang et al. (2016) (GenBank acc. no.: AMR58954.1; see Tables S1-S3), which notably lacks the signal peptide sequence entirely (Zhang et al., 2016). Sequence alignment of the cDNA we obtained and the two other cDNA sequences deposited in GenBank (Zhang et al., 2016; Dreanno et al., 2006c) showed that there are differences between the three protein sequences (Tables S1-S3). Bioinformatic analysis (see below) of the deduced amino acid sequence, encoded by the cDNA we obtained, revealed that the amino acid differences that we observed were not affecting any putative PTM site as judged by its primary structure.

We proceeded to correct the three amino acid differences (Tables S2 and S3) that we observed in the signal peptide sequence using a forward primer (primer 1; Table S4) and a reverse primer (primer 2; Table S4) designed to remove the 3'-untranslated region (UTR) and thus obtain the open reading frame (ORF) of the gene. The PCR reaction conditions were: 95° C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95° C for 30 s, 46° C for 30 s and 68° C for 5 min using *Pfx* polymerase (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The

resulting PCR product of \sim 4730 bp was cloned as an *Eco*RI fragment in pENTR1 α (Thermo Fisher Scientific) to generate clone pENTR1 α -SIPC-ORF.

To introduce a myc-tag (N–EQKLISEEDL–C) sequence immediately after the cleavage site of the signal peptide, we used primers 3 and 4 (see Table S4). Clone pENTR1 α –SIPC–ORF was used as template and PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 5 min using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions. Primers 3 and 4 were added at a final concentration of 125 nmol 1⁻¹ and primers 1 and 2 were added at a final concentration of 300 nmol 1⁻¹ to the PCR reaction. The resulting PCR product of ~4760 bp was cloned as an *Eco*RI fragment in pENTR1 α to create pENTR1 α –SIPC–Myc–ORF.

Next, we engineered a C-terminal His-tag on recombinant SIPC by using a reverse primer (primer 5; Table S4) that introduced a

 $6 \times$ His tag just before the stop codon, and a forward primer (primer 6; Table S4). The PCR conditions were identical to those described above but with shorter extension at 68° C for 1 min. The resulting PCR product of 950 bp was digested with *XbaI* (NEB) and cloned into pENTR1 α -SIPC-Myc-ORF to create pENTR1 α -SIPC-Myc-ORF-6×His.

To this clone, which coded for an N-terminal myc-tagged and C-terminal His-tagged SIPC, we introduced a *Sph*I restriction site just after the myc-tag using primers 7 and 8 (Table S4) and primers 1 and 5. The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 5 min using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions. Primers 7 and 8 were added at a final concentration of 125 nmol 1^{-1} and primers 1 and 5 were added at a final concentration of 300 nmol 1^{-1} to the PCR reaction. The resulting PCR product of ~4760 bp was digested with *Eco*RI-*XhoI* (NEB) and the resulting fragment of ~2825 bp replaced a fragment of similar size in the previous clone to create pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His.

To generate the Venus variant of EGFP (Nagai et al., 2002), the pEGFP-N1 plasmid (Clontech) was used as template and the ORF of EGFP was amplified by PCR using primers 9 and 10 (Table S4) and cloned as an *Eco*RI fragment in pENTR1 α . This clone was used as a template in PCR reactions that progressively mutated the ORF of EGFP to its Venus variant using primers 11–22 (Table S4). The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 1 min using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions. Primers for mutagenesis (primers 11–22) were added at a final concentration of 125 nmol 1⁻¹ and primers 9 and 10 were added at a final concentration of 300 nmol 1⁻¹ to the PCR reaction. Mutations introduced to EGFP to change it to its Venus variant were: F47L, T66G, V69L, Q70M, S73A, M154T, V164A, S176G and T204Y (Nagai et al., 2002).

Upon completion of the introduced mutations, the resulting ORF of Venus was subcloned as a *Sph*I (NEB) fragment into pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His to create pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-Venus-ORF-6×His.

To express the neurosecretory-vesicle-localised PTPRN2 (Caromile et al., 2010), first-strand cDNA was synthesised from 5 µg total RNA from rat cerebellum (Takara) with 200 U Superscript[®]III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific) in 20 µl reaction volume using an oligo(dT)₂₀ primer (Thermo Fisher Scientific) plus random hexamers (Thermo Fisher Scientific) (50 ng per 5 µg total RNA) according to the manufacturer's instructions. The resulting cDNA was diluted with nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific) before use in PCR. Using the NCBI reference sequence NM_031600.1 (Wasmeier and Hutton, 1996) as a guide, first a 3.02 kb PCR product, which contained the ORF of PTPRN2, was amplified from the cDNA using primers 23 and 24 (Table S4). The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 4 min using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions, and the PCR product was digested with EcoRI-AgeI (NEB). Next, the ORF of mTurquoise from mTurquoise2-ER (Goedhart et al., 2012) was amplified by PCR using primers 25 and 26 (Table S4). The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 1 min using Pfx polymerase according to the manufacturer's instructions. The PCR product was cloned as an EcoRI-XhoI fragment in pENTR1 α and then the resulting clone was digested with EcoRI-AgeI and the 3.02 kbp PCR product of the PTPRN2

ORF was cloned in frame to generate pENTR1 α -PTPRN2-mTurquoise.

To replace the signal peptide sequence of SIPC, we used primer 27 (Table S4) and primer 5 and pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His as template. The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 5 min using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions. The resulting PCR product of ~4760 bp was digested with *Eco*RI-*XhoI* and a fragment of ~2825 bp replaced a fragment of similar size in pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His to create pENTR1 α -SpSIPC-Myc-SphI-ORF-6×His. To this clone, the ORF of Venus was inserted in frame at the *SphI* site to create pENTR1 α -SpSIPC-Myc-SphI-Venus-ORF-6×His.

To generate truncated fragments of SIPC, we used a structural model-based approach (see below) in conjunction with the bioinformatic analysis of the primary structure of SIPC (see below). Using clone pENTR1\alpha-SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His as template, we generated first 2 truncated SIPC fragments (Tr.2 and Tr.7) using primer 28 and 29 (Table S4), respectively, as forward primers and primer 5 as reverse primer. The PCR conditions were: 95°C for 3 min as an initial step followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 46°C for 30 s and 68°C for 4 min for Tr.2 and 2 min for Tr.7, using *Pfx* polymerase according to the manufacturer's instructions. The PCR products were cloned as SphI-XhoI fragments in pENTR1a-SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His to generate truncated SIPC fragments Tr.2 and Tr.7. Subsequently, and based on the results we obtained from these truncated fragments, we generated truncated fragments Tr.1 and Tr.3 using primers 30 and 31 (Table S4) in an identical approach as above. Next, we generated truncated fragments Tr.4, Tr.5 and Tr.6 using primers 32, 33 and 34 (Table S4) in an identical approach as above by simply adjusting the PCR extension time at 68°C to 3 min. Finally, we generated truncated fragments Tr.8 and Tr.9 using primers 35 and 36 (Table S4) as forward primers and primer 37 (Table S4) as reverse primer in an identical approach as above by simply adjusting the PCR extension time at 68°C to 2 min. These last two PCR products were digested with SphI-SpeI (NEB) and cloned into pENTR1a-SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His to generate truncated fragments Tr.8 and Tr.9.

For expression in HEK293 cells, all constructs described above were transferred by recombination to the mammalian expression vector pcDNA3.2/V5-DEST (Thermo Fisher Scientific) using the Gateway LR Clonase II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

For baculovirus-mediated expression of SIPC in insect Sf9 cells, constructs (1) pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-ORF-6×His (hereafter termed SIPC), (2) pENTR1 α -SpSIPC-Myc-SphI-ORF-6×His (hereafter termed SpSIPC), (3) pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-Venus-ORF-6×His (hereafter termed VSIPC) and (4) pENTR1 α -SpSIPC-Myc-SphI-Venus-ORF-6×His (hereafter termed SpVSIPC) were recombined with baculovirus linear DNA using the BaculoDirectTM C-Term Expression Kit (Thermo Fisher Scientific) and the Gateway LR Clonase II enzyme mix (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions.

All constructs were sequenced using the described primers and additional primers 38–46 (Table S4) before transfer to expression vectors. Notably, we observed no additional change or mutation in the nucleotide sequence of *SIPC* during the construct engineering process, an indication that the *SIPC* cDNA does not exhibit any inherent instability during its propagation in *E. coli* that would justify the presence of the observed nucleotide changes.

Expression of recombinant SIPC in mammalian and baculovirus expression systems

HEK293 cells were seeded in culture flasks and transfected with expression vectors coding for SIPC, VSIPC and the various truncated SIPC fragments when in density of 1×10^6 cells ml⁻¹ with 10 µg of DNA per 1×10^6 cells ml⁻¹ of culture medium, using Escort IV transfection reagent (Merck) at a 1:1 ratio of µg DNA:µl of transfection reagent, according to the manufacturer's instructions. Medium and cells were separately harvested at 72 h posttransfection. Medium was initially centrifuged at 90 g for 10 min at 4°C to remove cells and then at 10,000 g for 10 min to remove cellular debris, and then carefully aspirated and stored at -80° C until use. Cells were removed by scraping in PBS and centrifuged twice in the presence of PBS at 90 g for 10 min at 4°C to remove any remaining medium, then resuspended in lysis buffer (50 mmol 1^{-1} Tris pH 7.6, 150 mmol l-1 NaCl, 2 mmol l-1 EDTA, 1% Triton X-100) and a protease inhibitor cocktail tablet/10 ml lysis buffer (Roche Diagnostics) and stored at -80° C until use.

Recombinant baculoviruses expressing the various forms of fulllength recombinant SIPC were propagated in Sf9 cells (Thermo Fisher Scientific) and, after 3 re-infections of Sf9 cells, the viral titre was determined using the end-point dilution assay. For large-scale protein expression, Sf9 cells were cultured in Sf-900TM III SFM medium and infected at a multiplicity of infection of 10. For each batch, a total of 10⁸ cells were infected. Medium and cells were harvested at 72 h post-infection, and samples were processed separately as described above and stored at -80° C until use. Protein concentration in samples was determined with the *RC DC*TM Protein Assay kit II (Bio-Rad) using bovine serum albumin

(BSA) as standard. Protein samples were pre-incubated with 250 mmol 1^{-1} dithiothreitol (DTT) before resolution in onedimensional (1D) SDS-PAGE gels of 5 or 8% acrylamide/bisacrylamide at 10 µg protein/lane for cell samples and 20 µl/lane for culture medium samples.

For western blots, gels were wet transferred onto a nitrocellulose membrane (Whatman) in transfer buffer [25 mmol 1^{-1} Tris, 192 mmol 1^{-1} glycine, 20% (v/v) methanol] at 100 V constant at 4°C for 90 min. Nitrocellulose membranes were blocked by incubation with 5% BSA in TBST (25 mmol 1^{-1} Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol 1^{-1} NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with a Myc-Tag (9B11) mAb (Cell Signaling Technology) at 1:1000 dilution in TBST with 5% BSA, washed with TBST (3×5 min) and incubated with an HRP-conjugated antimouse antibody (1:1000, Cell Signaling Technology) for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were detected using the 20× LumiGLO[®] chemiluminescence kit (Cell Signaling Technology) in an Alpha Innotech FluorChem 8800 imaging system.

Fluorescence confocal microscopy

HEK293 cells were seeded on poly-_D-lysine (Merck)-coated coverslips in 6-well plates at a density of 0.5×10^6 cells/well and transiently transfected with expression vectors for VSIPC and PTPRN2-mTurquoise as described above. At 72 h post-transfection, cells were washed 3 times with PBS (pH 7.4), fixed in 1 ml of 4% PFA for 15 min at room temperature followed by 3 washes with PBS, and sealed with 10 µl Duolink[®] *In Situ* Mounting Medium with DAPI (Merck). Cells were imaged on a multiphoton confocal microscope Leica TCS SP8 MP equipped with an Argon laser (excitation lines at 458, 476, 488, 496 and 514 nm) and an IR MaiTai DeepSee Ti:Sapphire laser (Spectra-Physics) for

Journal of Experimental Biology (2018) 221, jeb185348. doi:10.1242/jeb.185348

multiphoton applications. Images were acquired with the spectral detector of the microscope using appropriate emission wavelength ranges: PTPRN2-mTurquoise was excited at 458 nm with the Argon laser and emission was recorded between 465 and 500 nm, VSIPC was excited at 514 nm with the Argon laser and emission recorded at 520-600 nm. DAPI was excited at 780 nm with the MaiTai DeepSee laser and emission captured at 400-450 nm. Images were acquired with the LAS X software (Leica Microsystems CMS GmbH). For imaging, suitable doubly transfected cells were selected, and stacks of 20-30 optical sections were recorded for each cell. Images are presented without any post-processing.

Purification of recombinant SIPC from insect cell culture medium

The 6×His-tagged recombinant SIPC (SpSIPC) recovered from the insect cell culture medium at 72 h post-infection was purified using Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Science) and the following protocol: Ni beads prepared to 50% slurry with binding buffer (20 mmol 1^{-1} sodium phosphate, 0.5 mol 1^{-1} NaCl, 20 mmol 1^{-1} imidazole, pH 7.4) were added at 1.5 ml per 30 ml of culture medium and incubated at 4°C on a rotating shaker for 1 h. Beads were then washed $(2 \times 1 \text{ ml})$ with binding buffer and bound protein(s) were eluted from the beads with 4×0.5 ml elution buffer (20 mmol 1^{-1} sodium phosphate, 0.5 mol 1^{-1} NaCl, 500 mmol 1^{-1} imidazole, pH 7.4). Samples of the eluted fractions were analysed by western blots and then fractions from several batches (n=6) were pooled and dialysed against a HEPES buffer (20 mmol 1^{-1} HEPES. 200 mmol l⁻¹ NaCl, pH 7.4) using a Spectra/Por[™] cellulose ester dialysis membrane (molecular mass cut-off 100 kDa; Thermo Fisher Scientific). Samples were concentrated to 100 µl using the Amicon Ultra-15 centrifugal filter units (Merck) at 4000 g for 15 min at 4°C. A fraction of these samples was reserved for liquid chromatography tandem-mass spectrometry (see below) and the remaining was dialysed against sterile artificial seawater (ASW) (25‰) overnight in 4°C using Slide-A-Lyzer™ dialysis cassettes (molecular mass cut-off 100 kDa; Thermo Fisher Scientific). Protein concentration was again determined using the RC DCTM Protein Assay kit II (Bio-Rad) and BSA as standard, and samples saved for use in settlement assays.

Purification of recombinant SIPC from mammalian cell culture medium

The 6×His-tagged recombinant SIPC (rSIPC) and its truncated fragments recovered from HEK293 cell culture medium were purified using Ni Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare Life Science) and the following protocol: Ni beads prepared to 50% slurry with binding buffer (20 mmol l^{-1} sodium phosphate, $0.5 \text{ mol } l^{-1} \text{ NaCl}, 20 \text{ mmol } l^{-1} \text{ imidazole, pH 7.4})$ were added at 1.5 ml per 30 ml of culture medium and incubated at 4°C on a rotating shaker for 1 h. Beads were then washed $(2 \times 1 \text{ ml})$ with binding buffer and bound protein(s) were eluted from the beads with 4×0.5 ml elution buffer (20 mmol l⁻¹ sodium phosphate, 0.5 mol 1⁻¹ NaCl, 500 mmol 1⁻¹ imidazole, pH 7.4). Samples of the eluted fractions were analysed by western blot and then fractions from several batches (n=4-7) were pooled and dialysed against ddH₂O for 2 h, then sterile sea water (36‰) for 2 h and finally sterile ASW (25‰) overnight in 4°C using Spectra/Por™ cellulose ester dialysis membrane (molecular mass cut-off 100 kDa; Thermo Fisher Scientific). For truncated fragments of SIPC smaller than 100 kDa, a dialysis membrane with 14 kDa cut-off was used (Merck). Protein concentration was determined using the

 $RC DC^{TM}$ Protein Assay kit II (Bio-Rad) and BSA as standard, and samples saved for use in settlement assays.

Analysis of SIPC expression at A. amphitrite developmental stages

To identify whether the recombinant SIPC that we engineered has similar mobility in SDS-PAGE gels as the endogenous SIPC of *A. amphitrite*, we generated a rabbit polyclonal antibody against a peptide (N–IHKELKGGTERGGE–C) corresponding to amino acids 1186–1199 of SIPC (GenBank acc. no.: AAR33079.1). With a cysteine attached to its N-terminus, the 15 amino acid peptide was conjugated to keyhole limpet hecocyanin (KLH) and the conjugate was used to immunise rabbits. The antibody was produced and purified by GenScript (NJ, USA).

Monoclonal antibodies against the same peptide were produced according to a modified method of Köhler and Milstein (1975). Five BALB/c mice of 5 weeks of age were immunised intraperitoneally (i.p.) with 25 µg of the KLH-conjugated peptide (peptide synthesis and conjugation by GenScript). All immunisation and animal handling were in accordance with animal care guidelines as specified in EU Directive 2010/63/EU. After 5 cycles of immunisation, mice were euthanised and spleenocytes were collected and fused with the P3X63Ag8.653 cell line (ATCC[®] CRL1580[™]) according to the Köhler and Milstein (1975) fusion protocol. Positive clones and antibody specificity were determined through immunoblotting and immunosorbent assays and, among the several positive clones, one was further propagated and used.

Nauplii, cyprids and freshly settled adults were cultured as described above. Nauplii were collected with a wide-mouthed Pasteur pipette, whereas early attached cyprids of *A. amphitrite* (24 h old) and metamorphosed juveniles (48 h old) were gently scraped off the dishes. Animals were anaesthetised in 0.5 mol 1^{-1} MgCl₂ and this solution was quickly replaced with 1 µl/animal lysis buffer (50 mmol 1^{-1} Tris, pH 7.6, 150 mmol 1^{-1} NaCl, 2 mmol 1^{-1} EDTA, 1% Triton X-100) and a protease inhibitor cocktail tablet/ 10 ml lysis buffer (Roche Diagnostics) and stored at -80° C until use. After homogenisation with a small pestle, samples were sonicated 3 times (30 s with 2.5 min rest on ice) using an MSE Soniprep 150 ultrasonic disintegrator (Sanyo). Samples were centrifuged at 15,000 g for 10 min at 4°C and the supernatant was incubated with 250 mmol 1^{-1} DTT and resolved in a 5% acrylamide/bis-acrylamide SDS-PAGE gel.

Gels were wet transferred onto a nitrocellulose membrane in transfer buffer [25 mmol l^{-1} Tris, 192 mmol l^{-1} glycine, 20% (v/v) methanol] at 100 V constant at 4°C for 90 min. Nitrocellulose membranes were blocked by incubation with 5% BSA in TBST (25 mmol 1⁻¹ Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol 1⁻¹ NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Membranes were then incubated for 1 h at room temperature with the purified polyclonal anti-SIPC rabbit antibody at 1:1000 dilution in TBST with 5% BSA or with the mouse anti-SIPC monoclonal antibody at 1:100 dilution of the cloned cell line culture supernatant in TBST with 5% BSA. Membranes were then washed with TBST (3×5 min) and incubated with an HRP-conjugated anti-rabbit or HRP-conjugated anti-mouse antibody (1:1000, Jackson Laboratories) for 1 h at room temperature. Immunoreactive bands were detected using the 20× LumiGLO® chemiluminescence kit (Cell Signaling Technology) in an Alpha Innotech FluorChem 8800 imaging system.

Settlement bioassays

Assays were conducted by adding 12 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific) containing 2 ml of ASW (25‰) and various concentrations of recombinant SIPC. These experiments were repeated 3 times with 5 replicates for each concentration of recombinant SIPC (n=180 cyprids for each concentration of recombinant SIPC). An identical procedure was used for settlement assays in the presence of BSA (molecular biology grade from NEB).

Plates were covered and sealed with Parafilm® to avoid evaporation, incubated at 25°C away from any light source, and examined after 24, 48, 72 and 96 h. Each animal was inspected under a stereomicroscope and its condition recorded. On each day, cyprids that did not move, had extended thoracopods and did not respond after a light touch with a Pasteur pipette were regarded as dead (Lau and Qian, 2000; Rittschof et al., 1992; Hellio et al., 2004). Both permanently attached and metamorphosed individuals were counted as settled or juveniles (Hellio et al., 2005; Rittschof et al., 2003). The remainder were counted as 'no settlement'. Results were expressed as percentage of settlement, mortality and no settlement. For SIPC and its truncated fragments expressed in HEK293 cells, a similar approach was used but with fewer replicates (n=48-96 cyprids) and fewer concentrations of each protein per assay due to the substantially decreased yields of this expression system relative to the baculovirus expression system.

Adhesive properties of recombinant SIPC and truncated SIPC fragments

Adhesion assays of recombinant SIPC or its truncated fragments (Tr.1 to Tr.9) were conducted by adding 300 µl of each protein sample (50 nmol 1^{-1}) into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific). Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated at 25°C away from any light source for 24 h. Then, samples were aspirated and wells were blocked by incubation with 5% BSA in TBST $(25 \text{ mmol } l^{-1} \text{ Tris-HCl}, \text{ pH } 7.5, 150 \text{ mmol } l^{-1} \text{ NaCl}, 0.1\% \text{ Tween}$ 20) for 1 h at room temperature. Wells were then incubated for 1 h at room temperature with a Myc-Tag (9B11) mAb (Cell Signaling Technology) at 1:1000 dilution in TBST with 5% BSA, washed with TBST (3×5 min) and incubated with an HRP-conjugated antimouse antibody (1:1000, Cell Signaling Technology) for 1 h at room temperature. Wells were then washed with TBST (3×5 min) and immunostaining was detected using the 20× LumiGLO® chemiluminescence kit (Cell Signaling Technology) in a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ Gel Photo Documentation system. Acquired high-resolution images were analysed with ImageJ 1.48v (National Institutes of Health) and data were exported and statistically analysed with GraphPad Prism v.6. These experiments were repeated 3 times with 2 replicates for each sample.

In experiments where the adhesive properties of native SIPC was assessed, settlement bioassays were conducted by adding 10 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific) containing 2 ml of ASW (25‰). These experiments were repeated 6 times with 3 replicates per experiment. Plates were covered and sealed with Parafilm® to avoid evaporation and incubated at 25°C away from any light source for 96 h. Then, the 2 ml of ASW was aspirated from each well and saved, and all settled and non-settled cyprids were counted and removed as well. Wells were then blocked by incubation with 5% BSA in TBST (25 mmol l^{-1} Tris-HCl, pH 7.5, 150 mmol l^{-1} NaCl, 0.1% Tween 20) for 1 h at room temperature. Wells were then incubated for 1 h at room temperature with the mouse anti-SIPC monoclonal antibody at 1:100 dilution of the cloned cell line culture supernatant in TBST with 5% BSA, washed with TBST (3×5min) and incubated with an HRP-conjugated anti-mouse antibody

(1:1000, Cell Signaling Technology) for 1 h at room temperature. Wells were then washed with TBST ($3 \times 5 \text{ min}$) and immunostaining was detected using the $20 \times \text{LumiGLO}^{\textcircled{0}}$ chemiluminescence kit (Cell Signaling Technology) in a Bio-Rad ChemiDoc XRS+ Gel Photo Documentation system.

In parallel, the 2 ml of ASW sample from each well was subjected to trichloroacetic acid (TCA) precipitation to identify native SIPC, according to the following protocol. A 0.5 ml volume of 100% (w/v) TCA was added to 2 ml of each ASW sample and incubated at 4°C for 10 min. Following centrifugation of each sample at 20,800 g for 5 min at 4°C, supernatant was removed and 200 µl ice-cold acetone was added to the pellet. After centrifugation of each sample at 20,800 g for 5 min at 4°C, 200 µl ice-cold acetone was added to the pellet and the process was repeated one more time. After evaporation of acetone, 20 µl of 1× SDS-PAGE sample buffer was added to each pellet, and samples were boiled at 95°C for 5 min and subjected to SDS-PAGE electrophoresis in an 8% acrylamide/ bis-acrylamide gel. Western blots, with the mouse anti-SIPC monoclonal antibody at 1:100 dilution of the cloned cell line culture supernatant were carried out as described above.

Bacteria counting assays

Assays was conducted by adding 12 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific) containing 2 ml of ASW (25‰) and various concentrations of recombinant SIPC (SpSIPC; 10 nmol 1⁻¹, 50 nmol 1⁻¹, 150 nmol 1⁻¹) with 3 replicates per experiment. Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated for 24 h away from any light source at 25°C. Then, samples from each well were taken to assess the number of existing heterotrophic marine bacteria using the spread plate counting technique (Zobell, 1941). Zobell's marine-agar-containing plates were inoculated with 10 µl of each ASW sample or 10 µl of its 10⁻¹, 10^{-2} and 10^{-3} serial dilutions using a sterile glass rod. Colonies that developed on the marine agar plates were counted after incubation for 24 h at 25°C and the counts were expressed as colony forming units ml⁻¹.

Bioinformatic screening for PTMs of SIPC

The full-length recombinant SIPC (1568 amino acids) was screened for PTMs using relevant tools provided in the dbPTM server (http://dbptm.mbc.nctu.edu.tw/#; Huang et al., 2016) and ModPred (http://www.modpred.org; Pejaver et al., 2014). For tools available at the dbPTM server, default parameters were used. The results of bioinformatic annotation of PTMs of SIPC are shown in Table S5.

Crystal structure simulation of SIPC

To design the truncated fragments of recombinant SIPC, we used the i-TASSER algorithm at http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/ I-TASSER/ (Zhang, 2008), in conjunction with the bioinformatic screening of recombinant SIPC for PTMs. Using the PDB ID:2PN5 crystal structure of thioester-containing protein isoform TEP1 of *Anopheles gambiae* (Baxter et al., 2007), which has 26% identity to SIPC (Pagett et al., 2012), as template, the best scoring model had a C-score=-1.51. This value measures the relative clustering structural density and consensus significance score of multiple threading templates (Zhang, 2008). The estimated accuracy of the model was 0.53 ± 0.15 (TM-score or structural similarity measurement) with a root mean square deviation (RMSD) of 13.7 ± 4.0 Å. The model was visualised, annotated and coloured with PyMOL v.1.7.4.4 to determine the sites of truncation on recombinant SIPC that would eliminate distinct structural domains.

Deglycosylation assays

Full-length SIPC and its fragments were deglycosylated using the Protein Deglycosylation Mix, which contains PNGase F, *O*glycosidase, neuraminidase, β 1–4 galactosidase and β -*N*acetylglucosaminidase (NEB), in denaturing and non- denaturing reaction conditions according to the manufacturer's instructions. Assay performance was assessed by using bovine fetuin as a positive control. Deglycosylated samples were run on a 5 or 8% acrylamide/bis-acrylamide gel and western blots were carried out as described above. The migration of recombinant SIPC or its truncated fragments was analysed using ImageJ software, and calibrated with the standard molecular mass of the protein ladder from several western blots (*n*=3–7).

Proteomic analysis of recombinant SIPC

A purified 20 µl sample of SpSIPC expressed in Sf9 cells was subjected to SDS-PAGE electrophoresis in a 5% acrylamide/ bisacrylamide gel. The gel was then fixed for 30 min (45% methanol, 1% acetic acid) and subjected to silver staining using the Pierce[™] Silver Stain for mass spectrometry (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Upon band visualisation, a gel slice corresponding to the 217 kDa molecular mass of SpSIPC (Fig. S4F) was excised, cut into smaller pieces, transferred into a tube, washed, dehydrated with acetonitrile and subjected to in-gel enzymatic digestion with trypsin (Gold, mass spec grade, Promega) in 50 mmol 1^{-1} ammonium bicarbonate solution overnight at 37°C. Peptides were eluted and dried to completeness upon speed-vac-assisted solvent removal. The dried peptide mixtures were reconstituted in 2% acetonitrile, 0.1% formic acid in water and analysed by LC-MS/MS. Peptides were pre-concentrated with a flow of 3 µl min⁻¹ for 10 min on a C18 trap column (Acclaim PepMap100, 100 µm×2 cm, Thermo Fisher Scientific) and then loaded onto a 15 cm C18 column (75 µm ID, particle size 2 µm, 100 Å, Acclaim PepMap RSLC, Thermo Fisher Scientific). The binary pumps of the HPLC (RSLCnano, Thermo Fisher Scientific) consisted of solution A [2% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) formic acid] and solution B [80% (v/v) acetonitrile in 0.1% (v/v) formic acid]. The peptides were separated using a linear gradient of 4% solution B up to 40% in 50 min for a 1 h gradient run with a flow rate of 300 nl min⁻¹. The column was placed in an oven operating at 35°C. The eluted peptides were ionised by a nano-electros pray source and analysed by MS/MS on an LTQ Orbitrap XL mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Full scan MS spectra were acquired in the Orbitrap (m/z 300-1600) in profile mode and data-dependent acquisition, with the resolution set to 60,000 at m/z 400 and automatic gain control target at 10^6 ions. The 6 most intense ions were sequentially isolated for collision-induced (CID) MS/MS fragmentation and detection in the linear ion trap. Dynamic exclusion was set to 1 min and activated for 90 s. Ions with single charge states were excluded. Lock masses of m/z 445, 120 and 025 were used for internal calibration. Xcalibur (Thermo Fisher Scientific) was used to control the system and acquire the raw files. Peptides were identified using the Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Fisher Scientific). The Orbitrap raw data, with peak S/N threshold set to 1.5, were searched in Proteome Discoverer 1.4 using the SEQUEST HT against the SpSIPC FASTA sequence of SIPC as well as the UniProt entries of the human proteome (89,663 sequences), the UniProt entries of the Drosophila melanogaster proteome (18,540 sequences) and the UniProt entries of Bombyx mori proteins (19,062 sequences) with strict trypsin specificity and with a maximum of two missed cleavages and variable modifications of methionine oxidation, deamidation of glutamine

and asparagines residues and acetylation of the protein N-terminus. The identified peptides were filtered based on their Xcorr values versus peptide charge states (XCorr>2 for charge state +2 and XCorr>2.5 for charge state +3). The mass spectrometry proteomics data and search results have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE (Vizcaíno et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD006858 and 10.6019/PXD006858.

Statistical analysis

All data were fitted to a four-parameter logistic curve according to the following model: $y=Bottom+(Top-Bottom)/(1+10^{(LogEC50_x)×HillSlope]})$ in GraphPad Prism v.6. To measure the relative distance of immunoreactive bands in western blots, images were analysed with ImageJ 1.48v and data were exported and statistically analysed with GraphPad Prism v.6. All other statistical analyses were carried out with GraphPad Prism v.6.

RESULTS

Expression of recombinant SIPC

It was previously reported that SIPC contains a signal peptide that directs its secretion (Dreanno et al., 2006a,c), and that finding agrees

with our results where, upon expression of recombinant SIPC in HEK293 cells, we identified a secreted protein in the medium (Fig. 1A). The same was true for the Venus-containing recombinant SIPC (VSIPC), which was found to be secreted from HEK293 cells upon its expression (Fig. S1A). We observed that the expressed protein in HEK293 cells had a molecular mass>200 kDa, much higher than the calculated molecular mass of 171.45 kDa of secreted recombinant SIPC. The Venus-containing VSIPC had a molecular mass>230 kDa (Fig. S1A), much higher than the calculated molecular mass of 199.16 kDa of the secreted recombinant VSIPC. Fluorescenceconfocalmicroscopyrevealed that recombinant VSIPC, expressed in HEK293 cells, had an endoplasmic-reticulum-like localisation distinct from the secretory-vesicle-localised PTPRN2 (Caromile et al., 2010; Fig. 1B), an indication that SIPC is secreted through transport vesicles.

Assuming that the less complex glycosylations of insect cells (Shi and Jarvis, 2007) will result in a protein of reduced molecular mass, we expressed recombinant SIPC in Sf9 cells and observed that it had a similar molecular mass (>200 kDa) to that observed in HEK293 cells (Fig. 1A,C). In this case, however, the protein was not secreted from Sf9 cells (Fig. 1C). To obtain a secreted form of SIPC from Sf9



Fig. 1. Expression of recombinant SIPC from *Amphibalanus amphitrite*. (A) Recombinant settlement-inducing protein complex (SIPC) is secreted by HEK293 cells. Each lane contains 10 μ g of total cellular protein or 20 μ l of cell culture medium from untransfected cells (labelled as HEK293 cells and HEK293 medium) or cells transfected with the recombinant SIPC expression vector (labelled as SIPC cells and SIPC medium). Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image of several blots (*n*=10) is shown. L, protein ladder. (B) Recombinant VSIPC (pENTR1 α -SIPC-Myc-SphI-Venus-ORF-6×His) is not localised in secretory vesicles. Fluorescence confocal imaging of recombinant VSIPC in HEK293 cells co-transfected with PTPRN2-mTurquoise. Image 1 (far left): PTPRN2-mTurquoise localisation in secretory vesicles. Image 2: VSIPC localisation in endoplasmic-reticulum-like structures. Image 3: DAPI localisation in cell nuclei. Image 4 (far right): merge of images 1, 2 and 3 (scale bar: 10 μ m). (C) The endogenous signal peptide of SIPC does produce a secreted recombinant SIPC in extracts from *A. amphitrite* at different developmental stages, with a mouse anti-SIPC monoclonal antibody. Each lane contains 10 μ g of total cellular protein form different developmental stages of this species. A typical image of several blots (*n*=3) is shown. N1–N6, nauplii stage 1 to stage 6; C1, cyprid day 1; S1–S3, settled day 1 to day 3. (E) Time course of secretion of recombinant SPSIPC (pENTR1 α -SpSIPC-Myc-SphI-ORF-6×His) from Sf9 cells after infection with recombinant SpSIPC-expressing baculoviruses. Each lane contains 20 μ l of Sf9 cell culture medium. C, control Sf9 cell culture medium. Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image of several blots (*n*=3) is shown.

Journal of Experimental Biology (2018) 221, jeb185348.doi:10.1242/jeb.185348

cells, we engineered a construct that contained the signal peptide of sarcotoxin 1A of the flesh fly Sarcophaga peregrina that has been shown to direct secretion of baculovirus-encoded proteins (O'Reilly et al., 1995). This change in the signal peptide resulted in the expression and secretion of recombinant SIPC from Sf9 cells (Fig. S1B). These cells can be cultured in a serum-free and proteinfree medium and this was convenient for the purification of recombinant SIPC from the medium. Upon purification of SIPC from Sf9 cell culture medium, to eliminate any possibility that the immunoreactive protein was not SIPC, we probed the overexpressed proteins with a polyclonal antibody generated against a peptide sequence in the C-terminus of SIPC (Fig. S1C). This antibody recognised a single band in western blots from Sf9 cell culture medium at a molecular mass>200 kDa, only when a different signal peptide replaced the endogenous signal peptide of SIPC, in agreement with our previous results (Fig. 1A,C, Fig. S1A-C). As shown in the western blots in Fig. S1A,B, bands of smaller molecular mass, similar to those described before (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006a), were immunoreactive with the Nterminally located myc-epitope but not with the anti-SIPC antibody (Fig. S1C).

We tested this antibody against lysates from A. amphitrite nauplii, cyprids and adults of different developmental stages and observed that a protein of molecular mass much higher than the calculated molecular mass of endogenous SIPC immunoreacted with the anti-SIPC antibody (Fig. S1D). When probed in the same western blot, the antibody against SIPC recognised a band of identically high molecular mass (Fig. S1E). Because the western blot signals we were observing with the polyclonal antibody were generally weak (see Fig. S1C-E), we generated a mouse monoclonal antibody (mAb clone 1C4) against the same C-terminal epitope of SIPC and used it in western blot assays against lysates from A. amphitrite nauplii, cyprids and adults of different developmental stages (Fig. 1D). The results showed that this mAb reacted strongly with a band of \sim 96 kDa and less with a band of \sim 210 kDa, in addition to several other bands of smaller molecular masses (Fig. 1D). Immunoreactive bands were recorded exclusively at the cyprid stage and not in the nauplii stage (Fig. 1D). This observation effectively ended all our preliminary attempts to purify from cyprid homogenates and use the native SIPC in settlement assays because it showed that native SIPC exists in multiple subunits in cyprids as previously described (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006c; Ferrier et al., 2016). Realising that settlement assay results with the purified, native A. amphitrite SIPC can be potentially marred by the biological role of each of the 3 reported SIPC subunits (Matsumura et al., 1998b) versus the biological role of the fulllength protein, we expressed the full-length SIPC in heterologous expression systems. To obtain large amounts of the protein for settlement assays with A. amphitrite cyprids, we expressed the two forms of the recombinant protein (SpSIPC and SpVSIPC) in Sf9 cells and observed that both were secreted from these cells (Fig. 1E, Fig. S1F-H). Once again, bands of smaller molecular masses, similar to those described before (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006a), were immunoreactive with the N-terminally located myc-epitope, in agreement with results from another study (Zhang et al., 2016).

Settlement assays with recombinant SIPC

We tested the biological activity of purified recombinant SIPC (SpSIPC) in settlement assays with cyprids of *A. amphitrite* (Fig. 2A) using an established protocol (Dreanno et al., 2007). The results show that *A. amphitrite* cyprids behaved in a

bimodal fashion to the presence of SIPC, preferring to settle and metamorphose at lower concentrations of SIPC $(EC_{50}=3.73 \text{ nmol } 1^{-1})$ or preferring to avoid settlement at higher concentrations of SIPC (IC₅₀=101 nmol 1^{-1}) (Fig. 2B-D). The settlement or avoidance response of the animals was evident within 24 h in the presence of SIPC (Fig. 2A), so the calculations of effective concentrations of SIPC were done with the 24 h data (Fig. 2C,D). Peak settlement preference responses were recorded at a concentration of 25 nmol l-1 SpSIPC (Fig. 2A) and settlement avoidance responses were evident from a concentration of 50 nmol 1^{-1} SpSIPC onwards (Fig. 2A). Cyprids that did not metamorphose to juveniles were actively seeking a substrate to settle even after 96 h in the wells of the culture dishes (Fig. S2A) and there was no increase in mortality of the animals neither time-wise nor SIPC-concentration-wise (Fig. S2B). By plotting the percentage of cyprids that settled and metamorphose to juveniles (Fig. 2B, Fig. S2C), it is obvious that SIPC does not curtail, in any way, the developmental progression of barnacles. To rule out that the observed settlement avoidance by the animals at the highest range of SpSIPC concentrations (Fig. 2A,D) was not a potential artefact of our assay design, we carried out the same assays in the presence of BSA (Fig. S3A-D). The results showed that BSA at concentrations as high as 1 μ mol l⁻¹ had no settlement-inducing effect on cyprids and neither affected metamorphosis nor mortality (Fig. S3A-D). At a concentration of 10 μ mol 1⁻¹, BSA inhibited settlement of cyprids (Fig. S3A,B) with a calculated EC₅₀ of 3.69 μ mol 1⁻¹ at 24 h, a 36.5-fold higher concentration than the settlement avoidance response of the cyprids to SpSIPC. Because native SIPC has been shown to be a cyprid cuticle-bound protein (Zhang et al., 2016; Dreanno et al., 2006a), we tested whether recombinant SIPC is recognised by the cyprids as a surface-adhered moiety. When polystyrene plates were incubated with or without recombinant SIPC, only the wells that contained SpSIPC showed immunostaining (Fig. 2E). This immunostaining (Fig. 2E) was evident when cyprids were incubated for 96 h in polystyrene plates whereupon immunoreactive traces of native SIPC deposited by the cyprids could be detected on the surface of the plates (Fig. 2F). Western blots of the ASW where cyprids were incubated for 96 h showed that native SIPC is not a diffusible molecule (Fig. S4A). Furthermore, bacterial growth in the presence of recombinant SIPC did not mediate the settlement preference or avoidance behaviour of the cyprids (Fig. S4B).

To clarify whether PTMs of SIPC and not SIPC itself are responsible for the behaviour of cyprids, in the presence of SIPC, and identify which of its multiple domains is responsible for its biological activity, we generated truncated fragments of SIPC, maintaining the endogenous signal peptide, and expressed and purified the fragments from culture medium of HEK293 cells (Fig. 3A-D). The design of the fragments was based on a crystal structure simulation that we generated through i-TASSER (Zhang, 2008) that aided the choice of truncated fragment length. The process was iterative and informed by the bioinformatics analysis on the PTMs of SIPC (see Table S5 and Fig. S4C). The cumulative results (Fig. 3A-D) show that truncation of the first 212 amino acids results in a poorly secreted protein (Fig. 3C,D), an effect that was remedied when further truncations were made to the full-length SIPC (Fig. 3B-D). The apparent molecular masses of some of the various truncated SIPC fragments differed from their calculated molecular masses substantially but, as the size of the truncated fragments decreased, the apparent and calculated molecular masses became similar (Fig. 3A-D, Fig. S4D). As with the recombinant SIPC expressed in Sf9 cells (Fig. 2E), we tested the ability of all the

<u>Journal of Experimental Biology</u>



Fig. 2. Recombinant SIPC from *A. amphitrite* induces gregarious settlement preference or avoidance by cyprids of this species. (A) Recombinant SIPC transduces gregarious settlement preference and settlement avoidance behaviour by *A. amphitrite* cyprids in a dose-dependent manner. Values are expressed as the percentage of animals that settled from the total number of animals placed in a well of a 24-well tissue culture plate. The cumulative results from 3 independent experiments with 5 replicates each is shown. Results of one-way ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test between matched observations for the various time points revealed no statistical significance only between the datasets at 72 and 96 h (*P*>0.05). Results of one-way ANOVA with the Bonferonni's multiple comparisons test between control and the various concentrations of recombinant SIPC (SpSIPC) revealed statistical significance only between the 10 nmol I^{-1} , 25 nmol I^{-1} and 50 nmol I^{-1} concentrations of SpSIPC and the control group (*P*<0.05) in all 4 tested time points. (B) Recombinant SIPC promotes

metamorphosis of the settled A. amphitrite cyprids in a dose-dependent manner. Assay conditions and replicates are identical to A. For the percentage of animals that underwent metamorphosis, results of one-way ANOVA with the Tukey's multiple comparisons test between matched observations for the various time points revealed no statistical significance only between the datasets at 72 and 96 h (P>0.05). (C) Effective concentration of recombinant SIPC that induces gregarious settlement preference behaviour by A. amphitrite cyprids within 24 h. Assay conditions and replicates are identical to A and plotted separately for clarity. Results of one-way ANOVA with the Bonferonni's multiple comparisons test between control and the various concentrations of recombinant SIPC (SpSIPC) revealed statistical significance only between the 10 nmol I⁻¹, 25 nmol I⁻¹ and 50 nmol I⁻¹ concentrations of SpSIPC and the control group (P<0.05). (D) Effective concentration of recombinant SIPC that induces settlement avoidance behaviour by A. amphitrite cyprids within 24 h. Assay conditions and replicates are identical to A and plotted separately for clarity. Results of one-way ANOVA with the Bonferonni's multiple comparisons test between control and the various concentrations of recombinant SIPC (SpSIPC) revealed statistical significance only between the 50 nmol l⁻¹ and 150 nmol l⁻¹ concentrations of SpSIPC (P<0.05). (E) Recombinant SIPC adheres to the surface of polystyrene tissue culture plates used in settlement bioassays. Sterile tissue culture plates were incubated at 25°C empty (control) or with 0.3 ml of sterile artificial sea water (ASW) (Myc-Tag mAb) or with 0.3 ml of 10 µmol l⁻¹ BSA in sterile ASW or with 0.3 ml of 50 nmol I⁻¹ SpSIPC in sterile ASW. Solutions were then aspirated and western blotting carried out on the wells with a Myc-Tag (9B11) mAb. A typical image of several experiments (n=3) is shown. (F) A mouse anti-SIPC monoclonal antibody can detect native SIPC deposited by cyprids of A. amphitrite on the surface of polystyrene tissue culture plates used in settlement bioassays. Sterile tissue culture plates were incubated at 25°C without (control) or with 10 cyprids each in 2 ml sterile ASW for 96 h. Solutions and settled and non-settled cyprids were then removed and western blots were carried out on the wells with a mouse anti-SIPC monoclonal antibody. The bright-field images on the lower row contain drawn circles that show the position of the settled cyprids on each well, whereas the upper row shows the corresponding immunostained image. A typical image of several experiments (n=6) is shown.

truncated SIPC fragments to adhere to polystyrene plates (Fig. S4E). The results revealed that truncated SIPC fragments Tr.1 to Tr.3 adhere to the surface of polystyrene plates, while Tr.6 to Tr.9 do not (Fig. S4E).

We tested the settlement of cyprids against the truncated fragments of SIPC and observed that removal of the N-terminal 482 amino acids made the cyprids avoid settlement (Table 1, Fig. S5), whereas truncated fragments up until the N-terminal 482 amino acids made cyprids exhibit settlement preference rather than avoidance (Table 1, Fig. S5). The settlement avoidance behaviour was consistent even for the small C-terminal fragment of SIPC (Table 1, Fig. S5), which contains the receptor-binding domain of α 2-macroglobulin [*A*2*M*_*recep* (PF07677.13)], the protein that is phylogenetically related to SIPC (Dreanno et al., 2006c) (Fig. S4C).

PTMs of recombinant SIPC

We plotted the differences in the apparent and calculated molecular mass of recombinant SIPC and its truncated fragments from several western blots in an attempt to map the location of PTMs on the

primary structure of SIPC (Fig. 4A). Informed by a previous analysis of the N-linked glycosylations on native SIPC (Pagett et al., 2012), and by our bioinformatics analysis on the location of any PTMs on SIPC (see Table S5), we carried out deglycosylation assays on recombinant SIPC and selected truncated SIPC fragments (Fig. 4B-D) that would allow us to determine where such PTMs are located. We used a deglycosylation assay that provides more extensive removal of glycans (Fig. 4D) than previously reported with PNGase F, which removes only N-linked glycans (Pagett et al., 2012). Deglycosylation of the full-length SIPC reduced the molecular mass of the protein by 22.27±1.35 kDa (Fig. 4B, Table S6), while deglycosylation of Tr.5, Tr.6 and Tr.7 reduced the molecular mass of the fragments by 11.33±2.17, 13.91±1.83 and 7.04±1.24 kDa, respectively (Fig. 4C). We re-analysed the data presented in a previous study, in which the molecular nature and relative abundance of N-linked glycans, cleaved from native SIPC with PNGase F, was determined (Pagett et al., 2012), and found that N-linked glycans present on the native protein have a molecular mass of 14.7 kDa (Table S6).



Fig. 3. Design and expression of truncated SIPC fragments. (A) Graphical representation of the truncated SIPC fragments showing the protein length and the post-translational modifications identified by our bioinformatic analysis. Tr.1-Tr.9, truncated SIPC fragments 1 to 9. (B) Expression of recombinant SIPC and its truncated fragments in HEK293 cells. Each lane contains 10 µg of total cellular protein. Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image of several blots (n=3) is shown. (C) Secretion of recombinant SIPC and its truncated fragments by HEK293 cells. Each lane contains 20 μl of cell culture medium. Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image, which corresponds to the samples shown in B, is shown. (D) Secretion of recombinant SIPC and its truncated fragments by HEK293 cells. Each lane contains 20 µl of cell culture medium. Western blots were probed with an anti-myc antibody and proteins were resolved less than C to include truncated fragments Tr.8 and Tr.9. Sf9-SpSIPC, recombinant SIPC secreted from Sf9 cells; VSIPC, Venus-tagged recombinant SIPC secreted from HEK293 cells.

are larger than Tr.4 (i.e. Tr.2 and Tr.3) and also in a region in the middle of the primary structure of the protein (Fig. 3A). Such *O*-linked glycans may contribute an additional 8 kDa cumulatively to the full-length SIPC (see Tables S5 and S6 for details). The overall results, shown as a Circos figure (Krzywinski et al., 2009) (Fig. 4E), depict the relative contribution of each putative *N*-linked, *O*-linked or other simple glycans on the increase in the molecular mass of SIPC and its truncated fragments. The plot was created by a combination of bioinformatic analysis, western blots analysis, deglycosylation assays and previously published data (Pagett et al., 2012) to show how *N*-linked or *O*-linked glycans alter the molecular mass of full-length SIPC or its truncated fragments. The data table that was used to generate the Circos plot and the plot parameters are provided in Dataset 1.

DISCUSSION

SIPC (Dreanno et al., 2007; Matsumura et al., 1998b) serves as a mate-discerning (Dreanno et al., 2007) and mate-assessing (Matsumura et al., 1998b; Pagett et al., 2012) chemical cue but also serves as a predator-attracting chemical cue (Ferrier et al., 2016; Zimmer et al., 2016). In this context, and balancing the trade-off between reproduction and predation, having both settlement preference and avoidance cues conveyed by the same protein, i.e. SIPC, may be advantageous for barnacles because it will inform them of mate availability when the chemical cue is sparse enough to

Table 1. Recombinant SIPC (rSIPC) or its truncated fragments transduce gregarious settlement preference or settlement avoidance behaviour by *A. amphitrite* cyprids

rSIPC and truncated SIPC	Settlement preference	Settlement avoidance
fragments (see Fig. 3A)	EC ₅₀ (nmol I ⁻¹)	EC ₅₀ (nmol I ⁻¹)
SIPC (rSIPC)	1.56	-
Tr.1	1.19	-
Tr.2	1.49	-
Tr.3	26.6	-
Tr.4	14.1	-
Tr.5	-	10.8
Tr.6	-	12.4
Tr.7	-	4.75
Tr.8	-	14.2
Tr.9	-	550

Settlement preference and avoidance EC_{50} values are derived from dose– response curves shown in Fig. S5 and were calculated using GraphPad Prism v.6. Values were computed from the percentage of animals that settled within 24 h from the total number of animals placed in a well of a 24-well tissue culture plate. The cumulative results from 2 independent experiments with 4 replicates each is shown. See Fig. S5 for further details.



Fig. 4. Post-translational modifications of SIPC. (A) Differences between the apparent and calculated molecular mass of SIPC and its truncated fragments. Analysis by ImageJ software of several western blots (n=3-7) is shown. (B) Deglycosylation assays of recombinant SIPC secreted by Sf9 cells. Each lane contains 20 µl of cell culture medium. Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image of several blots (n=3) is shown. L, protein ladder; 1 and 2, SpSIPC culture medium; 3, SpSIPC culture medium after deglycosylation assay in non-denaturing reaction conditions; 4, SpSIPC culture medium after deglycosylation assay in denaturing reaction conditions. (C) Deglycosylation assays in non-denaturing reaction conditions of recombinant SIPC fragments secreted by HEK293 cells. Each lane contains 20 µl of cell culture medium. Western blots were probed with an anti-myc antibody and a typical image of several blots (n=3) is shown. L, protein ladder; 1, Tr.5 culture medium; 2, Tr.5 culture medium after deglycosylation; 3, Tr.6 culture medium; 4, Tr.6 culture medium after deglycosylation; 5, Tr.7 culture medium; 6, Tr.7 culture medium after deglycosylation. Arrows indicate the migration of the bands before and after the deglycosylation reaction. (D) Differences between the calculated, apparent and deglycosylated molecular masses of SIPC and selected truncated SIPC fragments. Analysis by ImageJ software of the migration of recombinant SIPC or the truncated SIPC fragments and calibration with the standard molecular mass of the protein ladder from several western blots (n=3) is shown. For each protein (x-axis), its calculated molecular mass is the left bar, its apparent molecular mass is the middle bar and its deglycosylated molecular mass is the right bar. Results from paired t-tests with Welch's correction [shown with an asterisk (*)] indicate that deglycosylation resulted in statistically significant (P<0.05) decreases in the apparent molecular mass of all tested truncated fragments and the full-length SIPC. (E) Circos plot showing the relative contribution of different post-translational modifications (PTMs), identified on SIPC or its truncated fragments, to the difference between the apparent and calculated molecular mass of each protein. Percentage values are related to kDa. See Dataset 1 for details. (F) Crystal structure simulation of SIPC showing the locations of N-linked glycosylations (dark blue spheres) that could be experimentally predicted in this study. The N-terminal domains of SIPC that induce gregarious settlement behaviour by A. amphitrite cyprids are shown in green. The C-terminal domains of SIPC that induce settlement avoidance by A. amphitrite cyprids are shown in red.

ensure reproductive success without reproductive competition, and will inform them of reproductive competition and potential predation when the chemical cue is abundant.

We show here that a recombinant form of SIPC from *A. amphitrite* serves such a dual role because it transduces both settlement preference and settlement avoidance cues to cyprids of

this species in a dose-dependent manner in laboratory conditions (Fig. 2). The settlement preference behaviour in the presence of endogenous SIPC has been recorded before (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2006c; Pagett et al., 2012) with a reported EC_{50} of 102 nmol l^{-1} for settlement preference (Pagett et al., 2012),

 EC_{50} of 102 nmol 1⁻⁺ for settlement preference (Pagett et al., 2012), but possibly the amounts of protein needed to produce a full-range
dose response precluded the observation of settlement avoidance behaviour. In addition, positive-settlement-directed purification of *B. glandula* MULTIFUNCin, an orthologue of *A. amphitrite* SIPC (Ferrier et al., 2016), showed that the 199 kDa full-length MULTIFUNCin and its 98 kDa N-terminal subunit possess settlement-inducing biological activity, but no data are available for the 88 kDa and the 76 kDa subunits of either MULTIFUNCin (Ferrier et al., 2016) or SIPC (Matsumura et al., 1998b; Dreanno et al., 2007).

By engineering a secreted recombinant SIPC, we obtained a complete picture of the response of *A. amphitrite* cyprids to the presence of SIPC (Figs 1 and 2). To achieve this, we had to replace the signal peptide sequence of endogenous SIPC (Fig. 1, Fig. S1), a result that agrees with previous suggestions that SIPC may not be an actively secreted protein in *A. amphitrite* but rather a deposited protein (Zhang et al., 2016; Dreanno et al., 2006a) present on their cuticle (Crisp and Meadows, 1962; Dreanno et al., 2006a,c) as well as a part of the temporary adhesive that these animals use in their plankto-benthic transition (Dreanno et al., 2006b).

The presence of PTMs on SIPC has been postulated ever since its discovery (Dreanno et al., 2006c) and further research has shown that glycans, such as mannose (Pagett et al., 2012), stimulate settlement of A. amphitrite cyprids (Matsumura et al., 1998a). Furthermore, the large difference between the apparent and calculated molecular mass of SIPC is an argument in favour of data that showed that PTMs (i.e. N-linked glycans) bring about the settlement preference response of A. amphitrite cyprids (Pagett et al., 2012) (Fig. 2A), so it can be argued that recombinant SIPC itself does not have a biological activity. Bioinformatic analysis of the SIPC primary sequence showed that there are several putative N-linked glycosylation sites and many O-linked glycosylation sites on SIPC (Table S5). We also identified several other putative PTM consensus sequences on SIPC (such as SUMOylation, ubiquitination or palmitoylation sites), but these modifications are reversible and we have not observed either full-length recombinant SIPC or its truncated fragments to migrate in western blots as more than one band (Figs 1 and 3). It should be noted that Tr.9 showed a consistently (n=4) high difference of ~ 20 kDa between the observed and calculated molecular mass for reasons we cannot, at present, explain (Fig. 4A,E). The same applies to the difference in the observed and calculated molecular mass of SIPC and VSIPC, which contain an additional ~15 kDa in mass that seems to be associated with the N-terminal 282 amino acids of the protein. This additional mass of ~ 15 kDa may not be a protein because our LC-MS/MS analysis on SDS-PAGE gel-isolated purified recombinant SIPC from Sf9 cells (Fig. S4F) yielded no evidence of conjugation of SIPC with proteins of small molecular mass that would explain this ~ 15 kDa difference (Table S6). Nevertheless, this additional entity of ~ 15 kDa does not seem to contribute to the settlement response of cyprids because the settlement assays showed that exclusion of the N-terminal 245 amino acids of SIPC does not

change the settlement response of cyprids (Table 1, Fig. S5). Based on the apparent molecular mass of the truncated SIPC fragments, the deglycosylation assays and previous data (Pagett et al., 2012), some of the putative PTMs could not be supported by our experimental results (Tables S5 and S6, Fig. 4A). For example, *N*-linked glycosylation sites at the C-terminus of recombinant SIPC do not seem to contain *N*-linked glycans, because a truncated SIPC fragment (Tr.8) has an apparent molecular mass equivalent to its calculated (Fig. 4A, Table S6), whereas Tr.7, when deglycosylated, does not yield a molecular mass reduction that would justify the existence of *N*-linked glycans at the C-terminus of SIPC (Fig. 4A, D). The same is true for deglycosylated fragments Tr.5 and Tr.6, which contain only two *N*-linked glycosylation sites (Fig. 4A–D).

Research on the PTMs of SIPC showed that high mannose-type oligosaccharides are present on SIPC and mannose can induce settlement by the cyprids (Pagett et al., 2012), an indication that glycans that are present on SIPC influence the settlement preference response. We suggest that, if indeed *N*-linked glycans contribute to the settlement-inducing activity of SIPC, then these glycans should be located at the N-terminal 600 amino acids of SIPC and more specifically at asparagines 263, 285, 289, 302 and 305 of

A. amphitrite recombinant SIPC (Figs 3A and 4F). Barnacles can discriminate between conspecific and allospecific SIPC in gregarious settlement assays (Dreanno et al., 2007; Crisp and Meadows, 1962) and the SIPC proteins identified so far from various barnacle species (Yorisue et al., 2012) have conserved *N*-linked glycosylation sites. Clearly deserving further investigation by site-directed mutagenesis of the *N*-linked glycosylation sites of SIPC, we posit that *N*-linked glycans on SIPC (Pagett et al., 2012) must play an auxiliary rather than decisive role in the gregarious settlement of the cyprids. Putative *N*-linked glycosylation sites are present at the C-terminus of SIPC (Fig. 4F), but these sites may be non-glycosylated, based on the apparent molecular mass of truncated SIPC fragments (Figs 3A and 4A) and our deglycosylation assays (Fig. 4B,C).

The bimodal response of barnacles to our engineered, recombinant form of SIPC shows that the settlement behaviour, and thereby the reproductive success, of these sessile species is a conspecific cue-guided response. We propose that, to avoid reproductive competition and possible predation, barnacles will not settle if conspecific cues inform of overcrowding but will settle gregariously when conspecific cues are sparse.

To clarify how SIPC transduces such bimodal responses at the molecular level, one would need to identify its endogenous receptor in *A. amphitrite*. Although complex ligand-receptor responses, dependent on receptor expression, have been recently documented in other cellular systems (Jenni et al., 2015; Fathi et al., 2016), the absence of the genomic sequence of *A. amphitrite* and the limited available transcriptomic data make any attempt to explain at the molecular level the bimodal response of cyprids to SIPC highly speculative, at present.

Acknowledgements

We thank Dr R. Kirby and Dr A. Clare for the generous gift of a vector containing the cDNA of SIPC from A. amphitrite.

Competing interests

The authors declare no competing or financial interests.

Author contributions

Conceptualization: M.K., S.G.D.; Methodology: M.K., M.P., S.M., M.Z., D.V., I.K., M.S., S.G.D.; Software: M.K., S.G.D.; Validation: M.K., M.P., S.M., S.G.D.; Formal analysis: M.K., M.P., S.M., M.Z., S.G.D.; Investigation: M.K., M.P., S.M., S.G.D.; Resources: M.K., M.Z., D.V., I.K., M.S., S.G.D.; Data curation: M.K., M.P., M.Z., S.G.D.; Writing - original draft: S.G.D.; Writing - review & editing: M.K., S.G.D.; Visualization: M.K., M.P., S.M., M.Z., S.G.D.; Supervision: S.G.D.; Project administration: S.G.D.; Funding acquisition: S.G.D.

Funding

Research reported in this publication was supported from funds by the National and Kapodistrian University of Athens under award number Kapodistrias:11240 and by the GSRT-EPANII-11SYN-5-1274 'Maripaints' research grant from the Greek General Secretariat for Research and Technology (GSRT) and the European Social Fund (ESF).

Data availability

The mass spectrometry proteomics data and search results have been deposited to the ProteomeXchange with the project accession: PXD006858 and project doi:10.6019/PXD006858.

Supplementary information

Supplementary information available online at http://jeb.biologists.org/lookup/doi/10.1242/jeb.185348.supplemental

References

- Aldred, N. and Clare, A. S. (2008). The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. *Biofouling* 24, 351-363.
- Barnes, H. and Barnes, M. (1977). Studies on the reproduction of cirripedes. I. Introduction: copulation, release of oocytes, and formation of the egg lamellae. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 27, 195-218.
- Baxter, R. H. G., Chang, C.-I., Chelliah, Y., Blandin, S., Levashina, E. A. and Deisenhofer, J. (2007). Structural basis for conserved complement factor-like function in the antimalarial protein TEP1. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 104, 11615-11620.
- Bernard, F. J. and Lane, C. E. (1962). Early settlement and metamorphosis of the barnacle Balanus amphitrite niveus. J. Morphol. 110, 19-39.
- Caromile, L. A., Oganesian, A., Coats, S. A., Seifert, R. A. and Bowen-Pope,
 D. F. (2010). The neurosecretory vesicle protein phogrin functions as a phosphatidylinositol phosphatase to regulate insulin secretion. *J. Biol. Chem.* 285, 10487-10496.
- Costlow, J. D. (1956). Shell development in Balanus improvisus Darwin. J. Morphol. 99, 359-415.
- Crisp, D. J. (1961). Territorial behaviour in Barnacle settlement. J. Exp. Biol. 38, 429-446.
- Crisp, D. J. and Meadows, P. S. (1962). The chemical basis of gregariousness in cirripedes. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 156, 500-520.
- Darwin, C. (1854). A monograph on the sub-class Cirripedia, with figures of all the species. The Balanidae (or sessile cirripedes); the Verrucidae, etc., etc., etc. London: Ray Society.

Dreanno, C., Kirby, R. R. and Clare, A. S. (2006a). Locating the barnacle settlement pheromone: spatial and ontogenetic expression of the settlement-inducing protein complex of Balanus amphitrite. *Proc. R. Soc. B* 273, 2721-2728.

- Dreanno, C., Kirby, R. R. and Clare, A. S. (2006b). Smelly feet are not always a bad thing: the relationship between cyprid footprint protein and the barnacle settlement pheromone. *Biol. Lett.* 2, 423-425.
- Dreanno, C., Matsumura, K., Dohmae, N., Takio, K., Hirota, H., Kirby, R. R. and Clare, A. S. (2006c). An α2-macroglobulin-like protein is the cue to gregarious settlement of the barnacle Balanus amphitrite. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 103, 14396-14401.
- Dreanno, C., Kirby, R. R. and Clare, A. S. (2007). Involvement of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC) in species recognition at settlement. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 351, 276-282.
- Fathi, S., Nayak, C. R., Feld, J. J. and Zilman, A. G. (2016). Absolute ligand discrimination by dimeric signaling receptors. *Biophys. J.* 111, 917-920.
- Ferrier, G. A., Kim, S. J., Kaddis, C. S., Loo, J. A., Ann Zimmer, C. and Zimmer, R. K. (2016). MULTIFUNCin: a multifunctional protein cue induces habitat selection by, and predation on, Barnacles. *Integr. Comp. Biol.* 56, 901-913.
- Goedhart, J., von Stetten, D., Noirclerc-Savoye, M., Lelimousin, M., Joosen, L., Hink, M. A., van Weeren, L., Gadella, T. W. J. and Royant, A. (2012). Structureguided evolution of cyan fluorescent proteins towards a quantum yield of 93%. *Nat. Commun.* 3, 751.
- Hellio, C., Simon-Colin, C., Clare, A. and Deslandes, E. (2004). Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, Grateloupia turuturu, inhibit settlement of Balanus amphitrite cyprid larvae. *Biofouling* 20, 139-145.
- Hellio, C., Tsoukatou, M., Maréchal, J.-P., Aldred, N., Beaupoil, C., Clare, A. S., Vagias, C. and Roussis, V. (2005). Inhibitory effects of mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle Balanus amphitrite. *Mar. Biotechnol.* 7, 297-305.
- Høeg, J. T. and Møller, O. S. (2006). When similar beginnings lead to different ends: constraints and diversity in cirripede larval development. *Invertebr. Reprod. Dev.* 49, 125-142.
- Huang, K.-Y., Su, M.-G., Kao, H.-J., Hsieh, Y.-C., Jhong, J.-H., Cheng, K.-H., Huang, H.-D. and Lee, T.-Y. (2016). dbPTM 2016: 10-year anniversary of a resource for post-translational modification of proteins. *Nucleic Acids Res.* 44, D435-D446.
- Jenni, S., Goyal, Y., von Grotthuss, M., Shvartsman, S. Y. and Klein, D. E. (2015). Structural basis of neurohormone perception by the receptor tyrosine kinase torso. *Mol. Cell* 60, 941-952.
- Köhler, G. and Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256, 495.
- Krzywinski, M., Schein, J., Birol, I., Connors, J., Gascoyne, R., Horsman, D., Jones, S. J. and Marra, M. A. (2009). Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res.* 19, 1639-1645.
- Lau, S. C. K. and Qian, P.-Y. (2000). Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle Balanus amphitrite amphitrite darwin. *Biofouling* 16, 47-58.

- Lucas, M. I., Walker, G., Holland, D. L. and Crisp, D. J. (1979). An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of Balanus balanoides (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Biol.* 55, 221-229.
- Matsumura, K., Mori, S., Nagano, M. and Fusetani, N. (1998a). Lentil lectin inhibits adult extract-induced settlement of the barnacle, Balanus amphitrite. *J. Exp. Zool*, 280, 213-219.
- Matsumura, K., Nagano, M. and Fusetani, N. (1998b). Purification of a larval settlement-inducing protein complex (SIPC) of the barnacle, Balanus amphitrite. *J. Exp. Zool.* 281, 12-20.
- Nagai, T., Ibata, K., Park, E. S., Kubota, M., Mikoshiba, K. and Miyawaki, A. (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat. Biotech.* 20, 87-90.
- O'reilly, D. R., Kelly, T. J., Masler, E. P., Thyagaraja, B. S., MOY Robson, R., Shaw, T. C. and Miller, L. K. (1995). Overexpression of Bombyx mori prothoracicotropic hormone using baculovirus vectors. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 25, 475-485.
- Pagett, H. E., Abrahams, J. L., Bones, J., O'Donoghue, N., Marles-Wright, J., Lewis, R. J., Harris, J. R., Caldwell, G. S., Rudd, P. M. and Clare, A. S. (2012). Structural characterisation of the N-glycan moiety of the barnacle settlementinducing protein complex (SIPC). J. Exp. Biol. 215, 1192-1198.
- Pejaver, V., Hsu, W.-L., Xin, F., Dunker, A. K., Uversky, V. N. and Radivojac, P. (2014). The structural and functional signatures of proteins that undergo multiple events of post-translational modification. *Protein Sci.* 23, 1077-1093.
- Phang, I. Y., Chaw, K. C., Choo, S. S. H., Kang, R. K. C., Lee, S. S. C., Birch, W. R., Teo, S. L. M. and Vancso, G. J. (2009). Marine biofouling field tests, settlement assay and footprint micromorphology of cyprid larvae of Balanus amphitrite on model surfaces. *Biofouling* 25, 139-147.
- Rittschof, D. (1990). Peptide-mediated behaviors in marine organisms Evidence for a common theme. J. Chem. Ecol. 16, 261-272.
- Rittschof, D. and Cohen, J. H. (2004). Crustacean peptide and peptide-like pheromones and kairomones. *Peptides* 25, 1503-1516.

Rittschof, D., Branscomb, E. S. and Costlow, J. D. (1984). Settlement and behavior in relation to flow and surface in larval barnacles, Balanus amphitrite Darwin. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 82, 131-146.

- Rittschof, D., Clare, A. S., Gerhart, D. J., Mary, S. A. and Bonaventura, J. (1992). Barnacle in vitro assays for biologically active substances: toxicity and Settlement inhibition assays using mass cultured Balanus amphitrite amphitrite darwin. *Biofouling* 6, 115-122.
- Rittschof, D., Lai, C.-H., Kok, L.-M. and Teo, S. L.-M. (2003). Pharmaceuticals as antifoulants: concept and principles. *Biofouling* 19, 207-212.
- Shi, X. and Jarvis, D. (2007). Protein N-glycosylation in the Baculovirus-insect cell system. Curr. Drug Targets 8, 1116-1125.
- Thiyagarajan, V., Harder, T. and Qian, P.-Y. (2002). Effect of the physiological condition of cyprids and laboratory-mimicked seasonal conditions on the metamorphic successes of Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 274, 65-74.
- Vizcaío, J. A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dianes, J. A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T. et al. (2016). 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447-D456.
- Wasmeier, C. and Hutton, J. C. (1996). Molecular cloning of Phogrin, a proteintyrosine phosphatase homologue localized to insulin secretory granule membranes. J. Biol. Chem. 271, 18161-18170.
- Yorisue, T., Matsumura, K., Hirota, H., Dohmae, N. and Kojima, S. (2012). Possible molecular mechanisms of species recognition by barnacle larvae inferred from multi-specific sequencing analysis of proteinaceous settlementinducing pheromone. *Biofouling* 28, 605-611.
- Yule, A. B. and Crisp, D. J. (1983). Adhesion of cypris larvae of the barnacle, Balanus balanoides, to clean and arthropodin treated surfaces. J. Mar. Biol. Assoc. UK 63, 261-271.
- Yule, A. B. and Walker, G. (1985). Settlement of balanus balanoides: the effect of cyprid antennular secretion. J. Mar. Biol. Assoc. UK 65, 707-712.
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9, 40.
- Zhang, G., Yang, X.-X., Leung, P. M., He, L.-S., Chan, T. Y., Yan, G.-Y., Zhang, Y., Sun, J., Xu, Y. and Qian, P.-Y. (2016). Secretory locations of SIPC in Amphibalanus amphitrite cyprids and a novel function of SIPC in biomineralization. Sci. Rep. 6, 29376.
- Zimmer, R. K., Ferrier, G. A., Kim, S. J., Kaddis, C. S., Zimmer, C. A. and Loo, J. A. (2016). A multifunctional chemical cue drives opposing demographic processes and structures ecological communities. *Ecology* 97, 2232-2239.
- Zobell, C. (1941). Studies on marine bacteria. I. The cultural requirements of heterotrophic aerobes. J. Mar. Res. 4, 42-75.





Biofouling The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research

ISSN: 0892-7014 (Print) 1029-2454 (Online) Journal homepage: http://www.tandfonline.com/loi/gbif20

Probing the settlement signals of Amphibalanus amphitrite

Mado Kotsiri, Maria Protopapa, Gesthimani-Myrto Roumelioti, Athena Economou-Amilli, Eleni K. Efthimiadou & Skarlatos G. Dedos

To cite this article: Mado Kotsiri, Maria Protopapa, Gesthimani-Myrto Roumelioti, Athena Economou-Amilli, Eleni K. Efthimiadou & Skarlatos G. Dedos (2018): Probing the settlement signals of Amphibalanus amphitrite, Biofouling, DOI: 10.1080/08927014.2018.1465566

To link to this article: https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1465566

+

View supplementary material



Published online: 24May 2018.

C	
н	
L	

Submit your article to this journal $\ensuremath{\mathbb{C}}$



Article views: 45



View related articles 🖸

View Crossmark data

Full Terms & Conditions of access and use can be found at http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=gbif20

Check for updates

Probing the settlement signals of Amphibalanus amphitrite

Mado Kotsiri^a, Maria Protopapa^a, Gesthimani-Myrto Roumelioti^a, Athena Economou-Amilli^a, Eleni K. Efthimiadou^b and Skarlatos G. Dedos^a

^aDepartment of Biology, national and Kapodistrian university of Athens, Athens, greece; ^bDepartment of Chemistry, national and Kapodistrian university of Athens, Athens, greece

ABSTRACT

To achieve their reproductive potential, barnacles combine tactile exploration of surface structural properties and integration of cellular signals originating from their antennular sensory setae within a developmentally defined, temporally narrow window of settlement opportunity. Behavioural assays with cyprids coupled with biometric analysis of scanning electron microscopy-acquired images in the presence of specific chemical compounds were used to investigate how settlement on a substratum is altered in response to the presence of these compounds. Impeding tactile exploration was shown which altered cellular signalling and/or induced malformation of anatomical features of the antennular sensory setae, which disrupted the settlement behaviour of the model barnacle species *Amphibalanus amphitrite*. It is concluded that surface exploration by the cyprids relies on mechanical and nociception-related and calcium-mediated signals while a protein kinase C signalling cascade controls the timely metamorphosis of the cyprids to sessile juveniles.

Abbreviations: BITC: benzyl isothiocyanate; JHAMT: juvenile hormone acid O-methyltransferase; JH: juvenile hormone; 20E: 20-hydroxyecdysone; MF: methyl farnesoate; PDE: 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases; ASW: artificial sea water; SEM: scanning electron microscopy; AD: attachment disc; ADS: axial disc seta; AS2–4: antennular segments 2–4; Bp: basis; CH: cuticular basal hair; FP: frontal horn pore; FF: frontal filament; PRS2: preaxial seta 2; PS2–3: postaxial setae 2–3; RDS3–5: radial disc setae 3–5; STS1-4: subterminal setae 1–4; Th1–6: thoracopods 1–6; TS-A–E: terminal setae A–E

Introduction

Much less studied in barnacles (Høeg et al. 2015), but firmly established in insects (Hartenstein and Chipman 2015), hormonal regulation of metamorphic events dominates the life cycles of arthropods. The interplay between juvenile hormone (JH) and ecdysteroids, as first established in insects, has also been found to apply to sessile arthropods including barnacles (Yamamoto, Kawaii, et al. 1997; Aldred and Clare 2008; Høeg et al. 2015). Research on a model cirripede species, Amphibalanus (=Balanus) amphitrite (Clare and Høeg 2008), showed that methyl farnesoate (MF), a structural variant of insect JH III (Yamamoto, Okino, et al. 1997; Smith et al. 2000) or 20-hydroxyecdysone(20E)(Clareetal. 1992; Yamamoto, Kawaii, et al. 1997) produce a concentration-dependent effect on the development of cyprids of A. amphitrite and impede, in the case of MF, their settlement behaviour by inducing developmental abnormalities (Yamamoto, Kawaii, et al. 1997). Conversely, in the case of 20E,

acceleration of settlement behaviour is observed which expedites their metamorphic process (Clare et al. 1992). These two hormones regulate temporal gene expression events that determine the phenotypic outcome of the metamorphic event, but very little is known in barnacles about the signalling cascades that modulate or are modulated by the titres of these hormones. The process of surface exploration and the ensuing metamorphosis bears a striking resemblance to the wandering and cocoon spinning process of insects, which is soon followed by pupal metamorphosis, with the exception that the cyprid stage in barnacles is equivalent to the pupal stage of insects. This analogy helps as a paradigm shift in creating a universal concept of arthropod development.

Research employing chemical agents that activate or inhibit components of certain signalling cascades (Clare et al. 1992, 1994; Yamamoto et al. 1995; Smith et al. 2000), suggests that there are elements of cellular regulation of gene expression that underlie the overt effects of JH

© 2018 informa uK limited, trading as Taylor & francis group

ARTICLE HISTORY

Received 23 february 2018 Accepted 11 April 2018

KEYWORDS

Amphibalanus amphitrite; barnacles; ecdysteroids; juvenile hormone; biofouling; metamorphosis

CONTACT Skarlatos g. Dedos Sdedos@biol.uoa.gr

The supplemental material for this paper is available online at https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1465566

and 20E on barnacles. One intriguing example is phorbol 12-myristate 13-acetate (Hartenstein and Chipman 2015), a known activator of protein kinase C, which induces metamorphosis of cyprids without attachment to a substratum (Yamamotoet al. 1995; Glenner and Brodin 2009). Such cellular regulation of gene expression may be the target of chemical agents such as the vast number of natural antifouling (AF) compounds, and synthetic AF compounds (Almeida and Vasconcelos 2015), which have a documented inhibitory effect on cyprid settlement but unknown mode of action (Almeida and Vasconcelos 2015). Moreover, given the mechanistic aspects of substratum exploration by cyprids (Maruzzo et al. 2011, 2012), it is increasingly accepted that cyprids rely on sensory mechanoreceptive and chemoreceptive signals to decode the status of their exploratory stage into cellular cascades of events that regulate gene expression and culminate in metamorphosis, on average 32 h after irreversible settlement on a substratum (Maruzzo et al. 2012).

To this end, of lesser interest, but equally intriguing as a prospect of identifying novel AF compounds, is the ability of noxious compounds to impede the settlement of cyprids on substrata and thereby delay or even cancel the cascade of events that lead to metamorphosis. Such a prospect has been suggested by research on the ability of capsaicin or its analogues (Xu et al. 2005; Peng et al. 2012) or other natural products (Holm 2012; Qian et al. 2013, 2015) to prevent settlement of A. amphitrite. However, apart from reports on the use of capsaicin as a repellent of barnacle settlement (Xuetal. 2005; Pengetal. 2012), there is little evidence that other noxious compounds (Almeida and Vasconcelos 2015) can elicit settlement avoidance behaviour, despite the wealth of data on the precise mechanisms of tactile surface exploration by cyprids (Høeg and Møller 2006; Bielecki et al. 2009; Maruzzo et al. 2011, 2012; Aldred et al. 2013). Cyprids employ antennular sensory setae on the second, third and fourth antennular segments as bimodal receptors with both chemo- and mechano-receptive modalities (Maruzzo et al. 2011). The precise mechanism of settlement preference or avoidance upon tactile exploration in the presence of noxious compounds, although akin to the behavioural response of Drosophila melanogaster to noxious stimuli (Al-Anzi et al. 2006), is currently not well understood given that there is still no molecular evidence for the existence of nociceptive channels in A. amphitrite, and no such data exist on the infraclass Cirripedia at all.

Putting together all these fundamental studies, the question was whether chemical agents that can modulate the activity of nociceptive neuronal circuits on the attachment discs and antennular sensory setae of *A. amphitrite* can impact on the settlement of the cyprids to a substratum. To address this question, scanning electron

microscopy (SEM), settlement assays and a repertoire of known chemical compounds were combined in order to examine and distinguish whether the ability of the cyprids to settle is a result of anatomical malformations, signal transduction activation or mechano- and chemo-sensitive perception.

Materials and methods

Animals

Adult A. amphitrite (Cirripedia, Balanidae) were collected from boat docks at Port Mikrolimano and Floisvos, Athens. Animals were cleaned of epibionts with a small hard brush and meticulously identified as individuals of the species (Costlow 1956; Bernard and Lane 1962). Adult barnacles were kept in separate aerated glass tanks (201) containing 200 µm-filtered natural seawater at 27°C and a 12:12 L:D photoperiod. Tanks were fed 24 h hatched nauplii of Artemia sp. (Class: Branchiopoda) and the algae *Tetraselmis suecica* (Class: Chlorodendrophyceae) and Skeletonema costatum (Class: Bacillariophyceae) each day and the seawater was changed on alternate days. Upon stress in order to induce egg hatching of brooded embryos (24 h exposure to air or immersion in fresh water for 5 h), adults were returned to seawater for larval release. Hatched nauplii were attracted to a point light source, collected and placed into a beaker containing 2 or 31 of 0.7 µm GF/F (Whatman-GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK)-filtered natural seawater at a density of ~1–2 nauplii ml⁻¹ with gentle aeration. Nauplii were maintained at 27°C at a 12:12 L:D photoperiod on a diet of *Chaetoceros gracilis* (Class: Bacillariophyceae) provided at a density of 2×10^5 cells ml⁻¹ (Matsumura et al. 1998; Thiyagarajan et al. 2002). Under these conditions, nauplii metamorphosed to cyprids in five days and the cyprid stage lasted for two days before metamorphosis to juveniles. For behavioural assays, aliquots of newly metamorphosed cyprids were collected with a wide-mouthed Pasteur pipette and aged at 4°C (Harder et al. 2001; Phang et al. 2009) for one day prior to use in behavioural assays. Only batches of cyprids that were active and had numerous oil cells, representing energy reserves (Lucas et al. 1979; West and Costlow 1988), were used in behavioural assays.

Behavioural bioassays

Assays were conducted by adding 12 cyprids into individual wells of a 24-well polystyrene sterile microplate (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium) with 2 ml of artificial seawater (ASW) (25%) and various concentrations of the chemical compounds named below. Experiments were repeated at least two times with five

replicates for each concentration of any given compound (n = 100 cyprids). Cyprids were incubated for 72 h in the presence of 20-hydroxyecdysone (20E; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), fenoxycarb (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; Calbiochem, Darmstadt, Germany), a protein kinase C inhibitor, Gö6976 (Calbiochem), thapsigargin (Tocris Bioscience, Bristol, UK), ionomycin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), an extracellular signal-regulated kinase (ERK) inhibitor, U0126 (Calbiochem), forskolin (Serva, Heidelberg, Germany), 3-isobutyl 1-methylxanthine (IBMX; Sigma-Aldrich), a stable cAMP analogue, SpcAMPS (Calbiochem), a protein kinase A inhibitor, KT5720 (Cayman Chemical), capsaicin (Cayman Chemical), yoda1 (Tocris Bioscience) and benzyl isothiocyanate (BITC; Sigma-Aldrich). Apart from SpcAMPS, stock solutions for all compounds were prepared in dimethyl sulfoxide (Scharlab, Barcelona, Spain) and serial dilutions were prepared in 0.7 μ m(GF/F, Whatman) filtered seawater to have a final concentration of 2% dimethyl sulfoxide in each assay solution. Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated at 25°C away from light and examined after 24, 48 and 72 h. Each animal was inspected under a stereomicroscope and its condition recorded. On each day, cyprids that did not move, had extended thoracopods and didnotrespondafteralighttouchwithaPasteurpipette, were regarded as dead (Rittschof et al. 1992; Lau and Qian 2000; Hellio et al. 2004). Both permanently attached and metamorphosed individuals were counted as settled or juveniles (Rittschof et al. 2003; Hellio et al. 2005). The remainder were counted as 'no metamorphosis', ie animals that responded to light touch and we restill cyprids at the end of the experiments with no overt signs of metamorphosis. In the figures, results are expressed as a percentage of animals that settled (settlement) or were inactive upon a light touch with a Pasteur pipette (mortality) or did not undergo settlement and metamorphosis (no metamorphosis) from the total number of animals placed in a well of a 24-well tissue culture plate. The cumulative results from two independent experiments with five replicates each are shown in each appropriate figure.

Scanning electron microscopy

To enable biometric analysis and examine any possible morphological abnormalities (Yamamoto, Kawaii, et al. 1997; Yamamoto, Okino, et al. 1997; Glenner and Brodin 2009; Al-Yahyaetal. 2016; Chan et al. 2017) brought about by the presence of the chemical compounds listed above, cyprids were exposed to specific concentrations of compounds and then observed by scanning electron microscopy (SEM). In these experiments and for each compound, the concentration that did not result in mortality of the animals and gave the best positive or negative response in settlement bioassays was selected. Under these two criteria, a 10 µM concentration was used for 20E, ionomycin, U0126, forskolin, IBMX, capsaicin and yoda1 and 1 µM concentration was used for fenoxycarb, thapsigargin and PMA. A3 µM concentration was used for Gö6976. These experiments were repeated at least twice with three replicates for any given compound (n = 60 cyprids). Plates were covered and sealed with Parafilm[®] to avoid evaporation and incubated at 25°C away from any light source and examined after 24 and 48 h. At 48 h, cyprids were placed in a volume of $0.4 \,\mathrm{M\,MgSO}_{4\prime}$ then removed and rinsed extensively with ddH₂O and centrifuged three times at $10 \times g$ for 1 h. Cyprids were fixed overnight in 2.5% glutaraldehyde (electron microscopy grade; Fluka, Buchs, Switzerland) freshly prepared in 0.1 M phosphate buffer (PB) pH7.4 at 4°C. Samples were then washed with PB three times for 2 min each and then fixed in a 1% solution of osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) in ddH₂O for 60 min, washed once with PB for 2 min and then washed with ddH_2O twice for 2 min each (Fischer et al. 2012). Samples were then dehydrated in a series of ethanol/water solutions as follows: 25%, 5 min; 50%, 5 min; 75%, overnight; 95%, 5 min; 100%, 30 min, followed by critical point drying (CPD) in acetone (Sigma-Aldrich). Next, samples were subjected to six washes in liquid CO_2 for 5 min per wash to remove acetone and then subjected to CPD at 1,072 psi and 31°C (Gohad et al. 2012) in a Balzers Union FL-9496 critical point dryer (Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein). After CPD, samples were mounted on aluminium stubs using double-sided carbon tape (Gohad et al. 2012), and sputter-coated using a Polaron E5100 sputter coater (Quorum Technologies, Lewes, UK) with a gold target at 30 mA for 1 min. Images were obtained on an Inspect scanning electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR, USA) with W (tungsten) filament operating at 25 kV. Acquired SEM images were subjected to biometrical analysis with ImageJ 1.48v (NIH, Bethesda, USA) and data were exported and statistically analysed with GraphPad Prism v.6 (GraphPad software Inc., San Diego, California, USA). Biometric measurements of the villi on the attachment discs of cyprids were taken from perfect lateral views (Al-Yahya et al. 2016; Chan et al. 2017) using stored micrograph images of the margins of the attachment discs. Counting was done by enumerating the length of villi visible in the test area as described (Al-Yahya et al. 2016; Chan et al. 2017).

Determination of ecdysteroids levels in A. amphitrite developmental stages

An enzyme immunoassay (ACE Enzyme Immunoassay; Cayman Chemical) kit and 20-hydroxyecdysone (20E) EIA antiserum (Cayman Chemical) was used to determine the levels of ecdysteroids in the naupliar, cyprid and early juvenile stages of the barnacle *A. amphitrite*. From carefully staged cultures, animals (n=20) were developmentally scored (Freeman and Costlow 1983) and transferred to a tube containing a minimal volume of ASW and 50 µl methanol. Samples were sonicated for 30 s on ice using an MSE Soniprep 150 ultrasonic disintegrator (Sanyo, Tokyo, Japan) fitted with a 3 mm probe at 20 amplitude µm with a nominal output frequency of 23 kHz. Samples were then centrifuged at 15,000 × g for 10 min at 4°C. The supernatant was dried *in vacuo*, and the residue was dissolved in phosphate buffer provided with the kit and assayed. Calibration curves were generated using 20E (Cayman Chemical) and results were expressed as pg of 20E per animal.

Statistical analysis

For EC_{50} (the concentration that results in 50% stimulation or inhibition relative to the control) calculations in GraphPad Prism v.6, all data were fitted to a three-parameter logistic curve according to the following models: $Y=Bottom + (Top - Bottom)/(1+10^{(LogEC_{50} - X)}) or$ $Y=Bottom + (Top - Bottom)/(1+10^{(X - LogIC50)})$ depending on the trend of the curve. For bellshaped responses the models were: Section1=Span1/ (1+10^((LogEC50_1-X)*nH1)) and Section2=Span2/ (1+10^{((X-LogEC50_2)*nH2))} where Span1=Plateau1-Dip, Span2=Plateau2-Dip, Y=Dip+Section1+Section2 and nH1 constrained to 1.0 and nH2 constrained to -1.0. For statistical comparisons between groups and biometrical analysis, one-way ANOVA followed by Dunnett's test or unpaired Student's two-tailed t-tests at *p*<0.05 were used where appropriate. To calculate the ratio (A/B) of settlement and metamorphosis between successive observations at 24, 48 and 72 h, the quotient (Q) was calculated from the percentages of the settled cyprids at these three time-points while the standard serror (s) of Qwere calculated from the following formula:

(Fieller 1940; mMotulsky 2014).

$$SE_Q = Q \qquad \frac{SEM_A^2}{A^2} + \frac{SEM_B^2}{B^2}$$

Results

Ecdysteroids titre in the early life stages of A. amphitrite

The temporal pattern of ecdysteroids titre in *A. amphi-trite* during the nauplii stages, the cyprid stage and the early juvenile stage was determined to identify how this titre fluctuates in relation to ecdysial and metamorphic events. The barnacle *A. amphitrite* has six naupliar stages and each stage has been reported to last on average 10 min

to 6 h (Stage I), one day (Stage II), 1.5 days (Stage III), one day (Stage IV), 1.5 days (Stage V) and 2.5 days (Stage VI) (Costlow and Bookhout 1958). For the culture conditions used, the duration of the naupliar stage was on average five days and there were no obvious sharp peaks of ecdysteroids that can be correlated with naupliar moults (Figure 1). A peak of ecdysteroids was recorded on the metamorphosis of the nauplii to cyprids and the subsequent metamorphosis to sessile juveniles occurs before the ecdysteroids titre starts to increase sharply again (Figure 1). The increase in the ecdysteroids titre after the metamorphosis to juveniles suggests that high ecdysteroids titres follow rather than precede the metamorphosis to juveniles, so any exogenously administered 20E on cyprids would expedite physiologically their developmental process.

To test this assumption, behavioural assays were carried out in the presence of varying concentrations of 20E (Figure 2A). A weak increase in the percentage of animals that settled in the presence of low concentrations of 20E was observed, while at much higher concentrations (10μ M; Figure 2A) settlement and metamorphosis were inhibited. Analysis by SEM of the villi on the attachment discs of cyprids exposed to 20E showed that the animals had short villi after exposure to 20E for 48 h (Figure 2B). A small percentage of cyprids exhibited developmental abnormalities in the presence of 20E (Figure 2C).

The effects of a potent juvenile hormone mimic, fenoxycarb, was tested to identify whether the presence of JH would have opposing effects to those of 20E. The choice of this JH mimic over MF was deliberate since fenoxycarb has been shown to have the highest affinity for the crustacean JH receptor (Miyakawa et al. 2013). Fenoxycarb curtailed the settlement of the cyprids at a concentration of $\geq 1 \mu M$ within 24 h (Figure 2D). Analysis by SEM revealed that cyprids exposed to 1 µM fenoxycarb had abnormally developed villi on the attachment discs, with no other obvious malformations (Figure 2E). At higher concentrations, fenoxycarb was lethal for cyprids (Figure S1 in Supplemental material) and did not result in any inhibition of metamorphosis (Figure S2). Biometric measurements of the villi on the attachment discs of control, 20E-exposed or fenoxycarb-exposed cyprids showed that the fenoxy carb-exposed animals $(1 \mu M)$ had the shortest villi (n = 44) (Figure 2F), while 20E-exposed animals (10) μ M) also had shorter villi (*n*=20) than the control (*n*=27) (Figure 2F). Such measurements were generated through biometric analysis of the attachment discs and the other antennular sensory setae on SEM-acquired images (Figure 2G, H and I) that provided clear resolution, enabled annotation of the structures involved in surface exploration by the cyprids (Lagersson and Høeg 2002; Maruzzo et al. 2011, 2012; Aldred et al. 2013) and led to the conclusion

BIOFOULING 🔄 5



Figure 1. Ecdysteroids titre at the naupliar, cyprid and juvenile stages of *A. amphitrite*. Samples of animals were taken at 24 h intervals starting 4 h after release of Stage i nauplii from cultured adults. Data are expressed as 20E equivalents/animal. Each day is indicated with the letter D and the mean duration of each naupliar stage (Si to SVi; white circles) is indicated by horizontal bars. The duration of the cyprid (C; blackcircles) and the juvenile (J; black and white circles) stages was assessed by observation of the sampled animals. Sampling was stopped when the juveniles were three days old.

that no other antennular setae were malformed by 20E or fenoxycarb.

Metamorphosis in A. amphitrite is mediated by a protein kinase C signal cascade

The morphological defects observed with 20E had a striking resemblance to those reported for *A. amphitrite* and *Loxothylacus panopaei* in the presence of phorbol esters which are potent activators of PKCs (Yamamoto et al. 1995; Glenner and Brodin 2009). Given that a link between PKC signalling and MF signalling has been demonstrated in *A. amphitrite* (Yamamoto, Okino, et al. 1997) and that PKC acts upstream of MF signalling in *Daphnia pulex* (Toyota et al. 2017), attempts were made to clarify the effects of phorbol esters further. PMA stimulated cyprid settlement at low concentrations (100 nM) (Figure 3A) and resulted in precocious metamorphosis to a small percentage of metamorphosed juveniles at concentrations ≥ 1 µM (Figure 3B and C), an effect identical to that brought about by 20E (Figure 2C).

The effects of PMA on cyprid settlement were reproduced with a PKC inhibitor of PKCs, Gö6976 (Figures 3D and S3). In the presence of Gö6976 a bell-shaped response for settlement was recorded (Figure 3D). At the highest concentrations tested for both reagents (100 μ M) the majority of the cyprids had not settled even after 72 h (Figure S2).

This counter-intuitive observation that both PMA (a PKC activator) and Gö6976 (a PKC inhibitor) produced identical effects on the cyprids (Figure 3), in conjunction with the reported potency of Gö6976 for inhibition of Ca2+-activated PKCs (Wu-zhang and Newton 2013), prompted the question of whether known chemical compounds that induce increases in intracellular Ca²⁺ also have an effect on cyprid settlement and metamorphosis. The effects of thapsigargin, a specific inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPases (Treiman et al. 1998) and ionomycin, an antibiotic Ca²⁺ transporter which produces generalised increases in intracellular Ca2+ and readily transports Ca²⁺ through biological membranes (Erdahl et al. 1994), were tested. Both reagents stimulated the settlement and metamorphosis of cyprids at 100 nM (Figure 4A and B) and, with the exception of high concentrations of ionomycin (100 μ M), were not lethal for the animals (Figure S1). Ionomycin produced a bell-shaped response on cyprid settlement (Figure 4B and Table 1) and induced precocious metamorphosis to a small percentage of metamorphosed juveniles at concentrations $\geq 1 \, \mu M$ (Figure 4C), identical to that recorded for PMA (Figure 3C) and 20E (Figure 2C). Cyprids exposed to 10 µM ionomycin had longer and abnormally developed villi on the attachment discs with no other obvious malformations (Figure 4D). Biometric measurements of the villi on the attachment discs of control, thapsigargin-exposed $(1 \mu M)$ and ionomycin-exposed (10 µM) cyprids showed that the



Figure 2. Cyprid settlement of *A. amphitrite* in the presence of 20E or fenoxycarb is compromised by morphological abnormalities. (A) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of 20E. (B) SEM image showing the villi in the attachment discs of cyprids exposed to 10 μ M 20E for 48 h (n = 7). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (C) SEM image showing a juvenile that underwent precocious metamorphosis within 48 h of exposure to 10 μ M 20E (n = 2). SEM scale bar: 100 μ m. (D) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of fenoxycarb. (E) SEM image showing the severe malformation of villi in the attachment disc of cyprids exposed to 1 μ M fenoxycab for 48 h (n = 8). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (f) Average length of plumose villi on the attachment discs of control cyprids and cyprids exposed for 48 h to 1 μ M fenoxycarb or 10 μ M 20E (n = 20). (g) SEM image showing the antennular setae and attachment disc of cyprids. SEM scale bar: 30 μ m. inset shows the relative position of terminal setae A–E on segment 4. SEM scale bar: 4 μ m. The dotted arrows mark the hidden parts of the attachment disc. The dotted line marks the post-axial side. (H) SEM image showing the right attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (i) SEM image showing the left attachment disc and fourth antennular segment of cyprids (n = 14). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (i) SEM image showing the left attachment disc and fourth antennular segment of cyprids (n = 9). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m.



Figure 3. Cyprid settlement in the presence of PMA or gö6976. (A) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of PMA. (B) Effect of varying concentrations of PMA on the induction of precocious metamorphosis to juveniles by cyprids. (C) SEM image showing a precociously metamorphosed juvenile after exposure of the cyprid to 10μ M PMA for 48 h (n = 2). SEM scale bar: 100μ m. (D) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of gö6976.

thapsigargin-exposed animals had villi (n = 44) shorter than the control (n = 27) (Figure 4E) and the ionomycin-exposed animals had villi (n = 19) longer than the control (Figure 4E).

To distinguish whether the settlement-stimulating effect of PMA is mediated solely and directly *via* PKC or whether PKC acts as an upstream activator of ERK, U0126, a known inhibitor of ERK (Favata et al. 1998), was used. U0126 had nostimulatory effect on cyprid settlement and clearly inhibited settlement of the cyprids (Figures 4F and S1–S3) without producing any morphological abnormalities in the animals as judged by SEM image analysis (Figure S4).

Divergent effects of cAMP-modulating agents on settlement of A. amphitrite cyprids

Three independent studies (Clare et al. 1995; Pagett et al. 2012; Aldred et al. 2018) have shown that IBMX induces a characteristic bell-shaped settlement-stimulating response on *A. amphitrite* cyprids, while one of these studies has shown that forskolin has a weak, but statistically

significant stimulatory effect (Clare et al. 1995). It was therefore judged to be critical to investigate whether the experimental approach used conformed with those previously described.

In the present experiments, forskolin inhibited metamorphosis (Figure 5A). When the settlement ratios between the different time points for all tested compounds were plotted (Figure S5), forskolin was one of the few compounds that produced high settlement ratios between the different time points. In the presence of IBMX it was observed that the characteristic bell-shaped settlement response of cyprids at a concentration of 10 µM (Figure 5B) was exactly as previously reported (Clare et al. 1995; Pagettetal. 2012). Further probing with another cAMP-modulating agent showed that the cAMP analogue, SpcAMPS, had an inhibitory effect on cyprid settlement (Figure 5C). On the other hand, a specific inhibitor of the cAMP-activated protein kinase A, KT5720 (Kase et al. 1987), had no stimulatory effect on cyprid settlement (Figure 5D), variably inhibited metamorphosis of cyprids (Figure S2), had no effect on animal mortality (Figure S1) and no immediate effect on metamorphosis at 24 h



Figure 4. Cyprid settlement in the presence of thapsigargin, ionomycin or u0126. (A) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of thapsigargin. (B) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of ionomycin. (C) SEM image showing a precociously metamorphosed juvenile after exposure of the cyprid to 10 μ M ionomycin for 48 h (n = 2). SEM scale bar: 200 μ m. (D) SEM image showing the villi in the attachment disc cyprids exposed to 10 μ M ionomycin for 48 h (n = 6). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 5 μ m. (E) Average length of plumose villi on the attachment discs of control cyprids and cyprids exposed for 48 h to 1 μ M thapsigargin or 10 μ M ionomycin (n = 20). (f) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of u0126.

(Figure S3). Analysis by SEM of cyprids exposed to 10μ M forskolin or 10μ M IBMX, while SpcAMPS and KT5720 was omitted due to inconclusive results (Figure 5C and D), which did not reveal any abnormal growth of the villi on the attachment discs or other obvious malformations on the antennular sensory setae (Figure S4).

Barnacle settlement behaviour can be altered by mechanosensitive or nociceptive channel activators

The ability of thapsigargin to stimulate the settlement behaviour of the cyprids (Figure 4A) stimulated further investigation of the role of Ca²⁺ entry in cyprid settlement

		Settlement			Mortality		2	Vo metamorphosis		Settled	Juvenile	
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	24 h	
20E	0.73 0	3.700	3.330	0.29	11.62 3	9.20	1.02 3	2.14 3	0.73 3	16.84 ©	0.45 0	<i>p</i> = 0.84
fenoxycarb	0.22 0	0.14 🕲	0.110	4.89 3	0.40 3	0.24 3	15.24 😡	3.32 0	0.0420	0.017 9	0.103 9	p = 0.07
PMA	2.19 0	1.79 0	1.37 😡	Dn	Qu	Qu	2.31 3	1.39 3	1.36 3	4.00 3	1.71 0	$p = 0.04^*$
gö6976	0.628 @/8.27 @	0.080 3 / 21.08 3	0.100@/10.79@	Qu	Qu	Q	0.598@/8.51®	0.063 9/21.72 8	0.097 @/8.83 @	0.005@/522.3@	0.701 3/4.43	$p = 0.005^*$
Thapsigargin	0.007 @/4.63 @	0.0018@/nD@	0.0016@/9.31@	Q	Qu	2.99 3	0.0092@/4.53®	0.0029/hD8	0.0010/22.430	0.033 @/nD @	0.006@/2.52@	$p = 0.0078^*$
ionomycin	0.008@/nD@	0.0003@/2.51@	0.0003 @/2.27 @	Dn	Dn	Qu	0.094 ©	0.0004 ©	0.00008	0.0005 3	0.007 (3)	$p = 0.0001^*$
u0126	12.48 😡	10.30 0	6.03 0	243.18	56.30	26.09 3	0 D	0 Dn	0 D D	34.14 🖸	7.550	p = 0.08
forskolin	4.10 3	0.057 @	0.133 0	0.011	17.498	20.63 8	5.648	nD 🕲	nD©	1.92 0	0.0037 9	p = 0.87
iBMX	1.09@/69.22@	0.604 @/39.21 @	1.01 3/64.35	С	0.0268	25.96 3	0.936 @/67.26 @	0.604 0/42.93 0	1.19@/131.7®	nD@/nD@	nD@/nD@	p = 0.0274
SpcAMPS	1070	142.90	107 ©	112.4 ®	95.23®	68.65 3	112.50	15.19	28.610	nD©	60.32 0	p = 0.14
KT5720	0 Dn	0 D	0 D D	Qu	Q	Ģ	nD®	nD®	nD 🕲	0 Ou	0 Ou	p = 0.40
Capsaicin	0.44 ©	4.43 🖸	4.77 ©	95.23®	112.4®	nC®	0.254@/nD@	5.59@/ nD 9	5.71 0 / nD 0	10.93 @	0.137 9	p = 0.34
Yoda1	0.25 😡	0.63 0	0.79 @	15.22®	7.23 3	5.75 3	0.128	0.10 3	0.0618	0.070	0.0880	$p = 0.047^*$
BiTC	0.63@/22.67@	2.103/31.529	1.66 3 /27.01 9	155.7®	79.288	65.31 ®	102.8 😡	5.40 9	2.60 😡	nD/@nD@	1.68 6 /20.32 9	p = 0.96
notes: The EC	30 values for settlem	ient and metamorph	osis (ie juvenile) at 2	4 h are also sh	nown. for th	e calculatior	n of settled cyprids ar	nd metamorphosed j	uveniles all animals	s that settled at 24 h	were divided into s	ettled cyprids
until the stage	of carapace sheddi	ng and metamorpho.	sed juveniles. unpair	red t-test anal	ysis was ca	irried out bei	tween the settled and	d juvenile groups at 2	4 h and the significa	ant differences at <i>p</i> .	<0.05 are shown by	an asterisk
(*). For clarity,	the trend for each go	enerated curve is sho	own by: 🕲 line going	up relative to	the control	and © line	going down relative	to the control (see th	gures 1–6 and tigur	es S2, S3 and S5 in \$	Supplemental mate	rial for
details). for be	II-shaped response	ንs both EC ₅₀ values έ	are shown. nD: an E	C ₅₀ could not l	be determii	ned.						

and, more specifically, the ability of agonists of mechanosensitive channels or nociceptive Ca^{2+} channels to modulate the timing of settlement and metamorphosis. Capsaicin inhibited cyprid settlement in a dose-dependent manner (Figure 6A) and at a concentration of 10 μ M did not produce any abnormal growth of the villi on the attachment discs or other obvious malformations on the antennular sensory setae (Figure 6B).

Yoda1, an activator of the mammalian mechanosensitive channel Piezo1 (Syeda et al. 2015), had an overall settlement-inhibiting effect (Figure 6C) and at a concentration of 10 μ M did not produce any abnormal growth of the villi on the attachment discs or other obvious malformations on the antennular sensory setae (Figure 6D). Yoda1 was also one of the few compounds that at a concentration of 1 μ M resulted in a very high settlement ratio (Figure S5), an indication that its effects at high concentrations are not immediate.

Benzyl isothiocyanate (BITC), an activator of the painless protein and the nociceptive channel TRPA1 of *D. melanogaster* (Al-Anzi et al. 2006; Kang et al. 2010), had a bell-shaped effect on cyprid settlement (Figure 6E). Analysis by SEM of cyprids exposed to 10μ M BITC showed that the animals had very short villi on the attachment discs and a severe malformation of terminal seta D (TS-D) (Figure 6F), a seta suggested to act as a sensor of water-born chemical stimuli (Maruzzo et al. 2011).

Discussion

The results obtained by exposure of cyprids to varying concentrations of 20E (Figure 2A-C) are in agreement with those reported in two previous studies (Freeman and Costlow 1983; Clare et al. 1992), partially agree with another study (Yamamoto, Kawaii, et al. 1997) and lead to the conclusion that 20E ages cyprids physiologically in agreement with previous conclusions (Clareetal. 1992). At higher concentrations of 20E, the ageing process is accelerated at such levels that the animals do not complete the full repertoire of substratum exploration and settlement events and proceed to metamorphose to juveniles, resulting in occasionally observed malformed juveniles (Figures 2C and 7). Such premature metamorphosis has also been observed in A. amphitrite cyprids after exposure to noradrenaline, which makes cyprids metamorphose without cementing to the substratum (Gohad et al. 2012).

The role of juvenile hormone or MF, the proposed juvenile hormone of Cirripedia (Smith et al. 2000), on cyprid settlement and metamorphosis is more perplexing than that of 20E. Data from two studies have shown that exposure of cyprids to>1µMMF results in developmental acceleration and metamorphosis to juveniles without attachment (Yamamoto, Okino, et al. 1997; Smith et al.



Figure 5. Cyprid settlement in the presence of intracellular cAMP modulating agents. (A) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of forskolin. (B) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of iBMX. (C) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of XT5720.

2000). In both studies, the non-attached and metamorphosed juveniles had developmental defects, ie they were cyprid-juvenile intermediates (Smith et al. 2000). Based on these results and the data from exposure of cyprids to 20E (Freeman and Costlow 1983; Clare et al. 1992; Yamamoto, Kawaii, et al. 1997; Glenner et al. 2008), it appears that at low concentrations, 20E accelerates metamorphosis to juveniles and MF delays it. Athigher concentrations both 20E and MF accelerate metamorphosis to juveniles to such a degree that cyprids do not go through the stereotypical programme of substratum exploration and metamorphosis but go through a precocious metamorphosis without attachment (Bourget and Crisp 1975; Yamamoto, Kawaii, et al. 1997; Smith et al. 2000). Discussed extensively and put forth as a possible explanation in these studies, exposure of cyprids to MF may lead to an increase in the 20E titre and initiation of precocious metamorphosis (Yamamoto, Okino, et al. 1997; Smith et al. 2000). This explanation agrees with results from holometabolous insects where application of a JH mimic leads to increases in the 20E titre and precocious adult metamorphosis (Dedos and Fugo 2001; Dedos et al. 2002).

Activation of PKCby PMA in A. amphitrite (Yamamoto et al. 1995) and the parasitic barnacle, L. panopaei (Glenner and Brodin 2009) leads also to precocious metamorphosis, an effect interpreted as a link between MF and the PKC signal transduction pathway in cyprid metamorphosis (Yamamoto et al. 1995; Glenner and Brodin 2009). Evidence from the sex determination mechanism in the water flea, D. pulex, suggests that PKC acts upstream of MF signalling during a clearly defined developmental window to induce expression of JHAMT and a subsequent increase in MF secretion (Toyota et al. 2017). Because MF (and 20E) should operate at the level of transcriptional regulation of gene expression, if the D. pulex model (Toyota et al. 2017) is adopted for A. amphitrite, the activity of PKCs should increase MF titres in cyprids and result in a timely completion of metamorphosis to juveniles, while inhibition of PKC should result in precocious metamorphosis. Since it has been shown that persistent activation for 48h of PKCs by PMA leads to downregulation of PKC in mammalian cells (Johnson et al. 1995), it is suggested that PMA downregulates specific PKC isoforms in the cyprids and thereby acts in the same way as Gö6976 (Figure 3A, D and S6).



Figure 6. Cyprid settlement in the presence of capsaicin, yoda1 and BiTC. (A) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of capsaicin. (B) SEM image showing the villi in the attachment disc of cyprids exposed to 10 μ M capsaicin for 48 h (n = 8). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (C) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of yoda1. (D) SEM image showing the villi in the attachment disc of cyprids exposed to 10 μ M yoda1 for 48 h (n = 5). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (C) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of yoda1. (D) SEM image showing the villi in the attachment disc of cyprids exposed to 10 μ M yoda1 for 48 h (n = 5). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m. (E) Settlement of cyprids in the presence of varying concentrations of BiTC. (f) SEM image showing the villi in the attachment disc of cyprids exposed to 10 μ M BiTC for 48 h (n = 3). inset shows the whole cyprid and the area of its attachment disc. SEM scale bar: 10 μ m.



Figure 7. Model for cyprid settlement and metamorphosis of *A. amphitrite*. The settlement seeking behaviour is regulated by the activities of multiple signalling modules within the sensory neurons of the terminal setae that transduce their activation to methyl far nesoate (Mf) secreting cells which, in turn, modulate the activity of ecdysteroids (Ecd.)-secreting cells. PKC signalling plays a primary role in metamorphosis by upregulating gene transcription of the Mf-biosynthesis cascade, if the *D. pulex* model is adopted (Toyota et al. 2017), while its activity must be moderated during settlement seeking to expedite the process. The model adopts the proposed regulation of settlement and metamorphosis by noradrenaline (nA) in *A. amphitrite* (gohad et al. 2012).

Exposure of cyprids to ionomycin (Figure 4B) produced the same effect as PMA, an indication that it is actually Ca²⁺ influx mechanisms that mediate the acceleration of metamorphic events (Figures 3A, B and 7). Based on all the evidence, it is proposed that conventional and/or novel PMA-sensitive PKC isoforms control the extent of exploratory behaviour of the cyprids and induce increases in MF titres which, in turn, dictate the timely completion

of metamorphosis that takes place 32 h after irreversible attachment (Maruzzo et al. 2012). It is proposed that the cascade of events that control the substratum exploratory phase and the ensuing metamorphosis takes place at the site of synthesis of MF in A. amphitrite (Figure 7). At the site of MF synthesis, be it a specific organ or a cluster of cells, neuronal signalling that decodes the substratum as suitable stimulates increases in MF secretion (Figure 7). Secreted MF then acts on the site of ecdysteroids synthesis to supress the surge of ecdysteroids titre (Figures 1 and 7) and complete the metamorphosis to juveniles. Data from holometabolous insects show that a surge in an ecdysteroids titre precedes metamorphosis to the next developmental stage, with actual metamorphosis taking place when the ecdysteroids titre is at its lowest level. Under this possible cascade of events, neuronal signalling that decode the substratum as suitable is initiated by Ca²⁺ permeable TRP channels that are sensitive to BITC (Figure 7) and generate Ca²⁺ signals that coordinate and complete the settlement process. Settlement avoidance signals generated by noxious stimuli-sensing Ca²⁺ channels and/or mechanosensitive channels counteractor cancel the signals that coordinate and complete the settlement process (Figure 7).

With the clear exception of the effects of IBMX on cyprid settlement, a congruent and conclusive result was not observed with chemical compounds that modulate cAMP signalling, either on cyprid settlement or metamorphosis (Figure 5), neither were any morphological defects on animals exposed to forskolin or IBMX observed (Figure S4). Clearly deserving further investigation, it is proposed that the sharp induction of cyprid settlement at $10 \,\mu$ M IBMX (Figure 5) is an effect that may be unrelated to the action of IBMX as a non-specific cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE) inhibitor or it may be an effect related to a yet-unidentified specific action of PDE that is unrelated to cAMP signalling.

The effects of capsaicin, yoda1 and BITC on cyprid settlement and metamorphosis show that cyprids avoid noxious and harmful stimuli, as do other metazoan phyla (Im and Galko 2012). Yoda1, a compound identified as an activator of the mammalian mechanosensitive channel Piezo1 (Syeda et al. 2015), had an inhibitory effect on cyprid settlement and metamorphosis, but at very low concentrations its timulated cyprid metamorphosis within 24 h (Table 1 and Figure S3). Although it needs to be proven that yoda1 actually binds to the barnacle orthologue of Piezo channel (Syeda et al. 2015), the prospect of mechanosensitive channel manipulation as a potential AF target merits further research.

Summing up the data presented in this study, two distinct pathways of signal transduction in cyprids were observed (Figure 7). The first pathway involves Ca²⁺ entry,

mediated by a TRP channel activation in neurons that sense the substratum as a favourable one, followed by subsequent settlement of the cyprids. The second pathway involves Ca²⁺ entry, activation of novel and classical isoforms of PMA-sensitive PKCs and activation of MF-mediated gene expression that leads to metamorphosis to juveniles.

Declarations

Ethics approval

There are no specific guidelines and permits required for the use of barnacles in scientific experiments in Greece. The research abides by the Presidential Decree No 160/1991, which implements the EEC Directive 86/609/EEC, and provides the guidelines for protection of animals used for experimental and other scientific purposes, the Presidential Decree No 1197/1981, that allows experiments on animals for scientific purposes to be conducted by biologists, and recommendation 2007/526 EEC. Barnacles were collected from locations which are not private lands, national parks or protected areas. Care was taken to transfer no other species but barnacles to laboratory conditions for further experimentation.

Availability of data and materials

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article and/or its Supplemental materials.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

Research reported in this publication was supported from funds by the National and Kapodistrian University of Athens under award number Kapodistrias:11240 and by the GS-RT-EPANII-11SYN-5-1274 "Maripaints" research grant from the Greek General Secretariat for Research and Technology (GSRT) and the European Social Fund (ESF).

References

- Al-Anzi B, Tracey WD, Benzer S. 2006. Response of *Drosophila* to wasabi is mediated by painless, the fly homolog of mammalian TRPA1/ANKTM1. Curr Biol. 16:1034–1040. doi: 10.1016/j.cub.2006.04.002.
- Aldred N, Alsaab A, Clare AS. 2018. Quantitative analysis of the complete larval settlement process confirms Crisp's model of surface selectivity by barnacles. Pro R Soc B Biol Sci. 285(1872).

- Aldred N, Clare AS. 2008. The adhesive strategies of cyprids and development of barnacle-resistant marine coatings. Biofouling. 24:351–363.doi: 10.1080/08927010802256117.
- Aldred N, Høeg JT, Maruzzo D, Clare AS. 2013. Analysis of the behaviours mediating barnacle cyprid reversible adhesion. PLoS ONE. 8:e68085. doi: 10.1371/journal.pone.0068085.
- Almeida JR, Vasconcelos V. 2015. Natural antifouling compounds: Effectiveness in preventing invertebrate settlement and adhesion. Biotechnol Adv. 33:343–357. doi: 10.1016/j.biotechadv.2015.01.013.
- Al-Yahya H, Chen H-N, Chan BKK, Kado R, Høeg JT. 2016. Morphology of cyprid attachment organs compared across disparate barnacle taxa: does it relate to habitat? Biol Bull. 231:120–129. doi: 10.1086/690092.
- Bernard FJ, Lane CE. 1962. Early settlement and metamorphosis of the barnacle *Balanus amphitrite* niveus. J Morphol. 110:19–39. doi: 10.1002/(ISSN)1097-4687.
- Bielecki J, Chan BKK, Hoeg JT, Sari A. 2009. Antennular sensory organs in cyprids of balanomorphan cirripedes: standardizing terminology using *Megabalanus rosa*. Biofouling. 25:203–214. doi: 10.1080/08927010802688087.
- Bourget E, Crisp DJ. 1975. An analysis of the growth bands and ridges of barnacle shell plates. J Mar Biol Assoc UK. 55:439–461. doi: 10.1017/S0025315400016052.
- Chan BKK, Sari A, Høeg JT. 2017. Cirripede cypris antennules: how much structural variation exists among balanomorphan species from hard-bottom habitats? Biol Bull. 233:135–143. doi: 10.1086/695689.
- Clare AS, Freet RK, McClary M. 1994. On the antennular secretion of the cyprid of *Balanus amphitrite* amphitrite, and its role as a settlement pheromone. J Mar Biol Assoc UK. 74:243–250. doi: 10.1017/S0025315400035803.
- Clare AS, Høeg JT. 2008. *Balanus amphitrite* or *Amphibalanus amphitrite*? A note on barnacle nomenclature. Biofouling. 24:55–57. doi: 10.1080/08927010701830194.
- Clare AS, Rittschof D, Costlow JD. 1992. Effects of the nonsteroidal ecdysone mimic RH 5849 on larval crustaceans. JExp Zool. 262:436–440. doi: 10.1002/(ISSN)1097-010X.
- Clare AS, Thomas R, Rittschof D. 1995. Evidence for the involvement of cyclic AMP in the pheromonal modulation of barnacle settlement. J Exp Biol. 198:655–664.
- Costlow JD. 1956. Shell development in *Balanus improvisus* Darwin. J Morphol. 99:359–415. doi: 10.1002/(ISSN)1097-4687.
- Costlow JD, Bookhout CG. 1958. Larval development of *Balanus amphitrite* var. denticulata Broch reared in the laboratory. Biol Bull. 114:284–295. doi: 10.2307/1538985.
- Dedos SG, Fugo H. 2001. Acceleration of pupal-adult development by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. Zool Sci. 18:771–777.
- Dedos SG, Szurdoki F, Székács A, Mizoguchi A, Fugo H. 2002. Induction of dauer pupae by fenoxycarb in the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Physiol. 48:857–865. doi: 10.1016/ S0022-1910(02)00155-5.
- Erdahl WL, Chapman CJ, Taylor RW, Pfeiffer DR. 1994. Ca2+ transport properties of ionophores A23187, ionomycin, and 4-Br A23187 in a well defined model system. Biophys J. 66:1678–1693. doi:10.1016/S0006-3495(94)80959-2.
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, et al. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J Biol Chem. 273:18623–18632. doi: 10.1074/jbc.273.29.18623.

- Fieller EC. 1940. The biological standardization of insulin. J R Statist Soc. 7:1–64.
- Fischer ER, Hansen BT, Nair V, Hoyt FH, Dorward DW. 2012. Scanning electron microscopy. Curr Proto Microbiol. Chapter 2:Unit 2B.2.
- Freeman JA, Costlow JD. 1983. The cyrpid molt cycle and its hormonal control in the barnacle, Balanus amphitrite. J Crustacean Biol. 3:173–182. doi: 10.2307/1548253.
- Glenner H, Brodin B. 2009. Phorbol ester-induced metamorphosis in the parasitic barnacle, *Loxothylacus panopaei*. J Mar Biol Assoc UK. 77:261–264.
- Glenner H, Høeg JT, Grygier MJ, Fujita Y. 2008. Induced metamorphosis in crustacean y-larvae: towards a solution to a 100-year-old riddle. BMC Biol. 6:21. doi: 10.1186/1741-7007-6-21.
- Gohad NV, Aldred N, Orihuela B, Clare AS, Rittschof D, Mount AS. 2012. Observations on the settlement and cementation of barnacle (*Balanus amphitrite*) cyprid larvae after artificial exposure to noradrenaline and the locations of adrenergiclike receptors. J Exp Mar Biolo Ecol. 416-417:153–161. doi: 10.1016/j.jembe.2012.02.013.
- Harder T, Thiyagarajan V, Qian PY. 2001. Combined effect of cyprid age and lipid content on larval attachment and metamorphosis of *Balanus amphitrite* darwin. Biofouling. 17:257–262. doi: 10.1080/08927010109378486.
- Hartenstein V, Chipman AD. 2015. Hexapoda: a drosophila's view of development. In: Wanninger A, editor. Evolutionary developmental biology of invertebrates 5: Ecdysozoa III: Hexapoda. Vienna: Springer Vienna; p. 1–91.
- Hellio Č, Simon-Colin C, Člare A, Deslandes E. 2004. Isethionic acid and floridoside isolated from the red alga, *Grateloupia turuturu*, inhibit settlement of *Balanus amphitrite* cyprid larvae. Biofouling. 20:139–145. doi: 10.1080/08927010412331279605.
- Hellio C, Tsoukatou M, Marechal J-P, Aldred N, Beaupoil C, Clare AS, Vagias C, Roussis V.2005. Inhibitory effects of Mediterranean sponge extracts and metabolites on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite*. Mar Biotechnol.7:297–305. doi: 10.1007/s10126-004-3150-x.
- Høeg JT, Deutsch J, Chan BKK, Semmler Le H. 2015. "Crustacea": Cirripedia. In: Wanninger A, editor. Evolutionary developmental biology of invertebrates 4: Ecdysozoa II: Crustacea. Vienna: Springer Vienna; p. 153– 181.
- Høeg JT, Møller OS. 2006. When similar beginnings lead to different ends: Constraints and diversity in cirripede larval development. Invertebr Repr Dev. 49:125–142. doi: 10.1080/07924259.2006.9652204.
- Holm ER. 2012. Barnacles and biofouling. Integr Comp Biol. 52:348–355. doi: 10.1093/icb/ics042.
- Im SH, Galko MJ. 2012. Pokes, sunburn, and hot sauce: Drosophila as an emerging model for the biology of
- nociception. Dev Dyn. 241:16–26. doi: 10.1002/dvdy.22737. Johnson JA, Adak S, Mochly-Rosen D. 1995. Prolonged phorbol ester treatment down-regulates protein kinase C isozymes and increases contraction rate in neonatal cardiac myocytes. Life Sciences. 57:1027–1038. doi: 10.1016/0024-3205(95)02048-N.
- Kang K, Pulver SR, Panzano VC, Chang EC, Griffith LC, Theobald DL, Garrity PA. 2010. Analysis of *Drosophila* TRPA1 reveals an ancient origin for human chemical nociception. Nature. 464:597–600. doi: 10.1038/ nature08848.

- Kase H, Iwahashi K, Nakanishi S, Matsuda Y, Yamada K, Takahashi M, Murakata C, Sato A, Kaneko M. 1987. K-252 compounds, novel and potent inhibitors of protein kinase C and cyclic nucleotide-dependent protein kinases. Biochem Biophys Res Commun. 142:436–440. doi: 10.1016/0006-291X(87)90293-2.
- Lagersson N, Høeg J. 2002. Settlement behavior and antennulary biomechanics in cypris larvae of *Balanus amphitrite* (Crustacea: Thecostraca: Cirripedia). Mar Biol. 141:513–526.
- Lau SCK, Qian PÄ. 2000. Inhibitory effect of phenolic compounds and marine bacteria on larval settlement of the barnacle *Balanus amphitrite amphitrite* darwin. Biofouling. 16:47–58. doi: 10.1080/08927010009378429.
- Lucas MI, Walker G, Holland DL, Crisp DJ. 1979. An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of *Balanus balanoides* (Crustacea: Cirripedia). Mar Biol. 55:221–229. doi: 10.1007/BF00396822.
- Maruzzo D, Aldred N, Clare AS, Høeg JT. 2012. Metamorphosis in the cirripede crustacean *Balanus amphitrite*. PLoS ONE. 7:e37408. doi:10.1371/journal.pone.0037408.
- MaruzzoD, ConlanS, AldredN, ClareAS, HøegJT.2011. Video observation of surface exploration in cyprids of *Balanus amphitrite*: the movements of antennular sensory setae. Biofouling. 27:225–239. doi: 10.1080/08927014.2011.555534.
- Matsumura K, Mori S, Nagano M, Fusetani N. 1998. Lentil lectin inhibits adult extract-induced settlement of the barnacle, *Balanus amphitrite*. J Exp Zool. 280:213–219. doi: 10.1002/(ISSN)1097-010X.
- Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T. 2013. A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. *Nat Commun.* 4:1856.
- mMotulsky H. 2014. Intuitive biostatistics : a nonmathematical guide to statistical thinking. 3rd ed. New York(NY): Oxford University Press.
- Pagett HE, Abrahams JL, Bones J, O'Donoghue NO, Marles-Wright J, Lewis RJ, Harris JR, Caldwell GS, Rudd PM, Clare AS. 2012. Structural characterisation of the N-glycan moiety of the barnacle settlement-inducing protein complex (SIPC). J Exp Biol. 215:1192–1198. doi: 10.1242/jeb.063503.
- Peng B, Wang J, Peng Z, Zhou S, Wang F, Ji Y, Ye Z, Zhou X, Lin T, Zhang X. 2012. Studies on the synthesis, pungency and anti-biofouling performance of capsaicin analogues. Sci China Chem. 55:435–442. doi: 10.1007/s11426-011-4307-x.
- Phang IY, Chaw KC, Choo SSH, Kang RKC, Lee SSC, Birch WR, Teo SLM, Vancso GJ. 2009. Marine biofouling field tests, settlement assay and footprint micromorphology of cyprid larvae of *Balanus amphitrite* on model surfaces. Biofouling. 25:139–147. doi: 10.1080/08927010802592925.
- Qian P-Y, Chen L, Xu Y. 2013. Mini-review: Molecular mechanisms of antifouling compounds. Biofouling. 29:381– 400. doi: 10.1080/08927014.2013.776546.
- Qian P-Y, Li Z, Xu Y, Li Y, Fusetani N. 2015. Mini-review: Marine natural products and their synthetic analogs as

antifouling compounds: 2009–2014. Biofouling. 31:101–122. doi: 10.1080/08927014.2014.997226.

- Rittschof D, Clare AS, Gerhart DJ, Mary SA, Bonaventura J. 1992. Barnacle *in vitro* assays for biologically active substances: toxicity and settlement inhibition assays using mass cultured *Balanus amphitrite amphitrite* darwin. Biofouling. 6:115–122. doi: 10.1080/08927019209386217.
- Rittschof D, Lai C-H, Kok L-M, Teo SL-M. 2003. Pharmaceuticals as antifoulants: concept and principles. Biofouling. 19(sup1):207–212. doi:10.1080/0892701021000083769.
- Smith PA, Clare AS, Rees HH, Prescott MC, Wainwright G, Thorndyke MC. 2000. Identification of methyl farnesoate in the cypris larva of the barnacle, *Balanus amphitrite*, and its role as a juvenile hormone. Insect Biochem Mol Biol. 30:885–890. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00062-X.
- Syeda R, Xu J, Dubin AE, Coste B, Mathur J, Huynh T, Matzen J, Lao J, Tully DC, Engels IH, et al. 2015. Chemical activation of the mechanotransduction channel Piezo1. eLife. 4:e07369.
- Thiyagarajan V, Harder T, Qian P-Y. 2002. Effect of the physiological condition of cyprids and laboratory-mimicked seasonal conditions on the metamorphic successes of Balanus amphitrite Darwin (Cirripedia; Thoracica). J Exp Mar Biol Ecol. 274:65–74. doi: 10.1016/S0022-0981(02)00182-X.
- Toyota K, Sato T, Tatarazako N, Iguchi T. 2017. Protein kinase C is involved with upstream signaling of methyl farnesoate for photoperiod-dependent sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. Biol Open. 6:161–164. doi: 10.1242/bio.021857.
- Treiman M, Caspersen C, Christensen SB. 1998. A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarco-endoplasmic reticulum Ca2+-ATPases. Trends Pharmacol Sci. 19:131– 135. doi: 10.1016/S0165-6147(98)01184-5.
- West TL, Costlow JD. 1988. Determinants of the larval molting pattern of the crustacean *Balanus eburneus* Gould (Cirripedia: Thoracica). J Exp Zool. 248:33–44. doi: 10.1002/ (ISSN)1097-010X.
- Wu-zhang AX, Newton AC. 2013. Protein kinase C pharmacology: refining the toolbox. Biochem J. 452:195– 209. doi: 10.1042/BJ20130220.
- Xu Q, Barrios CA, Cutright T, Zhang Newby B-m. 2005. Evaluation of toxicity of capsaicin and zosteric acid and their potential application as antifoulants. Environ Toxicol. 20:467–474. doi: 10.1002/(ISSN)1522-7278.
- YamamotoH, Kawaii S, Yoshimura E, Tachibana A, Fusetani N. 1997. 20-Hydroxyecdysone regulates larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite*. Zool Sci. 14:887–892. doi: 10.2108/zsj.14.887.
- Yamamoto H, Okino T, Yoshimura E, Tachibana A, Shimizu K, Fusetani N. 1997. Methyl farnesoate induces larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite via* protein kinase C activation. J Exp Zool. 278:349–355. doi: 10.1002/(ISSN)1097-010X.
- Yamamoto H, Tachibana A, Matsumura K, Fusetani N. 1995. Protein kinase C (PKC) signal transduction system involved in larval metamorphosis of the barnacle, *Balanus amphitrite*. Zool Sci. 12:391–396. doi: 10.2108/zsj.12.391.