

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Urška DOLINAR

**PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST VODNIH  
IZVLEČKOV IZBRANIH ANTARKTIČNIH  
MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Molekulska biologija

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ŠTUDIJ MOLEKULSKE BIOLOGIJE

Urška DOLINAR

**PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST VODNIH IZVLEČKOV  
IZBRANIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja Molekulska biologija

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUATIC EXTRACTS FROM  
SELECTED ANTARCTIC MARINE SPONGES**

M. Sc. Thesis

Master Study Programmes: Field Molecular Biology

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študija druge stopnje: Molekulska biologija. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bila dne 9. 3. 2012 za mentorico imenovana prof. dr. Kristina Sepčič.

Mentorica: prof. dr. Kristina Sepčič

Recenzent: prof. dr. Tom Turk

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: doc. dr. Jerneja AMBROŽIČ- AVGUŠTIN  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član : prof. dr. Tom TURK  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Kristina SEPČIČ  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: \_\_\_\_\_

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela. Podpisana, se strinjam z objavo svoje magistrske naloge na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddala v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Urška Dolinar

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD Du2

DK UDK 577:577,18:563.4(0.43.2)=163.6

KG antarktične spužve/Porifera/vodni izvlečki/sekundarni metaboliti/bioaktivne spojine/  
protibakterijska aktivnost/antibiotiki

AV DOLINAR, Urška, diplomirana biotehnologinja (UN)

SA SEPČIČ, Kristina (mentor)

KZ SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111

ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij molekulske biologije

LI 2013

IN PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST VODNIH IZVLEČKOV IZBRANIH  
ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV

TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Molekulska biologija)

OP XIV, 66 str., 9 pregl., 14 sl., 1 pril., 226 vir.

IJ sl

JI sl/en

AI Človeštvo se zaradi prekomerne in nepreudarne rabe protibakterijskih sredstev sooča s problemom pojavljanja vse večjega števila bakterij odpornih proti splošnim antibiotikom. Spužve zaradi pritrjenega načina življenja izločajo veliko število bioaktivnih spojin, ki služijo odganjanju plenilcev in jih ščitijo pred naseljevanjem z drugimi organizmi. Zaradi sinteze bioaktivnih metabolitov so spužve potencialni vir novih protibakterijskih učinkovin, uporabnih v biomedicinske namene. Ugotavljali smo protibakterijsko aktivnost vodnih izvlečkov antarktičnih morskih spužev z metodo difuzije na agarju. Uporabili smo sveže in kuhane izvlečke, ki smo jih testirali na različnih Gram<sup>+</sup>, Gram<sup>-</sup>, kliničnih proti antibiotiku odpornih in nepatogenih sevih bakterij. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 antibiotikov različnih redčitev, kot negativno pa destilirano vodo. Protibakterijsko aktivnost je imelo 16 od 33 vodnih izvlečkov, od tega jih je 11 preprečevalo rast bakterij, 5 pa jih je le omejilo njihovo rast. Izrazito protibakterijsko aktivnost je imel vodni izvleček spužve *Hemigellius bidens*. Po redčenju je bila aktivnost tega izvlečka še vedno prisotna. Učinkoval je proti 8 od 11 testiranih bakterijskih vrst, ni pa vplival na seve vrste *Pseudomonas aeruginosa*. Vidno protibakterijsko aktivnost so imeli še vodni izvlečki spužev *Latrunculia cf. lendenfeldi*, *Isodictya setifera* in 2 nedoločeni vrsti iz razreda *Demospongia*. Za nadaljnje biokemijske raziskave sta primerna vzorca spužev *Hemigellius bidens* in *Latrunculia cf. lendenfeldi*.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Du2
- DC UDC 577:577,18:563.4(043.2)=163.6
- CX antarctic sponges /Porifera /aquatic extracts/secondary metabolites/bioactive compounds/antibacterial activity/antibiotics
- AU DOLINAR, Urška, degree in Biotechnology
- AA SEPČIČ, Kristina (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Večna pot 111
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Study of Molecular Biology
- PY 2013
- TI ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF AQUATIC EXTRACTS FROM SELECTED ANTARCTIC MARINE SPONGES
- DT M.Sc.Thesis (Master Study Programmes: Field Molecular biology)
- NO XVI, 66 p., 9 tab., 14 fig., 1 ann., 226 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB As the result of excessive and imprudent use of antibacterial agents, the mankind is today faced with the problem of an increasing number of bacteria resistant to generally used antibiotics. Sponges are sessile filter feeders that produce a large number of bioactive compounds, which serve as a defence against the predators and in territorial competition. Because of synthesis of bioactive metabolites, sponges are a promising source of new antibacterial agents that could be used in biomedical applications. We investigated the antibacterial activity of aqueous extracts of Antarctic marine sponges using the agar diffusion method. Fresh and heated extracts were assayed on a variety of Gram<sup>+</sup> and Gram<sup>-</sup> bacteria, some of which were antibiotic-resistant, and the others were non-pathogenic. As a positive control, 5 antibiotics of various dilutions were used. Distilled water was used as a negative control. Out of 33 aqueous extracts, 16 showed antibacterial activity, of which 11 inhibited bacterial growths, while 5 of them only limited the growth. Pronounced antibacterial activity was observed using the aqueous extract of *Hemigellius bidens* sponge. After the dilution, the activity of the extract was still present. This extract affected against 8 out of 11 tested bacteria, but did not have an impact on *Pseudomonas aeruginosa* strains. Aqueous extracts of *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Isodictya setifera* and 2 different species of *Demospongia* have also shown a visible antibacterial activity. *Hemigellius bidens* and *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* sponges are suitable candidates for further biochemical studies and isolation of antimicrobial compound(s).

## KAZALO VSEBINE

	Str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA .....</b>	<b>III</b>
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION .....</b>	<b>IV</b>
<b>KAZALO VSEBINE .....</b>	<b>V</b>
<b>KAZALO PREGLEDNIC .....</b>	<b>VII</b>
<b>KAZALO SLIK .....</b>	<b>VIII</b>
<b>KAZALO PRILOG .....</b>	<b>X</b>
<b>OKRAJŠAVE IN SIMBOLI .....</b>	<b>XI</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 NAMEN DELA .....	2
1.2 HIPOTEZE .....	2
<b>2. PREGLED OBJAV .....</b>	<b>3</b>
2.1 ANTIBIOTIK .....	3
2.2 ZGODOVINA .....	3
2.3 DELOVANJE IN RAZDELITEV ANTIBIOTIKOV .....	4
<b>2.3.1 Razdelitev antibiotikov glede na mehanizem delovanja .....</b>	<b>5</b>
2.4 UPORABA IN FARMAKODINAMIKA .....	6
2.5 ODPORNOST .....	7
<b>2.5.1 Mehanizmi odpornosti .....</b>	<b>8</b>
2.6 ALTERNATIVE ANTIBIOTIČNEMU ZDRAVLJENJU .....	10
2.7 ISKANJE NOVIH ANTIBIOTIKOV .....	12
<b>2.7.1 Vpliv globalnih ekspresijskih raziskav novih antibiotikov .....</b>	<b>13</b>
2.8 BIOAKTIVNE SNOVI IZ MORSKIH ORGANIZMOV .....	14
<b>2.8.1 Biološko aktivne učinkovine iz spužev .....</b>	<b>15</b>
<b>2.8.2 Bioaktivne snovi iz polarnih spužev .....</b>	<b>18</b>
<b>2.8.3 Razvoj novih učinkovin in uporaba v terapevtske namene .....</b>	<b>19</b>
<b>2.8.4 Preglednica objavljenih raziskav biološko aktivnih učinkovin iz spužev .....</b>	<b>19</b>

<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>20</b>
3.1 MATERIALI .....	20
3.1.1 Vzorci spužev .....	20
3.1.2 Priprava vodnih izvlečkov .....	20
3.1.3 Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih .....	20
3.1.4 Bakterijski sevi.....	23
3.1.5 Antibiotiki .....	24
3.2 METODE.....	24
3.2.1 Priprava tekočega gojišča za prekončne kulture.....	24
3.2.2 Nacepitev bakterijske kulture .....	24
3.2.3 Priprava trdnega agarne gojišča .....	24
3.2.4 Inokulacija s prekončno kulturo .....	24
3.2.5 Razlivanje na petrijeve plošče .....	25
3.2.6 Vrtanje lukenj v strjene agarne plošče.....	25
3.2.7 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju .....	25
3.2.8 Odčitavanje rezultatov .....	25
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>26</b>
4.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST VODNIH IZVLEČKOV SPUŽEV .....	26
4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ANTIBIOTIKOV .....	34
<b>5. RAZPRAVA</b> .....	<b>38</b>
<b>6. SKLEPI</b> .....	<b>43</b>
<b>7. POVZETEK</b> .....	<b>44</b>
<b>8. VIRI</b> .....	<b>45</b>

ZAHVALA

PRILOGE

## KAZALO PREGLEDNIC

	Str.
Preglednica 1: Oznake vzorcev, vrste izoliranih spužev in suha teža vodnih izvlečkov.....	20
Preglednica 2: Uporabljeni Gram <sup>+</sup> in Gram <sup>-</sup> , odporni in nepatogeni bakterijski sevi .....	23
Preglednica 3: Uporabljeni antibiotiki in njihove izhodne koncentracije v mg/ml. ....	24
Preglednica 4: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih izvlečkov spužve <i>Hemigellius bidens</i> na različne seve <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i> sp. in bakterije <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	29
Preglednica 5: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih izvlečkov spužve <i>Bathydorus</i> cf. <i>spinosus</i> na različne seve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
Preglednica 6: Indukcija plakov in preprečitev tvorbe pigmenta bakterij <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958 in <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1/13160 pri nekaterih izvlečkih.....	30
Preglednica 7: Rezultati protibakterijske aktivnosti redčenih vodnih izvlečkov različnih vrst antarktičnih spužev na bakterijah <i>Staphylococcus epidermidis</i> in <i>Bacillus subtilis</i>	31
Preglednica 8: Koncentracije redčenih antibiotikov.....	34
Preglednica 9: Rezultati antibiograma za vse bakterijske vrste. ....	35



## KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Alexander Fleming (Wikipedia, 2013).....	4
Slika 2: V sredini plošče je kolonija plesni <i>Penicillium notatum</i> , ki izloča antibiotik penicilin (Todar, 2008: 1) .....	4
Slika 3: Tarče delovanja antibiotikov (Moore, 2013).....	5
Slika 4: Testiranje občutljivosti bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> proti antibiotikom po metodi Kirby-Bauer z difuzijo na diskih (Wikipedia, 2013). .....	7
Slika 5: Velikost inhibicijske cone rasti mikroorganizmov je pokazatelj občutljivosti mikrobov na antibiotike (Scott, 2009: 46). .....	7
Slika 6: Primerjava mehanizmov horizontalnega prenosa genov (Swarog, 2013).....	9
Slika 7: Mehanizmi odpornosti na antibiotik pri bakterijah (gWhiz, 2013).....	10
Slika 8: A, B: Barvili variolin in diskorabdin v polarni rdeči spužvi <i>Kirkpatrickia variolosa</i> (A) in zeleni spužvi <i>Latrunculia apicalis</i> (B), ki odvrata moske zvezde. C: barvilo kinolin v kaktusni spužvi <i>Dendrilla membranosa</i> brani spužvo proti naseljevanju morskih bakterij. D: barvilo erebusinon v spužvi <i>Isodictya erinacea</i> povzroča inhibicijo levitve in smrtnost plenilskih rakov. J.B. Baker (McClintock in sod., 2005: 366). .....	17
Slika 9: Antarktične spužve (a) <i>Latrunculia apicalis</i> , (b) <i>Kirkpatrickia variolosa</i> in (c) <i>Isodictya setifera</i> .....	18
Slika 10: (A, B, 194-m globine, C, D, 112 m). (A) <i>Rossella nuda</i> , cevasta, gladka, kremno rjava spužva (desno zgoraj, spodaj levo in na sredini), <i>Rossella racovitzae</i> , bela spužva spodaj levo, dve spužvi rodu demosponge, verjetno <i>Cinachyra barbata</i> , desno spodaj <i>Rossella nuda</i> . (B) Več primerkov spužve <i>Rossella racovitzae</i> (bela s projekcijo iglic) in <i>Rossella nuda</i> (kremasta, z gladko zunanostjo). (C) zgoščene steklene spužve rodu demosponge in majhne okrogle bele spužve <i>Cinachyra antarctica</i> . (D) <i>Rossella nuda</i> (desno) in <i>Cinachyra barbata</i> (levo na sredini). J. Gutt, APM (Leys in sod., 2007: 88). .....	23

Slika 11: Občutljivost bakterije <i>E. coli</i> 4 M 206 B <sub>2</sub> 3 CTX-M1 ST131 na kuhan (41ak) in svež (41a) izvleček spužve <i>Hemigellius bidens</i> (Strugar, 2012). .....	26
Slika 12: Primer nastanka plakov pri kuhanem (8k) in svežem (8) izvlečku spužve <i>Bathydorus</i> cf. <i>spinosus</i> na plošči z nacepljenim sevom <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958 (Strugar, 2012). .....	27
Slika 13: Cona inhibicije rasti <i>Bacillus subtilis</i> , oz. protibakterijska aktivnost .....	28
Slika 14: Antibiogram <i>Bacillus subtilis</i> (Strugar, 2012). .....	34

## KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica objavljenih raziskav biološko aktivnih učinkovin iz spužev

## OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

-	Preprečitev tvorbe pigmenta
*	Indukcija plakov
^	Multirezistentni klinični izolat
•	Nepatogen laboratorijski sev
30S, 50S	Mala in velika podenota ribosomov pri prokariontih
3Y1	Fibroblastne podganje metastazne rakaste celice
A549	Človeške celice raka pljuč
ABC	ATP – vezavni transporterji
Amp	Ampicilin
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hidroksi-5-metil-4-izoksazolpropionska kislina, receptor
APUA	Zveza za preudarno rabo antibiotikov
Ara – A	1- $\beta$ -D arabinofuranozil adenin / Citarabin
Ara – C	1- $\beta$ -D arabinofuranozil citozin / Vidarabin
ASABF	Ascaris suum antibakterijski faktor
AT	$\alpha$ -1-adrenergični receptorji
ATP-aza	Encim adenozin trifosfataza
BSC	Opičje ledvične celice
C. inh.	Cona inhibicije
C. om.	Cona omejene rasti
Ca <sup>2+</sup>	Kalcijev ion
Cdc25	Encim fosfataza, ki sodeluje v ciklu celične delitve
Cf.	Primerljiv

CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diklorometan
Clp P	Encim kazeinolitična proteaza C
Cm	Kloramfenikol
CP	Človeške predrakaste epitelijske celice nedisplastične metaplazije
d H <sub>2</sub> O	Destilirana voda
DKP	Diketopiperazin
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
ESBL	Beta-laktamaze z razširjenim spektrom delovanja
FCB1	EST knjižnica <i>P. falciparum</i>
GTP	Gvanozin trifosfat
HCT-116	Človeške celice raka debelega črevesa
HeLa	Človeške celice raka materničnega vratu
HIV	Humani imunodeficientni virus
IP <sup>3</sup>	Inozitol trifosfat
k	Vzorec »kuhane« serije
KAMP	Kationski antimikrobni peptidi
KB	Pod linija HeLa celic
Kn	Kanamicin
L-1210	Rakaste celice mišje limfocitne levkemije
L5178Y	Mišje fibroblastoidne rakaste celice timusa
LB	Luria–broth gojišče
LPS	Lipo polisaharid
mRNA	Prenašalna, messenger RNA
MBK	Minimalna baktericidna koncentracija

MDR	Večkratna odpornost na zdravila / multirezistenca
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MRAB	Večkratno odporne bakterije <i>Acinetobacter baumannii</i>
MRSA	Proti meticilinu odporne bakterije <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP	Proti meticilinu odporne bakterije <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
NCI-H460	Ne drobnocelične pljučne rakaste celice
NMDA	N- metil-D-aspartatni receptor, glutamatni receptor
NO	Dušikov oksid
P388	Celice mišje levkemije
PABA/PABK	Para - aminobenzoic acid / Para-aminobenzojska kislina
PAF	Trombocite aktivirajoči faktor
PB	Sponge primorph
PBP	Penicilin vezavni protein
PC12	Podganje celice nadledvičnega dela hrbtenjače
Pfnek1	Gen, ki kodira protein parazita <i>Plasmodium falciparum</i>
Ply C	Virusni hidrolitični protein C
R&R	Raziskave in razvoj
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinska kislina
SB	Sponge associated bacterium / simbiotska bakterija
sp.	Vrsta
tRNA	Prenašalna RNA
Tc	Tetraciklin
TXB <sub>2</sub>	Tromboksen B <sub>2</sub>

VISA                    *Staphylococcus aureus*, ki je intermediarno odporen proti vankomicinu

VRE                    Proti vankomicinu odporen *Enterococcus*

VRSA                   Proti vankomicinu odporen *Staphylococcus aureus*

## 1. UVOD

Narava je ogromen vir aktivnih učinkovin, ki jih izločajo živi organizmi. Do danes so v morskih organizmih odkrili okrog 20.000 biološko aktivnih naravnih spojin, kar 37% teh pa naj bi izhajalo iz morskih spužev. Spužve (Porifera) imajo zaradi sesilnega načina življenja kemično obrambo kot edini odgovor na stresne dejavnike v okolju, med katere spadajo: teritorialna kompeticija, obramba pred plenilci in patogeni (Sepčić, 2008). Spužve so izjemno bogat vir sekundarnih metabolitov kot so terpenoidi, alkaloidi, poliketidi, peptidi, sladkorji, steroidi in drugi (Simmons in sod., 2005), ki delujejo hemolitično, protivnetno, protitumorsko, protivirusno, protibakterijsko, protimalarično in protiglivno (Sipkema in sod., 2005). Prav tako so ugotovili, da so lahko simbiotske bakterije, ki živijo na ali v spužvah, dejanski proizvajalci nekaterih sekundarnih metabolitov izoliranih iz spužev (Sipkema in sod., 2005). Te učinkovine bi lahko bile potencialni vir antibiotikov v medicini in farmaciji. Danes premore tržišče le tri »morske« spojine, ki se tržijo pod komercialnimi imeni Vidarabin, Citarabin in Zikonotid (Sepčić, 2008).

Zikonotid (Prialt<sup>TM</sup>) je prva morska učinkovina oz. peptid izoliran iz  $\omega$ -konotoksina polža *Conus magus*, ki ima medicinsko uporabo. Zikonotid je specifičen blokator enega od podtipov kalcijevih kanalčkov in deluje kot analgetik. Vidarabin je učinkovina izolirana iz spužve *Cryptotethia crypta* in deluje protivirusno na virusa, ki povzročata hepatitis in herpes. Obstajata dve različici in sicer Ara-A (Vidarabin) in Ara-C (Citarabin), ki se trenutno uporabljata tudi za zdravljenje limfomov in levkemij. Tri nove morske učinkovine so v kliničnih testiranjih za zdravljenje akutne bolečine, tri so v kliničnem vrednotenju za zdravljenje astme, ena pa je predmet kliničnih ocen za zdravljenje Alzheimerjeve bolezni. Številne druge molekule so se v laboratorijskih poskusih izkazale učinkovite proti malariji, rakavim obolenjem in drugim nalezljivim boleznim, vendar (še) niso v klinični uporabi (Fenical, 2006).

Vse pogosteje se medicina srečuje z resnim problemom odpornosti bakterij proti danes pogosto uporabljanim antibiotikom, zato je vedno znova potrebno iskati nove alternative in odkrivati tarče potencialnih antibiotikov. Odkrivanje novih antibiotičnih učinkovin je eden najpomembnejših izzivov biomedicinskih raziskovalcev, saj naraščajoča prisotnost večkratno odpornih bakterijskih sevov resno ogroža našo zdravstveno blaginjo (Turk in sod., 2013), poleg tega pa še vedno niso odkrili zdravil proti nekaterim neozdravljivim boleznim. Problem protibakterijskih učinkovin iz morskih naravnih virov je, da jih je težko izolirati v zadostnih količinah. Bioaktivne molekule so zelo kompleksne, organska sinteza pa je zelo zapletena, če ne celo nemogoča (Sepčić, 2008).

Večino raziskav morskih organizmov so opravili na tropskih spužvah, mi pa smo se odločili, da pozornost usmerimo tudi na polarne spužve, saj glede na vse odkrite biološko aktivne snovi, le 3 % izhajajo iz organizmov, ki živijo v hladnih vodnih ekosistemih.



## 1.1 NAMEN DELA

Cilj naloge je bil testirati protibakterijsko učinkovitost liofiliziranih vodnih izvlečkov izbranih antarktičnih spužev. Rezultate smo primerjali z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz že raziskanih morskih spužev. Poleg tega smo s pomočjo literature in dosedanjih raziskav primerjali aktivnost izvlečkov na določene seve bakterij, ki živijo v različnih ekosistemih in tudi aktivnost na bakterijsko odporne klinične seve. Tako smo ovrednotili še ekološki pomen protibakterijskih snovi iz testiranih spužev.

## 1.2 HIPOTEZE

Postavili smo naslednje hipoteze:

- Polarne spužve imajo v primerjavi s tropskimi manj bioaktivnih učinkovin in manjšo protibakterijsko aktivnost zaradi manjše naseljenosti polarnih okolij.
- Predvidevamo, da je biološka pestrost tega ekosistema manjša kakor v tropskih vodah.

Z difuzijsko metodo na petrijevih ploščah z agarjem smo poskušali ugotoviti protibakterijsko aktivnost vodnih izvlečkov antarktičnih morskih spužev proti različnim bakterijskim sevom: Gram pozitivnim, Gram negativnim, nepatogenim in proti antibiotikom odpornim kliničnim sevom.

## 2. PREGLED OBJAV

### 2.1 ANTIBIOTIK

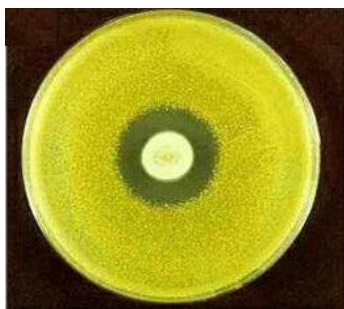
Antibiotik je kemijska spojina, ki povzroča smrt oz. zavira rast bakterij. Izraz antibiotik je prvič uporabil ameriški mikrobiolog Selman Waksman s sodelavci leta 1942. Po definiciji je antibiotik katerakoli kemijska spojina, proizvedena s strani mikroorganizmov, ki predstavlja zaviralca rasti drugih mikroorganizmov pri visokih redčitvah (Waksman, 1947).

### 2.2 ZGODOVINA

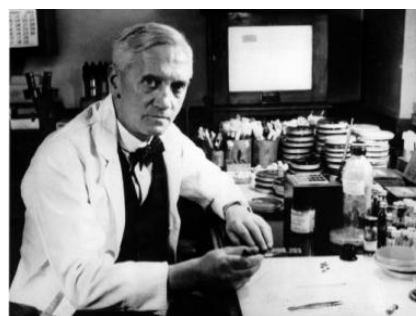
Snovi s protimikrobnimi učinki, predvsem rastlinske izvlečke, uporabljamo ljudje že tisočletja. Opisi delovanja teh snovi proti okužbam v tradicionalni kitajski medicini so stari več kot 2.500 let (Lindblad, 2008), poznali pa so jih tudi stari Egipčani, Grki in druga antična ljudstva. Prvi znanstveno opisani naravni antibiotik je penicilin, ki ga je leta 1928 opisal Alexander Fleming (sliki 1 in 2), desetletje kasneje pa sta Ernst Chain in Howard Florey razvila metodo za njegovo masovno proizvodnjo in prečiščevanje (Todar, 2009).

Očiščen penicilin je pokazal potencialno protibakterijsko učinkovitost proti širokemu spektru bakterij in imel nizko toksičnost za ljudi. Odkritje tako mogočnega antibiotika je bilo neprecenljivo in razvoj penicilina je vodil k obnovitvi zanimanja za iskanje antibiotičnih učinkovin podobne učinkovitosti in varnosti (Florey, 1945). Za odkritje in razvoj penicilina kot terapevtske učinkovine so si Ernst Boris Chain, Howard Walter Florey in Alexander Fleming leta 1945 delili Nobelovo nagrado za medicino oz. fiziologijo (Todar, 2009).

Izraz antibioza, kar pomeni proti življenju, je prvič opisal francoski bakteriolog Vuillemin (Foster in Raoult, 1974). Le-to so prvič opisali leta 1877 pri bakterijah, ko sta Louis Pasteur in Robert Koch opazila, da lahko spore bakterije rodu *Bacillus* v zraku preprečijo rast bakterij *Bacillus anthracis* (Landsberg, 1949). Te učinkovine so kasneje preimenovali v antibiotike (Waksman, 1947). Še kasneje je Paul Ehrlich odkril medicinsko pomembno učinkovino, sintetični salvarsan, antibiotik, ki ga danes imenujemo arsfenamin (Limbird, 2004).



Slika 2: V sredini plošče je kolonija plesni *Penicillium notatum*, ki izloča antibiotik penicilin (Todar, 2008: 1)



Slika 1: Alexander Fleming  
(Wikipedia, 2013)

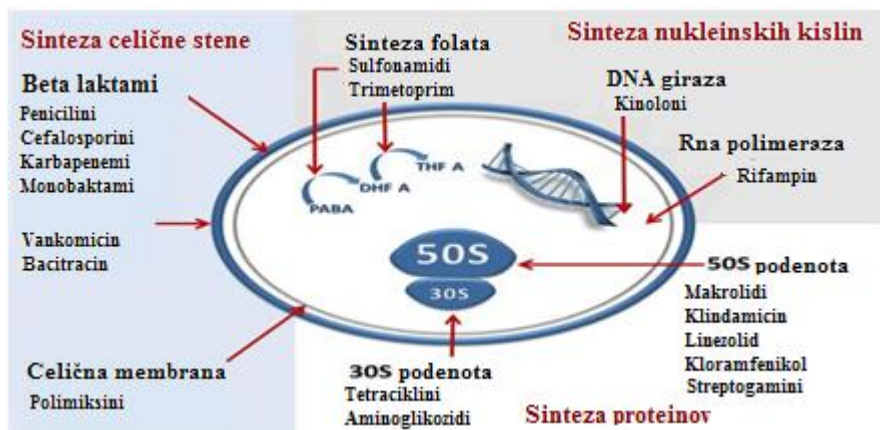
Rene Dubos je poročal o odkritju prvega naravno odkritega antibiotika gramicidina iz bakterije *Bacillus brevis*. Bil je eden prvih komercialno proizvedenih antibiotikov, univerzalen in učinkovito uporaben za zdravljenje ran in razjed med Drugo svetovno vojno (Van Epps, 2006). Metode za sintezo antibiotikov so do danes močno napredovale, še vedno pa jih večino pridobimo s kemičnimi spremembami naravnih snovi, redkeje pa neposredno od živih organizmov (von Nussbaum in sod., 2006).

Antibiotične učinkovine izvirajo iz gliv, bakterij, lišajev ali višjih rastlin. V našem primeru smo jih iskali v spužvah. Iskanje novih učinkovin je pomembna panoga farmacije, saj je zaradi množične uporabe prišlo pri bakterijah do razvoja odpornosti proti antibiotikom. Antibiotiki izvajajo močan selekcijski pritisk na populacije bakterij, ki so zaradi kratkega generacijskega časa sposobne hitro razviti mehanizme za odpornost. Ti mehanizmi vključujejo encime za razgradnjo učinkovin ali spremembe v steni oz. membrani, ki preprečujejo, da bi se učinkovina vezala na površino celice (Li in Nikadio, 2009).

### 2.3 DELOVANJE IN RAZDELITEV ANTIBIOTIKOV

Večina antibiotikov ima za tarčo bakterijske procese in procese rasti (Calderon in Sabundayo, 2007). Delujejo tako, da motijo delovanje bistvenih bakterijskih encimov, preprečijo sintezo celične stene, delujejo na presnovo folne kisline, strukturo citoplazemske membrane, DNA-girazo ali sintezo beljakovin (50S in 30S inhibitorji) (Todar, 2008).

Antibiotike navadno razvrstimo glede na mehanizem delovanja, kemijsko strukturo in spekter aktivnosti. Glede na biološki učinek na mikroorganizme jih delimo na baktericide, ki trajno uničijo bakterije in na bakteriostatike, ki začasno zavro njihovo razmnoževanje (Todar, 2008). Spodnja slika prikazuje tarče v bakterijski celici, na katere deluje antibiotik.



Slika 3: Tarče delovanja antibiotikov (Moore, 2013)

### 2.3.1 Razdelitev antibiotikov glede na mehanizem delovanja

Glede na mehanizem delovanja razdelimo antibiotike na tiste, ki preprečijo izgradnjo bakterijske celične stene. To so  $\beta$ -laktamski antibiotiki med katere štejemo (peniciline: ampicilin, meticilin, penicilin G in V; cefalosporine 1., 2. in 3. generacije: cefoksitin; monobaktame: aztreonam; karbapeneme: cilastatin, imipenem, meropenem). Vsi poleg fosfomicina inhibirajo delovanje encima transpeptidaza in tako preprečujejo prečno povezovanje peptidoglikanov. Nastajajoča celična stena zato ni več zmožna ščititi notranjosti bakterijske celice in vanjo vdre voda ter čez čas bakterija lizira. Ti antibiotiki torej delujejo baktericidno. Nekatere bakterije izločajo betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase). To so encimi, ki inaktivirajo različne  $\beta$ -laktamske antibiotike in so zato bakterije proti njim odporne (Ohlsen in sod., 2008). Zato  $\beta$ -laktamske antibiotike včasih kombiniramo z zaviralci  $\beta$ -laktamaze (klavulanska kislina, sublaktam). Glikopeptidi, kot je vankomicin in karbapenemi (lorakarbef), se vgradijo v bakterijsko celično steno, kjer nastanejo pore skozi katere vdre voda. Delujejo baktericidno, a le na Gram pozitivne bakterije (Todar, 2008).

Antibiotiki, ki preprečijo sintezo proteinov delujejo bakteriostatično (Finberg in sod., 2004). To so tetraciklini (oksitetraciklin, tetraciklin, metaciklin). So široko spektralni antibiotiki, torej delujejo na Gram negativne in Gram pozitivne bakterije. Vežejo se na ribosomsko podenoto 30S in preprečijo vezavo tRNA in s tem sintezo beljakovin. Tetraciklini tvorijo s kalcijevimi ioni komplekse in se deaktivirajo, zato jih ne smemo uživati z mlekom ali antacidi. Tudi aminoglikozidi, kot so gentamicin, kanamicin, neomicin in streptomycin, se prav tako kot tetraciklini vežejo na ribosomsko podenoto 30S ali 50S, vendar se sinteza beljakovin s tem ne ustavi. Nastajajo pa nefunkcionalne beljakovine, ki jih bakterija ne more uporabljati, lahko pa so za bakterijo celo toksične. Makrolidni antibiotiki (azitromicin, eritromicin), linkozamidni antibiotiki (klindamicin, linkomicin) in kloramfenikol se vežejo na ribosomsko podenoto 50S in preprečijo vezavo mRNA na ribosom, zato se prekine sinteza beljakovin. Oksazolidononi (linezolid) preprečijo sintezo proteinov z oviranjem iniciacije translacije (Todar, 2008).

Polipeptidni antibiotiki (bacitracin, polimiksin B) onemogočijo zaščitno funkcijo citoplazemske membrane. Gramicidin tvori pore v membrani in v celico vdrejo neželene ali celo škodljive snovi. Lipopeptidi (daptomicin) podobno kot polipeptidi z vezavo na membrano le to depolarizirajo, pride do izgube zaščitne funkcije membrane. Vsi učinkujejo baktericidno (Todar, 2008).

Sintezo nukleinskih kislin DNA in RNA preprečujejo fluorokinoloni kot je ciprofloksacin. Ti so popolnoma sintetičnega izvora, zato jih po stari definiciji sploh ne štejemo med antibiotike. Preprečijo delovanje DNA-giraze ali topoizomeraze IV. Tudi sulfonamidi (mafenid, sulfacetamid) in trimetoprim motijo sintezo nukleinskih kislin s tem, ko ovirajo sintezo folne kisline z delovanjem na encim, ki katalizira preoblikovanje PABA oz. PABK (para-aminobenzojska kislina). PABK je prekursor sinteze folne kisline, ki je nujna za sintezo nukleinskih kislin. Posledica je baktericidno zaviranje razmnoževanja bakterij. Imidazolni antibiotiki (metronidazol) s proizvodnjo toksičnih prostih radikalov motijo stabilnost DNA in proteinov. Miksopironin se veže na RNA-polimerazo in zavre funkcijo branja in prenosa DNA zapisa. To preprečuje RNA-polimerazi posredovanje genetske informacije na ribosome, kar povzroči propad bakterijske celice (Mukhopadhyay in sod., 2008).

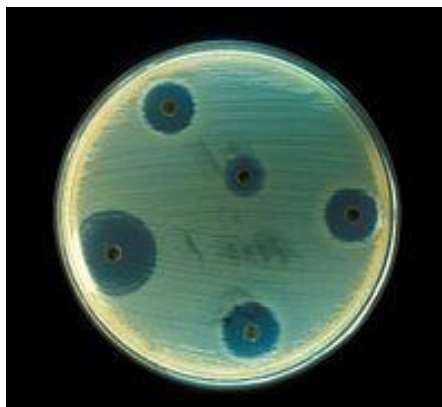
Po 40-let trajajočem upadu v odkrivanju novih protimikrobnih spojin, so v klinično uporabo prišli štirje novi razredi antibiotikov: ciklični lipopeptidi (daptomicin), gliciklini (tigeciklin), oksazolidinoni (linezolid) in lipramicini (kot je fidaksomicin) (Cunha, 2009). Nadaljnja razvrstitev je odvisna od njihove ciljne specifičnosti. Antibiotiki z ozkim spektrom delovanja delujejo na določene vrste bakterij, medtem ko antibiotiki s širokim spektrom delovanja vplivajo na širok nabor bakterij (Walsh, 2003).

## 2.4 UPORABA IN FARMAKODINAMIKA

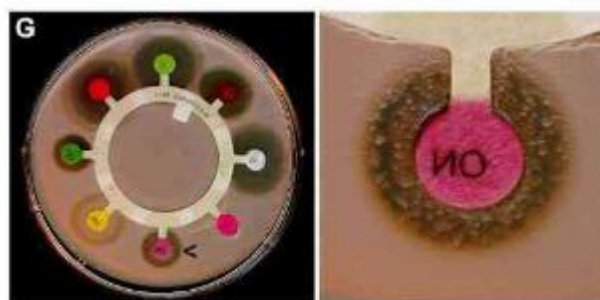
Antibiotike uporabljamo v medicinske namene za zdravljenje bakterijskih infekcij. Uspešen izid zdravljenja s protibakterijskimi spojinami je odvisen od več dejavnikov. Ti vključujejo obrambne mehanizme gostitelja, mesto okužbe ter farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti antibiotika (Pankey in Sabath, 2004). Baktericidna aktivnost antibiotikov je lahko odvisna od faze rasti bakterij in pogosto zahteva stalno metabolno aktivnost in delitev bakterijske celice (Mascio in sod., 2007).

Ker je aktivnost antibiotika pogosto odvisna od njegove koncentracije (Rhee in Gardiner, 2004), *in vitro* opredelitev protimikrobne aktivnosti pogosto vključuje določitev minimalne inhibitorne koncentracije in minimalne baktericidne koncentracije protibakterijske učinkovine (Pankey in Sabath, 2004), ki sta ponazorjeni na slikah 4 in 5. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je definirana kot minimalna koncentracija protimikrobne učinkovine, ki zavre vidno rast mikroorganizma po prekonočni inkubaciji. Minimalna

baktericidna koncentracija (MBK), pa je minimalna koncentracija protimikrobne učinkovine, ki prepreči rast organizma po subkultivaciji na gojišču brez antibiotika (Andrews, 2001).



Slika 4: Testiranje občutljivosti bakterije *Staphylococcus aureus* proti antibiotikom po metodi Kirby-Bauer z difuzijo na diskih (Wikipedia, 2013)



Slika 5: Velikost inhibicijske cone rasti mikroorganizmov je pokazatelj občutljivosti mikrobov na antibiotike (Scott, 2009: 46)

## 2.5 ODPORNOST

Odpornost proti antibiotiku se pojavi, ko le-ta izgubi sposobnost, da učinkovito nadzira rast ali ubije bakterijo oz., ko so bakterije sposobne preživeti in se še naprej množiti ob navzočnosti terapevtskih stopenj antibiotikov (APUA, 2012). Patogene vrste, ki so postale odporne proti antibiotikom povzročajo okužbe, ki jih ni mogoče zdraviti z običajnimi, nekdanj učinkovitimi antibiotiki in zdravili ali z njihovimi običajnimi, predhodno učinkovitimi odmerki in koncentracijami (Answers, 2013).

Nastanek odpornosti bakterij proti protimikrobnim učinkovinom je pogost pojav. Pojav odpornosti med zdravljenjem z antibiotiki pogosto odraža evlucijske procese bakterij, ki si izmenjujejo gene za odpornost. Terapija z antibiotiki lahko povzroči pojav bakterij, ki imajo fiziološko ali gensko okrepljeno sposobnost preživetja visokih doz antibiotikov. Odpornost lahko torej pod določenimi pogoji povzroči prednostno rast in preživetje

odpornih bakterij, medtem ko je rast občutljivih bakterij zaustavljena z antibiotikom (Levy, 1994).

Posebno težavo predstavlja dejstvo, da antibiotike, predvsem v Zahodnem svetu, pogosto uporabljamo napačno—v premajhnih ali prevelikih odmerkih, premalo časa ali celo za zdravljenje virusnih okužb, proti katerim antibiotiki ne delujejo. S tem pospešujemo razvoj sevov bakterij, ki so lahko odporni tudi proti večim antibiotikom hkrati (Soulsby, 2005) in jih imenujemo tudi multirezistentni (MDR) oziroma večkratno odporni mikroorganizmi t.i. »superbugs« (visoko odporni) sevi (Boseley, 2010).

Najbolj znan, proti antibiotikom odporen patogen je MRSA (Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*), pa tudi drugi, kot so VISA (Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus*), VRSA (Vancomycin resistant *S. aureus*), sevi, ki izločajo ESBL (Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase), sem spadajo odporni sevi vrst *Escherichia coli* in *Klebsiella pneumoniae*, VRE (Vancomycin resistant *Enterococcus*) in MRAB (Multi-resistant *Acinetobacter baumannii*) (Todar, 2008).

### 2.5.1 Mehanizmi odpornosti

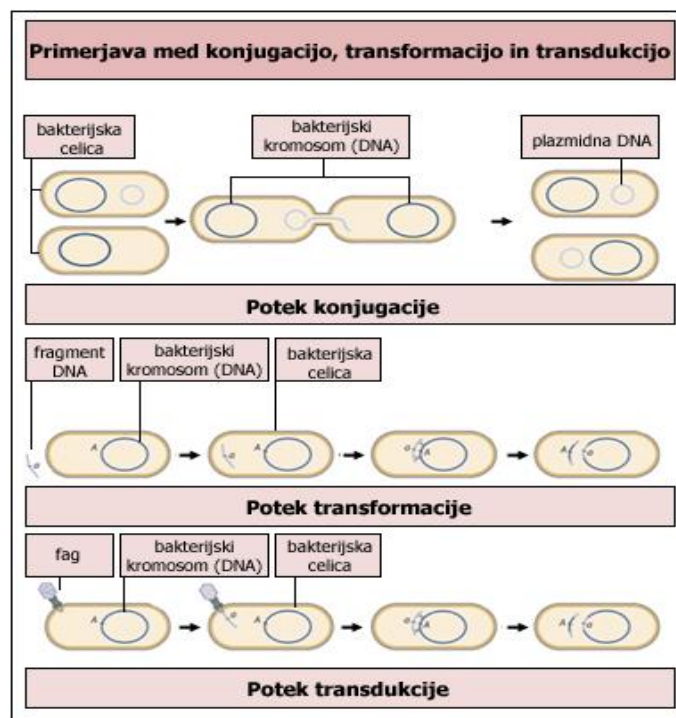
Obstaja več vrst odpornosti na protibakterijske učinkovine. Naravna ali endogena odpornost proti določenemu antibiotiku je lahko del nabora podedovanih genov. (Aleksun in Levy, 2007). Pridobljena odpornost pa je lahko posledica inducirane ali spontane mutacije v bakterijskem kromosomu ali privzema genov z zapisom za odpornost iz drugih bakterijskih vrst s horizontalnim prenosom preko konjugacije, transdukcije ali transformacije. Mehanizmi horizontalnega prenosa genov so prikazani na sliki 6. Transformacija je privzem in izražanje zunaj kromosomske DNA ali RNA. Pri transdukciji se bakterijska DNA prenese iz ene bakterije v drugo s posredovanjem virusa (bakteriofag). S konjugacijo pa se geni z zapisom za odpornost proti antibiotikom izmenjajo med različnimi bakterijskimi sevi ali vrstami preko plazmidov, transpozonov in integronov (mobilni genetski elementi) (Witte, 2004).

Verjetnost, da se pojavijo mutacije, redke spontane spremembe bakterijskega genetskega materiala, je ena na milijon do ena v deset milijonov celic. Genetske mutacije prinašajo različne odpornosti. Številne mutacije omogočajo bakterijam, da proizvedejo močne učinkovine (encime), ki inaktivirajo antibiotike, medtem ko druge mutacije spremenijo celične tarče antibiotika. Spet druge preprečijo vstop antibiotika v celico, in druge proizvedejo črpalne mehanizme, ki izčrpajo antibiotik iz bakterijske celice. Ker bakterije sčasoma zberejo gene z zapisom za številne vrste odpornosti, lahko postanejo odporne proti mnogim različnim družinam uporabljenih antibiotikov (APUA, 2012). Plazmidi ali transpozoni lahko zagotovijo odpornost proti večim antibiotikom. Do večkratne odpornosti



lahko pride tudi, ko mehanizem odpornosti, ki ga kodira en sam gen, izraža odpornost proti več kot eni protibakterijski snovi (Baker-Austin in sod., 2006).

Antibiotik mikroorganizmu predstavlja okoljski pritisk. Odpornost se razvija preko naravne selekcije. Po izpostavljenosti antibiotiku občutljive bakterije pomrejo. Preživele bakterije pa z mutacijo, ki jim omogoča preživetje prenesejo to novo lastnost na njihove potomce, kar vodi k razvoju popolnoma nove generacije odpornih kolonij (Todar, 2008).



Slika 6: Primerjava mehanizmov horizontalnega prenosa genov (Swarog, 2013)

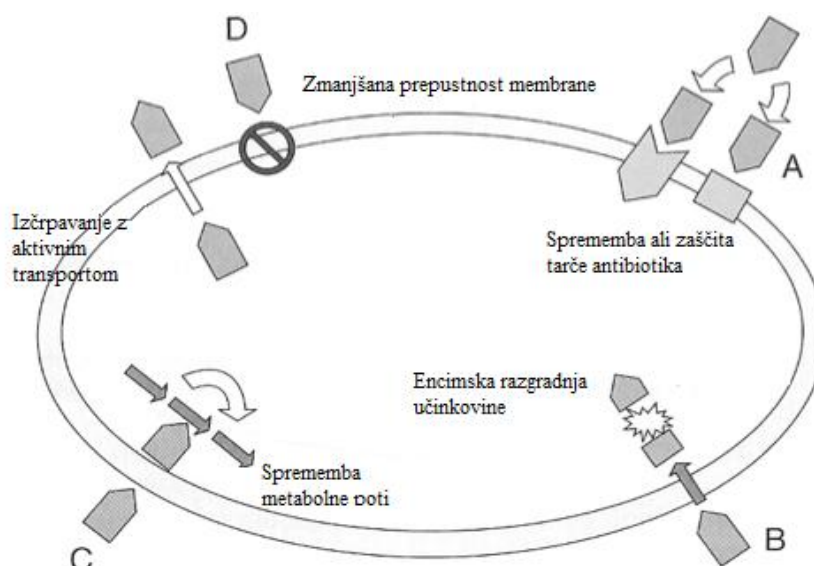
Glavni mehanizmi, s katerimi mikroorganizmi izražajo odpornost proti protimikrobnim sredstvom (slika 7) , so:

- inaktivacija, detoksifikacija ali sprememba učinkovine: npr. encimska cepitev penicilina G z  $\beta$ -laktamazami, aminoglikozidni antibiotiki se razgradijo z aciliranjem ali fosforilacijo, prav tako kloramfenikol (Seme in sod., 1998; Quintiliani in sod., 1999).
- sprememba tarčnega mesta za delovanje antibiotika: npr. sprememba PBP-vezavnega mesta za peniciline, v MRSA in drugih na peniciline odpornih bakterijah,  $\beta$ -laktam, eritromicin (Seme in sod., 1998; Quintiliani in sod., 1999).
- sprememba metabolne poti: nekatere proti sulfonamidu in trimetoprimu odporne bakterije ne potrebujejo para-aminobenzojske kisline (PABA), ki je v bakterijah pomemben prekursor za sintezo folne kisline in nukleinskih kislin (sinteza



deoksinukleotida timina), in katere sintezo inhibirajo sulfonamidi. Mutacija v sinteznem encimu namreč omogoča vezavo ekvalenta folne kisline in prepreči vezavo sulfonamidov, s tem pa omogoči sintezo DNA.

- neprepustnost ali zmanjšana prepustnost celične membrane za antibiotik: odpornost proti fluorokinolonom, kloramfenikolu, sprememba porinov v celični steni Gram negativnih bakterij (Scott, 2009).
- odstranjevanje antibiotika iz bakterijske celice z aktivnim transportom: odpornost Gram negativnih in Gram pozitivnih bakterij na tetracikline (Seme in sod., 1998; Quintiliani in sod., 1999).
- zaščita tarče antibiotika: npr. v Gram negativnih bakterijah, s plazmidi posredovani geni za odpornost proizvajajo proteine, ki se lahko vežejo na bakterijsko DNA-girazo, da jo zaščitijo pred delovanjem kinolonov (Robicsek in sod., 2006).



Slika 7: Mehanizmi odpornosti na antibiotik pri bakterijah (gWhiz, 2013)

## 2.6 ALTERNATIVE ANTIBIOTIČNEMU ZDRAVLJENJU

Povečanje števila sevov bakterij, odpornih proti antibiotikom za konvencionalno zdravljenje, je spodbudilo razvoj alternativnih metod zdravljenja bakterijskih bolezni. Ena od strategij reševanja bakterijske odpornosti proti zdravilom, je odkritje in uporaba snovi, ki spreminjajo odpornost proti komercialnim antibiotikom. Nekateri dejavniki, ki spreminjajo odpornost lahko zavirajo mehanizme odpornosti proti večim antibiotikom. Eden teh mehanizmov je preprečitev prehajanja učinkovin iz celice, kar povečuje občutljivost bakterij za antibiotik. Drugi pristop za boj proti odpornosti proti antibiotikom, je okrepiti delovanje obstoječih antibiotikov na ta način, da jih spremenimo tako, da jih bakterijski encimi, ki povzročajo odpornosti, ne morejo onesposobiti. Alternativno se lahko uporabijo

molekule za privabljanje ("vabe"), ki se uporabljajo skupaj z antibiotikom tako, da encim v odporni bakteriji napade vabo namesto antibiotika. Primera vab v uporabi sta klavulanska kislina in sublaktam, ki blokirata  $\beta$ -laktamaze, encime, ki uničujejo zdravila iz družine penicilinov (APUA, 2012). Alternativen pristop k problemu odpornosti proti antibiotikom torej ni eliminacija odpornih bakterij, temveč poseg v mehanizme, ki spodbujajo odpornost. Na primer, oviranje podvojevanja in prenosa genskega materiala, ki onemogočata prenos genov za odpornost med bakterijami (APUA, 2012). Tudi sožitje med gostiteljem in nekaterimi mikrobi (mlečnokislinskimi bakterijami) kaže, da bi lahko nadaljnje neantibiotične in probiotične strategije pripomogle k ohranitvi učinkovitosti antibiotikov (Ohlsen in sod., 2008).

Alternative antibiotikom so: 1.) terapija z bakteriofagi, ki so bakterijsko specifični in povzročijo propad bakterij pri čemer ne škodujejo človeškemu telesu (Mathur in sod., 2003; Abedon, 2005; Matthey in Spencer, 2008; Merril in sod., 2003; Inal, 2003); 2.) uporaba bakteriocinov, ki omogočajo delovanje antibiotika na bakterijske celice v človeškem telesu (Gillor in sod., 2004, 2005) in jih vnesemo oralno ali gastrointestinalno (Kirkup, 2006); 3.) z uporabo kelatorjev mikrohranil (Jones in sod., 1977), ki omejujejo npr. razpoložljivost železa v telesu in tako preprečijo razmnoževanje bakterij (Brock in sod., 2006); 4.) s cepivi, ki okrepijo imunski sistem gostitelja, da se ubrani pred okužbo, saj bakterije na cepiva ne razvijejo odpornosti (Miller, 2011). Alternativa antibiotikom so tudi različne bioterapije, npr. vnos organizmov, kot so praživali (Nacar, 2008) ali ličinke nekaterih muh, v rane mehkih tkiv pri ljudeh oz. živalih za čiščenje in razkuževanje ran (Opletalová in sod., 2012). V prebavnem traktu so zlasti pomembne žive kulture bakterij (npr. *Lactobacillus casei*) t.i. probiotiki. To so simbionti, ki ovirajo kolonizacijo s patogenimi organizmi (Ljungh in Wadström, 2009). Kot alternativa antibiotikom pridejo v poštev tudi obrambni peptidi gostitelja kot sta v medicini uporabna, polimiksin B in gramicidin S. Kationski antimikrobni peptidi (KAMP) so naravno prisotni v imunskem sistemu gostitelja. S tvorbo por v membrano motijo celovitost bakterijske celice, zmanjšujejo aktivnost določenih proteinov, preprečujejo adhezijo patogenov na gostitelja in prispevajo k odstranjevanju bakterij, gliv, virusov in parazitov (Miller, 2011; Ohlsen in sod., 2008). Lipoproteini iz različnih organizmov prinašajo obetavne rezultate pri zdravljenju okužb z Gram pozitivnimi bakterijami in sicer povzročajo razgradnjo bakterijskih proteinov z encimom kazeinolitična proteaza P (ClpP) (Ohlsen in sod., 2008). Kot alternativo antibiotičnemu zdravljenju štejemo še protimikrobne premaze, protimikrobne bakrene zlitine (Samuel, 2011), srebro, ki je učinkovito proti MRSA (Ohlsen in sod., 2008) in uporabo citokinov namesto antibiotikov v živalski krmni (Kogut, 2000).

Da bi rešili problem odpornosti, bi lahko antibiotike zamenjali z uporabo alternativnih metod in naravnih antibiotičnih učinkovin, ter tako zmanjšali pritisk na klasične antibiotike. Človeštvo že dolgo pozna številne rastline, ki vsebujejo protimikrobne snovi,

kot so česen (*Allium sativum*), črna kumina (*Nigella sativa*), brusnice (*Vaccinium vitis-idaea*), drevo čajevca (*Melaleuca alternifolia*), semena grenivke (*Citrus x paradisi*), čebulo (*Allium cepa*), ameriški slamnik (*Echinacea purpurea*), origano (*Origanum vulgare*), oljčne liste (*Olea europaea*), rastline rodu mlečne grašice (*Astragalus mongholicus* in *A. membranaceus*), hren (*A Armoracia rusticana*), cimet (*Cinnamomum zeylanicum*), kamilico (*Matricaria recutita* in *M. chamomila*) in timijan oz. materino dušico (*Thymus vulgaris*) (Červek, 2011).

Za več kot 2700 rastlin je znano, da učinkujejo proti MRSA. Problem pa je, da za njihovo uporabo ni dovolj podatkov o varnosti in predvsem o njihovi interakciji z običajnimi zdravili. Uporaba olja drevesa čajevca iz Avstralije je enako učinkovita proti MRSA kot klasični antibiotiki. Še uspešnejša je proti vaginalni okužbi s kandido, saj jo povsem uniči, medtem ko je antimikotik ne (Scott, 2009). Za te ugotovitve ni širšega zanimanja, saj farmacevtski industriji nemožnost patentiranja rastlinskih učinkovin preprečuje varovanje odkritih lastnosti, klinični testi pa so seveda zelo dragi. Poleg tega se pojavljajo številne zlorabe, ko proizvajalci ali trgovci oglašujejo večjo učinkovitost pripravka od dejanske, problem pa predstavlja tudi slaba kakovost nekaterih izdelkov. Kljub tem minusom pa obstaja toliko pozitivnih plati, da se uporaba antibiotikom alternativnih terapij vsekakor izplača. Pacienti imajo do pripravkov naravnega izvora izrazito pozitiven odnos. Poleg tega povzročajo manj stranskih učinkov kakor klasični antibiotiki, uporabni pa so tudi kot nadomestna ali podporna terapija tradicionalnemu zdravljenju (Červek, 2011).

## 2.7 ISKANJE NOVIH ANTIBIOTIKOV

Do nedavnega so raziskave in razvoj (R&R) pravočasno razvile zdravila za zatiranje bakterij, ki so postale odporne proti starejšim generacijam antibiotikov. Temu danes ni več tako. Potencialna kriza je nastala kot posledica občutnega zmanjšanja industrijskih raziskav in razvoja ter vedno večjega števila odpornih bakterij. Specialisti za zdravljenje kužnih bolezni so zaskrbljeni zaradi možnosti, da učinkovitih antibiotikov za zdravljenje hudo bolnih bolnikov v bližnji prihodnosti morda ne bo na voljo (Scott, 2009). Ker bakterijska odpornost proti antibiotikom še vedno omejuje učinkovitost antibiotikov, obstaja verjetnost za nastanek svetovne zdravstvene katastrofe. Slabo oz. nezadostno financiranje raziskav antibiotikov je še poslabšalo razmere (Walsh, 2013).

Kljub temu znanstveniki še vedno iščejo nove vire antibiotikov v morskih organizmih, ekstremnih okoljih, v bakterijah globoko pod zemeljsko površino, na koži žab in v določenih žuželkah (APUA, 2012). Stremijo tudi k osveževanju in izboljšavi dosedanjih zdravil s farmakološkim dizajniranjem in analizo (strukturni analogi obstoječih družin antibiotikov), na primer, iščejo nove potencialne zaviralce sinteze celične stene in celične delitve, izboljšujejo vezavo antibiotikov na ribosome in se s tem izogibajo odpornosti bakterij. Primer je uporaba RNA-aptamerov, ki je kemijska ojačitev za vezavo obstoječih

antibiotikov ter tako podaljšuje razpolovno dobo zdravila in stabilnost v telesnih tekočinah (Ohlsen in sod., 2008). Razvoj in trženje dobro raziskanih antibiotikov je manj tvegano in finančno bolj izvedljivo, kot prepoznavanje popolnoma novih razredov antibiotikov (Wecke in Mascher, 2011).

O uspešnosti raziskav in iskanja alternativ antibiotičnemu zdravljenju pričajo naslednja odkritja.

V letu 2012 je skupina raziskovalcev na Univerzi v Leipzigu spremenila protimikrobni peptid, ki je prisoten v čebeljem strupu. Ta prehaja skozi membrano bakterijske celice in se veže na peptide, ki sodelujejo pri zvijanju beljakovin. Zaradi prekinitve gubanja proteinov pride do celične smrti. Učinkovit je proti 37 vrstam bakterij (Gebel, 2012).

Skupini znanstvenikov iz Univerze v Melbournu je uspelo odkriti atomsko strukturo virusnega proteina Ply C, ki je omogočila razumevanje načina eliminacije patogenih bakterij, ki povzročajo različne okužbe, vključno z vnetim grlom, pljučnico in streptokoknim sindromom toksičnega šoka. Dekodiranje je pomemben korak v razvoju proteina v zdravilo. Protein Ply C je podoben letečemu krožniku na katerem je pritrjen par bojnih konic. Deluje tako, da se priklene na površino bakterije in jo prevrta, s čimer jo uniči. Ply C je v svoji prečiščeni obliki 100-krat bolj učinkovit kot katerikoli drugi od znanih encimov, ki povzročajo lizo bakterijske celice. Učinkovito zdravljenje ljudi je sicer oddaljeno vsaj desetletje, vendar so znanstveniki že uspešno zdravili okužbe s streptokoki pri miših (Mercer, 2012).

Ugotovili so, da je glavni vzrok za odpornost bakterij proti antibiotikom, povečana dejavnost mikrobnih ABC transporterjev, kar zmanjšuje učinkovito koncentracijo zdravila v notranjosti mikrobne celice. Inhibitorji ABC transporterjev, ki se lahko uporabljajo v kombinaciji s trenutnimi protimikrobnimi zdravili so že v kliničnih preizkušanjih in bodo kmalu na razpolago za terapevtske namene (Ponte-Sucre, 2009).

Bakterije, ki jih ne moremo gojiti so tudi lahko vir novih antibiotikov. Namesto, da jih poskušajo gojiti, bi izolirano DNA sekvencirali in v metagenomski zbirki poiskali homologne operone, ki proizvajajo antibiotike (Ohlsen in sod., 2008). Prav tako bi lahko DNA izolirano iz ekstremnih habitatov klonirali v ustrezne vektorje in bakterije ter poiskali klon s protibakterijsko aktivnostjo (Wecke in Mascher, 2011).

### **2.7.1 Vpliv globalnih ekspresijskih raziskav novih antibiotikov**

Uvedba orodij za splošno analizo, kot so primerjalna genomika in tehnike izražanja na ravni genoma (funkcijska genomika), vključno z DNA mikromrežami (transkriptomika) in dvodimenzionalno proteinsko gelsko elektroforezo (proteomika), je posodobila način

preučevanja mikrobne fiziologije. Genomsko rudarstvo se uporablja za raziskovanje skritih biosintetskih potencialov v določenih zaporedjih bakterijskih kromosomov in za iskanje novih tarč za antibiotike (Wecke in Mascher, 2011).

Raziskave so pomagale napovedati mehanizem delovanja novih protimikrobnih snovi ali identificirati potencialne biosenzorje specifične za antibiotike in odkriti lokuse za biosintezo novih. Primerjalna genomika velikega števila patogenih in tesno povezanih nepatogenih sevov je prispevala k določitvi induktorjev biosinteze antibiotikov (Wecke in Mascher, 2011).

Raziskave so pomagale pri odkritju novih zaviralnih mehanizmov navidezno znanih zdravil, ki bi lahko bili koristni za razvoj pomožnih zdravil za zdravljenje z antibiotiki. Učinkovitost enega antibiotika se lahko poveča s sočasno uporabo druge protimikrobne učinkovine z dopolnjujočimi lastnostmi—s tako imenovano »součinkovino«. Antibiotika kvinupristin in dalfopristin sta baktericidna zaradi sinergističnih učinkov; vezava ene snovi na ribosome okrepi vezavo in učinkovitost druge snovi. Beljakovine, ki sodelujejo v boju proti oksidativnemu stresu, bi lahko služile kot nove tarče za pomožna zdravila, s čimer bi potencirale učinke že uveljavljenih antibiotikov. Učinek antibiotikov se lahko poveča tudi z zaviranjem ali izbrisom sistemov, ki preprečujejo poškodbe celic (SOS odziv). Pristop z uporabo kombinacije dveh različnih snovi so že uspešno uporabili pri premagovanju odpornosti proti  $\beta$ -laktamom (Wecke in Mascher, 2011).

Signalne molekule za notranjo in medvrstno komunikacijo, ki Gram negativnim bakterijam omogočajo zaznavanje kvoruma, imajo lahko tudi protibakterijske lastnosti. Bakterije ne uporabljajo le tipičnih antibiotikov za pridobitev konkurenčnih prednosti, ampak tudi molekule iz njihovega naravnega okolja (Wecke in Mascher, 2011).

Kljub temu, da so določili veliko novih tarč, je dobljeno število morebitnih novih antibiotikov presenetljivo majhno. Da bi povečali uspešnost, moramo knjižnice spojin razširiti tako, da bodo vključevale tudi nekonvencionalne spojine, kemično modificirane molekule, kakor tudi naravne produkte iz novih virov, kot so sekundarni metaboliti iz morskih organizmov (Wecke in Mascher, 2011).

## 2.8 BIOAKTIVNE SNOVI IZ MORSKIH ORGANIZMOV

Viri poročajo, da so iz morskih organizmov izolirali že več kot 20000 biološko aktivnih molekul (Fusetani, 2000; Yasuhara in Lu, 2010). Ker so spužve sesilni organizmi, komunicirajo in se branijo za svoj obstoj s številnimi biološko aktivnimi učinkovinami, ki jih bodisi proizvajajo same, bodisi so proizvod simbiotskih mikroorganizmov s katerimi živijo v sožitju. Simbionti spužev so največkrat alge, cianobakterije, glive in bakterije, ki lahko predstavljajo tudi do 40 % suhe teže gostitelja. Rast simbiotskih mikroorganizmov

je pod nadzorom spužve in služi kot vir hranil ali kot oskrba z drugimi presnovnimi produkti (Müller in sod., 1981). Spužve proizvajajo veliko število aktivnih spojin, ki vplivajo na rast kopenskih bakterijskih vrst, medtem ko so manj učinkovite proti morskim bakterijam (Laport in sod., 2009). Do sedaj testirani lipofilni in hidrofilni izvlečki iz antarktičnih morskih spužev so pokazali le blage protibakterijske učinke proti bakterijam v povezavi s spužvami. To dokazuje, da simbiotske bakterije običajno ne predstavljajo grožnje spužvam oz. so proti spužvinim učinkovinam odporne, kar lahko pripišemo njihovi koevoluciji z gostiteljem (Peters in sod., 2010). Simbiotske bakterije lahko spužvi, če ta nima dovolj hrane v okolici, predstavljajo alternativni vir hranilnih snovi (McClintock in sod., 2005). Med učinkovinami iz spužev je kar 50% sekundarnih metabolitov biološko aktivnih. Med snovmi z bioaktivnim učinkom so spojine, ki delujejo protivnetno, hemolitično, protitumorsko, protivirusno, imunosupresivno, protibakterijsko, protimalarično, protiglivno, protivegetativno, citotoksično in citostatično. Inhibitorji transkripcije bi bili lahko učinkoviti proti raku in virusnim boleznim. Večina bioaktivnih metabolitov iz spužev je inhibitorjev določenih encimov, ki so vključeni v patogenezo različnih bolezni in lahko predstavljajo spojine vodnice za razvoj novih terapevtikov (Sipkema in sod., 2005).

### **2.8.1 Biološko aktivne učinkovine iz spužev**

Protivnetne učinkovine so večinoma sesterpenoidi in so zaviralci specifičnih encimov različnih bolezni kot je npr. revmatoidni artritis. Trenutno uporabljana nesteroidna protivnetna zdravila velikokrat ne zmorejo nadzorovati bolezni in imajo veliko neželenih stranskih učinkov (De Rosa, 2002), zato so protivnetne učinkovine iz spužev kot sta avaron in avarol še posebej dobrodošle (Müller in sod., 2004).

Protitumorske učinkovine so večinoma zaviralci proteinske kinaze C. Preprečujejo vezavo rakastih celic na endotelij. Za terapijo raka je citoskelet izvrstna tarča, ker so mikrotubuli in mikrofilamenti med celično delitvijo vpleteni v celično organizacijo. Triterpenoidni hidrokinoni iz spužve *Haliclona* sp., so prvi odkriti inhibitorji kinezin motornega proteina. Ti toksini zavirajo delovanje proteina z vezavo na mikrotubulno vezavno mesto, s tem preprečijo funkcijo motornega proteina in tako blokirajo celično delitev (Blackburn in sod., 1999). Poleg učinkovin, ki se povezujejo z mikrotubuli, so odkrili še halihondrin B (Bai in sod., 1991), spongistatin (Bai in sod., 1993), diskodermolid (Ter Haar in sod., 1996), laulimalid (Mooberry in sod., 1999), pelorusid A (Hood in sod., 2002) in diktiostatin (Isbrucker in sod., 2003). Drugi metaboliti, kot je latrunkulin iz spužve *Latrunculia magnifica*, motijo polimerizacijo aktina (Coue in sod., 1987). Salicilamid A iz spužve *Haliclona* sp. je selektivni zaviralec ATP-aze in je pokazal večjo selektivno citotoksičnost za določene rakaste celice kakor za normalne celice (Erickson in sod., 1997). Protitumorske učinkovine kot so diskorabdin D (Perry in sod., 1988), hondropsin A in B (Rashid in sod., 2000) in glaciasterola A in B (Pika in sod., 1992) so primeri spojin s

podobnimi učinki. Citarabin Ara-C (arabinofuranozil citozin) je že v klinični uporabi in se uporablja pri zdravljenju limfomov in levkemij (Müller in sod., 2004).

Gene iz različnih morskih organizmov bodo klonirali, kombinirali in izražali v gostiteljskih bakterijah, s čimer bo možno proizvesti večje količine različnih biološko učinkovitih molekul (Brady in Clardy, 2000; Brady in sod., 2001; Clardy, 2005). Napredek v sistematiki in razvrščanju novih bakterijskih vrst, napredek v načinih gojenja morskih bakterij, ki proizvajajo nove vrste antibiotikov in potencialnih protirakastih učinkovin, bo omogočil širše raziskave teh spojin in njihovo morebitno uporabo. Raziskave hitrih metod sekvenciranja (»shotgun«) DNA iz morske vode so pokazale, da raznolikost mikrobov variira za kar 80 % med vzorci zbranimi samo 161 km narazen. Nedavno so odkrili medicinsko uporabne aktinomicetne bakterije. Primer je rod morske aktinomicete *Salinospora*, ki proizvaja različne molekule kot je salinosporamid A, potencialni inhibitor rasti rakastih celic. Spojina je od leta 2006 v kliničnem preizkušanju. V zadnjih 3 letih so odkrili vsaj 13 novih skupin aktinomicet, ki verjetno vsebujejo podobno zanimive spojine (Jensen in sod., 2005; Stach in Bull, 2005).

Imunosupresivne učinkovine so zaželeno v primerih preobčutljivosti na določene antigene (alergije) ali pri transplantacijah organov. Pacienti, ki prejmejo organ morajo jemati zdravila celo življenje, da preprečijo zavrnitev organa s strani imunskega sistema. Zato je zelo pomembno, da so ta zdravila specifični zaviralci lastnega imunskega sistema. Nekatere spojine s potencialnim imunosupresivnim delovanjem so našli tudi v spužvah (Sipkema in sod., 2005).

Kardiovaskularne učinkovine iz morskih spužev so molekule, ki lahko pomagajo pri nekaterih bolezenskih stanjih, kot so tromboza, ateroskleroza in diabetes (Sipkema in sod., 2005).

Keramidin iz spužve *Agelas* sp. je potencialna učinkovina, ki zavira delovanje živčnega sistema. Je antagonist serotonergičnih receptorjev in blokira s serotoninom posredovano nevronske komunikacije. Serotonin ima v človeškem organizmu vlogo tkivnega hormona in živčnega prenašalca. Je snov, ki se nahaja v serumu in ki vpliva na tonus krvnih žil. Odkrili so več serotoninskih receptorjev, ki so povezani z zlepljanjem trombocitov in so lahko uporabni proti trombozi (krvnim strdkom) (Ruomei in sod., 1996). Najbolj zanimivo je, da bi lahko delovali kot antidepresivna zdravila (Nagayama in sod., 1980).

Mišični relaksanti se uporabljajo za lajšanje kapi ali med intubacijami in operacijami (Frakes, 2001). Motnje v nevro-muskulatorni komunikaciji, ki so posledica stresa, povzročajo stalno mišično aktivacijo (Lundberg, 1995; Edgar in sod., 2002). *Xestospongia* C iz spužve *Xestospongia* sp. je primer mišičnega relaksanta. Je potencialni zaviralec



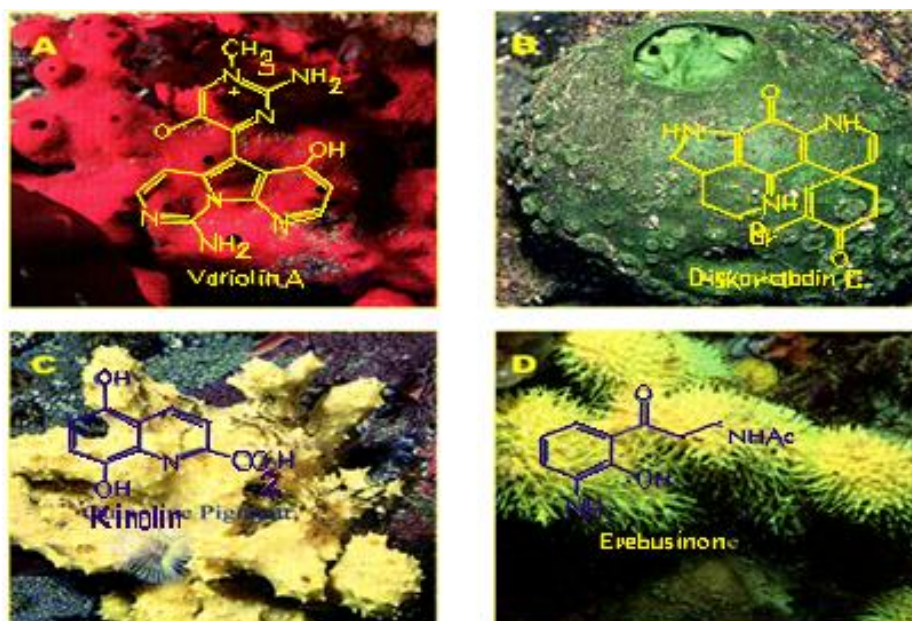
inozitol-3-fosfatnih receptorjev (IP<sub>3</sub>) in Ca<sup>2+</sup> črpalke, ki inhibira z IP<sub>3</sub> povzročeno povečanje krčenja mišic (Miyamoto in sod., 2000).

Protivirusna učinkovina kot je avarol (Müller in sod., 1987), ki so ga patentirali za zdravljenje luskavice (Müller in sod., 1991), je hkrati tudi primer zaviralca virusa HIV. Ara-A oz. Vidarabin (arabinofuranozil adenin) iz spužve *Cryptotethia crypta* je učinkovina, ki inhibira delovanje DNA-polimeraze virusa *Herpes simplex*, pa tudi razmnoževanje virusa HIV (Müller in sod., 2004).

Primer močnih protimalarijskih učinkovin, izoliranih iz spužev, ki jih proizvajajo aktinomicete rodu *Micromonospora*, so manzamini (Sakai in sod., 1986; Ang in sod., 2000; Yousaf in sod., 2002), ki so trenutno v predkliničnih raziskavah (Rao in sod., 2004).

Protibakterijsko aktivnost proti Gram pozitivnim in Gram negativnim bakterijam so odkrili v sekundarnih metabolitih spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi*, imenovanih diskorabdin in trunkulini. Odkrili so jo v 3-alkilpiridinijevih alkaloidih spužve *Haliclona* sp, kot tudi v seskviterpenoidih in galaktozid specifičnemu lektinu iz spužve *Halichondria*. Slednji so pokazali še protiglivno aktivnost (Turk in sod., 2013). Protibakterijsko aktivnost imajo tudi diskodermolidi B, C in D, ki so jih izolirali iz spužve rodu *Discodermia*, in topsentiasterol fosfati A-E iz vrst spužev rodu *Topsentia* in *Halichondria* (Sipkema in sod., 2005).

Na sliki 8 so predstavljeni sekundarni metaboliti oz. barvila iz polarnih spužev.



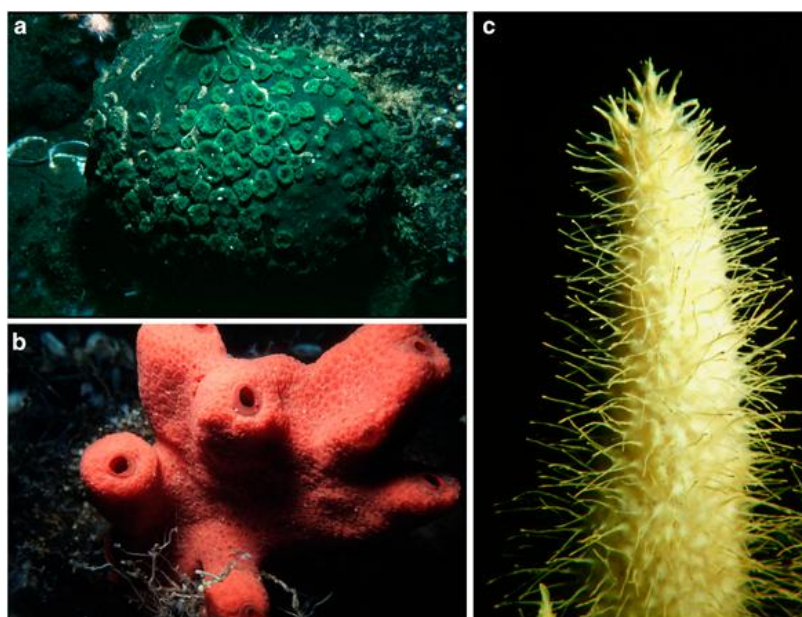
Slika 8: A, B: Barvili variolin in diskorabdin v polarni rdeči spužvi *Kirkpatrickia variolosa* (A) in zeleni spužvi *Latrunculia apicalis* (B), ki odvrata moske zvezde. C: barvilo kinolin v kaktusni spužvi *Dendrilla membranosa* brani spužvo proti naseljevanju morskih bakterij. D: barvilo erebusinon v spužvi *Isodictya erinacea* povzroča inhibicijo levitve in smrtnost penilskih rakov. J.B. Baker (McClintock in sod., 2005: 366)



## 2.8.2 Bioaktivne snovi iz polarnih spužev

Glede na vse do sedaj odkrite naravne biološko aktivne snovi je le okrog 3 % takih, ki so jih izolirali iz organizmov iz polarnih morij (Lebar in sod., 2007). Življenjske združbe spužev, živečih v polarnih morjih so za enkrat zelo slabo raziskane, vendar se raziskovalci zadnje čase ukvarjajo z biološkimi učinkovinami iz antarktičnih spužev, ki bi lahko bile potencialni vir novih naravnih učinkovin. Veliko vrst je neopisanih oz. taksonomsko nedoločenih, njihovi izvlečki pa kažejo protimalarično aktivnost, aktivnost proti oportunističnim nalezljivim boleznim, ki so posledica oslabljenega imunskega sistema in hepatitisu C. Odkritje novih vrst spužev in njihovih bioaktivnih neprečiščenih izvlečkov odpira nove možnosti za izolacijo novih bioaktivnih spojin iz relativno neraziskanega vira (Abbas in sod., 2011).

Do danes najbolj raziskan rod polarnih spužev je *Latrunculia*. Diskorabdin alkaloidi so očitno ena glavnih učinkovin v polarnih spužvah. Diskorabdin C ima potencialno protitumorsko aktivnost. Diskorabdin R so izolirali leta 2000 iz nedoločene vrste antarktičnih spužev *Latrunculia*. Spojina je pokazala podobno aktivnost kot ostali diskorabdini vključno z delovanjem na Gram pozitivne in Gram negativne bakterije. Leta 2009 so iz v arktičnem morju živečih, vrstno nedoločenih spužev rodu *Latrunculia*, izolirali diskorabdina B in Y, ki sta pokazala aktivnost proti virusu HIV, ter protimalarijsko in protibakterijsko aktivnost, podobno kakor diskorabdina C in A, ki sta pokazala tudi selektivno aktivnost proti naseljevanju praživali *in vitro* (Abbas in sod., 2011). Na sliki 9 so prikazane nekatere polarne spužve.



Slika 9: Antarktične spužve (a) *Latrunculia apicalis*, (b) *Kirkpatrickia varialosa* in (c) *Isodictya setifera* (Webster in Blackall, 2008: 2)

### **2.8.3 Razvoj novih učinkovin in uporaba v terapevtske namene**

Vsak od aktivnih metabolitov in njihovih derivatov ima svoj, od odmerka specifičen učinek, s čimer so povezani tudi stranski učinki, ki določajo primernost za uporabo v medicinske namene. Ogrodje oz. aktivno jedro zdravil pridobljenih iz spužev, se lahko uporabi kot vodilo razvoja derivatov s specifično učinkovitostjo in s čim manj stranskimi učinki. Zato je najpomembnejši izziv pri preoblikovanju bioaktivne učinkovine v zdravilo pregled zakladnice metabolitov iz spužev in izbor tistih s specifičnim načinom delovanja ter želeno učinkovitostjo proti specifični bolezni (Sipkema in sod., 2005). Eden od problemov je vsekakor količina razpoložljive snovi za pripravo novih zdravil, saj so izolirane spojine pogosto na voljo v zelo majhnih količinah. Poleg tega je naporno in pogosto nemogoče izolirati dovolj naravnega materiala za klinične poskuse. Morski naravni proizvodi so pogosto velik izziv za sintezne kemike ravno zaradi njihove kompleksne strukture. (Bhakuni in Rawat, 2005). Aktivno spojino morajo najprej izolirati iz naravnega okolja, nato določijo njeno kemijsko strukturo in preverijo biološko aktivnost *in vitro*. Sledi organska sinteza večjih količin aktivne spojine. Nato naredijo predklinične poskuse na laboratorijskih živalih, kjer ugotovijo morebitne toksične in druge stranske učinke. V kliničnem testiranju testirajo zdravila na majhnem številu zdravih prostovoljcev ter nato na širši populaciji bolnikov. Med 200 učinkovinami morskega izvora se le eni uspe prebiti na tržišče, kar povprečno traja 10 let (Sepčić, 2008).

### **2.8.4 Preglednica objavljenih raziskav biološko aktivnih učinkovin iz spužev**

V prilogi A je predstavljena dopolnjena preglednica do sedaj objavljenih raziskav in predstavlja biološke aktivnosti v organskih izvlečkih iz spužev, katere so bile vključene tudi v naše raziskovalno delo. S pregledom obstoječe literature in preglednico smo želeli ugotoviti, ali so bile aktivnosti v povezavi z antarktičnimi morskimi spužvami že opisane.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Vzorci spužev

Vzorci spužev so potapljači nabrali na Antarktiki med letoma 2007 in 2008. Spužve so nato zamrznili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jih prepeljali v Evropo, kjer so jih v laboratoriju taksonomsko identificirali in shranili z liofilizacijo. V preglednici 1 so predstavljene vrste spužev in oznake vzorcev iz Antarktike.

##### 3.1.2 Priprava vodnih izvlečkov

Vzorci so naši predhodniki razrezali in strli v terilnici. Homogenizirano maso so nato ekstrahirali z deionizirano vodo. Ekstrakcija je potekala 24 ur na stresalniku pri 600 obratih/min in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Izvlečke so naslednji dan centrifugirali 15 min pri 15 000 obratih/min in  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Supernatant so odpipetirali v čašo, nato pa v epice, po 2 ml. Polovico epic so označili kot svežo serijo, polovico pa kot kuhano, ki so jo označili z oznako »k«. Svežo serijo so takoj shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , kuhano serijo pa so 15 minut segrevali na vodni kopeli pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Ohlajene epice so centrifugirali 15 minut pri 13 000 obratih/min. Supernatant so nato odpipetirali v epice po 2 ml in jih shranili na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Te epice so ponovno označili s »k« kot kuhano serijo (Rajh, 2012). Tako so pripravili 33 svežih in 33 kuhanih izvlečkov antarktičnih spužev.

##### 3.1.3 Izračun suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Suho težo so predhodniki ugotavljali s sušenjem  $500\text{ }\mu\text{l}$  vzorca na predhodno stehtanem in označenem urnem steklu. Sušenje je potekalo v sterilizatorju 15 min pri  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Po sušenju so urna stekla s posušenim vzorcem ponovno stekali in preračunali suho težo v mg/ml (Rajh, 2012). Suhe teže vzorcev spužev (mg/ml) prikazuje preglednica 1. Na sliki 9 so predstavljene nekatere spužve rodov *Rossella* in *Cinachyra*.

Preglednica 1: Oznake vzorcev, vrste izoliranih spužev in suha teža vodnih izvlečkov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suha teža [g]	Suha teža [mg/ml]
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	0,0028	5,60
	3 k	0,0031	6,20
<i>Rossella sp.</i>	4	0,0025	5,00
	4 k	0,0056	11,20
<i>Monosyringa sp.</i>	6	0,0054	10,80
	6 k	0,0077	15,40

se nadaljuje

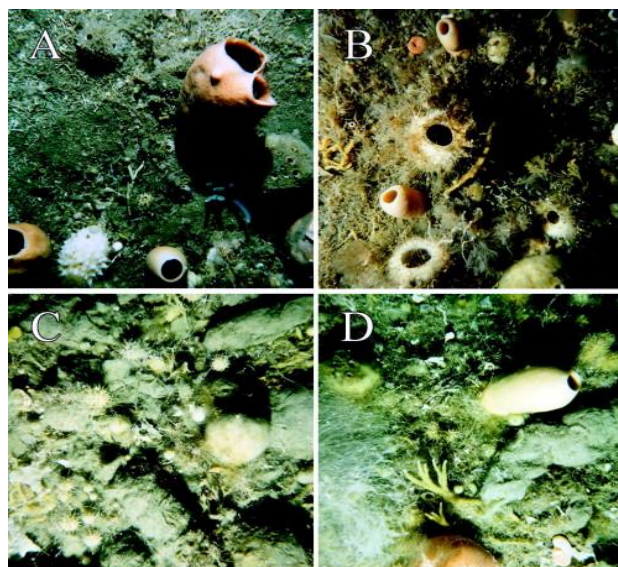
nadaljevanje preglednice 2: Oznake vzorcev, vrste izoliranih spužev in suha teža vodnih izvlečkov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suha teža [g]	Suha teža [mg/ml]
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8	0,0005	1,00
	8 k	0,0012	2,40
Neidentificirana spužva 1	10	0,0011	2,20
	10 k	0,0013	2,60
<i>Myxilla</i>	26	0,0015	3,00
	26 k	0,0017	3,38
<i>Cinachyra cf. barbata</i>	27	0,0034	6,80
	27 k	0,0060	12,00
<i>Rossella</i> sp.	34	0,0025	5,00
	34 k	0,0097	19,40
<i>Demospongia</i>	36	0,0029	5,80
	36 k	0,0040	8,00
<i>Rossella racovitzae</i> Topsent, 1901	37/R	0,0069	13,80
	37/R k	0,0078	15,60
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37/L	0,0067	13,40
	37/L k	0,0056	11,20
<i>Demospongia</i>	38	0,0059	11,80
	38 k	0,0068	13,60
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	0,0098	19,60
	40a k	0,0153	30,60
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	0,0063	12,60
	41a k	0,0079	15,80
<i>Microcionidae</i> spp.	41	0,0102	20,40
	41 k	0,0130	26,00
<i>Rossella cf. racovitzae</i>	43	0,0680	13,60
	43 k	0,0037	7,40
<i>Halichondria osculum</i>	45h	0,0011	2,20
	45h k	0,0016	3,20
<i>Demospongia</i>	45d	0,0021	4,20
	45d k	0,0024	4,80
<i>Latrunculia cf. bocagei</i>	46	0,0039	7,80
	46 k	0,0070	14,00
<i>Xestospongia</i> sp.	48/1	0,0029	5,80
	48/1 k	0,0037	7,40
Neidentificirana spužva 2	48/2	0,0069	13,80
	48/2 k	0,0105	21,00
<i>Isodictya toxophila</i>	51	0,0057	11,40
	51 k	0,0094	16,80

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 1: Oznake vzorcev, vrste izoliranih spužev in suha teža vodnih izvlečkov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Suha teža [g]	Suha teža [mg/ml]
<i>Homaxinella cf. balfouriensis</i>	52	0,0048	9,60
	52 k	0,0064	12,80
<i>Tetilla leptoderma</i>	55	0,0045	9,00
	55 k	0,0062	12,40
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	0,0064	12,80
	56 k	0,0078	15,60
<i>Isodictya setifera</i>	58	0,0057	11,40
	58 k	0,0075	15,00
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	0,0036	7,20
	63 k	0,0072	14,40
<i>Demospongia</i>	105	0,0038	7,60
	105 k	0,0052	10,40
<i>Tetillidae</i>	119	0,0054	10,80
	119 k	0,0062	12,40
<i>Demospongia sp.</i>	124	0,0095	19,00
	124 k	0,0173	35,20
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	0,0034	6,80
	132 k	0,0057	11,40
<i>Rosella racovitzae</i>	166	0,0072	14,40
	166 k	0,0119	23,80
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	167	0,0110	2,20
	167 k	0,0021	4,20



Slika 10: (A, B, 194-m globine, C, D, 112 m). (A) *Rossella nuda*, cevasta, gladka, kremno rjava spužva (desno zgoraj, spodaj levo in na sredini), *Rossella racovitzae*, bela spužva spodaj levo, dve spužvi rodu demosponge, verjetno *Cinachyra barbata*, desno spodaj *Rossella nuda*. (B) Več primerkov spužve *Rossella racovitzae* (bela s projekcijo iglic) in *Rossella nuda* (kremasta, z gladko zunanostjo). (C) zgoščene steklene spužve rodu demosponge in majhne okrogle bele spužve *Cinachyra antarctica*. (D) *Rossella nuda* (desno) in *Cinachyra barbata* (levo na sredini). J. Gutt, APM (Leys in sod., 2007: 88)

### 3.1.4 Bakterijski sevi

V raziskovalnem delu smo pri testiranju protibakterijske aktivnosti uporabili različne bakterijske seve iz zbirke Katedre za molekularno genetiko in biologijo mikroorganizmov Oddelka za biologijo. Navedeni so v spodnji preglednici.

Preglednica 3: Uporabljeni Gram<sup>+</sup> in Gram<sup>-</sup> odporni klinični in nepatogeni bakterijski sevi

- nepatogen laboratorijski sev
- ^- multirezistentni klinični izolat

<b>Gram<sup>+</sup></b>
<i>Bacillus subtilis</i> EXB-V68•
<i>Staphylococcus epidermidis</i> EXB-V55•
<b>Gram<sup>-</sup></b>
<i>Escherichia coli</i> ESBL MS30 CTX-2^
<i>Escherichia coli</i> ESBL M4 192 B <sub>2</sub> 3 CTX-M9 ST131^
<i>Escherichia coli</i> ESBL M4 206 B <sub>2</sub> 3 CTX-M1 ST131^
<i>Escherichia coli</i> HB101•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> EXB-V28•
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958^
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1/13160^
<i>Enterobacter</i> sp. EXB-V11•
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC ATTC^

### 3.1.5 Antibiotiki

Pri določanju protibakterijske aktivnosti izvlečkov smo kot pozitivno kontrolo uporabili naslednje antibiotike.

Preglednica 4: Uporabljeni antibiotiki in njihove izhodne koncentracije v mg/ml

antibiotik	Kloramfenikol (Cm)	Rifampicin (Rif)	Tetraciklin (Tc)	Ampicilin (Amp)	Kanamycin (Kn)
koncentracija (mg/ml)	1	1	10	100	10

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava tekočega gojišča za prekonočne kulture

Za pripravo 100 ml tekočega gojišča smo v 100 ml d H<sub>2</sub>O raztopili 2,5 g LB gojišča, premešali, nato pa s pipeto prenesli po 10 ml gojišča v vsako od desetih 150 ml erlenmajeric, ter te zaprli z aluminijasto folijo. Sledilo je avtoklaviranje pri 120 °C. Nato smo počakali, da se je tekoče gojišče ohladilo.

### 3.2.2 Nacepitev bakterijske kulture

Iz zbirke smo dobili predhodno nacepljene bakterijske kulture na agarjih ploščah. V laminariju smo vsak bakterijski sev posebej prenesli v tekoče gojišče za prekonočne kulture. To smo delali v aseptičnih razmerah ob plamenu s pomočjo sterilizirane eze. Erlenmajerice z nacepljenim gojiščem smo pokrili z aluminijasto folijo in jih preko noči (24 ur) stresali na 250 obr/min v topli sobi pri 37 °C. Ostale erlenmajerice s še ne nacepljenimi gojišči smo hranili pri sobni temperaturi, pokrite s parafilmom.

### 3.2.3 Priprava trdnega agarne gojišča

Sledila je priprava agarja, ki smo ga naredili z raztapljanjem 12,5 g LB in 7,5 g agarja v 500 ml d H<sub>2</sub>O v erlenmajerici, ki smo jo nato pokrili z aluminijasto folijo in jo avtoklavirali pri 120 °C. Nato smo erlenmajerico z gojiščem ohlajali pod mrzlo vodo ob stalnem mešanju. Ohladili smo jo na pribl. 42 °C. To je temperatura, pri kateri se agar še ne strjuje, bakterije pa preživijo.

### 3.2.4 Inokulacija s prekonočno kulturo

Nacepljeno bakterijsko gojišče smo vlili neposredno v gojišče tako, da je bila koncentracija bakterij v gojišču  $5 \times 10^8$  / ml in premešali. Tudi to smo opravili v aseptičnih razmerah.

### 3.2.5 Razlivanje na petrijeve plošče

Sledilo je razlivanje, pri čemer smo po 20 ml agarja z vcepljeno bakterijsko kulturo razlili na približno 25 sterilnih petrijevih plošč. Za to opravilo smo uporabljali rokavice. Plošče smo sproti zapirali, jih dali na ravno podlago za 5 min nato pa jih do uporabe hranili v hladilniku.

### 3.2.6 Vrtanje lukenj v strjene agarne plošče

S pomočjo steriliziranega plutovrta smo v vsako strjeno agarno ploščo zvrtili 5 lukenj premera 1 cm. S steriliziranim skalpelom smo nad plamenom pobrali agar iz luknjic v odpadno petrijevko. Na zunanje dno plošče smo zapisali sev in datum. Plošče smo do uporabe hranili pri 4 °C.

### 3.2.7 Določanje protibakterijske aktivnosti z difuzijskim testom na agarju

Na dnu petrijevk smo na izdolbene luknje napisali oznake izvlečkov spužev. Zamrznjene izvlečke spužev smo odtalili in jih z obračanjem premešali. V vsako od lukenj na gojišču smo za test odpipetirali po 100 µl vzorca (svežega ali kuhanega izvlečka posameznih spužev). Delo je potekalo v aseptičnih razmerah. Po dodajanju izvlečkov smo počakali, da so se vzorci vpili. Za 66 izvlečkov smo porabili okoli 14 trdnih agarjih gojišč za testiranje občutljivosti vsakega bakterijskega seva. Pri izvlečkih z večjo cono inhibicije, smo le te redčili z d H<sub>2</sub>O. Poleg vzorcev izvlečkov smo uporabili tudi pozitivno (antibiotiki) in negativno (destilirana voda) kontrolo. Pri pozitivni kontroli smo naredili redčitveno vrsto in redčitve antibiotikov od 10<sup>-1</sup> do 10<sup>-4</sup> odpipetirali v luknje gojišča z bakterijsko kulturo. Če je pri predhodni redčitvi še vedno prišlo do velike cone inhibicije rasti bakterij, smo uporabili še višje redčitve. Cm in Tc smo redčili z etanolom, Rif, Amp in Kn pa z d H<sub>2</sub>O. Antibiotike smo hranili v zamrzovalniku. Za negativno kontrolo smo v eno luknjo gojišča posamezne bakterijske vrste odpipetirali 100 µl d H<sub>2</sub>O. Petrijeve plošče smo zložili na pladenj, ki smo ga postavili v toplo sobo na 37 °C za 24 ur.

### 3.2.8 Odčitavanje rezultatov

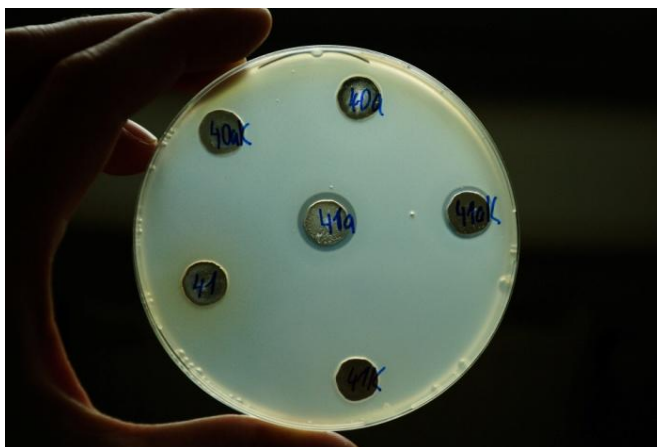
Po 24 urah smo odčitali rezultate. Vzorec izvlečka je z difuzijo prehajal v agar. Če je okrog luknje prišlo do zbistritve, je to pomenilo, da je imel izvleček protimikrobni učinek, ker bakterije tam niso rastle. Zbistritev imenujemo tudi cona inhibicije rasti. Rezultate smo odčitali z merjenjem polmera zbistritvene cone v mm. Tiste vzorce, ki so kazali visoko protibakterijsko aktivnost smo redčili do minimalne koncentracije, ki je inhibirala rast testnega mikroorganizma 1 mm od roba luknjice. Tako smo ugotovili MIK (minimalno inhibitorno koncentracijo) vzorca (antibiotika ali izvlečka). Delna zbistritev okrog luknje z vzorcem je pomenila cono omejene rasti, ki smo jo izmerili enako kot cono inhibicije. Agarne plošče smo po odčitavanju odnesli na uničenje v avtoklavirnico.



## 4. REZULTATI

### 4.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST VODNIH IZVLEČKOV SPUŽEV

Protibakterijska aktivnost proti različnim sevom *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. in *Klebsiella pneumoniae* KPC (ATTC) se je pokazala le pri izvlečkih spužve *Hemigellius bidens* (svežem 41 a in kuhanem 41 ak). Izvleček 41 a je imel največjo aktivnost proti *E. coli* 4 M 206 B<sub>2</sub>3 CTX-M1 ST131 (slika 11). Ob tem smo ugotovili, da so vsi sevi *E. coli* približno enako občutljivi na izvlečke te spužve in da ni bistvene razlike v občutljivosti med odpornimi (MS30 ESBL CTX-2, 4M 192 B<sub>2</sub>3 CTX-M9 ST131, 4M 206 B<sub>2</sub>3 CTX-M1 ST131) in nepatogenim sevom, kar prikazuje preglednica 4.



Slika 11: Občutljivost bakterije *E. coli* 4 M 206 B<sub>2</sub>3 CTX-M1 ST131 na kuhan (41ak) in svež (41a) izvleček spužve *Hemigellius bidens* (Strugar, 2012)

Pri nepatogenem in za antibiotik občutljivem sevu vrste *P. aeruginosa* ni bilo opaziti aktivnosti izvlečka 8 in 8k spužve *Bathydorus* cf. *spinosus*, ki pa je, zanimivo, zaviral rast odpornih sevov (1/13160) (preglednica 5). Neodporni sev *P. aeruginosa* torej ni pokazal nobene občutljivosti na izvlečke spužev, razen pasov temnejše zelene barve okoli izvlečkov, kjer so ti reagirali z barvilom bakterije.

Pri odpornih sevih *P. aeruginosa* je prišlo pri nekaterih izvlečkih spužev do nastanka plakov in inhibicije nastanka barvila. Do nastanka plakov je pri *P. aeruginosa* 8/1958 prišlo pri izvlečkih spužev *Rossella* sp. (4), *Bathydorus* cf. *spinosus* (8, 8k) na sliki 12, *Halichondria osculum* (45h) in *Demospongia* sp. (124) in *P. aeruginosa* 1/13160 pri izvlečkih vseh spužev. Preprečitev nastanka barvila je bila pri *P. aeruginosa* 8/1958 prisotna pri izvlečkih spužev *Rossella* sp. (4, 4k), *Myxilla* (26, 26k), *Demospongia* (38, 38k), *Hemigellius bidens* (41a, 41 ak), sevih iz družine *Microcionidae* (41), neidentificirani spužvi 2 (48/2), *Isodictya toxphila* (51), *Isodictya setifera* (58), *Suberitidae* gen. sp. (63k) in sevih družine *Tetillidae* (119k). Pri *P. aeruginosa* 1/13160 pa pri izvlečkih spužev

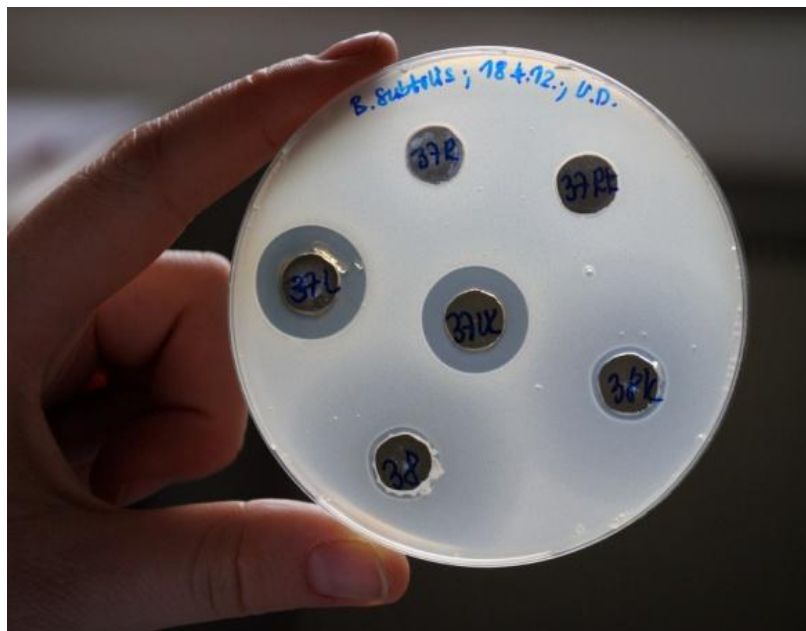
*Rossella* sp. (4, 4k), *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37/Lk), *Demospongia* (38, 38k), *Hemigellius bidens* (41a, 41ak), *Demospongia* (45d), *Homaxinella* cf. *balfouriensis* (52) in *Isodictya setifera* (58, 58k) (preglednica 6). Kamor je pri negativni kontroli difundirala voda, tam je bil prisoten zelen pigment.



Slika 12: Primer nastanka plakov pri kuhanem (8k) in svežem (8) izvlečku spužve *Bathydorus* cf. *spinosus* na plošči z nacepljenim sevom *Pseudomonas aeruginosa* 8/1958 (Strugar, 2012)

Občutljivost *S. epidermidis* se je pokazala pri izvlečkih spužev *Rossella* sp. (4, 4k), *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37/L), *Hemigellius bidens* (41a, 41ak), *Halichondria osculum* (45h), *Isodictya toxphila* (51), *Isodictya setifera* (58, 58k), *Demospongia* (105, 105k), in *Demospongia* sp. (124, 124k) (13 od 66 vodnih izvlečkov). Cona omejene rasti je bila vidna pri izvlečkih spužev *Rossella* sp. (4k), *Bathydorus* cf. *spinosus* (8k), *Myxilla* sp. (26k), *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37/L, 37/Lk), *Demospongia* (38, 38k), *Haliclona* (*Gellius*) *flagellifera* (40a, 40ak), *Hemigellius bidens* (41a, 41ak), sevih družine *Microcionidae* (41), *Isodictya toxphila* (51), *Homaxinella* cf. *balfouriensis* (52, 52k), *Tetilla leptoderma* (55k), *Isodictya setifera* (58, 58k), in *Demospongia* (105, 105k). Sev bakterije *B. subtilis* je bil občutljiv na izvlečke spužev *Rossella* sp. (4, 4k), *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37/L, 37/Lk), *Demospongia* (38, 38k), *Hemigellius bidens* (41a, 41ak), neidentificirane spužve 2 (48/2, 48/2k), *Isodictya toxphila* (51), *Isodictya setifera* (58, 58k), in *Demospongia* sp. (124, 124k) (15 od 66 vodnih izvlečkov). Cona omejene rasti se je pojavila pri izvlečkih spužev *Rossella* sp. (4, 4k), *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* (37/L), *Demospongia* (38, 38k), *Hemigellius bidens* (41a, 41ak), in *Demospongia* (105, 105k). Kjer je bila cona inhibicije rasti večja ali enaka 2 mm, smo izvlečke dodatno redčili (1:100). Pri vrsti *S. epidermidis* sta bila najbolj protibakterijsko aktivna izvlečka 58 in 58a iz spužve *Isodictya setifera*, pri *B. subtilis* pa izvlečka 37/L in 37/Lk (slika 13) spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, predstavljeno v preglednici 7.

Vodni izvlečki spužev so pokazali večjo protibakterijsko aktivnost proti Gram pozitivnim sevom bakterij (*B. subtilis*, *S. epidermidis*) kakor Gram negativnim (preglednica 7). Na Gram negativne seve bakterij je izrazito aktivnost pokazal izvleček spužve *Hemigellius bidens*, manjšo pa izvleček spužve *Bathydorus cf. spinosus* (preglednici 4 in 5).



Slika 13: Cona inhibicije rasti *Bacillus subtilis*, oz. protibakterijska aktivnost izvlečka spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi* (Strugar, 2012)

Razlika v protibakterijski aktivnosti kuhanih in svežih izvlečkov iz spužev *Bathydorus cf. spinosus* (8, 8k) se je pokazala pri testiranju na dovzetnost bakterije *P. aeruginosa* 1/13160, kjer je imel svež izvleček aktivnost, kuhan pa ne. Podoben primer smo opazili pri testiranju aktivnosti izvlečkov spužev *Hemigellius bidens* (41a, 41ak) proti bakterijam *Enterobacter* sp., izvlečkov spužev *Latrunculia cf. lendenfeldi* (37/L, 37/Lk) in *Isodictya toxophila* (51, 51k) na *S. epidermidis* in *B. subtilis*, ter izvlečka spužve *Halichondria osculum* (45h, 45hk) pri testiranju protibakterijske aktivnosti na *S. epidermidis*

Največjo protibakterijsko aktivnost je pokazal vodni izvleček spužve *Hemigellius bidens* (41a, 41ak) in sicer proti 8 od 11 testnih sevov bakterij. Deloval je na rezistentne bakterije *E. coli* (MS30 ESBL CTX-2, 4M 192 B<sub>2</sub>3 CTX-M9 ST131, 4M 206 B<sub>2</sub>3 CTX-M1 ST131), na rezistentno vrsto *Klebsiella pneumoniae* KPC (ATTC) in na nepatogene oz. neodporne vrste kot so: nepatogena *Escherichia coli* HB101, *Enterobacter* sp., *Staphylococcus epidermidis* in *Bacillus subtilis*. Izvleček ni pokazal aktivnosti proti bakterijam vrste *Pseudomonas aeruginosa*.

Preglednica 5: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih izvlečkov spužve *Hemigellius bidens* na različne seve *E.coli*, *Enterobacter* sp. in bakterijo *Klebsiella pneumoniae*

Protibakterijska aktivnost je izražena s cono inhibicije rasti bakterije v mm in MIK v mg/ml.

k= kuhan vzorec

Vista spužve	Oznaka vzorca	<i>Escherichia coli</i> ESBL MS30 CTX-2 (odporna)		<i>Escherichia coli</i> HB101 (nepatogena)		<i>Escherichia coli</i> 4M192 B <sub>2</sub> 3 CTX-M9 ST131 (odporna)		<i>Escherichia coli</i> 4M206 B <sub>2</sub> 3 CTX-M1 ST131 (odporna)		<i>Enterobacter</i> sp. (neodporna)		<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC (ATTC) (odporna)	
		Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)	MIK (mg/ml)
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	0,5	1,26	1	1,26	1	1,26	2	1,26	1	1,26	1,5	1,26
	41a k	1	1,58	1	1,58	0,5	1,58	1	1,58		1,58	0,5	1,58

Preglednica 6: Rezultati protibakterijske aktivnosti vodnih izvlečkov spužve *Bathydorus cf. spinosus* na različne seve *Pseudomonas aeruginosa*

Protibakterijska aktivnost je izražena s cono inhibicije rasti bakterije v mm in MIK v mg/ml.

k = kuhan vzorec

\* = indukcija plakov

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	Cona inhibicije (mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (neodporna)	Cona inhibicije (mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958 (odporna)	Cona inhibicije (mm) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1/13160 (odporna)
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8		1 (omejena rast) *	1 (MIK 0,1 mg/ml)
	8 k		1 (omejena rast) *	1 (omejena rast)

Preglednica 7: Indukcija plakov in preprečitev tvorbe pigmenta sevov bakterij *Pseudomonas aeruginosa* 8/1958 in *Pseudomonas aeruginosa* 1/13160 pri nekaterih izvlečkih

k = kuhan vzorec

\* = indukcija plakov

- = preprečitev tvorbe pigmenta

= ni opaženih sprememb

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1/13160
<i>Rossella</i> sp.	4	* -	- *
	4 k	-	- *
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8	*	*
	8 k	*	*
<i>Myxilla</i>	26	-	*
	26 k	-	*
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37/L		*
	37/L k		- *
<i>Demospongia</i>	38	-	- *
	38 k	-	- *
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	-	- *
	41a k	-	- *
<i>Microcionidae</i> spp.	41	-	*
	41 k		*
<i>Halichondria osculum</i>	45h	*	*
	45h k		*
<i>Demospongia</i>	45d		- *
	45d k		*
Neidentificirana spužva 2	48/2	-	
	48/2 k		

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 8: Indukcija plakov in preprečitev tvorbe pigmenta sevov bakterij *Pseudomonas aeruginosa* 8/1958 in *Pseudomonas aeruginosa* 1/13160 pri nekaterih izvlečkih

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 8/1958	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1/13160
<i>Isodictya toxophila</i>	51	-	*
	51 k		*
<i>Homaxinella cf. balfuriensis</i>	52		_*
	52 k		*
<i>Isodictya setifera</i>	58	-	_*
	58 k		_*
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63		*
	63 k	-	*
<i>Tetillidae</i>	119		*
	119 k	-	*
<i>Demospongia</i> sp.	124	*	*
	124 k		*

Preglednica 9: Rezultati protibakterijske aktivnosti redčenih vodnih izvlečkov različnih vrst antarktičnih spužev proti bakterijam *Staphylococcus epidermidis* in *Bacillus subtilis*

Protibakterijska aktivnost je izražena z omejeno rastjo in cono inhibicije rasti bakterij v mm ter MIK v mg/ml.

k = kuhan izvleček

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	<i>Staphylococcus epidermidis</i>				<i>Bacillus subtilis</i>					
		Cona inhibicije (mm)		Cona omejene rasti (mm)		MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)		Cona omejene rasti (mm)		MIK (mg/ml)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3										
	3 k										
<i>Rossella</i> sp.	4	1				0,5	1		4		0,5
	4 k	1		1		1,12	1		4		1,12
<i>Monosyringa</i> sp.	6										
	6 k										
<i>Bathydorus cf. spinosus</i>	8										
	8 k			1							
Neidentificirana spužva 1	10										
	10 k										

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 10: Rezultati protibakterijske aktivnosti redčenih vodnih izvlečkov različnih vrst antarktičnih spužev proti bakterijam *Staphylococcus epidermidis* in *Bacillus subtilis*

Vrsta spužve	Oznaka vzorca	<i>Staphylococcus epidermidis</i>					<i>Bacillus subtilis</i>				
		Cona inhibicije (mm)		Cona omejene rasti (mm)		MIK (mg/ml)	Cona inhibicije (mm)		Cona omejene rasti (mm)		MIK (mg/ml)
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	
<i>Myxilla</i>	26										
	26 k			3,5							
<i>Cinachyra</i> cf. <i> barbata</i>	27										
	27 k										
<i>Rossella</i> sp.	34										
	34 k										
<i>Demospongia</i>	36										
	36 k										
<i>Rossella racovitzae</i>	37/R										
	37/R k										
<i>Latrunculia</i> cf. <i> lendenfeldi</i>	37/L	3		2		0,134□ MIK□1,3 4	4,5			2	0,134□ MIK□1,3 4
	37/L k			2			4				0,112< MIK<1,12
<i>Demospongia</i>	38			6	6		1		15		1,18
	38 k			6	6		1		15		1,36
<i>Haliclona</i> (Gellius) <i> flagellifera</i>	40a			4							
	40a k			3							
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	3		2	7	0,126< MIK<1,26	2	0,5	13,5	11	0,126
	41a k	3		3	6	0,158< MIK<1,58	2	0,5	17	11	0,158
<i>Microcionidae</i> spp.	41			1							
	41 k										
<i>Rossella</i> cf. <i> racovitzae</i>	43										
	43 k										
<i>Halichondria osculum</i>	45h	1				0,22					
	45h k										
<i>Demospongia</i>	45d										
	45d k										
<i>Latrunculia</i> cf. <i> bocagei</i>	46										
	46 k										

se nadaljuje

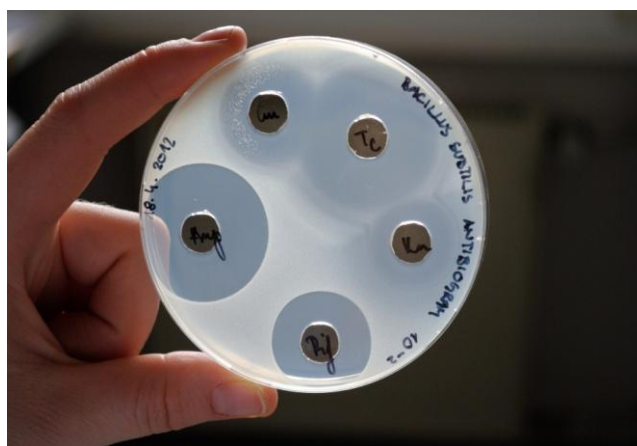




Pri ugotavljanju protibakterijske aktivnosti je tako na bakterije vplivalo 16 od 33 izvlečkov, od tega jih je 11 preprečilo rast, 5 izvlečkov pa je le omejilo rast bakterij.

#### 4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ANTIBIOTIKOV

V preglednici 8 so prikazane koncentracije redčenih antibiotikov. Največjo izhodno koncentracijo je imel ampicilin, najmanjšo pa sta imela rifampicin in kloramfenikol. Rezultati antibiograma v preglednici 9 kažejo, da je za ampicilin najbolj občutljivejši sev *S. epidermidis*, najmanj pa *E. coli* 4 M 192 B<sub>2</sub>3 CTX-M9 ST131, nanj sta odporna seva *E. coli* ESBL MS30 CTX-2 in *K. pneumoniae* KPC-ATTC. Tetraciklin najintenzivneje zavira rast bakterij *S. epidermidis*, najmanj protibakterijske aktivnosti pa ima na sev *E. coli* 4 M 206 B<sub>2</sub>3 CTX-M1 ST131. *S. epidermidis* je izmed preizkušenih sevov najbolj občutljiv za rifampicin, seva *K. pneumoniae* KPC-ATTC in *Enterobacter* sp. pa najmanj. Kanamicin kaže najvišjo protibakterijsko aktivnost proti sevu *S. epidermidis*, najnižjo pa proti *K. pneumoniae* KPC-ATTC. Kloramfenikol je najbolj učinkovit pri zaviranju rasti bakterij *Bacillus subtilis* (Slika 14), najmanj pa pri *P. aeruginosa* 1/13160 in *P. aeruginosa* 8/1958. *Klebsiella pneumoniae* KPC-ATTC pa kaže odpornost nanj. Pri coni inhibicije velikosti 2 ali več mm smo antibiotike dodatno redčili, da smo lahko ugotovili njihove MIK. Redčili smo jih od 1:10 do 1:100.000 včasih do 1:1.000.000 v kolikor je bilo potrebno.



Slika 14: Antibiogram *Bacillus subtilis* (Strugar, 2012)

Preglednica 12: Koncentracije redčenih antibiotikov

Redčitev	Ampicilin	Tetraciklin	Rifampicin	Kanamicin	Kloramfenikol
Izhodna konc.	100 mg/ml	10 mg/ml	1 mg	10 mg/ml	1 mg/ml
10 <sup>-1</sup>	10 mg/ml	1 mg/ml	100 µg/ml	1 mg/ml	100 µg/ml
10 <sup>-2</sup>	1 mg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml	100 µg/ml	10 µg/ml
10 <sup>-3</sup>	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
10 <sup>-4</sup>	10 µg/ml	1 µg/ml	100 ng/ml	1 µg/ml	100 ng/ml
10 <sup>-5</sup>	1 µg/ml	100 ng/ml	10 ng/ml	100 ng/ml	10 ng/ml
10 <sup>-6</sup>	100 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml	10 ng/ml	1 ng/ml

Preglednica 13: Rezultati antibiograma za vse bakterijske vrste

Protibakterijska aktivnost je izražena z zmanjšano rastjo in cono inhibicije rasti v mm ter MIK v mg/ml.

\* = indukcija plakov bakteriofagov

= ni opaženih sprememb

Bakterija	Antibiotik																	
	Amp			Tc			Rif			Kn			Cm					
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>			
<i>E. coli</i> HB 101	<i>Escherichia coli</i> HB 101																	
C. inh. (mm)	14	10	7	8	8	6	4	2		5	3	3		5	5	1		
C. om. (mm)	4		4	3	2	3	2			5	7	3		2				
MIK	10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			100 ng/ml < MIK < 1 µg/ml					
<i>E. coli</i> ESBL MS30 CTX-2	<i>Escherichia coli</i> ESBL MS 30 CTX-2																	
C. inh. (mm)				8,5	5	1		6						9	5	3	2	3,5
C. om. (mm)						2								4	5	3	9	4,5
MIK	rezistenca			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			100 ng/ml < MIK < 1 µg/ml					
<i>E. coli</i> 4M192 B <sub>3</sub> CTX-M9 ST131	<i>Escherichia coli</i> 4 M 192 B <sub>3</sub> CTX-M9 ST131																	
C. inh. (mm)				13	9	7	3	6,5						5	3	1	10	5
C. om. (mm)	2								2					2	2			
MIK	10 mg/ml < MIK < 100 mg/ml			100 ng/ml < MIK < 1 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			100 ng/ml < MIK < 1 µg/ml					

se nadaljuje

nadaljevanje preglednice 14: Rezultati antibiograma za vse bakterijske vrste

Bakterija	Antibiotik																		
	Amp			Tc			Rif			Kn			Cm						
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	
<i>Escherichia coli</i> 4 M 206 B <sub>3</sub> CTX-M1 ST131																			
<i>E. coli</i> 4M206 B <sub>3</sub> CTX-M1 ST131																			
C. inh. (rmm)				6	3	2	0,5								4	1		10	4
C. om. (rmm)	2	2													2				
MIK	1 mg/ml < MIK < 10 mg/ml			100 ng/ml < MIK < 1 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml						
<i>Enterobacter</i> sp.																			
C. inh. (rmm)	11	8																6	3
C. om. (rmm)			5															3	3
MIK	100 µg/ml < MIK < 1 mg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml						
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC-ATTC																			
C. inh. (rmm)																		1	
C. om. (rmm)																		1	
MIK	rezistenca			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			100 µg/ml < MIK < 1 mg/ml			100 µg/ml < MIK < 1 mg/ml						
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>																			
C. inh. (rmm)	11	4,5																5	2
C. om. (rmm)	2																		4
MIK	100 µg/ml < MIK < 1 mg/ml			1 µg/ml < MIK < 10 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			10 µg/ml < MIK < 100 µg/ml			100 µg/ml < MIK < 1 mg/ml						

se nadaljuje



## 5. RAZPRAVA

Že pred tremi tisočletji je človeštvo odkrivalo, da raznolikost rastlin, živali in mikroorganizmov omogoča zdravljenje bolezni. Vse to je pripeljalo do odkritja novih zdravil in antibiotikov. Posledično je zaradi prekomerne uporabe antibiotikov prišlo do čedalje večje odpornosti mikroorganizmov na določene, v manjšem ali večjem obsegu celo na večino antibiotikov. Čeprav se ljudje večinoma še vedno najbolj zanesejo na zdravilne učinkovine iz naravnih virov, je bilo relativno malo raziskav posvečeno iskanju novih virov naravnih snovi iz morskih organizmov. Vzrok temu je v nedostopnosti, nevarnosti in nezadostnih tehnikah potapljanja (Abbas in sod., 2011). V zadnjem času so zaradi vsesplošnega napredka v tehniki in vse bolj problematične odpornosti na znane antibiotike znanstveniki posvetili več pozornosti raziskavam pestrosti morskih organizmov kot vira novih učinkovin s protimikrobnim delovanjem.

Med temi organizmi so tudi spužve (Porifera), ki so zaradi pritrjenega načina življenja in s tem povezane potrebe po obrambi pred plenilci in naseljevanjem, razvile številne biološko aktivne sekundarne metabolite, s katerimi vplivajo na druge organizme. Večino bioaktivnih spojin iz morskih spužev je mogoče opredeliti kot protivnetne, protitumorske, imunosupresivne, protivirusne, protimalarijske, protibakterijske ali proti-proliferativne. Kemijska raznolikost proizvodov spužev je izjemna; do danes so opisali nenavadne nukleozide, terpene, sterole, ciklične peptide, alkaloidne, maščobne kisline, perokside in aminokislinske derivate (ki so pogosto halogenirani) (Sipkema in sod., 2005).

V magistrskem delu smo se osredotočili na potencialno vsebnost protimikrobnih snovi v polarnih spužvah, saj manj kot 3 % vseh opisanih morskih naravnih produktov izvira iz organizmov, ki živijo v polarnih okoljih (Lebar in sod., 2007). Po okolju sodeč smo sklepali, da imajo polarne spužve v primerjavi s tropskimi manj protibakterijske aktivnosti. Prav tako smo predpostavili, da je biološka pestrost tega ekosistema manjša kot v tropskih vodah.

V naši nalogi smo testirali protibakterijsko učinkovitost liofiliziranih vodnih izvlečkov izbranih polarnih/antarktičnih morskih spužev. Testirali smo 66 izvlečkov (33 svežih in 33 kuhanih) iz 33 različnih polarnih morskih spužev. V nadaljevanju smo rezultate poskusov primerjali z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz že raziskanih morskih spužev.

Protibakterijsko aktivnost izvlečkov spužev smo določali z difuzijskim testom na agarju. Bakterijski sevi, ki smo jih uporabili, so bili Gram pozitivni, Gram negativni, nepatogeni in klinični, proti antibiotikom odporni izolati. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili 5 različnih antibiotikov, kot negativno pa destilirano vodo.

Bakterije so skoraj vedno okužene z virusi. Bakteriofagi se lahko razmnožujejo le znotraj bakterijske celice. Ker je zaradi nihanja temperature gojišča ali zaradi protimikrobne aktivnosti izvlečka prišlo do poškodb bakterije, je ta aktivirala SOS mehanizem popravljanja DNA (Jerman, 2009). SOS sistem je posledično aktiviral litični cikel razmnoževanja virusa, kjer bakterijska celica propade. To je vidno v obliki plakov-odmrlih bakterij okoli izvlečkov na sliki 12 (Ambrožič-Avguštin, 2012).

Razlika v protibakterijski aktivnosti kuhanih in svežih izvlečkov iz spužev *Bathydorus cf. spinosus* (8, 8k) se je pokazala pri testiranju za dovzetnost bakterije *P. aeruginosa* 1/13160, kjer je imel svež izvleček aktivnost, kuhan pa ne. Drugje se je opazila razlika v širini cone inhibicije rasti bakterije med svežim in kuhanim izvlečkom, kar pa ni tolikšnega pomena, kot dejanska razlika med protibakterijsko aktivnostjo/neaktivnostjo izvlečka. Neaktivnost kuhanega in aktivnost svežega izvlečka lahko povežemo z aktivnostjo proteinov ali drugih temperaturno občutljivih molekul, ki prispevajo k protibakterijskim učinkom izvlečkov.

Najbolj učinkovit antibiotik proti vsem bakterijam je bil tetraciklin. Tetraciklini so široko spektralni antibiotiki, ki delujejo z enako učinkovitostjo na Gram negativne in Gram pozitivne bakterije. Vežejo se na ribosomsko podenoto 30 S in preprečijo vezavo t-RNA in sintezo beljakovin. Delujejo bakteriostatično in so antibiotiki širokega spektra (Finberg in sod., 2004). Žal, so prav tetraciklini tisti, proti katerim so številni bakterijski sevi rezistentni. V našem primeru smo opazili izrazito občutljivost na ta antibiotik.

Izvečki iz spužev so bili v primerjavi s kontrolnimi antibiotiki mnogo šibkejši, vendar so uspešno protibakterijsko aktivnost pokazali izvlečki spužev *Rossella* sp., *Hemigellius bidens*, *Latrunculia cf. lendenfeldi*, *Demosponge* (124, 124k) in *Isodictya setifera*, ki so zanimivi za nadaljnje raziskave. Podatkov o protibakterijski aktivnosti spužve *Hemigellius bidens* v literaturi nismo našli. Tropske vrste *Latrunculia* kažejo protiglivično in proti-HIV aktivnost (Zampella in sod., 2002; Sepe in sod., 2006; D'Auria in sod., 2007), citotoksičnost (Perry in sod., 1988; Genta-Jouve in sod., 2011), protimikrobno aktivnost (Capon in sod., 1987; Ford in Capon, 2000; Lang in sod., 2005; Perry in sod., 1988; D'Auria in sod., 2007) ter sposobnost zaviranja rasti različnih tumorjev (Lang in sod., 2005; Reyes in sod., 2004; Ahmed in sod., 2007; El Sayed in sod., 2008). V raziskavi arktičnih vrst rodu *Latrunculia* (Abbas in sod., 2011) so odkrili veliko bioaktivnih učinkovin, vendar bistveno manj kot pri tropskih spužvah. O spužvah *Latrunculia* je veliko znanega, med drugim tudi to, da proizvajajo veliko naravnih produktov, kot so citotoksični diskorabdini (Antunes in sod., 2005; Na in sod., 2010) ter 2-tiazolidinonski makrolidi, poznani kot latrunkulini, ki motijo omrežje mikrofilamentov in tako zavirajo rast organizmov (Yarmola in sod., 2000).

Etanolni izvlečki antarktičnih spužev v diplomskem delu Roka Kosmine 2012 so imeli v primerjavi z vodnimi izvlečki istoimenskih spužev podobno protibakterijsko aktivnost. Rok Kosmina je izvlečke testiral na bakterijah iz morske vode in bakterijah iz arktičnega ledenika. Tam je bilo moč opaziti največjo aktivnost etanolnega izvlečka spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*. Sledili so še izvlečki spužev *Rossella* sp., *Myxilla* in *Hemigellius bidens*, ki so tudi kazali precejšnjo aktivnost. V našem primeru je izvleček spužve *Rossella* sp. (4,4k) kazal protibakterijsko aktivnost, medtem ko je izvleček spužve *Myxilla* (26, 26k) ni. Na vrste *Pseudomonas* iz ledenika ni vplival nobeden izvleček, podobno kakor v naši raziskavi, ko je na odporne klinične seve *Pseudomonas aeruginosa* kazal majhno aktivnost le izvleček spužve *Bathydorus* cf. *spinosus*, če izvzamemo nastanek plakov in inhibicijo tvorbe barvila, ki so jo povzročili nekateri izvlečki.

Gašper Strugar (2013) je aktivnost etanolnih izvlečkov spužev testiral na istih laboratorijskih bakterijskih sevih kot mi, poleg nabora naših testnih odpornih kliničnih sevov pa je testiral še MRSA S-349 (proti meticilinu odporen *S. aureus*), MRSP S-350 in MRSP S-340 (proti meticilinu odporen *Staphylococcus pseudintermedius*), izolat vrste *Listeria monocytogenes* iz hrane in izolate komenzalov iz pasje kože (*S. aureus* 10F, *Macrococcus* 1F, *Micrococcus* 2F in *Acinetobacter* 1C). Rezultati protibakterijske aktivnosti etanolnih izvlečkov antarktičnih spužev iz diplomskega dela Gašperja Strugarja pričajo o pretežni aktivnosti izvlečkov iz spužev *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* in *Hemigellius bidens*, malo manj pa o aktivnosti izvlečka iz spužve *Halichondria osculum*. Omenjeni izvlečki so bili protibakterijsko aktivni proti večini testiranih sevov, čeprav so kazali specifično aktivnost proti Gram pozitivnim bakterijam. Izvleček spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* je vidno zaviral rast Gram negativnih bakterij. Protibakterijske aktivnosti etanolnih izvlečkov iz spužev rodu *Demospongia* ter tistih iz spužev rodov *Isodictya setifera*, *Myxilla* sp. in *Haliclona flagellifera*, so bile manjše in vidne samo pri nekaterih bakterijskih sevih (Turk in sod., 2013). Za negativno kontrolo je kolega Strugar uporabil etanol, ki je po navadi povzročil 1 mm cone inhibicije.

Proti vsem sevom *E. coli* je bil najbolj učinkovit etanolni izvleček iz spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* in bistveno manj *Hemigellius bidens*, proti laboratorijskemu sevu *E. coli* HB101, pa je za razliko od našega vodnega, vplival etanolni izvleček spužve *Halichondria osculum*. Etanolni izvleček *Hemigellius bidens* je deloval na rast vseh testnih bakterij *E. coli*, malo manj pa na seve klonalne skupine ST131, kar se razlikuje od rezultatov pri vodnih izvlečkih. V naši raziskavi je bil namreč vodni izvleček te spužve aktiven proti vsem testiranim sevom *E. coli*. Zanimivo je predvsem to, da naši rezultati ne potrjujejo protibakterijske aktivnosti izvlečka spužve *Latrunculia* cf. *Lendenfeldi*, za katerikoli sev omenjene bakterijske vrste. To si lahko razlagamo z dejstvom da je bioaktivna snov topna v etanolu, v vodnih izvlečkih pa se ne raztaplja.

Proti sevu vrste *Enterobacter* sp. je zanemarljivo vplival etanolni izvleček *Hemigellius bidens*, v našem primeru, ko smo uporabili vodni izvleček istoimenske spužve, pa je bila aktivnost dokaj prepričljiva. Pri vrsti *Klebsiella pneumoniae* sta alkoholna izvlečka *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* in *Hemigellius bidens* kazala šibko aktivnost v obliki zmanjšane rasti bakterij, v našem primeru pa je vodni izvleček *Hemigellius bidens* pokazal protibakterijsko aktivnost, medtem ko vodni izvleček spužve *Latrunculia* spet ni kazal aktivnosti.

Pri sevih *Pseudomonas aeruginosa* je le pri sevu 1/13160 prišlo do aktivnosti etanolnih izvlečkov spužev *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* in *Hemigellius bidens*. Naši rezultati so pokazali le protibakterijsko aktivnost vodnega izvlečka spužve *Bathydorus* cf. *spinus*.

Laboratorijski sev *S. epidermidis* je pokazal občutljivost na naslednje etanolne izvlečke: *Rossella* sp., *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Demospongia* (38), *Hemigellius bidens*, *Haliclona osculum* in *Isodictya setifera*. Vodni izvlečki istoimenskih spužev z vplivom na tovrstni sev so prav tako kazali protibakterijsko aktivnost, dodatno smo aktivnost opazili še pri vodnih izvlečkih *Isodictya toxophila* in *Demospongia* (105 in 124).

Etanolni izvlečki spužev, ki so posredovali protibakterijsko aktivnost proti *B. subtilis* so bili *Rossella* sp., *Myxilla*, *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Haliclona* (*Gellius*) *flagellifera*, *Hemigellius bidens*, *Haliclona osculum*, majhne spužve iz družine *Tetillidae* in reda *Demospongia* (124). Vodne izvlečke, ki vplivajo na to bakterijo, smo izolirali iz spužev *Rossella* sp., *Demospongia* (38 in 124), *Isodictya setifera*, *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Isodictya toxophila* in *Hemigellius bidens*.

Etanolni izvleček spužve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* je imel največjo protibakterijsko aktivnost, vodni izvleček z največjo protibakterijsko aktivnostjo pa je bil izvleček spužve *Hemigellius bidens*. Razlika v aktivnosti je verjetno posledica prej omenjene topnosti nekaterih protibakterijskih učinkovin v etanolu.

Primerjava minimalnih inhibitornih koncentracij vodnih in etanolnih izvlečkov nekaterih spužev je pokazala zanimive rezultate. Pri nepatogeni *E. coli* je bila npr. cona inhibicije etanolnega izvlečka spužve *Hemigellius bidens* (41a) polmera 1,5 mm, cona inhibicije vodnega izvlečka enake spužve pa 1 mm. Vrednost MIK pri etanolnem izvlečku spužve iste vrste je bila v primerjavi z MIK vodnega izvlečka 10 krat manjša, kar pomeni da so bili etanolni izvlečki spužev pri inhibiciji rasti enakih bakterijskih sevov bolj učinkoviti. Pri manjši koncentraciji raztopljene aktivne snovi so povzročili večji polmer cone inhibicije rasti bakterij in s tem pokazali večjo učinkovitost. Pri primerjavi etanolnega in vodnega izvlečka istoimenske spužve smo v prisotnosti rezistentnega seva *E. coli* 192 4 M 192 B<sub>23</sub> CTX-M 9 ST131 opazili, da sta oba povzročila 1 mm cone inhibicije. MIK etanolnega izvlečka pa je bila hkrati okrog 10 krat manjša od MIK vodnega izvlečka



spužve *Hemigellius bidens*. Podobne rezultate kjer je bila MIK etanolnih izvlečkov manjša od MIK vodnih izvlečkov smo opazili pri primerjavi testiranja občutljivosti bakterije *S. epidermidis* za izvlečke spužev *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Hemigellius bidens*, *Halichondria osculum* in *Isodictya setifera*. Pri ugotavljanju protibakterijske aktivnosti pa so v primerjavi z vodnimi izvlečki, etanolni izvlečki spužev *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, *Demospongia* (38 in 124), *Hemigellius bidens*, *Isodictya toxophila* in *Isodictya setifera* pokazali večjo učinkovitost proti bakteriji *B. subtilis*.

Po podatkih iz literature je razvidno, da etanolni izvlečki antarktičnih spužev niso pokazali tako širokega spektra bioloških aktivnosti, kot so jih izvlečki tropskih spužev. Biodiverziteteta v antarktičnih morjih je primerljiva s tisto v zmerno toplih in tropskih regijah (Turk in sod., 2013). Če jih primerjamo s spužvami iz zmerno toplih in tropskih morij, lahko sklepamo, da imajo antarktične spužve manjše število protimikrobnih sekundarnih metabolitov (Lippert in sod., 2003), kar kaže na splošno šibkejše aktivnosti antarktičnih spužev (McClintock in Baker, 1997). Razlaga za to je v naseljenosti, ki je v antarktičnih vodah manjša, kot v tropskih okoljih, posledično je tudi učinkovitost obrambnih sistemov manjša, ker je prilagojena ekološkim razmeram v okolju.

## 6. SKLEPI

Z metodo difuzije v agarju smo v tem magistrskem delu ugotavljali protibakterijsko aktivnost vodnih izvlečkov izbranih antarktičnih morskih spužev.

Od testiranih 33 vodnih izvlečkov različnih spužev jih je 16 pokazalo vpliv na rast bakterij, od tega jih je 11 preprečilo rast, 5 pa omejilo rast bakterij.

Izvlečki z najmočnejšo protibakterijsko aktivnostjo so pripadali spužvam *Hemigellius bidens*, *Latrunculia cf. lendenfeldi* in *Isodictya setifera*.

Ugotovili smo, da je največjo protibakterijsko aktivnost pokazal izvleček spužve *Hemigellius bidens*, ki je bil učinkovit proti večini testiranih bakterijskih sevov (8/11) in poleg spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi* predstavlja zanimiv vir učinkovin za nadaljnje biokemijske raziskave.

Opazili smo, da pri nekaterih kuhanih izvlečkih spužev (*Hemigellius bidens*, *Latrunculia cf. lendenfeldi* in *Isodictya toxophila*) protibakterijska aktivnost ni bila prisotna, medtem ko je pri svežih izvlečkih istoimenskih spužev bila. To nam je dalo vedeti, da je protibakterijska učinkovina protein ali kakšna druga temperaturno občutljiva vodotopna snov.

V primerjavi z vzorci etanolnih izvlečkov istih spužev, ki so bili testirani na enakih bakterijah, pri nas ni bilo videti protibakterijske aktivnosti vodnega izvlečka spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi*. To si razlagamo z različno topnostjo protibakterijskih učinkovin v primeru etanola in destilirane vode.

V primerjavi z literaturo smo opazili, da je naše predvidevanje o aktivnosti antarktičnih spužev v primerjavi s tropskimi, potrjeno. Izvlečki spužev iz tropskih morij kažejo širši spekter bioloških aktivnosti in proizvedejo več sekundarnih metabolitov.

## 7. POVZETEK

Problem vse večje odpornosti bakterij na komercialne antibiotike nam je bil iztočnica za izvedbo magistrskega dela in s tem odkrivanje potencialnih protibakterijskih učinkovin.

Odločili smo se poiskati biološko aktivne učinkovine v vodnih izvlečkih antarktičnih spužev, ki bi bile zanimive za nadaljnji razvoj v terapevtske produkte. Testirali smo protibakterijsko aktivnost 33 svežih in 33 kuhanih vodnih izvlečkov.

Rezultati so pokazali prisotnost biološko aktivnih učinkovin v 16 vodnih izvlečkih. Posebno je izstopal vodni izvleček spužve *Hemigellius bidens*, malo manj pa izvleček spužve *Latrunculia cf. lendfenfeldi*. Oba izvlečka sta kandidata za nadaljnje biokemične raziskave. V literaturi nismo našli informacij o protibakterijski aktivnosti spužve *Hemigellius bidens*, zato menimo, da njihove aktivne spojine še niso dovolj raziskane.

V primerjavi z rezultati protibakterijske aktivnosti etanolnih izvlečkov istih spužev v delu Gašperja Strugarja, kjer prednjači protibakterijska aktivnost izvlečka spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi*, smo ugotovili, da se v vodi raztaplja manj protimikrobnih snovi, saj so večjo protibakterijsko aktivnost pokazali etanolni izvlečki iz antarktičnih spužev.

## 8. VIRI

- Abbas S., Kelly M., Bowling J., Sims J., Waters A., Hamann M. 2011. Advancement into the Arctic region for bioactive sponge secondary metabolites. *Marine Drugs*, 9, 11: 2423-2437
- Abedon S.T., Calendar R.L. (ur.). 2005. The bacteriophages. 2. Izd. New York, USA, Oxford University Press: 768 str.
- Ahmed S.A., Odde S., Daga P., Bowling J.J., Mesbah M.K., Youssef D.T., Khalifa S.I., Doerksen R.J., Hamann M.T. 2007. Latrunculin with a highly oxidized thiazolidinone ring: structure assignment and actin docking. *Organic Letters*, 9, 23: 4773-4776
- Alam N., Bae B.H., Hong J., Lee C.O., Shin B.A., Im K.S., Jung J.H. 2001. Additional bioactive lyso-PAF congeners from the sponge *Spirastrella abata*. *Journal of Natural Products*, 64, 4: 533-535
- Alekshun M.N., Levy S.B. 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multi drug resistance. *Cell*, 128, 6: 1037-1050
- Ambrožič-Avguštin J. 2012. »Vzrok pojavljanja bakteriofagnih plakov«. Katedra za molekularno genetiko in mikrobiologijo. Oddelek za biologijo. Biotehniška fakulteta. Ljubljana.
- Amnuoypol S., Suwanborirux K., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C., Saito N. 2004. Chemistry of renieramycins. Part 5. Structure elucidation of renieramycin-type derivatives O, Q, R, and S from Thai marine sponge *Xestospongia* species pretreated with potassium cyanide. *Journal of Natural Products*, 67, 6: 1023-1028
- Andrews M.J. 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 1: 5-16
- Ang K.K.H., Holmes M.J., Higa T., Hamann M.T., Kara U.A.K. 2000. *In vivo* antimalarial activity of the  $\beta$ -carboline alkaloid manzamine A. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44, 6: 1645-1649
- Antunes E.A., Copp B.R., Davies-Coleman M.T., Samaai T. 2005. Pyrroloiminoquinone and related metabolites from marine sponges. *Natural Products Reports*, 22, 1: 62-72
- APUA 2012. General background: Antibiotic Agents. Boston, Alliance for prudent use of antibiotics.

[http://www.tufts.edu/med/apua/about\\_issue/agents.shtml](http://www.tufts.edu/med/apua/about_issue/agents.shtml) (2013)

APUA. 2012. General background: Antibiotic resistance, a societal problem. Boston, Alliance for prudent use of antibiotics.

[http://www.tufts.edu/med/apua/about\\_issue/societal\\_prob.shtml](http://www.tufts.edu/med/apua/about_issue/societal_prob.shtml) (2013)

APUA. 2012. General background: What can be done about antibiotic resistance? Boston, Alliance for prudent use of antibiotics.

[http://www.tufts.edu/med/apua/about\\_issue/what\\_can\\_be\\_done.shtml](http://www.tufts.edu/med/apua/about_issue/what_can_be_done.shtml) (2013)

Bai R.L., Cichacz Z.A., Herald C.L., Pettit G.R., Hamel E. 1993. Spongistatin 1, a highly cytotoxic, sponge-derived, marine natural product that inhibits mitosis, microtubule assembly, and the binding of vinblastine to tubulin. *Molecular Pharmacology*, 44, 4: 757–766

Bai R.L., Paull K.D., Herald C.L., Malspeis L., Pettit G.R., Hamel E. 1991. Halichondrin B and homohalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin. Discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. *The Journal of Biological Chemistry*, 266, 24: 15882–15889

Baker B.J., Barlow T.L., McClintock J.B. 1997. Evaluation of the functional role of suberitenones A and B from the sponge *Suberites* sp. found in McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Journal of the United States*, 32, 5: 90–91

Baker B.J., Scheuer R.J., Schoolery J.N. 1988. Papuamine, an antifungal pentacyclic alkaloid from a marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of American Chemical Society*, 110: 965-966

Baker B.J., Yoshida W.Y. 1994. Chemical constituents of four Antarctic sponges in McMurdo Sound, Antarctica. *Antarctic Journal of the United States*, 29, 5: 153–155

Baker-Austin C., Wright M.S., Stepanauskas R., McArthur J.V. 2006. Co-selection of antibiotic and metal resistance. *Trends in Microbiology*, 14, 4: 176–182

Bhakuni D.S., Rawat D.S. 2005. Bioactive marine natural products. New Delhi. India, Anamaya publishers: 382 str.

Blackburn C.L., Hopmann C., Sakowicz R., Berdelis M.S., Goldstein L.S.B., Faulkner D.J. 1999. Adociasulfates 1–6, inhibitors of kinesin motor proteins from the sponge *Haliclona* (aka *Adocia*) sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 64, 15: 5565–5570

- Boseley S. 2010. Are you ready for a world without antibiotics?. *The Guardian*. London, Guardian News and Media.  
<http://www.theguardian.com/society/2010/aug/12/the-end-of-antibiotics-health-infections> (12. jul. 2013)
- Brady S.F., Chao C.J., Handelsman J., Clardy J. 2001. First isolation of the genes for a known molecule from eDNA: Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from eDNA. *Organic Letters*, 3, 13: 1981–1984
- Brady S.F., Clardy J. 2000. First discovery of a new biologically active molecule from eDNA: Long-chain N-acyl amino acid antibiotics isolated from heterologously expressed environmental DNA. *Journal of the American Chemical Society*, 122, 51: 12903–12904
- Bringmann G., Lang G., Muhlbacher J., Schaumann K., Steffens S., Rytik P.G., Hentschel U., Morschhauser J., Müller W.E.G. 2003. Sorbicillactone A: A structurally unprecedented bioactive novel-type alkaloid from a sponge-derived fungus. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, 37: 231–253
- Brock J.H., Licéaga J., Kontoghiorghes G.J. 2006. The effect of synthetic iron chelators on bacterial growth in human serum. *FEMS Microbiology Letters*, 47, 1: 55–60
- Calcul L., Longeon A., Mourabit A.A., Guyot M., Bourguet-Kondracki M.L. 2003. Novel alkaloids of the aaptamine class from an Indonesian marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron*, 59, 34: 6539–6544
- Calderon C.B., Sabundayo B.P. 2007. Antimicrobial classifications: Drugs for bugs. V: Antimicrobial susceptibility testing protocols. Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A.C. (ur.). 1. Izd. London, *CRC Press. Taylor & Francis group*: 432 str.
- Cao S., Foster C., Brisson M., Lazo J.S., Kingston D.G. 2005. Halenaquinone and xestoquinone derivatives, inhibitors of Cdc25B phosphatase from a *Xestospongia* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 13, 4: 999–1003
- Capon R.J., MacLeod J.K., Willis A.C. 1987. Trunculins A and B, norsesterterpene cyclic peroxides from a marine sponge, *Latrunculia brevis*. *The Journal of Organic Chemistry*, 52, 3: 339–342
- Cerqueira F., Watanadilok R., Sonchaeng P., Kijjoa A., Pinto M., Quarles van Ufford H., Kroes B., Beukelman C., Nascimento M.S. 2003. Clionasterol: a potent inhibitor of complement component C1. *Planta Medica*, 69, 2: 174–176

- Cheenpracha S., Park E-J., Rostama B., Pezzuto J.M., Chang L.C. 2010. Inhibition of Nitric oxide (NO) production in lipopolysaccharide (LPS)- activated murine macrophage RAW 264,7 cells by the nosesterterpene peroxide, epimuqubilin A. *Marine Drugs*, 8, 3: 429-437
- Clardy J. 2005. A possibly useful review on marine natural products: Using genomics to deliver natural products from symbiotic bacteria. *Genome Biology*, 6, 9: 232–236
- Clark R.J., Garson M.J, Hooper J.N. 2001. Antifungal alkyl amino alcohols from the tropical marine sponge *Haliclona* n. sp. *Journal of Natural Products*, 64, 12: 1568-1571
- Concepción G.P., Foderaro T.A., Eldredge G.S., Lobkovsky E., Clardy J., Barrows L.R., Ireland C.M. 1995. Topoisomerase II-mediated DNA cleavage by adocia- and xestoquinones from the Philippine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 22: 4503-4507
- Copp R.B., Fulton F.K., Perry B.N., Blunt W.J., Munro H.G.M. 1994. Natural and synthetic derivatives of discorhabdin C, a cytotoxic pigment from the New Zealand sponge *Latrunculia* cf. *bocagei*. *The Journal of Organic Chemistry*, 59, 26: 8233-8238
- Coue M., Brenner S.L., Spector I., Korn E.D. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*, 213, 2: 316–318
- Cunha B.A. 2009. Antibiotic Essentials 2009. 8 izd. Sudbury, *Jones & Bartlett Learning*: 691 str.
- Červek U. 2011. Iskanje substituta za antibiotike v naravi? Maribor, Delo d.d.  
<http://www.delo.si/druzba/zdravje/iskanje-substituta-za-antibiotike-v-naravi.html>  
(2012)
- D'Auria M.V., Sepea V., D'Orsola R., Bellotta V., Debitus C., Zampella A. 2007. Isolation and structural elucidation of callipeltins J–M: antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron*, 63, 1: 131–140
- De Rosa S. 2002. Mediterranean marine organisms as source of new potential drugs. V: Natural products in the new millennium: Prospects and industrial applications. Rauter A., Palma FB., Justino J., Araujo ME., Santos SP. (ur). The Netherlands, *Kluwer Academic Publishers*: 441–461
- De Smet P., Parys J.B., Callewaert G., Weidema A.F., Hill E., De Smedt H., Erneux C., Sorrentino V., Missiaen L. 1999. Xestospongins C is an equally potent inhibitor of the

inositol 1,4,5-triphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  pumps. *Cell Calcium*, 26, (1-2): 9–13

Donia M., Hamann M.T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, 3, 6: 338–348

Edgar V.A., Cremaschi G.A., Sterin-Borda L., Genaro A.M. 2002. Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes from a chronic mild stress model of depression: effects of fluoxetine. *Brain Behaviour and Immunity*, 16, 4: 333–350

Edrada R.A., Proksch P., Wray V., Witte L., Müller W.E.G., Van Soest R.W. 1996. Four new bioactive manzamine-type alkaloids from the Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *Journal of Natural Products*, 59, 11: 1056–1060

El Sayed K.A., Dunbar D.C., Perry T.L., Wilkins S.P., Hamann M.T. 1997. Marine natural products as prototype insecticidal agents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 7: 2735–2739

El Sayed K.A., Khanfar M.A., Shallal H.M., Muralidharan A., Awate B., Youssef D.T., Liu Y., Zhou Y.D., Nagle D.G., Shah G. 2008. Latrunculin A and its C-17-O-carbamates inhibit prostate tumor cell invasion and HIF-1 activation in breast tumor cells. *Journal of Natural Products*, 71, 3: 396–402

Erickson K.L., Beutler J.A., Cardellina J.H. II, Boyd M.R. 1997. Salicylhalalamides A and B, novel cytotoxic macrolides from the marine sponge *Haliclona* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 62, 23: 8188–8192

Fahy E., Molinski T.F., Harper M.K., Sullivan B.W., Faulkner D.J. 1988. Haliclonadamine: an antimicrobial alkaloid from the sponge *Haliclona* sp. *Tetrahedron Letters*, 29, 28: 3427–3428

Fenical W. 2006. Marine pharmaceuticals: Past, present and future. *Oceanography*, 19, 2: 110–119

Finberg R.W., Moellering R.C., Tally F.P., Craig W.A., Pankey G.A., Dellinger E.P., West M.A., Joshi M., Linden P.K., Rolston K.V., Rotschafer J.C., Rybak M.J. 2004. The importance of bactericidal drugs: future directions in infectious disease. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 9: 1314–1320



Florey H.W. 1945. Use of micro-organisms for therapeutic purposes. *British Medicinal Journal*, 2, 4427: 635–642

Ford J., Capon R.J. 2000. Discorhabdin R: a new antibacterial pyrroloiminoquinone from two Latrunculiid marine sponges, *Latrunculia* sp. and *Negombata* sp. *Journal of Natural Products*, 63, 11: 1527–1528

Foster W., Raoult A. 1974. Early descriptions of antibiosis. *The Journal of the Royal College of General Practitioners*, 24, 149: 889–894

Foto: Strugar G., 2012

Frakes M.A. 2001. Muscle relaxant choices for rapid sequence induction. *Air Medical Journal*, 20, 1: 20–21

Fusetani N. 2000. Introduction. V: *Drugs from the Sea*. Fusetani N (ur.). Basel, Karger: 1-5

Fusetani N., Shinoda K., Matsunaga S. 1993. Bioactive marine metabolites. 48. Cinachyrolid A: a potent cytotoxic macrolide possessing two spiro ketals from marine sponge *Cinachyra* sp. *Journal of the American Chemical Society*. 115, 10: 3977-3981

Fusetani N., Yasumuro K., Matsunaga S., Hirota H. 1989. Haliclamines A and B, cytotoxic macrocyclic alkaloids from a sponge of the genus *Haliclona*, *Tetrahedron Letters*, 30, 49: 6891-6894

Gebel E. 2012. Modified bee peptide slays deadly bacteria, Chemical and Engineering news. Washington. DC, American Chemical Society.  
<http://cen.acs.org/articles/90/web/2012/05/Modified-Bee-Peptide-Slays-Deadly.html>  
(2013)

Genta-Jouve G., Francezon N., Puissant A., Auberger P., Vacelet P., Perez T., Fontana A., Mourabite A., Thomasa O.P. 2011. Structure elucidation of the new citharoxazole from the Mediterranean deep-sea sponge *Latrunculia (Biannulata) citharistae*. *Magnetic Resonance In Chemistry*, 49, 8: 533-536

Gillor O., Kirkup B.C., Riley M.A. 2004. Colicins and microcins: the next generation antimicrobials. *Advances in Applied Microbiology*, 54, 18: 129–146

Gillor O., Nigro L.M., Riley M.A. 2005. Genetically engineered bacteriocins and their potential as the next generation of antimicrobials. *Current Pharmaceutical Design*, 11, 8: 1067–1075

- gWhiz. 2013. What are the major mechanisms of bacterial resistance to antibiotics? (diagram). LCC. Antibacterial agents 1-EMF, Gngaging mobile education. <http://www.gwhizmobile.com/gWhiz/CatalogDetail.php?tag=flash&key=0AiNQSE5z3xXmdHVaNhRUndBdV9FM1lmYzVJaUU4bFE&action=view&title=Antibacterial%20Agents%20I%20-%20EMF&rating=5> (2013)
- Halim H., Chunhacha P., Suwanborirux K., Chanvorachote P. 2011. Anticancer and antimetastatic activities of renieramycin M, a marine tetrahydroisoquinoline alkaloid, in human non-small cell lung cancer cells. *Anticancer Research*, 31, 1: 193–201
- Han Y., Yang B., Zhang F., Miao X., Li Z. 2009. Characterization of antifungal chitinase from marine *Streptomyces* sp. DA11 associated with south China sea sponge *Craniella australiensis*. *Marine Biotechnology*, 11, 1: 132–140
- Harrison B., Talapatra S., Lobkovsky E., Clardy J., Crews P. 1996. The structure and biogenetic origin of (-) halicyclamine B from a *Xestospongia* sponge. *Tetrahedron Letters*, 37, 51: 9151-9154
- Hood K.A., West L.M., Rouwe' B., Northocote P.T., Berridge M.V., Wakefield S.J., Miller J.H. 2002. Peloruside A, a novel antimetastatic agent with paclitaxel-like microtubule-stabilizing activity. *Cancer Research*, 62, 12: 3356–3360
- Iguchi K., Fujita M., Nagaoka H., Mitome H. and Yamada Y. 1993. Aragusterol A: a potent antitumor marine steroid from the Okinawan sponge of the genus *Xestospongia*. *Tetrahedron Letters*, 34, 39: 6277-6280
- Inal J.M. 2003. Phage therapy: a reappraisal of bacteriophages as antibiotics. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 51, 4: 237-244
- Isbrucker R.A., Cummins J., Pomponi S.A., Longley R.E., Wright A.E. 2003. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin 1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochemical Pharmacology*, 66, 1: 75–82
- Ito M., Yamanaka M., Kutsumura N., Nishiyama S. 2004. Total synthesis of eurypamides, marine cyclic-isodityrosines from the Palauan sponge *Microcionia eurypa*. *Tetrahedron*, 60, 26: 5623-5634
- Iwagawa T., Kaneko M., Okamura H., Nakatani M., Van Soest R.W., Shiro M. 2000. A new quinolizidine alkaloid from the Papua New Guinean sponge *Xestospongia exigua*. *Journal of Natural Products*, 63, 9: 1310-1311

- Jaimovich E., Mattei C., Liberona J.L., Cardenas C., Estrada M., Barbier J., Debitus C., Laurent D., Molgo J. 2005. Xestospongin B, a competitive inhibitor of IP<sup>3</sup>-mediated Ca<sup>2+</sup> signalling in cultured rat myotubes, isolated myonuclei, and neuroblastoma (NG108–15) cells. *FEBS Letters*, 579, 10: 2051–2057
- Jayatilake G.S., Baker B.J., McClintock J.B. 1995. Isolation and identification of a stilbene derivative from the Antarctic sponge *Kirkpatrickia variolosa*. *Journal of Natural Products*, 58, 12: 1958–1960
- Jayatilake G.S., Thornton M.P., Leonard A.C., Grimwade J.E., Baker B.J. 1996. Metabolites from an Antarctic sponge associated bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Natural Products*, 59, 3: 293–296
- Jensen P.R., Mincer T.J., Williams P.G., Fenical W. 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 1: 43–48
- Jerman B. 2009. SOS odziv. Bio novice. Splet znanosti in biotehnologije.  
<http://bionovice.si/sos-odziv-sos-response/> (16. jul. 2013)
- Jimenez C., Crews P. 1990. Novel Marine Sponge Amino Acids, 10. Xestoaminols from *Xestasporgia* sp. *Journal of Natural products*, 53, 4: 978-982
- Jones R.L., Peterson C.M., Grady R.W., Kumbaraci T., Cerami A., Graziano J.H. 1977. Effects of iron chelators and iron overload on *Salmonella* infection. *Nature*, 267, 5606: 63–65
- Kashman Y., Groweiss A., Shmueli U. 1980. Latrunculin, a new 2-thiazolidinone macrolide from the marine sponge *Latrunculia magnifica*. *Tetrahedron Letters*, 21, 37: 3629–3632
- Kernan M.R., Faulkner D.J. 1987. Halichondramide, an antifungal macrolide from the sponge *Halichondria* sp. *Tetrahedron letters*, 28, 25: 2809-2812
- Kirkup B.C. 2006. Bacteriocins as oral and gastrointestinal antibiotics: theoretical considerations, applied research, and practical applications. *Current Medicinal Chemistry*, 13, 27: 3335–3350
- Kobayashi J., Ishida K., Naitoh K., Shigemori H., Mikami Y., Sasaki T. 1993. Xestokerols A, B, and C, new C<sub>29</sub> steroids with a cyclopropane ring from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*, 56, 8: 1350–1355

- Kobayashi J., Naitoh K., Ishida K., Shigemori H., Ishibashi M. 1994. Nepheliosyne A, new C<sub>47</sub> acetylenic acid from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*, 57, 9: 1300-1303
- Kobayashi M., Chen Y.-J., Aoki S., In Y., Ishida T., Kitagawa I. 1995. Four new  $\beta$ -carboline alkaloids isolated from two Okinawan marine sponges of *Xestospongia* sp. and *Haliclona* sp. *Tetrahedron*, 51, 13: 3727-3736
- Kobayashi M., Shimizu N., Kitagawa I., Kyogoku Y., Harada N., Uda H. 1985. Absolute stereostructures of halenaquinol and halenaquinol sulfate, pentacyclic hydroquinones from the okinawan marine sponge *Xestospongia sapra*, as determined by theoretical calculation of CD spectra. *Tetrahedron Letters*, 26: 3833
- Kogut M.H. 2000. Cytokines and prevention of infectious diseases in poultry: a review. *Avian Pathology*, 29, 5: 395-404
- Kubo A., Kitahara Y., Nakahara S. 1989. Synthesis of new isoguinolinequinone metabolites of a marine sponge, *Xestospongia* sp., and the Nudibranch *Jorunna funebris*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 5: 1384-1386
- Kubota T., Kon Y., Kobayashi J. 2008. Xestosaprol C, a new pentacyclic hydroquinone sulfate from a marine sponge *Xestospongia sapra*. *Heterocycles*, 76, 2: 1571-1575
- Landsberg H. 1949. Prelude to the discovery of penicillin. *Isis*, 40, 3: 225-227
- Lang G., Pinkert A., Blunt J.W., Munro M. 2005. Discorhabdin W, the first dimeric discorhabdin. *Journal of Natural Products*, 68, 12: 1796-1798
- Laport M.S., Santos O.C.S., Muricy G. 2009. Marine sponges: Potential sources of new antimicrobial drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology* 10, 1: 86-105
- Larsen T.O., Smedsgaard J., Nielsen K.F., Hansen M.E., Frisvad J.C. 2005. Phenotypic taxonomy and metabolite profiling in microbial drug discovery. *Natural Product Reports*, 22, 6: 672-695
- Laurent D., Jullian V., Parenty A., Knibiehler M., Dorin D., Schmitt S., Lozach O., Lebouvier N., Frostin M., Alby F., Maurel S., Doerig C., Meijer L., Sauvain M. 2006. Antimalarial potential of xestoquinone, a protein kinase inhibitor isolated from a Vanuatu marine sponge *Xestospongia* sp. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14, 13: 4477-4482

- Lebar M.D., Heimbegner J.L., Baker B.J. 2007. Cold-water marine natural products. *Natural Products Reports*, 24, 4: 774–797
- Lerch M.L., Faulkner D.J. 2001. Unusual polyoxygenated sterols from a Philippine sponge *Xestospongia* sp. *Tetrahedron*, 57, 19: 4091-4094
- Levy S.B. 1994. Balancing the drug-resistance equation. *Trends in Microbiology*, 2, 10: 341–342
- Leys S.P., Mackie G.O., Reiswig H.M. 2007. The biology of glass sponges. *Advances in marine biology*, 52: 1-145 Courtesy of J.Gutt, copyright: J.Gutt, AWI.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065288106520012#fig0041> (2013)
- Li H., Matsunaga S., Fusetani N. 1995. Halicyclindramides A–C, antifungal and cytotoxic depsipeptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 2: 338–343
- Li H., Matsunaga S., Fusetani N. 1996. Halicyclindramides D and E, antifungal peptides from the marine sponge *Halichondria cylindrata*. *Journal of Natural Products*, 59, 2: 163–166
- Li X., Nikadio H. 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*, 69, 12: 1555–1623
- Limbird L.E. 2004. The receptor concept: a continuing evolution. *Molecular Interventions*, 4, 6: 326–336
- Lindblad W.J. 2008. Considerations for determining if a natural product is an effective wound-healing agent. *The International Journal of Lower Extremity Wounds*, 7, 2: 75–81
- Lippert H., Brinkmeyer R., Mülhaupt T., Iken K. 2003. Antimicrobial activity in sub-Arctic marine invertebrates. *Polar Biology*, 26, 9: 591–600
- Liu D., Xu J., Jiang W., Deng Z., de Voogd N.J., Proksch P., Lin W. 2011. Xestospongienols A–L, brominated acetylenic acids from the Chinese marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Helvetica Chimica Acta*, 94, 9:1600-1607
- Ljungh A., Wadström T. (ur.) 2009. *Lactobacillus* molecular biology: From genomics to probiotics. 1. Izd. Norfolk, United Kingdom, Caister Academic Press: 205 str.

- Lundberg U. 1995. Methods and applications of stress research. *Technology and Health Care*, 3, 1: 3–9
- Makareva T. N., Krasokhin V. B., Guzii A. G., Stonik V. A. 2010. Strong ethanol solvate of discorhabdin A isolated from the far-east sponge *Latrunculia oparinae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 46, 1: 152-153
- Mansoor A.T., Bae H.B., Hong J., Lee C.-O., Im S.K., Jung H.J. 2005. New fatty acid derivatives from *Homaxinella* sp., a marine sponge. *Lipids*, 40, 9: 981-985
- Mansoor A.T., Lee Y.M., Hong J., Lee C.-O., Im S.K., Jung H.J. 2006. 5,6:8, diepoxy and other cytotoxic sterols from the marine sponge *Homaxinella* sp. *Journal of Natural Products*, 69, 1: 131-134
- Marshall K.M., Matsumoto S.S., Holden J.A., Concepción G.P., Tasdemir D., Ireland C.M., Barrows L.R. 2003. The anti-neoplastic and novel topoisomerase II-mediated cytotoxicity of neoamphimedine, a marine pyridoacridine. *Biochemical Pharmacology*, 66, 3: 447–458
- Mascio C.T., Alder J.D., Silverman J.A. 2007. Bactericidal action of daptomycin against stationary-phase and nondividing *Staphylococcus aureus* cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, 12: 4255–4260
- Mathur M.D., Vidhani S., Mehndiratta P.L. 2003. Bacteriophage therapy: an alternative to conventional antibiotics. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 51, 8: 593–596
- Mattey M., Spencer J. 2008. Bacteriophage therapy--cooked goose or phoenix rising?. *Current Opinion in Biotechnology*, 19, 6: 608–612
- Mayer A.M.S, Hall M.L, Lynch S.M, Gunasekera S.P, Sennett S.H, Pomponi S.A. 2005. Differential modulation of microglia superoxide anion and thromboxane B2 generation by the marine manzamines. *BMC Pharmacology*, 5: 6
- McClintock J.B., Baker B.J. 1997. A review of the chemical ecology of antarctic marine invertebrates. *American Zoologist*, 37, 4: 329–342
- McClintock J.B., Gauthier J.J. 1992. Antimicrobial activities of Antarctic sponges. *Antarctic Science*, 4, 2: 179–183

- McClintock J.B. 1987. Investigation of the relationship between invertebrate predation and biochemical composition, energy content, spicule armament and toxicity of benthic sponges at McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology*, 94, 3: 479–487
- McClintock J.B., Amsler C.D., Baker B.J., van Soest R.W. 2005. Ecology of Antarctic marine sponges: An overview. *Integrative & Comparative Biology, Oxford Journals*, 45, 2: 359–368  
<http://icb.oxfordjournals.org/content/45/2/359/F3.expansion> (2013)
- McClintock J.B., Heine J., Slattery M., Weston J. 1990. Chemical bioactivity in common shallow-water Antarctic marine invertebrates. *Antarctic Journal of the United States*, 25, 5: 204–206
- McClintock J.B., Slattery M., Baker B.J., Heine J.N. 1993. Chemical ecology of Antarctic sponges from McMurdo Sound, Antarctica: ecological aspects. *Antarctic Journal of the United States*, 28, 5: 134–135
- Mercer P. 2012. Researchers make critical antibiotic alternative discovery, Nevs/Health. Sydney, Voice of America.  
<http://www.voanews.com/content/australian-researchers-make-critical-antibiotic-alternative-discovery/1455499.html> (jul. 2013)
- Merril C.R., Scholl D., Adhya S.L. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 2, 6: 489–497
- Miller A.A., Miller P.F. (ur.) 2011. Emerging trends in antibacterial discovery: answering the call to arms. Norfolk, United Kingdom, *Caister Academic Press*: 468 str.
- Miyamoto S., Izumi M., Hori M., Kobayashi M., Ozaki H., Karaki H. 2000. Xestospongin C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP<sub>3</sub> receptor, attenuates the positive inotropic effect of  $\alpha$ -adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *British Journal of Pharmacology*, 130, 3: 650–654
- Mooberry S.L., Tien G., Hernandez A.H., Plubrukarn A., Davidson B.S. 1999. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Research*, 59, 3: 653–660
- Moon B., Baker B.J., McClintock J.B. 1998. Purine and nucleoside metabolites from the Antarctic sponge *Isodictya erinacea*. *Journal of Natural Products*, 61,1: 116–118

- Moon B., Park Y.C., McClintock J.B., Baker B.J. 2000. Structure and bioactivity of erebusinone, a pigment from the Antarctic sponge *Isodictya erinacea*. *Tetrahedron*, 56, 46: 9057–9062
- Moon S.S., MacMillan J.B., Olmstead M.M., Ta T.A., Pessah I.N., Molinski T.F. 2002. (+)-7S-Hydroxyxestospongin A from the marine sponge *Xestospongia* sp. and absolute configuration of (+)-xestospongin D. *Journal of Natural Products*, 65, 3: 249-254
- Moore D. 2013. Antibiotic classification & mechanism. Overview of by mechanism. *Orthobullets*. Boston, Lineage Medical, LLC.  
<http://www.orthobullets.com/basic-science/9059/antibiotic-classification-and-mechanism> (2013)
- Mukhopadhyay J., Das K., Ismail S., Koppstein D., Jang M., Hudson B., Sarafianos S., Tuske S., Patel J., Jansen R., Irschik H., Arnold E., Ebright R.H. 2008. The RNA polymerase "switch region" is a target for inhibitors. *Cell*, 135, 2: 295–307
- Müller W. E. G., Schröder H.C., Wiens M., Petrović-Ottstadt S., Batel R., Müller I. M. 2004. Traditional and modern biomedical prospecting: Part II- the benefits. *Evidenced-based Complementary and Alternative Medicine*, 1, 2: 133-144
- Müller W.E.G., Zahn R.K., Kurelec B., Lucu C., Müller I., Uhlenbruck G. 1981. Lectin, a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. *Journal of Bacteriology*, 145, 1: 548-558
- Müller W.E.G. 2001. Telomerase activity in sponges (Porifera) the closest related taxa of the hypothetical ancestral animal the Urmetazoa. V: Telomerases, Telomeres & Cancer. Krupp G., Parwaresch R. (ur.). Georgetown, Landes Bioscience, *Kluwer Academic/Plenum Publishers*: 446 str.
- Müller W.E.G., Klemm M., Thakur N.L., Schröder H.C., Aiello A., D'Esposito M., Menna M., Fattorusso E. 2003. Molecular/chemical ecology in sponges: evidence for an adaptive antibacterial response in *Suberites domuncula*. *Marine biology*, 144, 1: 19-29
- Müller W.E.G., Schatton W.F.H., Gudrum M. 1991. Verwendung von avarol oder dessen derivaten zur bekämpfung von entzündlichen systemischen und dermatologischen erkrankungen. German Patent Application DE 4137093.
- Müller W.E.G., Sobel C, Diehl-Seifert B., Maidhof A., Schröder H.C. 1987. Influence of the antileukemic and anti-human immunodeficiency virus agent avarol on selected immune responses *in vitro* and *in vivo*. *Biochemical Pharmacology*, 36, 9: 1489–1494



- Munro M.H., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J., Lill R.E., Li S., Battershill C.N., Duckworth A.R. 1999. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. *Journal of Biotechnology*, 70, 1-3: 15-25
- Na M., Ding Y., Wang B., Tekwani B.L., Schinazi R.F., Franzblau S., Kelly M., Stone R., Li X.C., Ferreira D., Hamann N.T. 2010. Anti-infective discorhabdins from a deep-water Alaskan sponge of the genus *Latrunculia*. *Journal of Natural Products*, 73, 3: 383-387
- Nacar A., Nacar E. 2008. Phagotrophic protozoa: A new weapon against pathogens?. *Medical Hypotheses*, 70, 1: 141-142
- Nagayama H., Hingtgen J.N., Aprison M.H. 1980. Pre and postsynaptic serotonergic manipulations in an animal model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behaviour*, 13, 4: 575-579
- Nam S.J., Ko H., Shin M., Ham J., Chin J., Kim Y., Kim H., Shin K., Choi H., Kang H. 2006. Farnesoid X activated receptor antagonists from a marine sponge *Spongia* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 16, 20: 5398-5402
- Nicolaou K.C., Schlawe D., Kim D.W., Longbottom D.A., de Noronha R.G., Lizos D.E., Manam R.R., Faulkner D.J. 2005. Total synthesis of halipeptins: isolation of halipeptin D and synthesis of oxazoline halipeptin analogues. *Chemistry*, 11, 21: 6197-6211
- Northcote P., Andersen R.J. 1989. Xestovanin A and secoxestovanin A, triterpenoid glycosides with new carbon skeletons from the sponge *Xestospongia vanilla*. *Journal of the American Chemical Society*, 111, 16: 6276-6280
- Ohlsen K., Dandekar G., Schwarz R., Dandekar T. 2008. New trends in pharmacogenomic strategies against resistance development in microbial infections. *Disclosures of Pharmacogenomics*, 9, 11: 1711-1723
- Oku N., Nagai K., Shindoh N., Terada Y., Van Soest R.W., Matsunaga S., Fusetani N. 2004. Three new cyclostelletamines, which inhibit histone deacetylase, from a marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 14, 10: 2617-2620
- Opletalová K., Blaizot X., Mourgeon B., Chêne Y., Creveuil C., Combemale P., Laplaud A.L., Sohyer-Lebreuilly I., Dompmartin A. 2012. Maggot therapy for wound debridement: a randomized multicenter trial. *Archives of Dermatology*, 148, 4: 432-438

- Orabi K.Y., El Sayed K.A., Hamann M.T., Dunbar D.C., Al-Said M.S., Higa T., Kelly M. 2002. Araguspongines K and L, new bioactive bis-1-oxaquinolizidine N-oxide alkaloids from Red Sea specimens of *Xestospongia exigua*. *Journal of Natural Products*, 65, 12: 1782-1785
- Pankey G.A., Sabath L.D. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 6: 864–870
- Patil A.D., Kokke W.C., Cochran S., Francis T.A., Tomszek T., Westley J.W. 1992. Brominated polyacetylenic acids from the marine sponge *Xestospongia muta*: inhibitors of HIV protease. *Journal of Natural Products*, 55, 9: 1170-1177
- Pearse V., Pearse J., Bushsbaum M., Buschsbaum R. 1987. V: *Living Invertebrates*, Pacific Grove, California, *The Blackwood Press*: 71-90
- Perry N.B, Blunt J.W, Munro M.H.G, Higa T., Sakai R. 1988. Discorhabdin D an antitumor alkaloid from the sponges *Latrunculia brevis* and *Prianos* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 53, 7: 4127–4128
- Peters K.J., Amsler C.D., McClintock J.B., Baker B.J. 2010. Potential chemical defenses of Antarctic sponges against sympatric microorganisms. *Polar Biology*, 33, 5: 649–658
- Pham N.B., Butler M.S., Hooper J.N., Moni R.W., Quinn R.J. 1999. Isolation of xestosterol esters of brominated acetylenic fatty acids from the marine sponge *Xestospongia testudinaria*. *Journal of Natural Products*, 62, 10: 1439-1442
- Piel J. 2009. Metabolites from symbiotic bacteria. *Natural Products Reports*, 26, 3: 338–362
- Pika J., Tischler M., Andersen R.J. 1992. Glaciasterols A and B, 9,11-secosteroids from the marine sponge *Aplysilla glacialis*. *Canadian Journal of Chemistry*, 70, 5: 1506–1510
- Pimentel S.M., Bojo Z.P., Roberto A.V., Lazaro J.E., Mangalindan G.C., Florentino L.M., Lim-Navarro P., Tasdemir D., Ireland C.M., Concepcion G.P. 2003. Platelet aggregation inhibitors from Philippine marine invertebrate samples screened in a new microplate assay. *Marine Biotechnology (NY)*, 5, 4: 395–400



- Reyes F., Martin R., Rueda A., Fernandez R., Montalvo D., Gomez C., Sanchez-Puelles J. 2004. Discorhabdins I and L, Cytotoxic Alkaloids from the Sponge *Latrunculia brevis*. *Journal of Natural Products*, 67, 3: 463-465
- Řezanka T., Dembitsky V.M. 2003. Ten-membered substituted cyclic 2-oxecanone (decalactone) derivatives from *Latrunculia corticata*, a red sea sponge. *European Journal of Organic Chemistry*, 2003, 11: 2144-2152
- Rhee K.Y., Gardiner D.F. 2004. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal activity in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases*, 39, 5: 755-756
- Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. 2006. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 6, 10: 629-640
- Roll D.M., Scheuer P.J., Matsumoto G.K., Clardy J. 1983. Halenaquinone, a pentacyclic polyketide from a marine sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 105, 19: 6177-6178
- Ruomei Q., Ozaki Y., Satoh K., Kurota K., Asazuma N., Yatomi Y., Kume S. 1996. Quantitative measurement of various 5-HT receptor antagonists on platelet activation induced by serotonin. *Thrombosis Research*, 81, 1: 43-54
- Sakai R., Higa T., Jefford C.W., Bernardinelli G. 1986. Manzamine A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 20: 6404-6405
- Samuel A. 2011. Chilean subway protected with antimicrobial copper. *Global Rail News*. Hemel Hempstead, *Copper Development Association*.  
<http://www.globalrailnews.com/2011/07/22/chilean-subway-protected-with-antimicrobial-copper/> (19. oktober, 2012)
- Schröder C.H., Sudek S., De Caro S., De Rosa S., Perović S., Steffen R., Müller M.I., Müller W.E.G. 2002. Synthesis of neurotoxin Quinolinic acid in apoptotic tissue from *Suberites domuncula*: Cell biological, molecular biological and chemical analyses. *Marine Biotechnology*, 4, 6: 546-558
- Scott M. 2009. Antibiotic research supplement/Simple truths white paper research literature supplement. part 1. 52 str.
- Seme K., Gubina M., Poljak M. 1998. Mehanizmi bakterijske odpornosti proti antibiotikom. Infektološki simpozij 1998. Zbornik predavanj: 1-8

- Sepčić K. 2008. Zdravila iz morja: prvaki so spužve, ki so prave "kemične tovarne". *Znanost* (Ljubl.), 50, 77: 20
- Sepe V., D'Orsi R., Borbone N., D'Auria M.V., Bifulco G., Monti M.C., Catania A., Zampella A. 2006. Callipeltins F–I: new antifungal peptides from the marine sponge *Latrunculia* sp. *Tetrahedron*, 62, 5: 833-840
- Shimura H., Iguchi K., Yamada Y., Nakaike S., Yamagishi T., Matsumoto K., Yokoo C. 1994. Aragusterol C: a novel halogenated marine steroid from an Okinawan sponge, *Xestospongia* sp., possessing potent antitumor activity. *Experientia*, 50, 2: 134-136
- Shin B.A., Kim Y.R., Lee I.S., Sung C.K., Hong J., Sim C., Im K.S., Jung J.H. 1999. Lyso-PAF analogues and lysophosphatidylcholines from the marine sponge *Spirastrella abata* as inhibitors of cholesterol biosynthesis. *Journal of Natural Products*, 62, 11: 1554–1557
- Shin J., Seo Y., Rho J.R., Baek E., Kwon B.M., Jeong T.S., Bok S.H. 1995. Suberitenone A and suberitenone B: sesterterpenoids of an unprecedented skeletal class from the Antarctic sponge *Suberites* sp. *The Journal of Organic Chemistry*, 60, 23: 7582–7588
- Shoji N., Umeyama A., Shin K., Takeda K., Arihara S., Kobayashi J., Takei M. 1992. Two unique pentacyclic steroids with cis C/D ring junction from *Xestospongia bergquistia* Fromont, powerful inhibitors of histamine release. *The Journal of Organic Chemistry*, 57, 11: 2996–2997
- Simmons T.L., Andrianasolo E., McPhail K., Flatt P., Gerwick W.H. 2005. Minireview. Marine natural products as anticancer drugs. *Molecular Cancer Therapeutics*, 4, 2: 333-342
- Sipkema D., Franssen M.C.R., Osinga R., Tramper J., Wijffels R.H. 2005. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7, 3: 142-162
- Smith A.B., Leahy J.W., Noda I., Remiszewski S.W., Liverton N.J., Zibuck R. 1992. Total synthesis of the latrunculins. *Journal of the American Chemical Society*, 114, 8: 2995–3007
- Soulsby E.J. 2005. Resistance to antimicrobials in humans and animals: overusing antibiotics is not the only cause and reducing use is not the only solution. *British Medicinal Journal*, 331, 7527: 1219-1220

- Stach J.E.M., Bull A.T. 2005. Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 87, 1: 3–9
- Suwanborirux K., Amnuoypol S., Plubrukarn A., Pummangura S., Kubo A., Tanaka C., Saito N. 2003. Chemistry of renieramycins. Part 3.(1) isolation and structure of stabilized renieramycin type derivatives possessing antitumor activity from Thai sponge *Xestospongia* species, pretreated with potassium cyanide. *Journal of Natural Products*, 66, 11: 1441-1446
- Swarog 2013. Kako se prenaša genski zapis, primerjava med konjugacijo, transformacijo in transdukcijo. Ministrstvo RS za šolstvo in šport.  
[http://mss.swarog.si/biologija/MSS/index.php?page\\_id=11164](http://mss.swarog.si/biologija/MSS/index.php?page_id=11164) (maj, 2013)
- Ta TA., Feng W., Molinski T.F., Pessah I.N. 2006. Hydroxylated xestospongins block inositol-1,4,5-trisphosphate-induced  $Ca^{2+}$  release and sensitize  $Ca^{2+}$ -induced  $Ca^{2+}$  release mediated by ryanodine receptors. *Molecular Pharmacology*, 69, 2: 532–538
- Tachibana K., Scheuer P.J., Tsukitani Y., Kikushi H., Engen D.V., Clardy J., Gopichand Y., Schmitz F.J. 1981. Okadaic acid a cytotoxic polyether from the marine sponges of the genus *Halichondria*. *Journal of the American Chemical Society*, 103, 9: 2469–2471
- Takahashi Y., Tanaka N., Kubota T., Ishiyama H., Shibasaki A., Gono T., Fromont J., Kobayashi J. 2012. Heteroaromatic alkaloids, nakijinamines, from the sponge *Suberites* sp. *Tetrahedron*, 68, 41: 8545-8550
- Tasdemir D., Marshall K.M., Mangalindan G.C., Concepcion G.P., Barrows L.R., Harper M.K., Ireland C.M. 2001. Deoxyamphimedine, a new pyridoacridine alkaloid from two tropical *Xestospongia* sponges. *The Journal of Organic Chemistry*, 66, 9: 3246-3248
- Taylor M.W., Radax R., Steger D., Wagner M. 2007. Sponge-associated microorganisms: Evolution, ecology and biotechnological potential. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 2: 295–347
- Ter Haar E., Kowalski R.J., Hamel E., Lin C.M., Longley R.E., Gunasekera S.P., Rosenkranz H.S., Day B.W. 1996. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry*, 35, 1: 243–250
- Thakur N.A., Thakur N.L., Indap M.M., Pandit R.A., Datar V.V., Müller W.E.G. 2005. Antiangiogenic, antimicrobial and cytotoxic potential of sponge-associated bacteria. *Marine Biotechnology*, 7, 3: 245-252

- Thakur N.L., Hentschel U., Krasko A., Pabel C.T., Anil A.C., Müller W.E.G. 2003. Antibacterial activity of the sponge *Suberites domuncula* and its primmorphs: potential basis for epibacterial chemical defense. *Aquatic Microbial Ecology*, 31: 77–83
- Todar K. 2008-2012. Principles of bacterial pathogenesis. Bacterial resistance to antibiotics. V: Todar's online textbook of bacteriology. Lectures in Microbiology, University of Wisconsin-Madison, Department of Bacteriology.  
<http://www.textbookofbacteriology.net/resantimicrobial.html> (14. mar. 2013)
- Tsukamoto S., Takahashi M., Matsunaga S., Fusetani N., Van Soest R.W. 2000. Hachijodines A-G: seven new cytotoxic 3-alkylpyridine alkaloids from two marine sponges of the genera *Xestospongia* and *Amphimedon*. *Journal of Natural Products*, 63, 5: 682-684
- Turk T., Ambrožič-Avguštin J., Batista U., Strugar G., Kosmina R., Čivović S., Janussen D., Kauferstein S., Mebs D., Sepčić K. 2013. Biological activities of ethanolic extracts from deep-sea antarctic marine sponges. *Marine Drugs*, 4, 11: 1126-1139
- Ueda T., Nakamura Y., Smith M.C., Coptis A.B., Inoue A., Ojima T., Matsunaga S., Swanson T.G., Sakai R. 2012. Isolation of novel prototype galectins from the marine ball sponge *Cinachyrella* sp. guided by their modulatory activity on mammalian glutamate-gated ion channels. *Glycobiology*, 23, 4: 412-425
- Van Epps H.L. 2006. René Dubos: unearthing antibiotics. *The Journal of Experimental Medicine*, 203, 2: 259
- Vetter W., Janussen D. 2005. Halogenated natural products in five species of Antarctic sponges: compounds with POP-like properties? *Environmental Science & Technology*, 39, 11: 3889–3895
- Vilozny B., Amagata T., Mooberry S.L., Crews P. 2004. A new dimension to the biosynthetic products isolated from the sponge *Negombata magnifica*. *Journal of Natural Products*, 67, 6: 1055-1057
- von Nussbaum F., Brands M., Hinzen B., Weigand S., Häbich D. 2006. Medicinal chemistry of antibacterial natural products – exodus or revival?. *Angewandte Chemie International ed. in English*, 45, 31: 5072–5129
- Waksman S.A. 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance?. *Mycologia*, 39, 5: 565–569

- Walsh C. 2003. Perspectives. Where will new antibiotics come from. *Nature reviews/ Microbiology*, 1, 1: 65-70
- Walsh F. 2013. Antibiotic resistance `as big a risk as terrorism` - medical chief. United Kingdom, BBC News health.  
<http://www.bbc.co.uk/news/health-21737844> (2013)
- Wang G., Abrell L.M., Avelar A., Borgeson B.M., Crews P. 1998. New hirsutane based sesquiterpenes from salt water cultures of a marine sponge derived fungus and the terrestrial fungus *Coriolus consors*. *Tetrahedron*, 54, 26: 7335–7342
- Webster S.N., Blackall L.L. 2008. Commentary. What do we really know about sponge-microbial symbioses. *The ISME Journal. Multidisciplinary Journal of Microbial Ecology*, 3: 1-3  
[http://www.nature.com/ismej/journal/v3/n1/fig\\_tab/ismej2008102f2.html#figure-title](http://www.nature.com/ismej/journal/v3/n1/fig_tab/ismej2008102f2.html#figure-title) (2013)
- Wecke T., Mascher T. 2011. Antibiotic research in the age of omics: from expression profiles to interspecific communication. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 12: 2689-2704
- White J.D., Kawasaki M. 1992. Total synthesis of (+)-latrunculin A, an ichthyotoxic metabolite of the sponge *Latrunculia magnifica* and its C-15 epimer. *The Journal of Organic Chemistry*, 57, 20: 5292-5300
- Wiens M., Luckas B., Brümer F., Shokry M., Ammar A., Steffen R., Batel R., Dicht-Seifert B., Schröder H.C., Müller W.E.G. 2002. Okadaic acid: a potential defense molecule for the sponge *Suberites domuncula*. *Marine Biology*, 142, 2: 213-223
- Wiens M., Schröder C.H., Korzev M., Wang X-H., Batel R., Müller W.E.G. 2011. Inducible ASABF - Type antimicrobial peptide from the sponge *Suberites domuncula*: Microbicidal and hemolytic activity *in vitro* and toxic effect on *Molluscs in vivo*. *Marine Drugs*, 9, 10: 1969-1994
- Wikipedia na Answers.com: Antibiotic resistance. 2013.  
<http://www.answers.com/topic/antibiotic-resistance> (2013)
- Wikipedia, 2013.  
[http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alexander\\_Fleming.jpg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Alexander_Fleming.jpg) (2013)  
[http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Staphylococcus\\_aureus\\_\(AB\\_Test\).jpg](http://sl.wikipedia.org/wiki/Slika:Staphylococcus_aureus_(AB_Test).jpg) (2013)



- Williams D.E., Craig K.S., Patrick B., McHardy L.M., Van Soest R., Roberge M., Andersen R.J. 2002. Motuporamines, anti-invasion and anti-angiogenic alkaloids from the marine sponge *Xestospongia exigua* (Kirkpatrick): isolation, structure elucidation, analogue synthesis, and conformational analysis. *The Journal of Organic Chemistry*, 67, 1: 245-258
- Witte W. 2004. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. *Infection, Genetics and Evolution*, 4, 3: 187–191
- Yarmola E.G., Somasundaram T., Boring T.A., Spector I., Bubb M.R. 2000. Actin-latrunculin A structure and function: Differential modulation of actin-binding protein function by latrunculin A. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 36: 28120–28127
- Yasuhara J., Lu Y. 2010. Marine compounds and their antiviral activities. *Antiviral Research*, 86, 3: 231-240
- Yousaf M., El Sayed K.A., Rao K.V., Lim C.W., Hu J-F., Kelly M., Franzblau S.G., Zhang F., Peraud O., Hill R.T., Hamann M.T. 2002. 12,34-Oxamanzamines, novel biocatalytic and natural products from rmanzamine producing Indo-Pacific sponges. *Tetrahedron*, 58, 7397–7402
- Zampella A., Randazzo A., Borbone N., Luciani S., Trevisi L., Debitus C., D’Auria M.V. 2002. Isolation of callipeltins A–C and of two new open-chain derivatives of callipeltin A from the marine sponge *Latrunculia* sp. A revision of the stereostructure of callipeltins. *Tetrahedron Letters*, 43, 35: 6163–6166

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Kristini Sepčič za ljubeznivost, podporo in pomoč pri izvedbi magistrske naloge, doc. dr. Jerneji Ambrožič Avguštin za izvedbeni material in razlago, ko česa nisem razumela, ter recenzentu prof. dr. Tomu Turku za popravke in usmerjanje tekom pisanja naloge.

Iskrena hvala Vsem, ki so me spremljali in me spodbujali na poti mojega študija. Družini, fantu Jerneju, vsem prijateljem ter sošolcem.

## PRILOGE

### Priloga A

Preglednica 1: Objavljene raziskave biološko aktivnih učinkovin iz antarktičnih spužev

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Cinachyra</i> sp.	Galektin	galaktozo-vezavni lektin	voda	Vpliv na sesalske AMPA in kainatne glutamatne receptorje, modulacija centralnega živčnega sistema.	Ueda in sod., 2012
	Cinahirolid A	makrolidi	metanol in n-heksan	Citotoksičnost proti mišjim levkemičnim rakastim celicam L-1210.	Fusetani in sod., 1993
<i>Halichondria</i> sp.	Halihondrin B			Antimitotična (vezava na GTP) in protitumorska aktivnost.	Munro in sod., 1999
	Izohomohalichondrin B				
	Halihondramidi	amidi, makrolidi		Protiglivna, protimalarična aktivnost.	Kernan in Faulkner, 1987, El Sayed in sod., 1997
	Okadaična kislina ( <i>Prorocentrum lima</i> )	polietri	voda:metanol = 20:80	Inhibitor fosfataze, citotoksična aktivnost, pri višjih koncentracijah indukcija apoptoze, pri nižjih koncentracijah stimulacija obrambnega sistema proti bakterijam.	Tachibana in sod., 1981 Wiens in sod., 2002
	Halicindramini (A-D)			Protiglivna aktivnost proti <i>Mortierella ramanniana</i> , citotoksičnost proti mišjim levkemičnim celicam P388.	Li in sod., 1995, 1996
				voda	Citotoksičnost, inhibicija rekrakcije cevastih nog.

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Haliclona</i> sp.	Manzamin A	derivati indolnih alkaloidov, 3-alkilpirimidinijevi alkaloidi		Proti nevroinflamatorna aktivnost, proti tuberkulozna aktivnost, TXB <sub>2</sub> in inhibicija superoksidnega aniona, modulacija z LPS aktiviranih mikroglia in vitro, protimikrobna aktivnost, protimalarična aktivnost.	Mayer in sod., 2005 Piel, 2009
	Manzamin B				
	Manzamin C				
	Manzamin D-Hidroklorid				
	Manzamin E				
	Manzamin F				
	Manzamin alkaloid	alkaloid		Inhibicija <i>M. tuberculosis</i> .	Rao in sod., 2006
	Salicilamid A in B	poliketidi		Inhibitor V0 ATP-aza, protitumoska aktivnost.	Simmons in sod., 2005 Erickson in sod., 1997
Triterpenoidni hidrokinoni			Inhibicija kinezin motornega proteina in s tem blokada celične delitve, proti proliferativna aktivnost proti tumorskim KB celicam in NCI-H460 (nedrobnoceličnim pljučnim rakastim celicam).	Blackburn in sod., 1999 Bringmann in sod., 2003	
		voda	Protibakterijska aktivnost proti <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Pseudomonas purida</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Candida tropicalis</i> in protiglivna proti <i>Sporothrix schenckii</i> .	McClintock in Gauthier, 1992	
Haliptepini (A-D)	ciklični depsipeptidi		Haliptepin A - in vivo protivnetna aktivnost.	Randazzo in sod., 2001 Nicolau in sod., 2005	
Haligramidi A in B			Citotoksičnost proti humanim tumorskim celičnim linijam.	Rashid in sod., 2000	

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Hirsutanol A, <i>Ent</i> – gloeosteretriol			Blaga protibakterijska aktivnost proti <i>Bacillus subtilis</i> .	Wang in sod., 1998
	Haliklondiamin	alkaloid		Protiglivna aktivnost	Fahy in sod., 1988
	Halaminol A, B in C	alkil amino alkohol		Protiglivna aktivnost	Clark in sod., 2001
	Haliklamin A, B	oligomerna alkilpiridinijeva sol		Inhibicija celične delitve oplojenih jajčec morskega ježka, proti neoplastična aktivnost.	Fusetani in sod., 1989
			metanol- toulén	Protibakterijska, protiglivna in protikvasna aktivnost.	McClintock in Gauthier, 1992
	Papuamin	pentaciklični alkaloid		Protiglivna aktivnost	Baker in sod., 1988
<i>Homaxinella</i>	5,6:8,9-Diepoksi steroli	polioksgenirani steroli	metanol	Proti celičnim linijam različnih tumorjev, protimikrobna aktivnost.	Mansoor in sod., 2006
	Bromiran FA	lipid	metanol	Citotoksičnost, inhibicija biosinteze holesterola.	Mansoor in sod., 2005
<i>Homaxinella balfouriensis</i>			voda	Protibakterijska aktivnost proti <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Candida tropicalis</i> in protiglivna proti <i>Sporothrix schenckii</i> .	McClintock in Gauthier, 1992
			metanol, toulén	Protibakterijska, protikvasna in protiglivna aktivnost.	McClintock in Gauthier, 1992

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Isodictya erinacea</i>	Erebusinon  7-metiladinin p-hidroksi-benzojska kislina  diketopiperazini in fenazinski alkaloidi iz <i>Pseudomonas aureuginosa</i>	aminokislinski derivat tirozina		Preprečuje levitev rakov in s tem povzroči njihov propad, protimikrobna aktivnost.	Baker in sod., 1997 Baker in Yoshida, 1994 Jayatilake in sod., 1996
	Erinacean		metanol/ CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Citotoksičnost proti mišjim limfoblastoidnim celicam L5178Y in kemično odganja morske zvezde.	Moon in sod., 1998, 2000 Pearse in sod., 1987
<i>Isodictya setifera</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (γ-proteobakterija)  Diketopiperazin (DKP) Fenazin-1-karboksilna kislina  Fenazin- 1-karboksamid	fenazin alkaloid	metanol	Protimikrobna aktivnost proti <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> in <i>Micrococcus luteus</i> ter protiglivna aktivnost.	Jayatilake in sod., 1995

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> $\gamma$ -proteobakterija  ciklo- (L-prolin-L-metionin)	diketopiperazin alkaloid		Protimikrobna aktivnost proti <i>B. subtilis</i> , <i>S. aureus</i> in <i>M. luteus</i> ..	Jayatilake in sod., 1996
			metanol, kloroform	Protimikrobna aktivnost	McClintock, 1987 McClintock in sod., 1993
<i>Latrunculia/ Latrunculia cf. bocagei</i>	Kalipeltini A – C	aciklični peptidi	etanol	Protiglivična in anti-HIV aktivnost, zaviralec Na <sup>+</sup> / Ca <sup>2+</sup> izmenjevalca, pozitiven inotropni agent v levem atriju morskega prašička, citotoksičnost proti humanim tumorskim KB celicam.	Zampella in sod., 2002
	Kalipeltini F – I	aciklični peptidi	metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida albicans</i> .	Sepe in sod., 2006
	Kalipeltini J – M	aciklični peptidi	metanol	Protiglivično delovanje proti <i>C. albicans</i> in citotoksična aktivnost proti L16 celicam.	D'Auria in sod., 2007
	Diskorabdin A	policiklični alkaloidi	etanol	Močan citotoksin proti tumorskim celicam, zavira karcinome mišjih Erlich celic.	Makareva in sod., 2010
	Diskorabdin B	policiklični alkaloidi	ni podatka	Močno citotoksičen in protimikroben.	Perry in sod., 1988
	Diskorabdin C, E	pirolaiminokinoninski alkaloidi	metanol	Citotoksičnost proti BSC opičjim ledvičnim celicam in P388 mišjim levkemičnim celicam. Antimikrobno delovanje proti Gram <sup>+</sup> in Gram <sup>-</sup> bakterijam in glivam.	Copp in sod., 1994
	Diskorabdin W, D	pirolaiminokinoninski alkaloidi	metanol/diklorometan(1:1)	Delovanje proti mišjim levkemičnim celicam P388. Protiemikrobno in protitumorsko delovanje.	Lang in sod., 2005

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Diskorabdin I, L	pirolaiminokinoninski alkaloidi	2-propanol	Citotoksičnost proti tumorskim celičnim linijam.	Reyes in sod., 2004
	Diskorabdin R	pirolaiminokinoninski alkaloidi	etanol	Protibakterijsko delovanje	Ford in Capon, 2000
	Latrunkulinosid A – B	dekalaktonski glikozidi	butanol	Inhibicija prehranjevanja zlatih ribic.	Řezanka in Dembitsky, 2003
	Latrunkuleična kislina	poliketid makrocikličnega in triazolidnega obroča	metanol	Potencialni terapevtik, molekularne sonde v raziskavah citoskeleta.	Vilozny in sod., 2004
	Oksalatrunkulin B	heterocikel s triazolidnim obročem	metanol/ diklorometan	Inhibicija aktina, delovanje proti glivam in proti raku.	Ahmed in sod., 2007
	Diskorabdin B Diskorabdin Y Diskokabdin C Diskorabdin A			Protivirusna (proti HIV), protimalarijska, protibakterijska aktivnost, protivegetativna aktivnost.	Abbas in sod., 2011
	Latrunkulin A	ketidne aminokisliline	ni podatka	Zavira tumorske celice prostate, aktivacija celic raka prsi.	El Sayed in sod., 2008
	Latrunkulin A in B	ketidne aminokisliline	petrolejski eter	Učinki na celične linije mišjih nevroblastov in fibroblastov, povzročijo reorganizacijo mikrofilamentov v celicah.	Kashman in sod., 1980



IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	(+)-latrunkulin A  (+)-latrunkulin B  Latrunkulina C in M	ketidne aminokisljne	ni podatka	Povzroči reverzibilne spremembe v morfologiji celic, ogrozi organizacijo mikrofilamentov in zavira posredovanje mikrofilamentov med celično delitvijo.	Smith in sod., 1992
	(+)-latrunkulin A (1)  (+)-1Bepilatrunkulin A	ketidne aminokisljne, knjugirani dieni	ni podatka	Močan zaviralec mikrofilamentov med celično delitvijo.	White in Kawasaki, 1992
	Citaroksazol	aromatični alkaloid	etanol	Citotoksično delovanje	Genta - Jouve in sod., 2011
	Epimikubilin A  Mukubilon B  Epimukubilin B  Sigmosceptrelin A  metil ester  Sigmosceptrelin A  Sigmosceptrelin B  metil ester	norsesterterpenski peroksid	metanol/ diklorometan (1:1) in metanol	Zaviranje proizvodnje NO, protivnetni agensi.	Cheenpracha in sod., 2010
	Trunkulina A in B	norsesterterpenski ciklični peroksidi	etanol	Protimikrobna aktivnost	Capon in sod., 1987

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Microcionidae</i>	Euripamidi A in B	ciklični peptidi	ni podatka	Zavirajo kopičenje lipidnih kapljic v makrofagih.	Ito in sod., 2004
<i>Myxilla</i>	<i>Microsphaeropsis</i> sp. H5-50 Mikrosphaeropsin	derivat eremofilana		Protiglivna aktivnost	Thakur in sod., 2003
<i>Rossella nuda</i>			metanol, kloroform	Inhibicija retrakcije cevastih nog istoživečih vrst morskih organizmov.	McClintock, 1987
<i>Rossella racovitzae</i>			metanol  kloroform	Inhibicija retrakcije cevastih nog istoživečih vrst morskih organizmov, Protibakterijska aktivnost proti organizmom iz drugega geografskega okolja.	McClintock, 1987
<i>Suberites</i> sp. <i>/Suberitidae</i>	Nakijinamin A,  Nakijinamin B,  Nakijinamin F,	heteroaromatični alkaloidi	metanol	A: Protibakterijska aktivnost proti <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> B in F: Protibakterijska aktivnost proti <i>C. albicans</i> .	Takahashi in sod., 2012
	Suberitinon A  Suberitinon B	sesterpenoidi	EtOAc in heksan	Inhibicija krčenja cevastih nog morskih organizmov, protimikrobna aktivnost Inhibicija holesteril-ester transportnega proteina, protibakterijska aktivnost.	Shin in sod., 1995 Baker in sod., 1997
<i>Suberites domuncula</i>	ASABF- Ascaris suum antibakterijski faktor	kationski peptid	metanol	Antimikrobna aktivnost ( $G^+$ in $G^-$ ) significantna proti <i>S. aureus</i> , <i>B.subtilis</i> , <i>M. Lutens</i> , manj očitna proti <i>P. aureuginosa</i> in <i>E.coli</i> , protiglivna ( <i>C.albicans</i> in <i>A.niger</i> ), baktericidna in hemolitična aktivnost.	Wiens in sod., 2011

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	1-o-heksadecil-sn-glicero-3-fosfoholin 1-o-oktadecil-sn-glicero-3-fosfoholin	PAF- trombocite aktivirajoči faktor	metanol	Citotoksičnost proti humanim tumorskim celicam, inhibicija biosinteze holesterola, protibakterijska aktivnost.	Alam in sod., 2001 Shin in sod., 1999 Müller in sod., 2003
	Kinolinska kislina			Aktivacija NMDA receptorjev, citotoksičnost, nevrotoksičnost, citostatičnost, odstranjevanje apoptotičnega tkiva.	Schröder in sod., 2002
	SB2: <i>a-proteob.</i> MBIC3368 (s spužvo povezana bakterija)  PB1 in PB2: <i>Pseudomonas sp.</i> (primmorph)	3D agregati, ki vsebujejo proliferajoče bakt. celice	n- butanol	SB2: citotoksičnost proti PC12, protimikrobna aktivnost PB1 in PB2- citotoksičnost proti HeLa PB2: zaviranje angiogeneze, protimikrobna ( <i>S.aureus</i> , <i>S.epidermidis</i> , <i>E.coli</i> in <i>C.albicans</i> ), hemolitična in citotoksična aktivnost.	Thakur in sod., 2005 Taylor in sod., 2007 Müller, 2001
	Taclektin	lektin		Protibakterijska aktivnost proti <i>E. coli</i> in <i>S. aureus</i> .	Müller in sod., 2004
<i>Tetilla leptoderma</i>			voda	Protibakterijska aktivnost proti <i>Pseudomonas purida</i> , <i>Serratia rubidaea</i> , <i>Candida tropicalis</i> , citotoksičnost.	McClintock in Gauthier, 1992
			metanol, toulén	Protibakterijska, protikvasna aktivnost.	McClintock in Gauthier, 1992
<i>Tetillidae</i>	<i>Sterptomyces sp.</i> DA – 11			Protiglivna aktivnost	Han in sod., 2009

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	Renieron  7-Metoksi-1,6-dimetilisokinolin-5,8-dion  N-Etilen metil keton  derivat renierona	alkaloidi - izokinolinski kinoni	aceton in metanol	Aktiven proti Gram <sup>+</sup> bakterijam <i>Bacillus subtilis</i> in <i>Staphylococcus aureus</i> . Prav tako deluje proti plesni <i>Cladosporium cucumerinum</i> .	Edrada in sod., 1996
	Renierol acetat  Renierol propionat, N-formil-1,2-dihidrorenierol acetat  N-formil-1,2-dihidrorenierol propanoat	alkaloidi - izokinolinski kinoni	ni podatka	Protitumorska dejavnost	Kubo in sod., 1989
	Renieramicin M  Renieramicin G  Renieramicin N	alkaloidi - izokinolinski kinoni	metanol	Indukcija apoptoze preko p53 in inhibicija napredka metastaz pljučnih rakastih celic, proti proliferativna aktivnost na celice raka črevesja (HCT- 116) in pljuč (A549), močna citotoksičnost in protitumorska aktivnost.	Suwanborirux in sod., 2003 Halim in sod., 2011
	Renieramicin O - S	alkaloidi - izokinolinski kinoni	etil acetat	Citotoksičnost, protitumorske spojine.	Amnuoyopol in sod., 2004

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Hacijodini A - G	alkaloidi – 3-alkilpiridinski alkaloidi	metanol	Citotoksični proti celicam mišje levkemije.	Tsukamoto in sod., 2000
	Ciklosteletamin A Ciklosteletamin G Dehidro-ciklosteletamin D	alkaloidi – 3-alkilpiridinski alkaloidi	etanol	Zavirajo človeške levkemične celice.	Oku in sod., 2004
	Haliciklamin B	alkaloidi – 3-alkilpiridinski alkaloidi	metanol	Protimikrobna aktivnost, selektivna citotoksičnost proti tumorskim celicam.	Harrison in sod., 1996
	Ksestomanzamin A, B, X	alkaloidi – □-karbolinski alkaloidi	aceton	Citotoksičnost proti KB celicam (celice raka materničnega vratu).	Kobayashi in sod., 1995
	Manzamin A, Manzamin J, 3,4-Dihidromanzamin A 6-Deoksimanzamin X Manzamin A N-oksid Manzamin J N-oksid 3,4-Dihidromanzamin A N-oksid	alkaloidi – □-karbolinski alkaloidi	aceton in metanol	Insekticidna aktivnost, delujejo proti Gram + bakterijam, citotoksičnost.	Edrada in sod., 1996

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	(+)-3b,3'b-Dimetilksestospongini  (+)-(7S)-Hidroksiksestospongini A	alkaloidi – makrolitični kinolizidini	metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida</i> spp.	Moon in sod., 2002
	(+)-Araguspongini K, L	alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	etanol	Protimalarična in protituberkulozna aktivnost.	Orabi in sod., 2002
	Ksestosin A	alkaloidi – makrolitični kinolizidini	metanol	Vazodilatorna in ihtiotoksična aktivnost.	Iwagawa in sod., 2000
	Motuporamin A- I	alkaloidi	metanol	Zavira celično gibanje, citotoksična aktivnost.	Williams in sod., 2002
	Aaptamin  Izoaaptamin  Demetil(oksi)aaptamin  Dimetilketal aaptamin  Benzo[de][1,6]naptiridin derivat A - derivat D	alkaloidi	metanol	Citotoksičnost proti KB celicam.	Calcul in sod., 2003

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Ampimedin Neoampimedin Deoksiampimedin	alkaloidi	metanol in metanol/ kloroform	Citotoksičnost proti različnim vrstam tumorjev, proti humanim KB tumorjem.	Tasdemir in sod., 2001 Marshall in sod., 2003
	Halenakinon	kinoni	ni podatka	Kardiotonična aktivnost	Roll in sod., 1983
	Halenakinol Halenakinol sulfat	kinoni	ni podatka	Kardiotonične aktivnosti	Kobayashi in sod., 1985
	Ksestokinon	kinoni	metanol– diklorometan	Inhibicija cdc25b fosfataze, Pfnek-1 kinazna inhibicija, protimalarična aktivnost-inhibicija FCB1 <i>F. falciparum</i> .	Cao in sod., 2005 Laurent in sod., 2006
	Adociakinon A - B Sekoadociakinon A -B 14-Metoksiksestokinon 15-Metoksiksestokinon 15-Kloro-14- hidroksiksestokinon 14-Kloro-15- hidroksiksestokinon 41	kinoni	metanol	Citotoksične aktivnosti, poskusi <i>in vitro</i> in <i>in vivo</i> kažejo na protitumorsko aktivnost pri živalih, citotoksičnost proti človeškem tumorju debelega črevesa.	Concepción in sod., 1995

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	3-Ketoadociakinon A - B  13-O-Metilkestokinol sulfat	kinoni	ni podatka	Strupeni v človeških tumorskih celicah debelega črevesa, citotoksična aktivnost.	Cao in sod., 2005
	Ksestosaprol C	kinoni	metanol	Inhibitor virusa HIV.	Kubota in sod., 2008
	Ksestovanin A  Sekoksestovanin A	terpenoidi	metanol	Protiglivično delovanje proti <i>Pythium ultimum</i> .	Northcote in Andersen, 1989
	Klionasterol	steroli, konvencionalni steroli	ni podatka	Inhibitor CP celic.	Cerqueira in sod., 2003
	Ksestokerol A- B	steroli – steroli s ciklopropanskim obročem	metanol	Protimikrobno delovanje proti bakterijam.	Kobayashi in sod., 1993
	Aragusterol A	steroli – steroli s ciklopropanskim obročem	metanol	Močan protitumorski sterol.	Iguchi in sod., 1993
	Aragusterol B  Aragusterol D (Ksestokerol C)	steroli – steroli s ciklopropanskim obročem	metanol	Antiproliferativna aktivnosti proti KB celicam <i>in vitro</i> , Aragusterol D nima tega učinka.	Iguchi in sod., 1993
	Aragusterol C	steroli – steroli s ciklopropanskim obročem	metanol	Protitumorska aktivnost.	Shimura in sod., 1994
	Haplosamat A - B	steroli – polihidroksi steroli	metanol	Inhibicija HIV-1 integraze.	Qureshi in sod., 1999



IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Ksestobergsterol A - B	steroli – polihidroksi steroli	ni podatka	Zavira sproščanje histamina iz podganjih celic, citotoksičnost proti celicam I-1210 mišje levkemije.	Shoji in sod., 1992
	Ibisterol sulfat B -C  (22S)-4b,5b-Epoksi-2b,3a,12b,22-tetrahidroksi-14a-metilholesta-7,9(11)-diene-6,24-dion	steroli – polihidroksi steroli	metanol	Inhibicija HIV-1 integraze.	Lerch in Faulkner, 2001
	5a,8a-Epidioksi-24a-etilholest-6-en-3b-ol	drugi steroli	ni podatka	Inhibitor CP celic.	Cerqueira in sod., 2003
	Ksestosterol (9E,17E)-18-bromooctadeca-9,17-diene-7,15-dinoat  Ksestosterol (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoat	drugi steroli	diklorometan	Inhibicija vezave ligandov na možganske podganje A1 receptorje.	Pham in sod., 1999
	Ksestospongienol A – L	maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	metanol	Protiglivični in protimikrobni učinki, zaviranje HIV-1 integraze, citotoksičnost.	Liu in sod., 2011

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	<p>(9E,13E,17E)-18-Bromooktadeka-9,13,17-trien-5,7,15-trinoična kislina</p> <p>Metil (9E,13E,17E)-18-bromooktadeka-9,13,17-trien-5,7,15-trinoat</p> <p>(7E,13E,17E)-18-Bromooktadeka-7,13,17-trien-5,15-dinoična kislina</p>	<p>maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline</p>	<p>etil acetat</p>	<p>Inhibicija HIV proteaze</p>	<p>Patil in sod., 1992</p>
	<p>Metil (7E,13E,17E)-18-bromooktadeka-7,13,17-trien-5,15-dinoat</p> <p>(9E,17E)-18-Bromooktadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoična kislina</p> <p>(9E,15E)-16-Bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoična kislina</p>	<p>maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline</p>	<p>etil acetat</p>	<p>Inhibicija HIV proteaze</p>	<p>Patil in sod., 1992</p>

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Metil (9E,15E)-16-bromoheksadeka-9,15-dien-5,7-dinoat  (9E,17E)-18-Bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoična kislina  Metil (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoat	maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Metil (9E,17E)-18-bromooktadeka-9,17-dien-5,7-dinoat  (9E,15E)-18-Bromooktadeka-9,15-dien-5,7,17-trinoična kislina	maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Nefeliosin A	maščobne kisline – druge	metanol, etil acetat in voda	Protiglivično delovanje, citotoksičnost, protivirusna aktivnost.	Kobayashi in sod., 1994
	2-okso-2,5-dihidrofuran-5-očetna kislina metil ester  Ksestin A –B	maščobne kisline – druge	diklorometan	Aktivna spojina proti P388 celicam mišje levkemije.	Quiñoà in Crews, 1987

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
	Ksestoaminol A - C	maščobne kisline – druge	metanol	Aktivnosti proti parazitom, mikrobom in reverzni transkriptazi.	Jimenez in Crews, 1990
	Sesterpenoidi	sesterpeni		Antagonisti hiperholesteolemije, inhibicija z farmezoid-x aktiviranega receptorja.	Nam in sod., 2006
	Kestospongini B Kestospongini C	alkaloidi	etanol	Inhibicija izločanja Ca <sup>2+</sup> , ki je inducirano z IP <sub>3</sub> ,  IP <sub>3</sub> inhibitor, relaksacija mišic.	Donia in Hamann, 2003 Larsen in sod., 2005 Jaimovich in sod., 2005 Ta in sod., 2006 De Smet in sod., 1999
	Ksestospongini A	alkaloidi		Zaviranje s kolagenom in adrenalinom inducirane agregacije trombocitov.	Pimentel in sod., 2003
	Dehidrociklostetamin D	amini		Citotoksičnost proti P388, HeLa in 3Y1 pri nizkih koncentracijah.	Rahman in sod., 2008