

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Gašper STRUGAR

**PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST V ETANOLNIH
EKSTRAKTIH IZBRANIH ANTARKTIČNIH
MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ MIKROBIOLOGIJE

Gašper STRUGAR

**PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST V ETANOLNIH EKSTRAKTIH
IZBRANIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija

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

M. SC. THESIS
Master Study Programmes: Field Microbiology

Ljubljana, 2014

Magistrsko delo je zaključek magistrskega študijskega programa druge stopnje Mikrobiologija. Opravljeno je bilo na Oddelku za biologijo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Po sklepu komisije za študij 1. in 2. stopnje je bil dne 09.03. 2012 za mentorja imenovan prof. dr. Tom Turk in za recenzentko prof. dr. Kristina Sepčić.

Mentor: prof. dr. Tom Turk
Recenzentka: prof. dr. Kristina Sepčić

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK
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 SEPČIĆ
 Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Datum zagovora: _____

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

Gašper Strugar

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 604.4:615.33:579.24:593.4 (043)=163.6
KG antarktične morske spužve/Porifera/etanolni izvlečki/sekundarni metaboliti/bioaktivne spojine/protibakterijska učinkovitost/antibiotiki
AV STRUGAR, Gašper, dipl. mikrobiol. (UN)
SA TURK, Tom (mentor)/SEPČIĆ, Kristina (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij mikrobiologije
LI 2014
IN PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST V ETANOLNIH EKSTRAKTIH IZBRANIH ANTARKTIČNIH MORSKIH SPUŽEV
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja Mikrobiologija)
OP XI, 64 str., 17 pregl., 7 sl., 1 pril., 169 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Morske spužve so izjemno bogat vir različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov in so potencialno uporabne v različnih medicinskih in industrijskih panogah. Zaradi majhnega števila raziskav na področju antarktičnih morskih spužev smo se odločili preučiti protibakterijske lastnosti izvlečkov iz antarktičnih spužev proti klinično pomembnim izolatom, komenzalnim bakterijam in laboratorijskim sevom, z metodo difuzijskega antibiograma. Protibakterijske lastnosti smo opazili pri 25 od skupno 33 testiranih izvlečkov, protibakterijska aktivnost pa je bila bolj opazna pri po Gramu pozitivnih bakterijah. Močno protibakterijsko učinkovitost sta kazala izvlečka iz spužve *Latrunculia cf. lendenfeldi* in *Hemigeliaus bidens*, ki sta učinkovala na večino testiranih bakterij, tudi na rezistentne, klinično pomembne izolate.

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Du2
DC UDC 604.4:615.33:579.24:593.4(043)=163.6
CX antarctic marine sponges/Porifera/ethanolic extracts/secondary metabolites/biologically active compounds/antibacterial activity/antibiotics
AU STRUGAR, Gašper
AA TURK, Tom (supervisor)/SEPČIĆ, Kristina (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study in Microbiology
PY 2014
TI ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOL EXTRACTS FROM SELECTED ANTARCTIC MARINE SPONGES
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes: Field Microbiology)
NO XI, 64 p., 17 tab., 7 fig., 1 ann., 169 ref.
LA sl
AL sl/en
AB Marine sponges are an extremely rich source of various compounds that show a number of interesting biological effects and are potentially useful in a variety of medical and industrial domains. Due to the small number of studies on Antarctic marine sponges, we decided to examine the antibacterial properties of extracts from Antarctic sponges against clinically significant isolates, commensal bacteria and laboratory strains, using the diffusion antibiogram method. Antibacterial properties were observed in 25 out of 33 extracts, and the antibacterial activity was more apparent in Gram-positive bacteria. Extracts from sponges *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* and *Hemigeliaus bidens* showed a strong antibacterial efficiency, which affected the majority of the tested bacteria, including resistant, clinically significant isolates.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VIII
KAZALO SLIK.....	IX
KAZALO PRILOG	X
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	XI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA.....	1
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	1
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 ANTIBIOTIKI.....	3
2.1.1 Kaj so antibiotiki	3
2.1.2 Zgodovina odkrivanja antibiotikov	3
2.1.3 Razvrstitev in način delovanja antibiotikov	7
2.1.3.1 β-laktamski antibiotiki	7
2.1.3.2 Tetraciklini	7
2.1.3.3 Aminoglikozidi	8
2.1.3.4 Rifamicini.....	8
2.1.3.5 Makrolidi	8
2.1.3.6 Glikopeptidni in glikolipopeptidni antibiotiki	8
2.1.3.7 Lipopeptidi	8
2.1.3.8 Streptogramini.....	9
2.1.3.9 Fenikoli	9
2.1.4 Odpornost na antibiotike.....	9
2.1.4.1 Mehanizmi odpornosti na antibiotike.....	9
2.1.4.2 Odpornost na antibiotike pri oportunističnih in patogenih bakterijah	9
2.1.4.3 Geni za neobčutljivost na antibiotike v okolju.....	11
2.1.4.4 Neobčutljivost na antibiotike pri bakterijah živali	12

2.1.5 Iskanje novih antibiotikov	13
2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI IZ MORSKIH VIROV	13
2.2.1 Biološko aktivni produkti iz morskih spužev	14
2.2.1.1 Protivnetne lastnosti	15
2.2.1.2 Protitumorske lastnosti.....	15
2.2.1.3 Imunosupresivne lastnosti	15
2.2.1.4 Kardiovaskularni agensi.....	16
2.2.1.5 Nevrosupresivne lastnosti	16
2.2.1.6 Mišični relaksanti	16
2.2.1.7 Protivirusne lastnosti.....	16
2.2.1.8 Protibakterijske in protiglivne lastnosti	16
2.2.1.9 Protimalarične lastnosti.....	17
2.2.1.10 Protivegetativne lastnosti	17
2.2.2 Biološko aktivne spojine iz polarnih sružev	17
3 MATERIAL IN METODE	19
3.1 MATERIAL	19
3.1.1 Organski izvlečki sružev	19
3.1.2 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih	19
3.1.3 Negativna kontrola	20
3.1.4 Priprava gojišč	20
3.1.4.1 Gojišče za prekonočno kulturo.....	20
3.1.4.2 Gojišče za določabnje protibakterijske aktivnosti.....	20
3.2 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOST Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU	21
3.2.1 Antibiotiki	21
3.2.2 Bakterijski sevi	21
4 REZULTATI	23
4.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETANOLNIH IZVLEČKOV NA PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE	23
4.1.1 Cone inhibicije pri po Gramu negativnih bakterijah	27
4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETANOLNIH IZVLEČKOV NA PO GRAMU POZITIVNE BAKTERIJE	28

4.2.1 Cone inhibicije pri po Gramu pozitivnih bakterijah	31
4.3 POZITIVNA KONTROLA.....	38
4.4 NEGATIVNA KONTROLA	39
5 RAZPRAVA	41
5.1 PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE	41
5.2 PO GRAMU POZITIVNE BAKTERIJE.....	43
5.3 EKOLOŠKI POMEN IZVLEČKOV	46
6 SKLEPI.....	47
7 POVZETEK	48
8 VIRI.....	49

ZAHVALA

PRILOGE

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Teža suhe snovi/koncentracija vzorcev (Kosmina, 2012)	19
Preglednica 2: Koncentracije antibiotikov	21
Preglednica 3: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu negativnim bakterijam	24
Preglednica 4: Cone inhibicije v milimetrih pri laboratorijskih sevih <i>E. coli</i> EXB-V1, <i>E. coli</i> HB101 in kliničnem izolatu ESBL- <i>E. coli</i> 30 (CTX-M-2)	27
Preglednica 5: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnih izolatih ESBL- <i>E. coli</i> 192 (CTX-M-9; ST131), ESBL- <i>E. coli</i> 206 (CTX-M-1; ST131) in <i>P. aeruginosa</i> 06131	27
Preglednica 6: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu <i>Acinetobacter</i> 1C	27
Preglednica 7: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu pozitivnim bakterijam.....	29
Preglednica 8: Cone inhibicije v milimetrih pri laboratorijskem sevu <i>S. epidermidis</i> EXB-V55 in komenzalnem kožnem izolatu <i>S. aureus</i> 10F	33
Preglednica 9: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu <i>S. aureus</i> (MRSA) S-943	34
Preglednica 10: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu <i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-053	34
Preglednica 11: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu <i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-043	34
Preglednica 12: Cone inhibicije v milimetrih pri živilskem izolatu <i>L. monocytogenes</i>	35
Preglednica 13: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu <i>Macrococcus</i> 1F	35
Preglednica 14: Cone inhibicije (mm) pri laboratorijskem sevu <i>B. subtilis</i> EXB-V68.....	36
Preglednica 15: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu <i>Micrococcus</i> 2F	37
Preglednica 16: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotikov proti testiranim bakterijam	38
Preglednica 17: Vpliv etanola na rast testiranih bakterijskih sevov.....	40

KAZALO SLIK

Slika 1: Izolat bakterije <i>Listeria monocytogenes</i>	22
Slika 2: Neobčutljivost bakterije <i>P. aeruginosa</i> EXB-V28 na etanolne izvlečke	23
Slika 3: Porast cone inhibicije ob redčenju izvlečka	32
Slika 4: <i>Micrococcus</i> na plošči z izvlečki in tvorba pigmenta	33
Slika 5: Cona zmanjšane rasti pri bakteriji <i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-053.....	37
Slika 6: Pozitivna kontrola z antibiotiki pri bakteriji <i>Listeria monocytogenes</i>	39
Slika 7: Negativna kontrola pri bakteriji <i>Enterobacter</i> sp.....	40

KAZALO PRILOG

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih sružev (Kosmina, 2012)

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

Ara-A	1-β-D-arabinofuranozil adenin
Ara-C	1-β-D-arabinofuranozil citozin
DNA	Deoksiribonukleinska kislina
ESBL	β-laktamaze razširjenega spektra
FDA	ameriški vladni urad za zdravila in prehrano (ang. Food and Drug Administration)
HIV	Humani imunodeficitni virus
IP ₃	Inozitol trifosfat
MIK	Minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MRSP	Proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>
NDM-1	New Delhi metalo-β-laktamaza
PKC	Proteinska kinaza C
RNA	Ribonukleinska kislina
tRNA	Prenašalna RNA
VISA	<i>S. aureus</i> z zmanjšano občutljivostjo proti vankomicinu
VRSA	Proti vankomicinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>

1 UVOD

Svet se sooča z vedno pogostešim pojavljanjem na antibiotična sredstva odpornih bakterijskih sevov, zato je iskanje novih protimikrobnih spojin dobrodošel vir novih načinov obrambe. Spojine s protibakterijskimi učinkovinami so izolirali iz rastlin, gliv in bakterij, vendar je v večni bitki s pojavljajočo se neobčutljivostjo na ta sredstva človek v iskanju novih antibiotikov prešel tudi pod morsko gladino. Tako so do leta 2002 iz morskih organizmov izolirali okrog 10.000 biološko aktivnih spojin. Med najbolj raziskanimi skupinami so bili morski mikroorganizmi, ožigalkarji (Cnidaria), rebrače (Ctenophora) in sružve (Porifera), iz katerih so izolirali kar 37 % do zdaj znanih biološko aktivnih spojin.

Morske sružve so izjemno bogat vir različnih spojin, ki kažejo vrsto zanimivih bioloških učinkov (citotoksičnost, protibakterijsko, protivirusno in imunomodulatorno aktivnost, inhibicijo različnih encimov, hemaglutinacijo, protivegetativne učinke...). Sružve uporabljajo te snovi kot kemijsko zaščito pred plenilci, za preprečevanje naseljevanja drugih organizmov na njihovo površino, ali za teritorialno kompeticijo. Nekatere od teh snovi lahko najdejo tudi potencialno uporabnost v različnih medicinskih (Faulkner, 2000) in industrijskih panogah (Fusetani, 2004).

Na protibakterijske lastnosti izolatov iz antarktičnih sružev smo se osredotočili zaradi majhnega števila raziskav protibakterijskih aktivnosti spojin iz polarnih sružev in na temelju predhodnih raziskav protibakterijskih lastnosti istih izvlečkov na morske bakterije in tiste iz ledenikov. Protibakterijsko učinkovitost smo preverjali z metodo difuzijskega antibiograma, pri katerem smo uporabili klinično pomembne izolate, komenzalne bakterije in laboratorijske seve.

1.1 NAMEN DELA

Cilj eksperimentalnega dela bo testirati protibakterijsko aktivnost etanolnih izvlečkov izbranih liofiliziranih antarktičnih morskih sružev. Glede na to, da je večina sružev že sistematsko določenih, bomo pridobljene rezultate lažje primerjali z že objavljenimi podatki s področja kemije naravnih substanc iz morskih sružev. V primeru, da se bo v določenih ekstraktih pokazala učinkovita in še neopisana vrsta biološke aktivnosti, bomo v prihodnosti iz njih poskušali izolirati čisto aktivno učinkovino.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Ob začetku eksperimentalnega dela smo postavili naslednje hipoteze:

- Ekstrakti delujejo protibakterijsko na komenzalne, laboratorijske in medicinsko pomembne seve bakterij.
- Protibakterijska učinkovitost ekstraktov se razlikuje med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami.
- Pričakujemo da bomo protibakterijsko aktivnost izvlečkov opazili pri istih rodovih sružev, ki se pojavljajo v polarnih, tropskih in zmernih območjih.

- Protimikrobna aktivnost ekstraktov iz antarktičnih vrst sružev ima predvsem ekološki pomen.

2 PREGLED OBJAV

2.1 ANTIBIOTIKI

2.1.1 Kaj so antibiotiki

Izraz *antibiotik*, zdravilo, ki uničuje ali zavira rast mikroorganizmov, je v sodobnem pomenu besede prvi uporabil Selman A. Waksman leta 1942 in ga definiral kot "zaviralec rasti ali metabolne aktivnosti bakterij in drugih mikroorganizmov preko kemijskih spojin mikrobnega izvora". Izraz izhaja iz besede *antibioza*, s katerim je Paul Vuillemin opredelil odnos med živimi bitji, kjer eno živo bitje za svoje preživetje ubije drugo (Waksman, 1947). Antibiotiki so torej naravne snovi, ki ovirajo razmnoževanje bakterij in so proizvod živih celic, navadno drugih bakterij in gliv. Poznamo pa tudi protimikrobne kemoterapevtike, ki so sintetične oziroma umetne učinkovine, pridobljene s pomočjo sinteze ali kemijske modifikacije naravne učinkovine (Madigan in Martinko, 2006). Pomen besede *antibiotik* se je v zadnjem času razširil in obsega tako naravne kakor umetne spojine.

2.1.2 Zgodovina odkrivanja antibiotikov

Začetki uporabe antimikrobnih kemoterapevtikov segajo v začetek 20. stoletja. Temelje sta postavila Koch in Pasteur s teorijo mikrobnega nastanka bolezni, pripomogli pa so tudi histologi, ki so dokazali, da je mogoče tkiva in patogene selektivno obarvati. To spoznanje pa je omogočilo Paulu Ehrlichu, da je postavil koncept kemoterapije, ki selektivno uničuje patogene. Za osnovo je uporabil učinkovino proti spalni bolezni z imenom atoksil, ki pa je imela hude stranske učinke. S kemijsko modifikacijo je naposled prišel do organo-arzenske izvedenke osnovne učinkovine s selektivno toksičnostjo za patogene, analoga 606, kasneje imenovanega *Salvarsan*, ki je bil zelo učinkovit pri zdravljenju sifilisa. Od odkritja v letu 1909 do klinične uporabe je minilo zgolj eno leto (White, 2012).

Leta 1932 so pod okriljem oddelka Bayer razvili učinkovino KI-730 oziroma *Prontozil*, predhodnika sulfonamidov. Kljub neučinkovitosti *in vitro* so ga testirali tudi *in vivo*, kjer se je izkazal za zelo učinkovitega. Uradno so ga oznanili leta 1935, kar je povzročilo iskanje njegovih analogov in zelo povečalo število sulfonamidov, ki so bili učinkoviti tako *in vivo* kot *in vitro* (White, 2012).

Prvi naravni antibiotik, ki ga je odkril človek, je bil penicilin, proizvod plesni *Penicillium rubens* (Houbraken in sod., 2011). Naključno ga je leta 1929 odkril britanski znanstvenik Alexander Fleming, ko je med pregledovanjem petrijevih plošč z bakterijo rodu *Staphylococcus* opazil, da je nekaj plošč kontaminiranih s plesnijo. Pri podrobнем ogledu je opazil, da so kolonije streptokokov v bližini plesni spremenile morfologijo ter lizirale (Fleming, 1929). Penicilin je bil zaradi težavne proizvodnje na voljo za uporabo v medicini šele leta 1942, 1945 pa se je začela množična proizvodnja penicilina, prav tako pa so določili njegovo strukturo.

Leta 1939 Rene Dubos z namernim iskanjem protimikrobnih snovi pri zemeljskih mikrobih odkrije tirotricin, za katerega se je izkazalo, da je v bistvu mešanica dveh snovi, tirocidina in gramicidina. Obe spojini sta za splošno uporabo preveč toksični, gramicidin pa se uporablja za topično zdravljenje površinskih okužb.

Pomembno delo pri odkrivanju novih antibiotikov je prispeval tudi Selman Waksman, ki je s sistematičnim pregledom bakterij, gliv in aktinomicet v prsti dokazal, da so slednje najboljše proizvajalke antimikrobnih snovi. Odkril je tudi aktinomicin in streptotricin, ki sta prav tako preveč toksična za klinično uporabo.

Leta 1943 je Albert Schatz v Waksmanovem laboratoriju odkril streptomycin, ki se je izkazal za zelo učinkovitega proti po Gramu negativnim bakterijam in *Mycobacterium tuberculosis*. Prva zdravljenja so z njim opravili tri leta kasneje, žal pa se je streptomycin izkazal za ototoksičnega.

Klortetraciklin so odkrili leta 1945. Proizvaja ga *Streptomyces aureofaciens*. Odkrili so ga, ko so iskali varnejšo alternativo streptomycinu za zdravljenje tuberkuloze, a se je izkazal za neučinkovitega. Kmalu so odkrili še druge tetracikline, kot je oksitetraciklin, ki pa jih proizvajajo druge vrste aktinomicet. Streptomicete so se tako izkazale za najboljše producentke protimikrobnih snovi.

Kloramfenikol so odkrili pri vrsti *Streptomyces venezuelae* leta 1947 in je bil prvi antibiotik širokega spektra za oralno ali sistemsko rabo. Prve klinične teste so opravili do leta 1947, dve leti kasneje pa so začeli z masovno proizvodnjo s kemijsko sintezo.

Temu je sledila skupina neomicinov, ki jih je leta 1949 odkril Waksman, vendar je v klinično uporabo prišel le neomycin B, ki so ga zaradi sistemske toksičnosti uporabljali le topično.

Kanamicin, ki spada v skupino aminoglikozidov, je odkril Hamao Umezawa leta 1957. Gentamicin, ime za zapleteno mešanico najmanj petih aktivnih komponent, je bil odkrit nekaj let kasneje med pregledovanjem številnih kultur aktinomicet iz rodu *Micromonospora*.

Eritromycin je leta 1952, kot edino snov z zadostno protimikrobnou aktivnostjo odkril James McGuire s sodelavci v aktinobakteriji *Streptomyces erythreus*, ki so jo izolirali iz vzorca prsti. Štiri leta kasneje so določili tudi njegovo strukturo. Uporaben je bil predvsem v boju s proti penicilinu rezistentnimi stafilokoki in je bil ključen pri razvoju novejših generacij antibiotikov kot so azalidi in ketolidi.

Linkomicin spada v družino linkozamidov, proizvaja ga *S. lincolnensis*, odkrili pa so ga pri podjetju Upjohn (Pfizer) leta 1962, kmalu pa so s kemijsko sintezo razvili bolj učinkovite analoge, kot je na primer klindamicin.

Vankomicin so osamili iz fermentacijske tekočine vrste *Amycolatopsis orientalis* leta 1956. Uporaben je bil predvsem zaradi učinka na po Gramu pozitivne bakterije, baktericidnosti,

delovanja proti penicilin-, streptomicin- in eritromicin-rezistentnim stafilokokom ter zaradi majhne možnosti razvoja odpornosti. Z razvojem meticilina leta 1960 se je uporaba vankomicina zelo zmanjšala, zopet pa se je povečala s pojavom proti meticilinu rezistentne bakterije *Staphylococcus aureus* v 70. letih 20. stoletja.

Rifamicin je kot kompleks podobnih antibiotikov odkril Piero Sensi leta 1959 v vrsti *Amycolopsis mediterranei*. Prva določena struktturna komponenta kompleksa je bil rifamicin B, ki je sicer neaktivен, vendar ob razgradnji preko rifamicina O nastane rifamicin S, ki ima močno protibakterijsko aktivnost. Rifamicin S je bil tudi prekurzor za sintezo rifampicina, ki je pomemben pri zdravljenju tuberkuloze.

Novobiocin je leta 1955 skoraj hkrati odkrilo več različnih skupin. Gre za aktivno snov, ki jo proizvaja *Streptomyces sphaeroides*.

Spektinomicin je bil prvič izoliran leta 1961 iz vrste *Streptomyces spectabilis*, spada med aminociklitole in se uporablja za zdravljenje lažjih primerov gonoreje.

Lipopeptidne snove z antibiotičnim učinkom so odkrili leta 1987 v vrsti *Streptomyces roseosporus*. Mešanico lipopeptidov so inkubirali s kulturo *Actinoplanes utahensis*, ki je postopoma odcepila acilne repe molekule, dokler ni ostal le skupni jedrni peptid, ki je bil ključen za kemijsko sintezo analognih snovi z dodajanjem različnih stranskih verig. Na trg pa je prišel šele leta 2003 pod imenom Daptomicin.

Streptogramini, ki jih proizvajajo aktinomicete, so posebni zaradi sinergističnega učinka, ki ga imajo struktурno različne molekule posameznih učinkovin ena na drugo. Prvi predstavnik, pristinamicin, je bil odkrit v petdesetih letih 19. stoletja, opisan pa šele 1968. Zaradi slabe topnosti ni primeren za paraenteralno uporabo, zato je po polsintetski poti sledil razvoj analogov komponent pristinamicina, kot sta dalfopristin in kuinupristin.

Giuseppe Bontzu je leta 1945 iz morske vode izoliral glivo *Cephalosporium acremonium*, ki je kazala protibakterijski učinek širokega spektra. Tri leta kasneje je objavil uspešne raziskave z grobim izvlečkom te glive, ker pa ni bilo sredstev za določitev aktivne spojine, je delo prevzela oksfordska univerza. *Cephalosporium acremonium* proizvaja več učinkovin, med prvimi izoliranimi je bil tako cefalosporin P, nato cefalosporin N, ki so ga preimenovali v penicilin N, ko je bila določena njegova struktura. Cefalosporin C so prvič odkrili pri študiji razgradnje penicilina N kot nečistočo, imel je šibko protibakterijsko delovanje, po strukturi je soroden penicilinom vendar bolj odporen na β-laktamaze. postal je osnova za polsintetsko proizvodnjo cefalosporinov.

Fucidinsko kislino so po naključju odkrili v Leo Pharmaceuticals pri iskanju 6-aminopenicilanske kisline. Gliva *Fusarium coccineum* se je izkazala za učinkovito proti stafilokokom, rahlo kisla učinkovina pa ima nenavadno, steroidom podobno strukturo.

Bacitracin so odkrili leta 1945 pri bakterijskih izolatih iz zagnojenih ran. Proizvaja ga sev *Bacillus licheniformis*. Učinkuje le na po Gramu pozitivne bakterije, zaradi

nefrotoksičnosti pa je omejen na topikalno ter intramuskularno uporabo pri hudih stafilokoknih okužbah.

Polimiksini A do E so sorodna skupina protimikrobnih učinkovin, ki jih proizvaja *Bacillus polymyxa*. Prvič so jih odkrili leta 1947 pri iskanju antibiotikov ki učinkujejo samo na po Gramu negativne bakterije. Zaradi kemijske narave polimiksinov – ciklična peptidna struktura z lipofilnim repom – se ti selektivno vežejo na lipopolisaharid v zunanjih membranah po Gramu negativnih bakterij, hidrofobni repi molekule pa poškodujejo celično membrano.

p-amino salicilno kislino so prvič sintetizirali leta 1943 z namenom zdravljenja tuberkuloze. Izkazala se je za izjemno uspešno alternativo streptomycinu.

Izoniazid so prvič sintetizirali leta 1912 vendar so njegovo učinkovitost proti bakteriji *Mycobacterium tuberculosis* odkrili šele leta 1951 s proučevanjem predhodnih del izumitelja prontozila – Dogmark-a. Izoniazid je zelo učinkovit, brez hujših stranskih učinkov in lahko ga je sintetizirati.

Pirazinamid je odkril Kushner leta 1952 pri sintezi analogov nikotinamida z namenom zdravljenja tuberkuloze. Pirazinamid se v *M. tuberculosis* pretvori v pirazinojsko kislino, ki inhibira biosintezo maščobnih kislin.

Etambutol so odkrili leta 1961 v Lederle Laboratories kot produkt raziskav analogov nikotinamida.

Nitrofurane so množično sintetizirali v štiridesetih letih, v petdesetih letih prejšnjega stoletja pa so prvič uporabili nitrofurantoin. Nitrofurantoin se je uporabljal za zdravljenje okužbe sečil, saj je prekurzor za aktivno snov, saj bakterijski encimi reducirajo nitro skupino, reducirana spojina pa nato inhibira ali spremeni bakterijske ribosomske proteine in druge makromolekule, ki so potrebne za sintezo proteinov, RNA in DNA, celične stene in sinteze ATP.

Metronidazol je analog, ki je nastal na podlagi odkritja azomicina. Ta je bil po strukturi podoben aminitrozolu, s čimer so zdravili trihomonazio. Pomemben je za zdravljenje okužb s trihomonasom, ugotovili pa so tudi, da zdravi ulcerativni gingivitis, predvsem pa deluje na anaerobne bakterije kot je *Bacteroides fragilis*.

Nalidiksično kislino so odkrili leta 1946 kot stranski produkt kemijske sinteze klorokina, njene protimikrobne lastnosti pa so odkrili kasneje, ko je bila učinkovina vključena v pregled protimikrobnih lastnosti proti kokcidiozi, uradno odkrita pa je bila šele leta 1962. Učinkovita je proti po Gramu negativnim bakterijam.

Flumekin so odkrili z nadaljevanjem raziskav na kinolonih (nalidiksična kislina) leta 1977 in predstavlja prvi fluorokinolon. V nasprotju z nalidiksično kislino učinkuje nekoliko tudi proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Učinkovitost so s kemijskimi manipulacijami še

povečali, zmanjšali frekvenco rezistence in izboljšali farmakokinetiko. Tako je nastalo več generacij široko spektralnih antibiotikov za oralno in paraenteralno rabo.

Linezolid predstavlja nov razred sintetičnih antibiotikov in ima svoj izvor v 70. letih. Izmed skupine oksazolidinonov je kazal učinkovito aktivnost *in vitro*, kar pa se je kasneje izkazalo za neutemeljeno. Testiranje *in vivo* je potrdilo protimikrobno učinkovitost, odkrili pa so tudi odsotnost naravne odpornosti na oksazolidinone. Nadaljnje delo je vodilo k odkritju analogov, ki so bili *in vitro* in *in vivo* učinkoviti proti stafilokokom in MRSA, streptokokom in *Bacteroides fragilis*. Zaradi ugotovljene hepatotoksičnosti je bil potreben razvoj izboljšanih oksazolidinonov, ki so bili za klinično testiranje na voljo leta 1995, 2002 pa je bil linezolid odobren za klinično rabo pri ljudeh (White, 2012).

2.1.3 Razvrstitev in način delovanja antibiotikov

Antibiotike lahko glede na kemično strukturo razvrstimo v 19 različnih skupin. To so β -laktamski antibiotiki, aminoglikozidi, tetraciklini, kinoloni, linkozamidi, derivati azolov, nitroamidazoli, glikopeptidni antibiotiki, makrolidi, polieni, glicilciklini, ehinokandini, streptogramidi, oksazolidinoni, ketolidi, lipopeptidi, epoksiidi, polimiksini in anzamicini (Frank in Taconelli, 2012). Vendar pa naravne antibiotike v pravem pomenu besede, torej snovi, ki jih proizvajajo bakterije in glice, razdelimo le v 9 različnih skupin: β -laktamski antibiotiki, tetraciklini, aminoglikozidi, rifamicini, makrolidi, glikopeptidni in glikolipopeptidni antibiotiki, lipopeptidni antibiotiki, streptogramini in fenikoli (Kohanski in sod., 2010). Glede na delovanje jih razvrstimo na baktericidne in bakteriostatične, glede na mehanizme delovanja pa na take ki preprečujejo sintezo celične stene, inhibirajo ali drugače modulirajo delovanje znotrajceličnih beljakovin ali nukleinskih kislin, inhibirajo metabolne poti ali ovirajo dejavnosti citoplazemske membrane.

2.1.3.1 β -laktamski antibiotiki

β -laktamski antibiotiki inhibirajo sintezo bakterijske celične stene tako, da se vežejo na encime, ki so ključni za sintezo peptidoglikanskega sloja celične stene, zato tovrstne encime imenujemo tudi penicilin vezavni proteini. Inhibicija encimov nastopi zaradi strukturne podobnosti β -laktamov s terminalnim delom peptidoglikana, acil D-alanil-D-alaninom. Pomembna reakcija, ki jo posredujejo ti encimi je navzkrižno povezovanje peptidoglikana, zaradi česar je bakterijska celična stena toga. β -laktami tako nepovratno inhibirajo encim, preprečijo navzkrižno povezovanje peptidoglikana in sintezo bakterijske celične stene. Njihovo delovanje je baktericidno (Kotra in Mobashery, 1998).

2.1.3.2 Tetraciklini

Tetraciklini inhibirajo sintezo bakterijskih beljakovin z vezavo na 30S podenoto bakterijskih ribosomov. Tako preprečijo povezavo aminoacil tRNA z bakterijskim ribosomom. Vezava tetraciklinov na 30S podenoto bakterijskega ribosoma je reverzibilna, zato je njihovo delovanje bakteriostatično (Chopra in Roberts, 2001).

2.1.3.3 Aminoglikozidi

Ireverzibilno se vežejo na filogenetsko močno ohranjeno mesto A na 16S ribosomski RNA, ki je komponenta 30S podenote bakterijskega ribosoma. Interakcije aminoglikozidov s 16S RNA inducirajo spremembe v konformaciji kompleksa kodona mRNA s sorodno aminoacil tRNA na ribosому, zato pride do vgraditve napačne aminokisline in posledično nefunkcionalnega proteina. Učinkujejo lahko baktericidno ali bakteriostatično (Armstrong in sod., 2012).

2.1.3.4 Rifamicini

Rifamicini preprečijo od DNA odvisno prepisovanje in s tem nastanek RNA tako, da se med prepisovanjem vežejo na podenoto β RNA polimeraze, vendar le toliko časa dokler nista dodana dva nukleotida. Njihov učinek je baktericiden (Kohanski in sod., 2010).

2.1.3.5 Makrolidi

Vežejo se na 23S rRNA ribosomske podenote 50S in zaprejo izhodni kanal za peptide, ki ga tvori kompleks ribosomov, s čimer spodbudijo ločitev peptidil tRNA od ribosoma med translacijo. Poleg tega učinka pa makrolidi preprečijo tudi sestavljanje prekurzorjev za 50S podenoto, ki se nato nukleolitično uničijo (Kohanski in sod., 2010; Xu in sod., 2012) Njihovo delovanje je baktericidno in bakteriostatično.

2.1.3.6 Glikopeptidni in glikolipopeptidni antibiotiki

V to skupino spadata vankomicin in teikoplanin, njuno delovanje pa je baktericidno.

Vankomicin se substratno specifično veže na karboksi-terminalni del acil-D-alanil-D-alaninskega ostanka pentapeptidne molekule lipida II in sterično ovira transglukozilazo pri dodajanju disaharidno pentapeptidnega monomera v nastajajoči peptidoglikanski sloj (Kohanski in sod., 2010). Polnsintetični derivati vankomicina pa vplivajo tudi na integriteto in polarnost membrane, nastanejo pa lahko tudi spremembe v ultrastrukturi, ki se odražajo kot nenormalen, asimetričen začetek delitve, spremenjena oblika in debelina septumov. (Arhin in sod., 2012).

2.1.3.7 Lipopeptidi

Lipopeptidi se z acilnimi repi vežejo na celično membrano v odvisnosti od Ca^{2+} , kjer dimerizirajo in tvorijo pore, zaradi česar pride do depolarizacije membrane in uhajanja kalijevih ionov, posledica je liza celice. Delujejo na po Gramu pozitivne vrste, njihov učinek je baktericiden. Lipopeptidi se z acilnimi repi vežejo na celično membrano v odvisnosti od Ca^{2+} , kjer dimerizirajo in tvorijo pore, zaradi česar pride do depolarizacije membrane in uhajanja kalijevih ionov (Steenbergen in sod., 2005; White, 2012)

Gramicidin, ki ga sicer uvrščamo med peptidne antibiotike, ima podoben način protibakterijskega delovanja (Hartmann in sod., 2010)

2.1.3.8 Streptogramini

Streptogramine delimo na dve skupini, A in B. Učinek posamezne skupine je bakteriostatičen, če pa jih uporabimo skupaj, pride so sinergističnih učinkov med temo dvema molekulama in delujeta baktericidno.

Streptogramin A z vezavo na peptidil transferazno domeno 50S podenote bakterijskega ribosoma prepreči zgodnje podaljševanje peptidne verige in povzroči strukturno spremembo, kar omogoči močnejšo vezavo streptomicina B in nastanek zelo stabilnega kompleksa. Streptogramin B prepreči podaljševanje peptidne verige in sprosti nedokončan peptid z ribosomskega kompleksa (Vannuffel in Cocito, 1996).

2.1.3.9 Fenikoli

Značilen predstavnik je kloramfenikol. Imajo bakteriostatično delovanje. Vrstno specifično pa so lahko baktericidni, na primer za vrste *Streptococcus pneumoniae* in *Neisseria meningitidis* (Kohanski in sod., 2010) Delujejo na principu preprečevanja sinteze bakterijskih proteinov, tako da se vežejo na 23S rRNA, s čimer preprečijo nastanek peptidnih vezi in podaljševanje verige z inhibicijo peptidil transferazne aktivnosti na ribosomski podenoti 50S.

2.1.4 Odpornost na antibiotike

2.1.4.1 Mehанизmi odpornosti na antibiotike

Skupaj z odkritjem in obsežno uporabo antibiotikov na različnih področjih človekovega delovanja, so se začeli pojavljati tudi na antibiotike neobčutljivi mikroorganizmi. Neobčutljivost na antibiotike je lahko posledica inaktivacije ali spremembe antibiotika, spremembe metabolne poti, tarčnega mesta antibiotika ali zmanjšanega vnosa antibiotika (Hawkey, 2000).

Poznamo dva načina nastanka odpornosti proti antibiotikom. To so mutacije, ki so lahko spontane ali inducirane, ter prevzem genov rezistence preko transdukcije, transformacije ali konjugacije s horizontalnim genskim prenosom, bakterije pa so proti antibiotikom lahko tudi naravno odporne zaradi specifične zgradbe in fiziologije. Pri horizontalnem širjenju odpornosti je pomemben zlasti R-plazmid, ki nosi gene za neobčutljivost na antibiotike (Madigan in Martinko, 2006; Tenover, 2006).

2.1.4.2 Odpornost na antibiotike pri oportunističnih in patogenih bakterijah

Bakterije lahko pod selektivnim pritiskom zaradi uporabe antibiotikov v medicini, živinoreji in drugih področjih človekovega delovanja, postanejo nanje neobčutljive oziroma odporne. Tako se je neobčutljivost na penicilin zaradi prisotnosti penicilaze pri

Staphylococcus aureus pojavila že 1942, kmalu po začetku njegove klinične uporabe (Bondi in Dietz, 1945; Deurenberg in sod., 2007), prve na meticilin neobčutljive vrste *S. aureus* (MRSA - methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) pa so odkrili leta 1961 v Veliki Britaniji, le slabo leto po odkritju meticilina. *S. aureus* z zmanjšano občutljivostjo proti vankomicinu (VISA – vancomycin intermediate *S. aureus*) so prvič odkrili leta 1997 na Japonskem (Saga in Yamaguchi, 2009), odtlej pa postopoma po vsem svetu. Poleg vankomicina je bil proti MRSA in VISA učinkovit tudi linezolid, vendar se je odpornost nanj pojavila že leta 2001 (Tsiodras in sod., 2001), leto pred odobreno uporabo. Leta 2002 so prvič izolirali sev *S. aureus*, ki je bil odporen proti vankomicinu (VRSA – vancomycin resistant *S. aureus*) (Bozdogan in sod., 2003).

Na penicilin odporen sev *Streptococcus pneumoniae* so prvič odkrili leta 1967 v Južni Afriki, deset let kasneje pa so odkrili tudi prvi multirezistentni sev, odporen na penicilin, tetraciklin, eritromicin, klindamicin, trimetoprim-sulfametoksazol, in kloramfenikol (Appelbaum, 1992).

V devetdesetih letih se pojavijo tudi na vankomicin odporni enterokoki (VRE – vancomycin-resistant *Enterococcus*), ki so predvsem odgovorni za bolnišnične okužbe, ter po Gramu negativni bacili z β-laktamazami razširjenega spektra (ESBL). Ti bolnišnični patogeni v razvitih državah predstavljajo glavni problem odpornosti na antibiotike (Murray, 1997). Pojavila se je tudi neobčutljivost na makrolide pri bakteriji *Streptococcus pyogenes*, vendar sevi za zdaj še vedno ostajajo občutljivi na penicilin (Albrich in sod., 2004).

Bakterija *Pseudomonas aeruginosa* je intrinzično neobčutljiva na veliko strukturno nesorodnih antibiotikov (Mesaros in sod., 2007) zaradi nizke permeabilnosti zunanje membrane (Livermore, 1984), nenehne ekspresije različnih efluksnih črpalk s široko substratno specifičnostjo (Livermore, 2001) in naravno prisotne kromosomske AmpC β-laktamaze (Nordmann in Guibert, 1998). Nekateri sevi so postali odporni tudi na kinolone, trimetoprim, tetraciklin in kloramfenikol (Pechere in Köhler, 1999). *P. aeruginosa* pa lahko nosi več zapisov za različne mehanizme neobčutljivosti na β-laktamske antibiotike hkrati. Zаписи за β-laktamaze z razširjenim spektrom se lahko nahajajo tudi na plazmidih ali integronih (Strateva in Yordanov, 2009).

Clostridium difficile je bolnišnični patogen, ki povzroča diarejo. V ZDA je bil med letoma 1989 in 1992 zabeležen pojav seva, ki je bil neobčutljiv na klindamicin (Johnson in sod., 1999), leta 2005 pa seva, neobčutljivega na fluorokinolone (Loo in sod., 2005). Izkazalo se je, da se je sev *C. difficile* 027/BI/NAP1 prvič pojavil že leta 2001 v Pensilvaniji. Iz njega izhajata dve liniji, FQR1 in FQR2, ki sta bili odgovorni za epidemijo *C. difficile* v zadnjem desetletju (He in sod., 2012).

Escherichia coli je po naravi neobčutljiva na antibiotike, ki delujejo na po Gramu pozitivne bakterije. Ker pa je vsespolno prisotna v okolju in predstavlja tudi del mikroflore človeškega prebavnega trakta in drugih živali, je pojav na antibiotike neobčutljivih sevov nekaj pričakovanega. Največ pozornosti je v zadnjem času deležen pandemični sekvenčni

tip ST131, ki so ga prvič odkrili leta 2008 (Nicolas-Chanoine in sod., 2008; Coque in sod., 2008) in nosi zapis za β -laktamaze razširjenega spektra CTX-M. Sekvenčni tip ST131 je poleg β -laktamov najpogosteje neobčutljiv tudi na fluorokinolone in trimetoprim/sulfametoksazol, pojavlja pa se tudi odpornost na ciprofloksacin in aminoglikozide (Rogers in sod., 2011).

Klebsiella pneumoniae je prav tako bolnišnični patogen, ki prizadene predvsem ljudi z oslabljenim imunskim sistemom. Leta 1983 so v Nemčiji odkrili prvo β -laktamazo razširjenega spektra, ki se je lahko s horizontalnim prenosom širila na bakterijo *E. coli* in ki je bila sposobna inaktivirati cefalosporine širokega spektra (Knothe in sod., 1983). Najnovejša različica β -laktamaz pa so karbapenemaze, ki inaktivirajo karbapeneme, ki so bili uporabni predvsem v boju proti bakterijam z β -laktamazo razširjenega spektra. Najpogostejša karbapenemaza je KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), ki so jo prvič izolirali leta 1996 v Severni Karolini (Yigit in sod., 2001). Leta 2009 so odkrili novo različico karbapenemaz, to je NDM-1 (New Delhi metalo- β -laktamaza), ki so jo prvič osamili iz Švedskega bolnika z Indijskim poreklom (Yong in sod., 2009), zdaj pa je najpogostejša karbapenemaza v Združenem Kraljestvu (Kumarasamy in sod., 2010).

Med patogeni domačega okolja od šestdesetih let prejšnjega stoletja poznamo odporne bakterije iz rodu *Shigella*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* in bakterije iz rodu *Moraxella*. V domačem okolju je glaven problem odpornost na antibiotike pri črevesnih patogenih, v razvitih in razvijajočih se državah pa sta glavna problema odpornost na antibiotike pri pnevmokokih in bakterijah iz rodu *Mycobacteria* (Murray, 1997).

2.1.4.3 Geni za neobčutljivost na antibiotike v okolju

Pojav rezistence na antibiotike pravzaprav ni nič nenavadnega, saj so geni, ki nosijo zapis za rezistenco na določen antibiotik, prisotni v naravnem okolju, kjer so nastali v evoluciji in so posledica stalnega prilagajanja na določeno spreminjačo se življenjsko okolje. Takšen primer so nespecifične efluksne črpalke, ki poleg topil odstranjujejo tudi številne protimikrobne spojine (Kadavy in sod., 2000).

Neobčutljivost na antibiotike ni omejena zgolj na patogene mikroorganizme (Benveniste in Davies, 1973; Cundliffe, 1989; Marshal in sod., 1998), temveč tudi na oportunistične patogene, kot je *Pseudomonas aeruginosa* in okoljske mikroorganizme, ki protimikrobne snovi proizvajajo. Ti so namreč v večini primerov celo bolj neobčutljivi, kot povzročitelji bolezni in predstavljajo pomemben rezervoar genov za neobčutljivost na antibiotike. V tem pogledu so zlasti pomembne bakterije iz prsti. V raziskavi iz leta 2006, ki je vključevala 480 različnih sevov in 21 različni antibiotikov, od starejših do novejših, so D'Costa in sodelavci (2006) dokazali pojav odpornosti na vse antibiotike neodvisno od načina delovanja, vsi sevi pa so bili tudi večkrat odporni.

Geni za odpornost proti antibiotikom se lahko pojavijo tudi zaradi človeškega vpliva. V vzorcih kmetijske prsti iz pridelovalnih površin na Nizozemskem se je od leta 1940 do 2010 precej povečalo število genov za odpornost proti antibiotikom, od leta 1970 naprej

zlasti proti tetraciklinu in β -laktamom, kar verjetno odraža spremembe v kmetijski praksi in s tem povezano selekcijo odpornih mikroorganizmov z uporabo antibiotikov (Knapp in sod., 2010). Odkrili so tudi gene, ki kodirajo CTX-M β -laktamaze širokega spektra, še preden so se ti geni postali medicinski problem (Canton in Coque, 2006), kar nakazuje, da imajo geni za odpornost na antibiotike izvor v okoljski mikroorganizmih, kot je na primer *Kluyvera* (Poirel in sod., 2002).

Geni za odpornost na antibiotike se torej pojavljajo v naravnem okolju zaradi selekcijskih pritiskov bodisi zaradi naravnih razmer bodisi zaradi delovanja človeka. Dober primer pojavnosti teh genov v naravi je preizkus, s katerim so hoteli dokazati, da transgena koruza z genom za β -laktamazo, *bla_{TEM116}*, ne vpliva na pojavnost tega gena pri bakterijah v okoliški prsti. β -laktamaze so bile prisotne dejansko v vsaki prsti, ne glede na to ali je v njej 10 let rasla transgena koruza ali ne (Demaneche in sod., 2008). Veliko genov za odpornost proti antibiotikom lahko najdemo tudi v vodnih okoljih (Baquero in sod., 2008; Zhang in sod., 2009), zlasti v čistilnih napravah in predstavljajo intrinzično odpornost normalne mikrobne populacije v vodnih okoljih, lahko pa so posledica antropogenih dejavnikov, kot so izlivи iz kmetijskih površin ali uporaba antibiotikov v akvakulturah, kar predstavlja precejšen problem in obremenjuje okolje z geni za odpornost na antibiotike in patogeni kot sta *Escherichia coli* in *Salmonella*, kar vpliva na gibanje odpornosti v mikrobnih populacijah in medicini.

Gene za odpornost proti antibiotikom pa najdemo tudi v na videz nenavadnih okoljih, kot so na primer sedimenti, katerih zadnji stik s površjem je bil pred približno tremi milijoni let in ki ležijo globoko pod zemljo (Brown in Balkwill, 2009). Glede na okoliščine je skrajno neverjetno, da bi bile te bakterije podvržene človeškim virom antibiotikov.

2.1.4.4 Neobčutljivost na antibiotike pri bakterijah živali

Na antibiotike neobčutljive bakterije lahko najdemo tudi pri živalih, na primer divjih prašičih (Poeta in sod., 2007; Literak in sod., 2009; Poeta in sod., 2009), glodavcih (Gilliver in sod., 1999), pticih (Chen in sod., 2010; Radhouani in sod., 2009; Poeta in sod., 2008; Bonnedahl in sod., 2009), ribah (Verner-Jeffreys in sod., 2009) in žuželkah (Kadavy in sod., 2000; Allen in sod., 2009). Bakterije so lahko del normalne komenzalne mikroflore živali ali pa so jih živali pridobile zaradi izpostavljenosti ljudem, kar dokazano poviša prevalenco na antibiotike neobčutljivih mikroorganizmov (Osterblad in sod., 2001). Velikokrat pa vzrok za pojavnost sevov pri divjih živalih na prvi pogled ni znan. Velik vpliv pri širjenju elementov neobčutljivosti na antibiotike imajo tudi kmetijske prakse, zlasti intenzivna živiloreja, kjer se antibiotiki večinoma uporabljajo zaradi ekonomične prireje mesa. Dokazana je povezava med uporabo antibiotikov in izolacijo odpornih bakterij, kot je *Escherichia coli* z geni za β -laktamaze skupine CTX-M-1 in HLGR *Enterococcus faecalis* pri prireji svinjine (Larsen in sod., 2010; Cortés in sod., 2010), *E. coli* CTX-M-9, *E. coli* CMY-2 (Cortés in sod., 2010) ter *Salmonella* sp. z genom *blaDHA-1* pri prireji perutnine (Rayamajhi in sod., 2010) in na ampicilin in tetraciklin neobčutljive *E. coli* pri prireji govedine (Alexander in sod., 2010).

2.1.5 Iskanje novih antibiotikov

Naraščanje odpornosti na antibiotike in zahteve medicine po novih zdravilih sta spodbudili iskanje novih antibiotikov. Način, s katerim iščemo nove spojine z antibiotičnim učinkom pa ni enak, kot je bil nekoč. Namesto iskanja novih producentov antibiotikov, prednjači predvsem pristop polsinteze modifikacije naravnih spojin, ki že znane molekule z dokazanim antibiotičnim učinkom poskuša spremeniti, da bi dobili molekule z novimi lastnostmi - bodisi bolj učinkovite, manj toksične za bolnike bodisi manj dovzetne za mehanizme odpornosti. S takim pristopom poskušajo izhodne molekule spremeniti tako, da bi dobili molekule z novimi lastnostmi - bodisi bolj učinkovite, manj toksične za bolnike bodisi manj dovzetne za mehanizme odpornosti. Ponoven pregled opuščenih naravnih struktur se je izkazal za koristnega, čemur priča odkritje linezolida, daptomicina, retapamulina in fidaksomicina. Zanemariti pa ne gre tudi sintetičnih spojin, ki z nekaj modifikacije tudi predstavljam pomemben vir novih antibiotikov.

Raziskave v sistemski biologiji so tudi pripomogle k razumevanju kompleksnega celičnega okolja. Raziskave na "odvečnih genih" so pokazale, da te gene lahko inaktiviramo z različnimi spojinami – antibiotičnimi adjuvansi – ali jih celo izbrišemo. Organizmi se na to odzovejo s povečano ekspresijo esencialnih genov in postanejo precej bolj dovzetni za antibiotike. S kombiniranjem bioaktivnih spojin lahko na več mestih vplivamo na celične procese in tako povečamo učinkovitost. Priložnost za nove antibiotike pa predstavlja tudi ciljanje produktov bakterijskih genov in fiziologije, ki so potrebni za okužbo. Inhibitorji virulence mikrobov so že nekaj časa v uporabi, vendar bi jih lahko uporabili v kombinaciji z antibiotičnimi adjuvansi, za izboljšanje učinka in povečanja nabora tarč antibiotikov (Wright, 2012).

Novi biološko aktivni naravni produkti z izjemno strukturno raznolikostjo in kompleksnostjo najdemo v skoraj vseh bioloških virih, vključno s kopenskimi rastlinami, lišaji in morskimi makroorganizmi (656 novih spojin v letu 2003). Morski organizmi predstavljajo še vedno potencialno visoko produktivni vir za nova zdravila proti raku in proti mnogim drugim boleznim. Nekaj derivatov naravnih produktov je celo v klinični stopnji preizkusov, vendar pa so manj popularni, in ne tako dobro raziskani kot antibiotiki. Podobno je z rastlinskimi viri, ki tudi niso priljubljeni na področju iskanja antibiotikov, in niso prispevali klinično pomembnih antibiotikov kljub dokazom o protistafilokokni aktivnosti nekaterih njihovih naravnih produktov (Singh, 2012).

2.2 BIOLOŠKO AKTIVNE SNOVI IZ MORSKIH VIROV

V preteklosti oceanov, kot vira naravnih zdravil, z izjemo slabo opisane "morske" etnomedicine iz južne Kitajske, kljub napredku pri odkrivanju morskega življenja v 18. in 19. stoletju, niso obravnavali. Tudi do nedavnega je bilo tako, verjetno zaradi obilice spojin iz kopenskih rastlin in mikroorganizmov v prsti. V 60. letih prejšnjega stoletja pa je začelo rasti zanimanje za kemijsko raznolikost morskega življa in kmalu so bile odkrite nove, strukturno zelo posebne in neznane vrste spojin (Fenical, 2006). Desetletje kasneje se je raziskovanje biološko aktivnih snovi iz morskih virov precej razmahnilo. Odkrili so

veliko molekul s še neopisanimi funkcionalnimi skupinami, velikostjo in kompleksnostjo, kot so na primer karbonimidinski dikloridi (carbonimidic dichlorides) iz morske spužve *Pseudaxinyssa pitys* (Wratten in Faulkner, 1977) ali polietrski toksin brevetoksin-B (brevetoxin-B) iz dinoflagelata *Karenia breve* (*Ptychodiscus brevis*), ki povzroča rdečo plimo (Lin in sod., 1981). Nove spojine iz morskih virov pa so zašle tudi na področje človekovega zdravja. Že sredi 50. let je Werner Bergman iz morske spužve *Tethia crypta* izoliral spongotimidin in spongouridin (Bergman in Feeny, 1951), ki sta imela edinstvene protibakterijske lastnosti in sta kasneje botrovala nastanku protivirusnega zdravila Ara-A, poznanega kot vidabarın oziroma Vira-A®, ki je bil umaknjen iz ameriškega trga leta 2001, in protitumorskega zdravila Ara-C, poznanega kot Cytosar-U® ali Depocyt® (Mayer in sod., 2010). Naslednje pomembno zdravilo iz morskih virov je zikonotid (Prialt™) (Olivera in sod., 1978; Miljanich, 2004) ki je močno protiblečinsko sredstvo, razvito iz toksina ω -konotoksin plenilskega morskega polža stožca (*Conus magus*). Do februarja 2013 so bila s strani FDA (Food and Drug Administration) odobrena še štiri zdravila; Halaven® (makrolid eribulin mesilat - E7389 iz spužve *Halicondria okadae*), Yondelis® (alkaloid ektokinascidin, pozan kot trabektedin – ET 743 iz plaščarja *Ecteinascidia turbinata*) in Adcetris® (konjugirano zdravilo iz protiteles, ki ga sestavlja monoklonsko protitelo, usmerjeno proti CD30, ki se kovalentno veže na antimikrotubulno učinkovino monometil avristatin E (Mayer, 2013), ki je sintetični derivat dolastatina 10 iz cianobakterije iz rodu *Symploca* (Luesch in sod., 2001)) za zdravljenje raka, ter Lovaza® za zdravljenje hipertrigliceridemije (etyl estri omega-3 kislin iz rib).

Za zdravljenje različnih obolenj, je po navedbah Alejandra M. S. Mayer-ja v različnih kliničnih fazah testiranja še 11 spojin iz morskih virov. Eden obetavnejših je briostatin 1 iz morskega koloniskskega mahovnjaka *Bugula neritina*. V predkliničih fazah je 1458 spojin iz morskih virov (Mayer, 2012).

Spojine, izolirane iz morskih organizmov, pa so uporabne tudi na drugih področjih človekove dejavnosti.

Alkilpiridinijeve soli, med drugimi izolirane tudi iz kruhaste jadranske spužve *Reniera sarai*, (Sepčić in sod., 1997), imajo na primer vrsto uporabnih lastnosti. Izkazujejo citolitične, citotoksične, protimikrobne in protivegetativne lastnosti, delujejo pa tudi kot encimski inhibitorji ter tvorci prehodnih por v membrani. Zaradi teh lastnosti bi bili lahko uporabni predvsem pri transfekciji celic in genskih terapijah ter kot protivegetativni premazi na vodnih plovilih in potopljenih površinah (Turk in sod., 2008).

Pseudopterozini, izolirani iz mehke korale *Pseudopterogorgia elisabethae* (Look in sod., 1986) imajo močne protivnetne in protialergijske lastnosti in jih uporablajo tudi v kozmetični industriji.

2.2.1 Biološko aktivni produkti iz morskih spužev

Že prej omenjene alkilpiridinijeve soli, spongotimidin, spongouridin in eribulin mesilat so le nekatere biološko aktivne spojine, ki jih z ekstrakcijo ali kemijsko sintezo pridobimo iz spužev. Po lastnostih jih lahko opredelimo kot protivnetne, protitumorske, protimalarične,

imunosupresivne, protibakterijske, protivirusne in protivegetativne. Nekatere imajo celo kardiovaskularne učinke ali pa delujejo kot mišični relaksanti. Te lastnosti imajo nenavadni nukleozidi, bioaktivni terpeni, steroli, ciklični peptidi, alkaloidi, maščobne kislina, peroksidi in derivati aminokislin, ki so pogosto halogenirani (Sipkema in sod., 2004).

2.2.1.1 Protivnetne lastnosti

Protivnetne lastnosti iz sružev delujejo tako, da selektivno inhibirajo specifične encime, ki sodelujejo pri nastanku nekaterih vnetnih boleznih. Manoalid je bil eden prvih sesterpenoidov, ki so jih izolirali iz sružev, in ima poleg protivnetnega (Bennet, 1987), še protimikrobeno (De Silva in Scheuer, 1980) in analgečno delovanje (Mayer in Jacobs, 1988).

2.2.1.2 Protitumorske lastnosti

Kar nekaj spojin, izoliranih iz sružev, deluje kot inhibitorji proteinske kinaze C (PKC). PKC so pomembne, ker naj bi bili vpletene v nastanek tumorjev, psorize in artrita (Bradshaw in sod., 1993; Yoshiji in sod., 1999). Inhibitorji PKC preprečijo vezavo tumorskih celic na endotelij (Liu in sod., 1991). Glikozilacija receptorjev in še posebej prisotnost fukoznih ostankov, igrajo pomembno vlogo pri vezavi tumorskih celic in limfocitov na endotelij (Springer in Lasky, 1991). Fukoziltransferazni inhibitorji kot so okta in nonaprenilhidrokinon sulfati iz sružve *Sarcotragus* sp. (Wakimoto in sod., 1999) bi bili ravno zato obetavne nove spojine za zdravljenje artrita in tumorjev.

Triterpenoidni hidrokinoni motijo delovanje mikrotubulov tako, da vplivajo na delovanje kinezina (Blackburn in sod., 1999). Na mikrotubule vplivajo tudi halikondrin B (Bai in sod., 1991), spongistatin (Bai in sod., 1993), diskodermolid (ter Haar in sod., 1996) in drugi. Nekatere spojine pa delujejo na drug tip citoskeleta, na aktin, in preprečijo njegovo polimerizacijo v mikrofilamente ter s tem delitev celic. To sta na primer latrunkulin A iz vrste *Latrunculia magnifica* (Coue in sod., 1987) in svinoilid iz vrste *Theonella swinhoei* (Bubb in sod., 1995). Na delitev celice pa lahko vplivamo tudi s preprečevanjem sinteze proteinov, kakor delujeta mikalamid (Burres in Clement, 1989) in aragusterol (Fukuoka in sod., 2000) ali pa z blokado topoizomeraze II, kakor delujeta neoamfimedin (De Guzman in sod., 1999) in elenska kislina (Juagdan in sod., 1995).

2.2.1.3 Imunosupresivne lastnosti

Inhibitorji sintetaze dušikovega oksida igrajo pomembno vlogo tudi pri upočasnjevanju odziva celic T, s katerim zavrejo delovanje imunskega odziva in zmanjšajo moč napadov migren (Griffith in Gross, 1996). Bolj specifični zaviralci imunskega odziva pa so poliokisični steroli izolirani iz sružve *Dysidea* sp., ki preprečujejo vezavo IL-8 na receptorje (de Leone in sod., 2000) ter simpleksidi, izolirani iz sružve *Plakortia simplex*, ki onemogočijo proliferacijo aktiviranih limfocitov T (Costantino in sod., 1999). Zelo specifičen je tudi pateamin A iz sružve *Mycale* sp., ki inhibira nastanek IL-2 in tako prepreči aktivacijo limfocitov T in B (Romo in sod., 1998). Kontignasterol iz vrste *Petrosia contignata* (Burgoyne in Andersen, 1992) pa prepreči z alergeni inducirano sproščanje histamina (Takei in sod., 1994).

2.2.1.4 Kardiovaskularni agensi

Cikloteonarnid A iz vrste *Theonella* sp. (Fusetani in sod., 1990) je predstavnik nenavadne skupine inhibitorjev serinskih proteaz in je potencialno zdravilo za zdravljenje tromboze (Maryanoff in sod., 1993). Erylozid F iz vrste *Erylus formosus* je močan antagonist trombinskih receptorjev (Stead in sod., 2000), haliklorin iz vrste *Halichondria okadai* pa je inhibitor ekspresije vaskularne celične adhezijske molekule 1 (Kuramoto in sod., 1996). Kalisponginska kislina iz vrste *Callyspongia truncata* je inhibitor α -glukozidaze in vpliva na hidrolizo glikogena ter tako vzdržuje koncentracijo glukoze v krvi na nižji ravni.

2.2.1.5 Nevrosupresivne lastnosti

Keramidin in vrste *Agelas* sp. (Nakamura in sod, 1984) je antagonist serotonergičnih receptorjev in bi ga lahko uporabili kot antidepresijsko sredstvo (Nagayama in sod, 1980). Disherbain iz vrste *Dysidea herbacea* (Sakai in sod., 1997) pa je močna ekscitacijska aminokislina, ki moti L-glutamatne prenašalce (Sakai in sod, 2001).

2.2.1.6 Mišični relaksanti

1-metilgvanozin iz spužve vrste *Tedania digitata* (Quinn in sod., 1980) in ksestospongin C iz vrste *Xestospongia* sp. (Gafni in sod., 1997) sta bila med prvimi mišičnimi relaksanti, izoliranimi iz spužev. Ksestospongin C deluje tako, da inhibira IP₃ receptor in kalcijeve črpalke endoplazmatskega retikuluma (De Smet in sod., 1999) in zmanjša oscilatorno krčenje mišic (Miyamoto in sod., 2000). S1319 je spojina, izolirana iz *Dysidea* sp., ki je antagonist β -adenoreceptorjev in ima uterorelaksantne sposobnosti (Dennedy in sod., 2002), uporablajo pa se tudi kot zdravila proti astmi (Suzuki in sod., 1999).

2.2.1.7 Protivirusne lastnosti

Veliko spojin iz spužev ima za človeka uporabne protivirusne lastnosti. Ena pomembnejših je sposobnost inhibicije virusa HIV, vendar je pri večini spojin njihovo delovanje slabo raziskano. Na primer, hamigeran B iz spužve *Hamigera tarangaensis* je v laboratorijskih razmerah zelo učinkovit proti virusu herpesa in poliovirusom (Wellington in sod., 2000). Bolje je znano delovanje avarola iz vrste *Dysidea avara* (Muller in sod., 1987), ki zavre sintezo UAG tRNA stop kodona, njegovi derivat pa so močni inhibitorji reverzne transkriptaze (Loya in Hizi, 1990). Kalisponginska kislina je tudi ena od protivirusnih učinkovin in ima širok spekter delovanja, saj vpliva na glikozilacijo proteinov, zaradi česar se ti ne zvijejo pravilno in zato zastajajo v endoplazmatskem retikulumu, poleg tega pa vplivajo na infektivnost virusov (Ratner in sod., 1991; Mehta in sod., 1998).

2.2.1.8 Protibakterijske in protiglivne lastnosti

Med spojinami, izoliranimi iz morskih spužev je velika raznolikost pri spojinah s protibakterijskim učinkom. Arenosklerini A, B in C iz *Arenosclera brasiliensis* so zelo učinkoviti proti 12 sevom multirezistentnih bakterij izoliranih iz bolnišničnega okolja (Torres in sod. 2002). Fungicidi so, zaradi lastnosti gliv, toksični tudi za ljudi, živali in rastline (Nakagawa in Moore, 1995; Rahden-Staron, 2002). Fungicidne spojine iz spužev, kot so topsentisteroli iz vrste *Topsentia* sp. (Fusetani in sod., 1994), akantosterol sulfati iz

Acanthodendrilla sp. (Tsukamoto in sod., 1998) in leukaskandolid A iz apnenčaste sružve *Leucascandra alveolata* (D'Ambrosio in sod., 1996) pa so obetavni nadomestki, ki pa jih je treba še temeljito preučiti.

2.2.1.9 Protimalarične lastnosti

Zaradi naraščanja odpornosti plazmodijev na protimalarična zdravila so zelo dobrodoše nove učinkovine, ki jih najdemo tudi v sružvah. Selektivne protimalarične učinke so našli pri kalihinolu A iz vrste *Acantella* sp. (Miyaoka in sod. 1998) ter različnih terpenoidih, izocianatih, izotiocianatih in izonitrilih iz vrste *Cymbastella hooperi*. Iz vrste *Diacarnus levii* pa so pridobili proste karboksilne kisline, ki so služile kot prekurzorji za nastanek novih cikličnih norditerpenski peroksidov. Najbolj obetavni pa so manzamini (Sakai in sod., 1986; Ang in sod., 2000; Yousaf in sod., 2002), vendar naj bi bil njihov učinek posledica stimulacije imunskega odziva (Ang in sod., 2001).

2.2.1.10 Protivegetativne lastnosti

Zaradi svojega načina pritrjenega življenja sružve vsebujejo ali izločajo tudi protivegetativne snovi, ki preprečujejo, da bi jih prerasli drugi sesilni mikroorganizmi. Te spojine bi lahko uporabili za izdelavo premazov za preprečevanje naseljevanja sesilnih morskih organizmov in tako nadomestili toksične sintetične premaze na osnovi tributil kositra (tributyltin) (Konstantinou in Albanis, 2004; Katranitsas in sod., 2003; Sepčić in Turk, 2006).

2.2.2 Biološko aktivne spojine iz polarnih sružev

Zaradi oteženega dostopa in neugodnih delovnih razmer so odkritja biološko aktivnih spojin iz polarnih sruževsiva lisa na področju tovrstnih raziskav. Prednjačila so predvsem odkritja v tropskih in subtropskih morjih, kljub raznolikosti polarnih sružev (Abbas in sod., 2011). Veljalo je celo mnenje, da raznolikost kemičnih snovi v sružvah obratno korelira z zemljepisno širino (Bakus in Green, 1974; Green 1977). Dandanes pa je znano, da so kemične spojine za obrambo pri sružvah iz polarnih morij relativno pogoste (McClintock and Baker, 1997, 1998). V polarnih sružvah so najbolj znani alkaloidi, pigmenti, ki jih sružve kopičijo v zunanjem sloju in služijo kot zaščita pred obžiranjem morskih zvezd. Tako delujeta, na primer, variolin A in diskorabdin G iz sružev *Kirkpatrickia variolosa* in *Latrunculia apicalis* (McClintock in sod., 2005). Diskorabdini imajo tudi protitumorske, protimalarijske in protibakterijske lastnosti (Perry in sod., 1988a in 1988b; Ford in Capon, 2000; Na in sod., 2010). Izokinolonski pigment iz sružve *Dendrilla membranosa* (Baker in sod., 1995) inhibira rast morskih bakterij in verjetno ščiti pred nastajanjem biofilma in preraščanjem (Amsler in sod., 2001). Rumeni pigment erebuzinon iz sružve *Isodictya erinacea* dokazano inhibira proces levitve in poveča umrljivost pri postranicah, ki se hranijo s sružvami (Moon in sod., 2000). Iz polarnih sružev so izolirali tudi citotoksične monanhocidine, ciklične perokside protibakterijske 3-alkil piridinijeve alkaloide in polimastiamide ter protivegetativne diketopiperazine (Abbas in sod., 2011).

Obsežen pregled biološko aktivnih sekundarnih metabolitov iz spužev je opravil Rok Kosmina (Kosmina, 2012). Preglednica je prikazana v prilogi A.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Organski izvlečki spužev

Uporabili smo že prej pripravljene organske izvlečke antarktičnih sružev, ki jih je pri svoji diplomi pripravil Rok Kosmina (Kosmina, 2012). Izvlečki so bili pripravljeni tako, da so vzorce sružev drobno narezali, in jih v cetrifugirki prelili z 10 ml 96 % tehničnega etanola (Merck) ter stresali preko noči pri sobni temperaturi in 600 obratih na minuto. Po končanem stresanju so vzorce filtrirali in shranili v mikrocentrifugirke ter jih ovili s parafilmom in shranili v hladilniku pri 4 °C.

3.1.2 Izračuni suhe teže ekstrahirane snovi v vzorcih

Suho težo ekstrahirane snovi je določil v svoji diplomske nalogi Rok Kosmina tako, da je 500 µl izvlečka odmeril na posušeno in stehtano urno stekelce, ponovno tehtal ter ga sušil v sterilizatorju 10 minut pri 120 °C. Po sušenju je urno stekelce ponovno stehtal in določil suho težo vzorca v gramih na mililiter (Kosmina, 2012).

Preglednica 1: Teža suhe snovi/koncentracija vzorcev (Kosmina, 2012)

Spužva	Vzorec	Koncentracija (mg/ml)
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	3,80
<i>Hexactinellida</i>	4	4,72
<i>Monosyringa</i> sp.	6	4,56
<i>Bathydorus</i> sp.	8	3,60
<i>Myxilla</i>	26	7,40
<i>Chinachyra</i>	27	3,46
<i>Rosella</i> sp.	34	6,50
<i>Demospongia</i>	36	3,70
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	5,74
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	8,96
<i>Demospongia</i>	38	5,44
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	7,22
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	5,94
<i>Microcionidae</i>	41	4,46
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	6,40
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3,06
<i>Demospongia</i>	45d	3,88

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 1: Teža suhe snovi/koncentracija vzorcev (Kosmina, 2012)

Spužva	Vzorec	Koncentracija (mg/ml)
<i>Latrunculia</i>	46	7,16
<i>Xestospongia</i>	48/1	3,96
Neidentificirana spužva 1	48/2	6,94
<i>Isodictya toxophila</i>	51	4,28
<i>Homaxinella</i>	52	4,60
<i>Tetillia</i>	55	4,24
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	5,30
<i>Isodictya setifer</i>	58	6,52
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63	4,20
<i>Demospongia</i>	105	4,92
Tetillidae	119	10,26
<i>Demospongia</i>	124	4,96
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	6,14
<i>Rossella racovitzae</i>	166	6,48
<i>Rossella</i> sp.	167	3,84
Neidentificirana spužva 2	604	6,72

3.1.3 Negativna kontrola

Za negativno kontrolo smo uporabili 96 % etanol (Merck) brez denaturantov, da bi izključili morebitno protimikrobnno delovanje etanola.

3.1.4 Priprava gojišč

3.1.4.1 Gojišče za prekonočno kulturo

Vnaprej smo pripravili tekoče gojišče za prekonočne kulture bakterijskih sevov. 2,5 g Luria Broth gojišča (Merck, Nemčija) smo raztopili v 100 ml destilirane vode ter odmerili po 10 ml gojišča v posamezne erlenmajerice z volumnom 100 ml, ki smo jih pokrili s kosom aluminijaste folije. Erlenmajerice smo avtoklavirali in vrhove oblepili s parafilmom, da bi preprečili izhlapevanje vode in vdor mikrobov v gojišče.

3.1.4.2 Gojišče za določanje protibakterijske aktivnosti

Gojišče za določanje protibakterijske aktivnosti smo pripravili tako, da smo v 1000 ml erlenmajerico zatehtali 12,5 g LB (Merck), 7,5 g agarja (Merck) in dodali 500 ml destilirane vode ter dobro premešali, pokrili s kosom aluminijaste folije in avtoklavirali.

3.2 DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOST Z DIFUZIJSKIM TESTOM NA AGARJU

Še tekoč agar smo ohladili na primerno temperaturo (približno 42 °C), ki omogoča nacepitev bakterij, agar pa še ne polimerizira. Dodali smo prekonočno kulturo, da smo dobili želeno koncentracijo bakterij (2 %). Zatem smo po 20 ml gojišča razlili v vsako označeno petrijevo ploščo, te pa smo pustili na ravni površini, da se ohladijo. Po 30 minutah, ko je bil agar čvrst, smo jih postavili še za 30 minut v hladilnik oziroma hladno sobo.

Ko je bil agar ohlajen, smo s plutovtrom vanj navrtali pet do šest luknjic, in te luknjice na spodnji strani petrijevke označili z zaporedno številko izvlečka ali antibiotika. V vsako luknjico smo nanesli 100 µl izvlečka ali ustreznega količina različnih redčitev antibiotika. Negativno kontrolo smo opravili s 96 % etanolom (Merck). Po nanosu vzorcev in antibiotikov smo počakali, da je tekočina vidno difundirala v okoliško gojišče, nato pa smo petrijeve plošče inkubirali preko noči pri 37 °C. V primeru, da je antibiotik deloval močno protimikrobnno, smo pripravili redčitve od 10^{-2} do 10^{-5} , da smo lahko določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). MIK smo zaradi omejitve natančnosti difuzijskega antibiograma, določili približno, kot vrednost med najvišjo redčitvijo vzorca, pri kateri nismo zasledili antibakterijskega učinka, in naslednjo nižjo redčitvijo, pri kateri je ta učinek bil opazen. Organskim izvlečkom iz sružev z vidnim protimikrobnim delovanjem smo določili MIK na enak način.

3.2.1 Antibiotiki

Antibiotike z določeno koncentracijo smo dobili pripravljene vnaprej. Uporabili smo kloramfenikol (1 mg/ml), tetraciklin (10 mg/ml), ampicilin (100 mg/ml), kanamicin (10 mg/ml) in rifampicin (1 mg/ml).

Preglednica 2: Koncentracije antibiotikov

	Antibiotiki raztopljeni v etanolu		Antibiotiki raztopljeni v vodi		
	Tetraciklin (Tc)	Kloramfeniko (Cm)	Kanamicin (Kn)	Ampicilin (Amp)	Rifampicin (Rif)
Koncentracija (mg/ml)	10	1	10	100	1

3.2.2 Bakterijski sevi

Pri delu z organskimi izvlečki smo uporabili:

- laboratorijske seve: *Escherichia coli* EXB-V1, *Escherichia coli* HB101, *Bacillus subtilis* EXB-V68, *Enterobacter* EXB-V11, *Pseudomonas aeruginosa* EXB-V28 in *Staphylococcus epidermidis* EXB-V55;

- komenzalne izolate iz kože psa: *Staphylococcus aureus* 10F, *Macrococcus* sp. 1F, *Micrococcus* sp. 2F in *Acinetobacter* sp. 1C;
- živilski izolat: *Listeria monocytogenes*; in
- klinične izolate: na meticilin neobčutljiv *S. aureus* (MRSA) S-943, na meticilin neobčutljiv *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) S-053 in S-043, ESBL-*E. coli* 206 (CTX-M-1, klonalna skupina ST131), ESBL-*E. coli* 192 (CTX-M-9; ST131), ESBL-*E. coli* 30 (CTX-M-2), KPC *Klebsiella pneumoniae*, *P. aeruginosa* 06131 and *P. aeruginosa* 8591.

Bakterijske seve, ki smo jih pri nalogi uporabili, smo dobili iz EX (extremophilic microorganisms) in GM (genetic laboratory microbes) mikrobiološke zbirke Oddelka za molekularno genetiko in mikrobiologijo Biotehniške fakultete v Ljubljani ter Inštituta za mikrobiologijo in parazitologijo Veterinarske fakultete v Ljubljani.



Slika 1: Izolat bakterije *Listeria monocytogenes*

4 REZULTATI

4.1 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETANOLNIH IZVLEČKOV NA PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE

Inhibicijo mikrobne rasti je pri po Gramu negativnih bakterijah kazalo le 6 izvlečkov od 33 testiranih. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti pri inhibiciji rasti bakterij *Acinetobacter* sp. 1C in *E. coli* HB101, kjer so protimikrobno delovali kar širje oziroma trije izvlečki. Protimikrobna aktivnost ni bila posebno velika; v večini primerov je bila inhibicija prisotna pri nanosu neredčenega izvlečka, pri nadaljnih redčitvah pa je ni bilo zaznati. Izstopa le *Acinetobacter* C1, kjer smo zasledili manjšo inhibicijo s področjem zmanjšane rasti tudi pri 100-kratni redčitvi vzorca (10^{-2}).

Na protimikrobne izvlečke je bilo skupno občutljivih 7 od 11 testiranih po Gramu negativnih bakterij. Neobčutljivost na izvlečke smo opazili pri *P. aeruginosa* EXB-V28, *P. aeruginosa* 1958, *Enterobacter* EXB-V11 in KPC *K. pneumoniae*. Najmanjša koncentracija izvlečka, ki je še omogočila inhibicijo, je bila pri *Acinetobacter* 1C med 3,06 in 30,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$.



Slika 2: Neobčutljivost bakterije *P. aeruginosa* EXB-V28 na etanolne izvlečke

Preglednica 3: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu negativnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK (µg/ml)			
		E. coli EXB-V1	E. coli HB101	ESBL-E. coli 30 (CTX-M-2)	ESBL-E. coli 192 (CTX-M-9; ST131)
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	89,6–896	89,6–896	89,6–896	89,6–896
<i>Demospongia</i>	38	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	59,4–594	59,4–594	59,4–594	n/a
<i>Microcionidae</i>	41	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	n/a	30,6–306	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	45d	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 1	48/2	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillidae</i>	119	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	167	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	n/a	n/a	n/a	n/a

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu negativnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK ($\mu\text{g/ml}$)			
		ESBL- <i>E. coli</i> 206(CTX-M-1; ST131)	<i>P. aeruginosa</i> EXB-V28	<i>P. aeruginosa</i> 06131	<i>P. aeruginosa</i> 1958
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	89,6–896	n/a	89,6–896	n/a
<i>Demospongia</i>	38	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona (Gellius)</i> <i>flagellifera</i>	40a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	n/a	n/a	59,4–594	n/a
<i>Microcionidae</i>	41	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	45d	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	48/2	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillidae</i>	119	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella</i> sp.	167	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	604	n/a	n/a	n/a	n/a

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 3: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu negativnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK (µg/ml)		
		<i>Enterobacter</i>		Acinetobacter 1C
		EXB-V11	KPC <i>K. pneumoniae</i>	
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a	n/a	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	n/a	n/a	n/a
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a	n/a	74–740
<i>Chinachyra</i>	27	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	n/a	n/a	8,96–89,6
<i>Demospongia</i>	38	n/a	n/a	54,4–544
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	n/a	n/a	59,4–954
<i>Microcionidae</i>	41	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a	n/a	64,0–640
<i>Halichondria osculum</i>	45h	n/a	n/a	3,06–30,6
<i>Demospongia</i>	45d	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a	n/a	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 1	48/2	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	n/a	n/a	n/a
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillidae</i>	119	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	167	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	n/a	n/a	n/a

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

4.1.1 Cone inhibicije pri po Gramu negativnih bakterijah

Največje cone inhibicije smo zasledili pri izvlečku 37L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi*, vendar le v 10-krat redčenem vzorcu, pri večjih redčitvah ni bilo opaziti inhibicije mikrobne rasti. Inhibicija rasti je pri bakterijah iz rodov *Escherichia* in *Pseudomonas* razmeroma šibka, obsega le največ 2 mm. Večjo inhibicijo – 5 mm – , zasledimo pri komenzalnem kožnem izolatu *Acinetobacter* sp. 1C. Nanj, poleg vzorca 37L, močneje vplivata še 41a in 45h.

Preglednica 4: Cone inhibicije v milimetrih pri laboratorijskih sevih *E. coli* EXB-V1, *E. coli* HB101 in kliničnem izolatu ESBL-*E. coli* 30 (CTX-M-2).

Spužva	Vzorec	<i>E. coli</i>			<i>E. coli</i>			ESBL- <i>E. coli</i>		
		EXB-V1			HB101			30 (CTX-M-2)		
		10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}
		Inh.	Zmr.	(µg/ml)	Inh.	Zmr.	(µg/ml)	Inh.	Zmr.	(µg/ml)
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	2	n/a	89,6–896	2	n/a	89,6–896	2	n/a	89,6–896
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	1,5	n/a	59,4–594	1,5	n/a	59,4–594	1	n/a	59,4–594
<i>Halichondria osculum</i>	45h	n/a	n/a	n/a	1	n/a	30,6–306	n/a	n/a	n/a

– redčitev; Inh. – inhibicija; Zmr. – zmanjšana rast; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 5: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnih izolatih ESBL-*E. coli* 192 (CTX-M-9; ST131), ESBL-*E. coli* 206 (CTX-M-1; ST131) in *P. aeruginosa* 06131

Spužva	Vzorec	ESBL- <i>E. coli</i>			ESBL- <i>E. coli</i>			<i>P. aeruginosa</i>		
		192 (CTX-M-9; ST131)			206 (CTX-M-1; ST131)			06131		
		10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}	MIK	10^{-1}
		Inh.	Zmr.	(µg/ml)	Inh.	Zmr.	(µg/ml)	Inh.	Zmr.	(µg/ml)
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	1,5	n/a	89,6–896	1,5	n/a	89,6–896	2	n/a	89,6–896
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	1	n/a	59,4–594	1	n/a	59,4–594	1,5	n/a	59,4–594

10^{-1} – redčitev; Inh. – inhibicija; Zmr. – zmanjšana rast; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 6: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu *Acinetobacter* 1C

Spužva	Vzorec	Acinetobacter 1C							
		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		MIK(µg/ml)	
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.		
<i>Myxilla</i>	26	2	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	74–740	
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	5	1	2	0,5	n/a	n/a	8,96–89,6	
<i>Demospongia</i>	38	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	54,4–544	
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	3	0	0	0	n/a	n/a	59,4–594	
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	64–640	
<i>Halichondria osculum</i>	45h	4,5	0	1	0	n/a	n/a	3,06–30,6	

10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} – redčitev; Inh. – inhibicija; Zmr. – zmanjšana rast, MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

4.2 PROTIBAKTERIJSKA AKTIVNOST ETANOLNIH IZVLEČKOV NA PO GRAMU POZITIVNE BAKTERIJE

Pri po Gramu pozitivnih bakterijah smo opazili večjo protimikrobnoučinkovitost izvlečkov. Inhibicijo mikrobne rasti je izkazalo 25 od 33 testiranih izvlečkov. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti pri inhibiciji *B. subtilis* EXB-V86, ki je bil občutljiv na kar 22 izvlečkov, in *Macrococcus* sp.1F, ki je bil občutljiv na 14 izvlečkov. Na 7 izvlečkov je bil občutljiv *Micrococcus* sp. 2F, na 6 *S. epidermidis* EXB-V55, in *S. pseudintermedius* (MRSP) S-043. *S. aureus* 10F in *S. aureus* (MRSA) S-943 sta bila občutljiva na 4 izvlečke, *S. pseudintermedius* (MRSP) S-053 pa na 3. Pri *B. subtilis* EXB-V86 smo opazili najnižjo koncentracijo izvlečka 37L (med 0,306 in 3,06 µg/ml) iz sružve vrste *Halichondria osculum*, ki je povzročila inhibicijo rasti,

Vse testirane po Gramu pozitivne bakterije so bile občutljive na izvleček *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* - 37L.

Preglednica 7: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu pozitivnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK (µg/ml)			
		<i>S. epidermidis</i> EXB-V55	<i>S. aureus</i> 10F	MRSA S-943	MRSP S-053
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	47,2–472	47,2–472	47,2–472	n/a
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a	n/a	74,0–740	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	89,6–896	89,6–896	8,96–89,6	8,96–89,6
<i>Demospongia</i>	38	54,4–544	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	59,4–594	59,4–594	59,4–594	59,4–594
<i>Microcionidae</i>	41	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	30,6–306	30,6–306	30,6–306	30,6–306
<i>Demospongia</i>	45d	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 1	48/2	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	65,2–652	n/a	65,2–652	n/a
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillidae</i>	119	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella</i> sp.	167	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	n/a	n/a	n/a	n/a

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 7: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu pozitivnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK ($\mu\text{g/ml}$)			
		MRSP S-043	B. subtilis EXB-V68	Macrococcus 1F	Micrococcus 2F
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a	n/a	38,0–380	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	47,2–472	4,72–47,2	47,2–472	47,2–472
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a	7,4–74	74,0–740	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	n/a	34,6–346	34,6–346	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a	37,0–370	n/a	n/a
<i>Rosella racovitzae</i>	37R	n/a	57,4–574	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	0,896–8,96	0,896–8,96	8,96–89,6	8,96–89,6
<i>Demospongia</i>	38	5,44–54,4	54,4–544	5,44–54,4	54,4–544
<i>Haliclona (Gellius)</i> <i>flagellifera</i>	40a	n/a	7,22–72,2	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	59,4–594	5,94–59,4	5,94–59,4	59,4–594
<i>Microcionidae</i>	41	n/a	44,6–446	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a	64,0–640	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	30,6–306	0,306–3,06	3,06–30,6	3,06–30,6
<i>Demospongia</i>	45d	n/a	38,8–388	n/a	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a	71,6–716	71,6–716	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Neidentificirana spužva 1</i>	48/2	n/a	n/a	6,94–69,4	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a	46–460	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a	42,4–424	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	n/a	65,2–652	6,52–65,2	65,2–652
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	49,2–492	n/a	49,2–492	49,2–492
<i>Tetillidae</i>	119	n/a	10,26–102,6	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a	4,96–49,6	n/a	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a	61,4–614	n/a	n/a
<i>Rosella racovitzae</i>	166	n/a	64,8–648	64,8–648	n/a
<i>Rosella</i> sp.	167	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Neidentificirana spužva 2</i>	604	n/a	67,2–672	67,2–672	n/a

MIK – minimalna inhibitorna koncentracija,

se nadaljuje

nadaljevanje

Preglednica 7: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) etanolnih izvlečkov testiranih antarktičnih spužev proti po Gramu pozitivnim bakterijam

Spužva	Vzorec	MIK ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
		<i>L. monocytogenes</i>
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	n/a
<i>Hexactinellida</i>	4	n/a
<i>Monosyringa</i> sp.	6	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	n/a
<i>Myxilla</i>	26	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	n/a
<i>Rosella</i> sp.	34	n/a
<i>Demospongia</i>	36	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	89,6–896
<i>Demospongia</i>	38	n/a
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	n/a
<i>Microcionidae</i>	41	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	n/a
<i>Demospongia</i>	45d	n/a
<i>Latrunculia</i>	46	n/a
<i>Xestospongia</i>	48/1	n/a
Neidentificirana spužva 1	48/2	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	n/a
<i>Tetillia</i>	55	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	n/a
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	n/a
<i>Demospongia</i>	105	n/a
<i>Tetillidae</i>	119	n/a
<i>Demospongia</i>	124	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	n/a
<i>Rosella</i> sp.	167	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	n/a

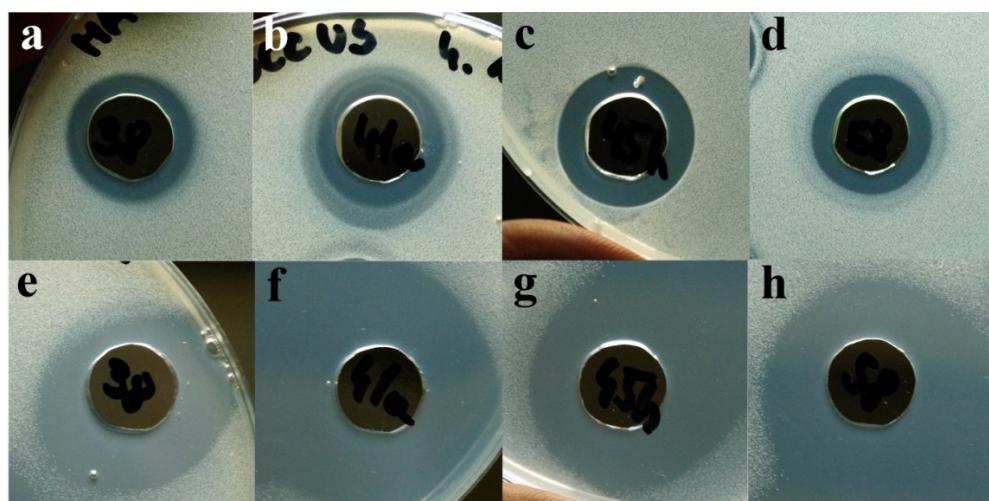
MIK – minimalna inhibitorna koncentracija,

4.2.1 Cone inhibicije pri po Gramu pozitivnih bakterijah

Največja območja inhibicije smo zasledili pri izvlečku 37L pri večini po Gramu pozitivnih bakterijskih vrst. Največja območja inhibicije rasti smo izmerili pri laboratorijskem sevu *B. subtilis* EXB-V68 in komenzalnih kožnih izolatih *Macrococcus* sp. 1F in *Micrococcus* sp. 2F, in sicer od 6 do 9 mm. Pri komenzalnem kožnem izolatu *Micrococcus* sp. 2F smo po redčitvi vzorca opazili tudi pojav območja zmanjšane rasti, kar je razvidno v preglednici

15. Z redčitvijo vzorca je območje zmanjšane rasti izginilo pri 1000-kratni redčitvi. Izvleček 37L je bil dokaj učinkovit tudi proti živilskemu izolatu *L. monocytogenes*, kjer smo opazili 5,5 mm veliko območje inhibicije, po redčenju pa le še območje zmanjšane rasti v velikosti 2 mm. Zadovoljivo inhibicijo pa smo opazili tudi pri kliničnem izolatu *S. pseudintermedius* (MRSP) S-053. Manj učinkovit je bil izvleček 37L pri dveh kliničnih izolatih, *S. aureus* (MRSA) S-943 in *S. pseudintermedius* (MRSP) S-043, kjer smo izmerili le največ 2 mm inhibicije rasti, območje z zmanjšano rastjo pa je bilo do 2-krat večje in se je z redčitvijo vzorca zmanjševalo.

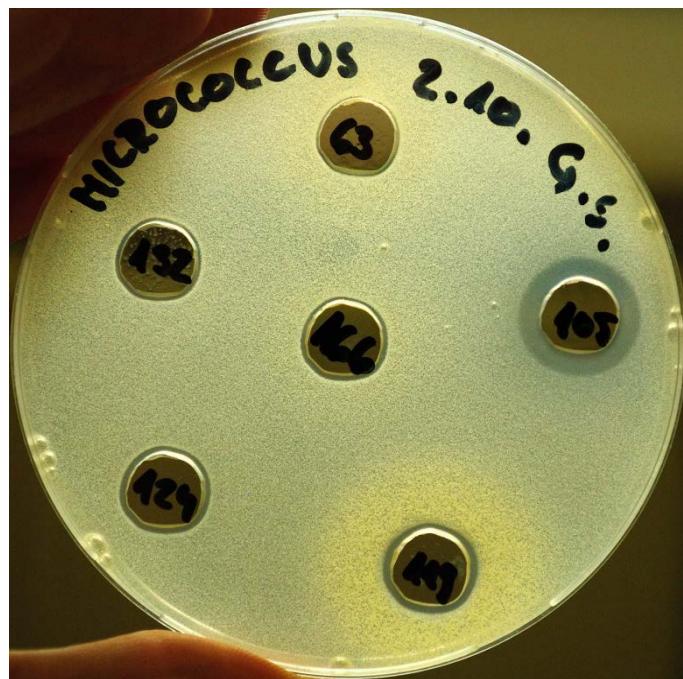
Pri bakteriji *Macrococcus* sp. F1 smo pri izvlečkih 38, 41a, 45h in 58 opazili, da se je področje inhibicije rasti pri 100-kratnem redčenju povečalo za 2–3-krat, pri 1000-kratnem redčenju pa je cona inhibicije izginila.



Slika 3: Porast cone inhibicije ob redčenju izvlečka. Slike a, b, c in d prikazujejo neredčene izvlečke 38, 41a, 45h in 58 na petrijevki s komenzalnim kožnim izolatom *Macrococcus* sp. 2F, slike e, f, g in h pa redčene izvlečke na enakem gojišču.

Znatno cono inhibicije smo zasledili še pri izvlečkih 4, 26, 38, 41a, 45 in 58.

Pri komenzalnem kožnem izolatu *Micrococcus* sp. 2F smo pri izvlečkih 26, 27, 40a, 46, 51, 52, 55, 63, 166, 167 in 604 opazili nastanek pigmenta.



Slika 4: *Micrococcus* na plošči z izvlečki in tvorba pigmenta

Preglednica 8: Cone inhibicije v milimetrih pri laboratorijskem sevu *S. epidermidis* EXB-V55 in komenzalnem kožnem izolatu *S. aureus* 10F

Spužva	Vzorec	<i>S. epidermidis</i> EXB-V55						<i>S. aureus</i> 10F					
		10 ⁻¹		10 ⁻²		MIK (µg/ml)	10 ⁻¹		10 ⁻²		MIK (µg/ml)		
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.			
<i>Hexactinellida</i>	4	1,5	0	n/a	0	47,2–472	1,5	n/a	0	n/a	472–47,2		
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	4,5	2	0	0	89,6–896	5	n/a	0	n/a	896–89,6		
<i>Demospongia</i>	38	4	0	0	2	54,4–544	1	n/a	n/a	n/a	n/a		
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	6	0	0	4	59,4–594	2	n/a	0	n/a	594–59,4		
<i>Halichondria osculum</i>	45h	2	0	0	0	30,6–306	1,5	n/a	0	n/a	306–30,6		
<i>Isodictya setifer</i>	58	3,5	0	0	2	65,2–652	1	n/a	n/a	n/a	n/a		
<i>Demospongia</i>	105	1	1,5	0	1	49,2–492	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a		

10⁻¹, 10⁻² – redčitev; Inh. – inhibicija; Zmr. – zmanjšana rast; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 9: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu *S. aureus* (MRSA) S-943

Spužva	Vzorec	<i>S. aureus</i> (MRSA) S-943						MIK (µg/ml)	
		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}			
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.		
<i>Hexactinellida</i>	4	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	47,2–472	
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	1	4	2	1	n/a	n/a	8,96–89,6	
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	2	0	n/a	n/a	n/a	n/a	59,4–594	
<i>Halichondria osculum</i>	45h	1	0,5	n/a	n/a	n/a	n/a	30,6–306	

10^{-1} – 10^{-3} - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 10: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu *S. pseudintermedius* (MRSP) S-053

Spužva	Vzorec	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-053						MIK (µg/ml)	
		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}			
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.		
<i>Hexactinellida</i>	4	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	4	1	0,5	3,5	0	0	8,96–89,6	
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	1,5	0	0	0	0	0	59,4–594	
<i>Halichondria osculum</i>	45h	1,5	0	0	0	0	0	30,6–306	

10^{-1} – 10^{-3} - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 11: Cone inhibicije v milimetrih pri kliničnem izolatu *S. pseudintermedius* (MRSP) S-043

Spužva	Vzorec	<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-043						MIK (µg/ml)	
		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}			
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.		
<i>Hexactinellida</i>	4	1,5	0	0,5	0	n/a	n/a	47,2–472	
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	2	3	1	1	0,5	1	0,896–8,96	
<i>Demospongia</i>	38	1,5	0	0,5	1,5	n/a	n/a	5,44–544	
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	2	0	0	1	n/a	n/a	59,4–594	
<i>Halichondria osculum</i>	45h	2	0	0	1	n/a	n/a	30,6–306	

10^{-1} – 10^{-3} - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 12: Cone inhibicije v milimetrih pri živilskem izolatu *L. monocytogenes*

Spužva	Vzorec	<i>L. monocytogenes</i>						MIK (µg/ml)
		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	5,5	0	0	2	0	n/a	89,6–896
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	1	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	1	0	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

10⁻¹–10⁻³ - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 13: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu *Macrococcus 1F*

Spužva	Vzorec	<i>Macrococcus 1F</i>						MIK (µg/ml)
		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	
<i>Rossella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	3	2	0	n/a	n/a	n/a	n/a	38,0–380
<i>Hexactinellida</i>	4	3	0	n/a	n/a	n/a	n/a	47,2–4,2
<i>Monosyringa</i> sp.	6	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Bathydorus</i> sp.	8	1	0,5	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Myxilla</i>	26	3	1	0	0	n/a	n/a	74,0–740
<i>Chinachyra</i>	27	2	0	n/a	n/a	n/a	n/a	34,6–346
<i>Rosella</i> sp.	34	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	36	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	9	0	6	0	0	0	8,96–89,6
<i>Demospongia</i>	38	2,5	0	6	0	0	0	5,44–54,4
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	1	1,5	0	0	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	3	3	9	0	0	0	5,94–59,4
<i>Microcionidae</i>	41	1	1	0	0	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	1	1	0	0	n/a	n/a	n/a
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3	0	7	0	0	0	3,06–30,6
<i>Latrunculia</i>	46	1,5	0	0	0	n/a	n/a	71,6–716
<i>Xestospongia</i>	48/1	1	2	0	0	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 1	48/2	2,5	0	2	0	0	0	6,94–69,4
<i>Isodictya toxophila</i>	51	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Haliclona flagellifera</i>	56	1	2	0	0	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	3	2	6	0	0	0	6,52–65,2
<i>Suberitidae</i> gen. sp.	63	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	2	1	n/a	n/a	n/a	n/a	49,2–492
<i>Tetillidae</i>	119	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	124	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rosella racovitzae</i>	166	1,5	1	n/a	n/a	n/a	n/a	64,8–648
<i>Rosella</i> sp.	167	1	1	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	2	0	n/a	n/a	n/a	n/a	67,2–672

10⁻¹–10⁻³ - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 14: Cone inhibicije (mm) pri laboratorijskem sevu *B. subtilis* EXB-V68

Spužva	Vzorec	<i>B. subtilis</i> EXB-V68						MIK (µg/ml)
		10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	
<i>Hexactinellida</i>	4	2	0	1	0	n/a	n/a	4,72–47,2
<i>Myxilla</i>	26	2	0	1	0	n/a	n/a	7,4–74
<i>Chinachyra</i>	27	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	34,6–346
<i>Demospongia</i>	36	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	37,0–370
<i>Rossella racovitzae</i>	37R	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	57,4–574
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	6	0	3	0	1	0	0,896–8,96
<i>Demospongia</i>	38	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	54,4–544
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	2	0	1	0	n/a	n/a	7,22–72,2
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	2,5	0	1	0	n/a	n/a	5,94–59,4
<i>Microcionidae</i>	41	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	44,6–446
<i>Rosella cf. racovitzae</i>	43	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	64,0–640
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3	0	2	0	1	0	0,306–3,06
<i>Demospongia</i>	45d	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	38,8–388
<i>Latrunculia</i>	46	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	71,6–716
<i>Homaxinella</i>	52	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	46–460
<i>Tetillia</i>	55	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	42,4–424
<i>Isodictya setifer</i>	58	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	65,2–652
<i>Tetillidae</i>	119	2	0	1,5	0	n/a	n/a	10,26– 102,6
<i>Demospongia</i>	124	2	0	1	0	n/a	n/a	4,96– 49,6
<i>Rosella cf. nuda/vanhoeffeni</i>	132	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	61,4– 614
<i>Rossella racovitzae</i>	166	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	64,8– 648
Neidentificirana spužva 2	604	1,5	0	n/a	n/a	n/a	n/a	67,2– 672

10⁻¹–10⁻³ - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr - zmanjšana rast, MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

Preglednica 15: Cone inhibicije v milimetrih pri komenzalnem kožnem izolatu
Micrococcus 2F

Spužva	Vzorec	<i>Micrococcus 2F</i>						MIK (µg/ml)
		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}		
		Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	Inh.	Zmr.	
<i>Hexactinellida</i>	4	4	0	1	0	n/a	n/a	47,2–472
<i>Myxilla</i>	26	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Chinachyra</i>	27	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Latrunculia cf. lendenfeldi</i>	37L	9	0	2	1	0	0	8,96–89,6
<i>Demospongia</i>	38	6	0	0	3	0	0	54,4–544
<i>Haliclona (Gellius) flagellifera</i>	40a	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Hemigellius bidens</i>	41a	6	0	0	2	0	0	59,4–594
<i>Halichondria osculum</i>	45h	3	0	1	0	0	0	3,06–30,6
<i>Latrunculia</i>	46	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya toxophila</i>	51	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Homaxinella</i>	52	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Tetillia</i>	55	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Isodictya setifer</i>	58	4	0	1	0	0		65,2–652
<i>Suberitidae gen. sp.</i>	63	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Demospongia</i>	105	2	0	1	0	0	0	49,2–492
<i>Tetillidae</i>	119	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella racovitzae</i>	166	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>Rossella</i> sp.	167	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
Neidentificirana spužva 2	604	*	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a

* - tvorba pigmenta; 10^{-1} – 10^{-3} - redčitev; Inh. - inhibicija; Zmr. - zmanjšana rast; MIK - minimalna inhibitorna koncentracija



Slika 5: Cona zmanjšane rasti pri bakteriji *S. pseudintermedius* (MRSP) S-053. Levo: osvetlitev od zgoraj; desno: osvetlitev od zadaj.

4.3 POZITIVNA KONTROLA

Inhibicijo rasti na bakterijskih izolatih, ki jo povzročajo etanolni izvlečki sružev smo primerjali z inhibicijo, ki jo povzročijo antibiotiki.

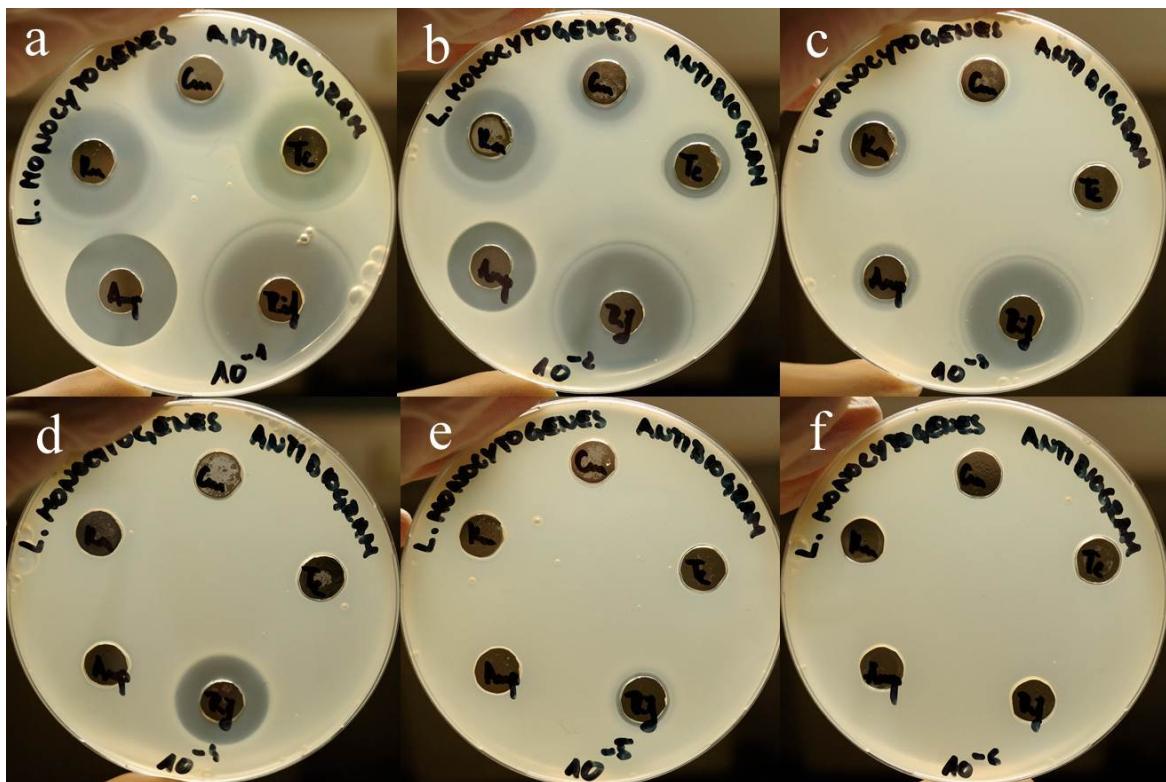
Med po Gramu negativnimi bakterijami je bil najučinkovitejši tetraciklin. Pri 10 od 11 testiranih po Gramu negativnih bakterijah je učinkoval z izmerjeno MIK med 1 in 10 µg/ml ali manj, kar je v območju koncentracij izvlečkov iz sružev. Sledil je kloramfenikol z učinkom pri 8 od 11 testiranih z izmerjeno MIK pod 10 µg/ml. Najmanj učinkovit je bil ampicilin z učinkom le pri eni bakteriji z izmerjeno MIK med 1 in 10 µg/ml, dve bakteriji pa sta bili nanj celo rezistentni.

Pri po Gramu pozitivnih izolatih je bil najbolj učinkovit rifampicin. Pri vseh 9 izolatih smo izmerili MIK med 0,1 in 1 µg/ml ali manj. Sledita mu kanamicin in kloramfenikol z izmerjenim MIK manjšim od 10 µg/ml pri 7 in tetraciklin pri 6 izolatih.

Preglednica 16: Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) antibiotikov proti testiranim bakterijam

Bakterije	MIK posameznih antibiotikov(µg/ml)				
	Tc	Cm	Kn	Amp	Rif
<i>E. coli</i> EXB-V1	1–10	0,1–1	1–10	10–100	1–10
<i>E. coli</i> HB101	0,1–1	1–10	10–100	10–100	10–100
ESBL- <i>E. coli</i> 30 (CTX-M-2)	1–10	0,1–1	1–10	rezistentna	10–100
ESBL- <i>E. coli</i> 192 (CTX-M-9; ST131)	0,1–1	1–10	1–10	10 ⁴ –10 ⁵	10–100
ESBL- <i>E. coli</i> 206 (CTX-M-1, ST131)	1–10	1–10	10–100	1000–10000	1–10
<i>P. aeruginosa</i> EXB-V28	1–10	100–1000	10–100	100–1000	10–100
<i>P. aeruginosa</i> 06131	10–100	1–10	100–1000	100–1000	10–100
<i>P. aeruginosa</i> 8591	1–10	10–100	10–100	1000–10000	10–100
<i>Enterobacter</i> sp. EXB-V11	1–10	1–10	10–100	100–1000	10–100
KPC <i>K. pneumoniae</i>	1–10	100–1000	100–1000	rezistentna	10–100
<i>Acinetobacter</i> sp. 1C	0,001–0,01	1–10	100–1000	1–10	0,1–1
<i>S. epidermidis</i> EXB-V55	0,1–1	1–10	0,1–1	0,1–1	0,01–0,1
<i>S. aureus</i> 10F	1–10	10–100	1–10	0,1–1	0,1–1
<i>S. aureus</i> (MRSA) S-943	10–100	1–10	1–10	100–1000	0,001–0,01
<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-053	1–10	100–1000	100–1000	1000–10000	0,01–0,1
<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-043	10–100	1–10	100–1000	100–1000	0,01–0,1
<i>B. subtilis</i> EXB-V68	0,01–0,1	0,1–1	1–10	1–10	0,01–0,1
<i>Macrococcus</i> sp. 1F	0,1–1	1–10	0,01–0,1	0,1–1	0,001–0,01
<i>Micrococcus</i> sp. 2F	0,1–1	1–10	1–10	0,1–1	0,001–0,01
<i>L. monocytogenes</i>	10–100	1–10	1–10	100–1000	0,001–0,01

Tc – tetraciklin; Cm – kloramfenikol; Kn – kanamicin; Amp – Ampicilin; Rif – Rifampicin; MIK – minimalna inhibitorna koncentracija



Slika 6: Pozitivna kontrola z antibiotiki pri bakteriji *Listeria monocytogenes*. Slike od a do f prikazujejo zaporedno redčenje antibiotikov od 10^{-1} do 10^{-6} .

4.4 NEGATIVNA KONTROLA

Z negativno kontollo smo želeli dokazati, kakšen vpliv ima na bakterije 96% etanol. Cona inhibicije je bila povsod manjša ali enaka 1 mm, zato rezultatov, ki so bili enaki ali manjši od inhibicije etanola, nismo upoštevali.

Preglednica 17: Vpliv etanola na rast testiranih bakterijskih sevov.

Bakterije	Cone inhibicije (mm)			
	1.	2.	3.	4.
<i>E. coli</i> EXB-V1	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>E. coli</i> HB101	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
ESBL- <i>E. coli</i> 30 (CTX-M-2)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
ESBL- <i>E. coli</i> 192 (CTX-M-9; ST131)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
ESBL- <i>E. coli</i> 206 (CTX-M-1, ST131)	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>P. aeruginosa</i> EXB-V28	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>P. aeruginosa</i> 06131	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>P. aeruginosa</i> 8591	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>Enterobacter</i> sp. EXB-V11	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
KPC <i>K. pneumoniae</i>	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>Acinetobacter</i> sp. 1C	<1	<1	<1	<1
<i>S. epidermidis</i> EXB-V55	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5
<i>S. aureus</i> 10F	<1	<1	<1	<1
<i>S. aureus</i> (MRSA) S-943	<1	<1	<1	<1
<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-053	0	0	0	0
<i>S. pseudintermedius</i> (MRSP) S-043	0	0	0	0
<i>B. subtilis</i> EXB-V68	1	1	1	1
<i>Macrococcus</i> sp. 1F	1	1	1	1
<i>Micrococcus</i> sp. 2F	<1	<1	<1	<1
<i>L. monocytogenes</i>	<0,5	<0,5	<0,5	<0,5

1. – 4. ponovitve



Slika 7: Negativna kontrola pri bakteriji *Enterobacter* sp.

5 RAZPRAVA

Naš namen je bil preučiti protibakterijske učinke etanolnih izvlečkov iz antarktičnih spužev na medicinsko pomembne bakterijske izolate, kot so MRSA, *E. coli* z β -laktamazami razširjenega spektra, na nekatere antibiotike rezistentni *Pseudomonas aeruginosa* in v veterinarski medicini pomemben MRSP. Preverili smo tudi protibakterijske učinke na laboratorijske seve, komenzalne in živilske izolate. Rezultate protibakterijske aktivnosti smo primerjali med po Gramu pozitivnimi in po Gramu negativnimi bakterijami. Rezultate smo ravno tako primerjali z že obstoječimi podatki iz literature.

Pri negativni kontroli inhibicije bakterijske rasti smo ugotovili, da etanol le neznatno inhibira bakterijsko rast v območju največ 1 mm od roba luknjice, zato inhibicije mikrobne rasti, ki je bila manjša ali enaka 1 mm, nismo upoštevali.

5.1 PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE

Inhibicijo mikrobne rasti je pri po Gramu negativnih bakterijah kazalo le 6 izvlečkov od 33 testiranih. Izvlečki so bili aktvni pri 7 od 11 testiranih po Gramu negativnih bakterijah.

E. coli EXB-V1 je bila rahlo občutljiva na izvlečka 37L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi* in 41a iz vrste *Hemigellius bidens*. Premer inhibicijske cone je bil 2 mm oziroma 1,5 mm, MIK pa smo izmerili med 89,6 in 896 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ter med 59,4 in 594 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Izvlečkov nadalje nismo redčili zaradi majhne cone inhibicije.

Enake rezultate pri istih izvlečkih smo dobili tudi pri laboratorijskem sevu *E. coli* HB101.

ESBL-*E. coli* 30 (CTX-M-2), ESBL-*E. coli* 192 (CTX-M-9; ST131) in ESBL-*E. coli* 206 (CTX-M-1; ST131) so bile podobno občutljive na izvlečke sružev. Pri vseh smo pri izvlečku 37L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi* odčitali MIK pri prvem nanosu in sicer med 89,6 in 896 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Inhibicijske cone si bile podobne med sabo – 2 mm pri ESBL-*E. coli* 30 (CTX-M-2) oz 1,5 mm pri ESBL-*E. coli* 192 (CTX-M-9; ST131) in ESBL-*E. coli* 206 (CTX-M-1; ST131). Za izvleček 37L so bile inhibicijske cone kakor tudi MIK enake kakor pri laboratorijskih sevih *E. coli* EXB-V1 in *E. coli* HB101.

Pri sevih *E. coli* smo pričakovali tudi aktivnost izvlečkov sružev iz rodu *Xestospongia* a so bile naše ugotovitve v nasprotju z navedbami v literaturi (Jiménez in Crews, 1990), verjetno zaradi uporabe drugačnega topila za ekstrakcijo.

P. aeruginosa EXB-V28 in *P. aeruginosa* 1958 sta bila na izvlečke neobčutljiva. Največja cona inhibicije, ki smo jo izmerili pri laboratorijskem sevu *P. aeruginosa* EXB-V28, je bila 1 mm, česar zaradi vpliva etanola nismo upoštevali. *P. aeruginosa* 06131 pa je bil občutljiv na izvleček 37L in 41a, s cono inhibicije 2 oziroma 1,5 mm. MIK smo določili med 89,6 in 896 oz. med 59,4 in 594 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Enterobacter EXB-V11 in KPC *Klebsiella pneumoniae* nista bili občutljivi na noben izvleček.

Pri *Acinetobacter* 1C smo opazili občutljivost na največ izvlečkov med po Gramu negativnimi bakterijami. Občutljiv je bil na 6 izvlečkov, in sicer izvleček z oznako 26, sružve iz rodu *Myxilla*, 37L iz vrste *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, 38 iz rodu *Demospongia*, 41a iz vrste *Hemigellius bidens*, 43 iz vrste *Rosella* cf. *racovitzae* in 45h iz vrste *Halichondria osculum*. Največji premer cone inhibicije, 5 mm, smo zasledili pri izvlečku 37L, ki smo ga nato redčili. Pri 100x redčitvi je bila cona inhibicije velika le 2 mm, po 1000x redčitvi pa je izginila. MIK smo izmerili med 8,96 in 89,6 µg/ml. Pri izvlečku 45h smo opazili cono inhibicije s premerom 4,5 mm, pri 100x redčitvi pa je bila velika le še 1 mm. MIK smo določili med 3,06 in 30,6 µg/ml.

Pri občutljivih, po Gramu negativnih izolatih smo opazili, da se protibakterijski učinki pojavljajo pri dveh izvlečkih, 37L iz sružve vrste *Latrunculia* cf. *lendenfeldi* in 41a iz sružve vrste *Hemigellius bidens*. Za izvlečke iz sružve *Latrunculia* velja, da imajo protibakterijske lastnosti (Capon in sod., 1987; Perry in sod., 1988a, 1988b; McClintock, 1992; Copp in sod., 1994; Ford in Capon, 2000), medtem ko za rod *Hemigellius* druge literature, razen objavljenega članka naše skupine (Turk in sod., 2013) nismo zasledili. Sevi *E. coli* so bili podobno občutljivi na najbolj aktivne izvlečke, ne glede na antibiotično rezistenco.

Pri izolatih iz rodu *Pseudomonas* smo občutljivost na izvlečke opazili pri rezistentnem sevu *P. aeruginosa* 06131, medtem ko pri nerezistentnem *P. aeruginosa* EXB-V28 in rezistentnem *P. aeruginosa* 1958 občutljivosti ni bilo zaznati.

Pri izolatu *Enterobacter* EXB-V11 nismo zaznali občutljivosti na izvlečke.

Pri bakteriji *Klebsiella pneumoniae* KPC prav tako nismo opazili občutljivosti na izvlečke, čeprav v literaturi, sicer pri nerezistentnem sevu, navajajo občutljivost na izvlečke antarktičnih sružev iz vrst *Cinachyra antarctica*, *Isodictya erinacea*, *Homixinella* (navedeno kot *Homaxonella*), in *Latrunculia* (McClintock in Gauthier, 1992). Neobčutljivost je verjetno povezana z nastankom karbapenemaz ali efluksnih črpalk. Izolat *Acinetobacter* sp. 1C je bil občutljiv na največ izvlečkov, poleg 37L in 41h tudi na izvleček 45h iz vrste *Halichondria osculum*, 26 iz sružve *Myxilla* sp., 38 iz nedoločene vrste *Demospongia* in 43 iz vrste *Rosella* cf. *racovitzae*. Iz subtropskih sružev rodu *Halichondria* so doslej izolirali lektine (Kawsar in sod., 2010), ki naj bi bili bolj aktivni pri inhibiciji po Gramu pozitivnih bakterijah, podatkov o protibakterijskih učinkovinah iz drugih vrst sružev pa v objavljeni literaturi nismo zasledili.

Iзвlečki, ki so kazali protibakterijske lastnosti, so imeli po večini slabšo sposobnost zaviranja protibakterijske rasti kakor preizkušani antibiotiki. Pri po Gramu negativnih bakterijah se je MIK izvlečkov gibala med 3,06 in 896 µg/ml, medtem ko je imela pri antibiotikih precej večji razpon. Izvlečki so pri laboratorijskih sevih *E. coli* imeli slabši učinek kakor antibiotiki, pri rezistentnih kliničnih izolatih, pa so bili, kljub majhni coni inhibicije, bolj učinkoviti kot ampicilin, čeprav naj bi bili ti izolati nanj neobčutljivi. Aktivnost izvlečkov pri kliničnem izolatu *P. aeruginosa* 06131 je bila primerljiva z aktivnostjo kanamicina in ampicilina. Pri *Acinetobacter* sp. 1C imajo izvlečki podobno aktivnost kot kloramfenikol, kanamicin in ampicilin.

5.2 PO GRAMU POZITIVNE BAKTERIJE

Po Gramu pozitivne bakterije so bila na delovanje izvlečkov bolj očutljive. Nanje je vplivalo kar dobre tri četrtine od vseh testiranih izvlečkov. Vse testirane po Gramu pozitivne bakterije so bile občutljive na vsaj en izvleček.

Laboratorijski sev *S. epidermidis* EXB-V55 je bil občutljiv na 7 izvlečkov. Največji izmerjeni premer cone inhibicije, 6 mm, smo opazili pri izvlečku 41a, pri redčenju pa smo dobili le še cono zmanjšane rasti s premerom 4 mm. MIK smo določili med 59,4 in 594 µg/ml. Učinkovit pa je bil tudi izvleček 37L s premerom inhibicijske cone 4,5 mm, kjer smo opazili tudi območje zmanjšane rasti v premeru 2 mm. Po redčenju cone inhibicije ni bilo. MIK smo določili med 89,6 in 896 µg/ml. Izstopal je še izvleček 58 iz vrste *Isodictya setifer*, s premerom inhibicijske cone 3 mm, po redčenju pa smo izmerili le cono zmanjšane rasti s premerom 2 mm. MIK smo določili med 65,2 in 652 µg/ml. Protibakterijsko aktivnost izvlečka iz rodu *Isodictya* navajajo Moon in sodelavci (1998), vendar je v svojem delu uporabil vrsto *Isodictya eriancea*. Šlo je za učinkovino erinacean.

Komenzalni kožni izolat *S. aureus* 10F je bil občutljiv na 4 izvlečke, med katerimi imata največji premer cone inhibicije spet izvlečka 37L (5 mm) in 41a (2 mm). Po redčenju aktivnosti ni bilo. MIK smo določili med 89,6 in 896 µg/ml ter med 59,4 in 594 µg/ml. Izvlečka 4 in 45h sta imela premer cone inhibicije 1,5 mm, MIK pa smo določili med 47,2 in 472 µg/ml in med 30,6 in 306 µg/ml. Izvleček 27 iz vrste *Cinachyra* sp., verjetno zaradi drugačnega ekstrakcijskega topila, ni kazal nobene aktivnosti proti omenjenem izolatu, čeprav bi po rezultatih iz literature to lahko pričakovali (McClintock in Gauthier, 1992). Glede na literaturo (Moon in sod., 1998) smo pričakovali tudi aktivnost izvlečkov iz rodu *Isodictya* – 51 in 58.

S. aureus (MRSA) S-943 je bil občutljiv na 4 izvlečke, vendar so bile cone inhibicije razmeroma majhne. Pri izvlečku 41a iz sružve *Hemigellius bidens* smo izmerili inhibicijsko cono s premerom 2 mm, po redčenju pa nismo opazili nobene inhibicije. MIK smo določili med 59,4 in 594 µg/ml. Izvleček 4 iz sružve iz rodu *Hexactinellida* je povzročil inhibicijo v premeru 1,5 mm, MIK smo določili med 47,2 in 472 µg/ml. Pri vzorcu 37L smo izmerili 1 mm inhibicijske cone s 4 mm cone zmanjšane rasti, ki je po redčenju povzročil 2 mm veliko cono inhibicije in mm veliko področje zmanjšane rasti. MIK smo določili med 8,96 in 89,6 µg/ml. Za izvlečke iz arktične vrste *Latrunculia* vemo, da inhibirajo rast MRSA (Na in sod., 2010). Šibko cono inhibicije (1 mm) smo izmerili tudi pri izvlečku 45h, kjer je bila tudi prisotna majhna (0,5 mm) cona zmanjšane rasti. MIK je bila med med 30,6 in 306 µg/ml.

S. pseudintermedius (MRSP) S-053 je bil občutljiv na 3 izvlečke. Največjo aktivnost smo spet zasledili pri izvlečku 37L, kjer smo izmerili inhibicijsko cono s 4 mm premera, spremljala pa jo je cona zmanjšane rasti s premerom 1 mm. Po redčenju je cona inhibicije izginila, ostala je le še šibka cona zmanjšane rasti. MIK smo določili med 8,96 in 89,6 µg/ml. Izvlečka 41a in 45h sta bila manj aktivna, cona inhibicije je imela le 1,5 mm premera. MIK smo določili med 59,4 in 594 µg/ml ter med 30,6 in 306 µg/ml.

S. pseudointermedius (MRSP) S-043 je bil sicer občutljiv na 5 izvlečkov, vendar so bile cone inhibicije zato manjše. Največjo cono inhibicije smo opazili pri izvlečkih 37L, 41a in 45h, premer je bil zgolj 2 mm. Pri izvlečku 37L smo izmerili tudi cono zmanjšane rasti s premerom 3 mm, zato smo vzorec redčili. Pri 100x redčitvi je imela cona inhibicije premer 1 mm, opazili pa smo še 1 mm cone zmanjšane rasti. Pri 1000x redčitvi je bil premer cone inhibicije le 1 mm, izmerili pa smo tudi 1 mm cone zmanjšane rasti, zato smo MIK določili med med 0,896 in 8,96 µg/ml. Izvlečka 41a in 45h sta imela enako cono inhibicije, ki je po redčenju izginila, opazili smo le šibko cono zmanjšane rasti, zato smo MIK določili med 59,4 in 594 µg/ml oziroma med 30,6 in 306 µg/ml. Izvlečka 4 in 38 sta imela preme inhibicijske cone 1,5 mm. Po redčenju je izvleček 4 imel inhibicijsko cono s premerom 0,5 mm brez cone zmanjšane rasti, zato smo določili MIK med 47,2 in 472 µg/ml. Pri izvlečku 38 smo po 100x redčenju opazilcono inhibicije s premerom 0,5 mm in cono zmanjšane rasti s premerom 1,5 mm. Pri 1000x redčenju niso zasledili cone inhibicije ali cone zmanjšane rasti, zato smo določili MIK med 5,44 in 54,4 µg/ml.

B. subtilis EXB-V86 je bil občutljiv na kar 22 izvlečkov, največjo cono inhibicije pa smo izmerili pri izvlečku 37L iz vrste *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, ki je pri 10x redčenemu vzorcu merila 6 mm, pri 100x redčivi 3 mm in pri 1000x redčitvi 1 mm. Določili smo tudi MIK med 0,896 in 8,96 µg/ml. Za protibakterijsko učinkovitost izvlečka iz omenjenega rodu spužev zasledimo podatke tudi v literaturi (Capon in sod., 1987) Sledil je izvleček 45h s premerom inhibicijske cone 3 mm, pri 100x redčitvi 2 mm in pri 1000x redčitvi 1 mm, tu smo določili tudi najnižjo vrednost MIK med med 0,306 in 3,06 µg/ml. McClintock (1993) v svojem delu navaja protibakterijske aktivnosti sružev iz rodov *Haliclona*, *Isodictya*, *Rosella*, *Latrunculia* in *Tetilla* tudi proti *B. subtilis*. Pri testiranih izvlečkih, z izjemo 37 iz *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, smo opazili zgolj šibko protibakterijsko aktivnost omenjenih rodov, neaktivni pa so bili izvlečki št. 4 iz vrste *Rossella* cf. *nuda/vanhoeffeni*, 51 iz vrste *Isodictya toxophila* in 167 iz neznane vrste *Rossella* sp. To bi lahko pripisali drugačnemu topilu, ki smo ga uporabili pri ekstrakcijah.

Podobno je bilo pri komenzalnem kožnem izolatu *Macrococcus* sp. 1F. Občutljiv je bil na 14 izvlečkov, ki smo jih nato redčili. Največjo inhibicijsko cono, s premerom 9 mm, smo spet izmerili pri izvlečku 37L, ki je po 100x redčenju še vedno merila 6 mm, po 1000x redčenju izvlečka pa je izginila. MIK smo določili med 8,96 in 89,6 µg/ml. Cono inhibicije s premerom 3 mm smo izmerili še pri izvlečkih 4, 26, 41a, 45h in 58. Pri izvlečkih 38, 41a, 45h in 58 smo opazili, da se je cona inhibicije po redčenju izvlečka povečala tudi do 3x, največ na 9 mm premera. Z nadaljnim redčenjem je cona inhibicije izginila. Ker smo imeli redčene izvlečke pripravljene že prej in smo jih uporabili tudi pri drugih bakterijah, prav tako pa smo jih imeli shranjene na drugem stojalu, ločeno od neredčenih izvlečkov, lahko napake pri redčenju ali napačno izbiro redčitve ovržemo. Verjetno gre tu za sinergistične učinke, do katerih je prišlo pri redčitvi, ko se je vzpostavilo ustrezno razmerje med učinkovinami. Pri drugih izvlečkih (3, 27, 46, 48/2, 105) je imela cona inhibicije premer od 1,5 do 2,5 mm. Zanimivo je, da je bil *Macrococcus* sp. 1F edini občutljiv sev na izvleček 48/2, kjer smo izmerili cono inhibicije s premerom 2,5 mm. Tudi po 100x redčenju je izvleček kazal inhibicijske lastnosti. Izmerili smo cono inhibicije s premerom 2 mm. MIK

smo določili med 6,94 in 69,4 µg/ml. Osemnajst izvlečkov je sicer kazalo šibko inhibicijo rasti, ki bi jo lahko pripisali tudi etanolu, vendar se je pri vseh pojavila tudi cona zmanjšane rasti, najpogosteje s premerom 1 mm.

Komenzalni kožni izolat *Micrococcus* sp. 2F je bil občutljiv na manjše število izvlečkov kot *Macrococcus* sp. 1F, so pa bile cone inhibicije pri posameznih izvlečkih večje. Največjo cono inhibicije s premerom 9 mm smo ugotovili pri izolatu 37L iz sružve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, kar smo zasledili tudi v literaturi (McClintock in Gauthier, 1992). Po 100x redčenju izvlečka se je cono inhibicije zmanjšala na 2 mm, po 1000x redčenju pa smo zabeležili le še cono zmanjšane rasti. MIK smo določili med 8,96 in 89,6 µg/ml. Pri izvlečkih 38 in 41a smo izmerili 6 mm inhibicije, ki je po redčenju izvlečka izginila, izmerili smo le še 2-3 mm cone zmanjšane rasti. MIK smo določili med 54,4 in 544 µg/ml oziroma med 59,4 in 594 µg/ml. Pri izvlečku z oznako 58 smo izmerili cono inhibicije s 4 mm premera, po redčenju pa le še 1 mm. MIK smo določili med 65,2 in 652 µg/ml. Pri izvlečkih, ki sicer niso kazali protibakterijskega delovanja (26, 27, 40a, 46, 51, 52, 55, 63, 119, 166, 167, 604), smo opazili nastanek pigmenta v bližini nanosa izvlečkov.

L. monocytogenes je bila občutljiva le na izvleček 37L, kjer smo izmerili cono inhibicije s premerom 5,5 mm, po redčenju pa smo lahko izmerili le cono zmanjšane rasti s premerom 2 mm. MIK smo določili med 89,6 in 896 µg/ml. Cono inhibicije s premerom 1 mm smo zasledili še pri izvlečkih 41a in 45h, vendar smo to pripisali vplivu etanola. Razen inhibicije rasti z izvlečki mediteranskih sružev *Agelas oroides* and *Axinella damicornis* (Touati in sod., 2007), drugih podtkov o inhibiciji izvlečkov iz sružev proti tej bakteriji nismo našli.

V literaturi smo zasledili podatke o močni protimikrobnii aktivnosti izvlečkov sružev rodu *Xestospongia* proti po Gramu pozitivnim bakterijam *B. subtilis* in *S. aureus* (Edrada in sod., 1996a, 1996b; Kobayashi in sod., 1993; Jiménes in Crews, 1990;) vendar pri našem izvlečku 48/1 iz sružve rodu *Xestospongia* pri komenzalnem in kliničnih rezistentnih izolatih *S. aureus* protimikrobnii aktivnosti nismo zasledili, pri laboratorijskem sevu *B. subtilis* pa smo zasledili le 1 mm premera con inhibicije in 2 mm cone zmanjšane rasti. Verjetno je posledica večje protimikrobnii aktivnosti iz literature uporaba drugačnih topil za ekstrakcijo.

S. epidermidis EXB-V55 in *S. aureus* 10F sta bolj občutljiva na antibiotike kot na izvlečke, pri *S. aureus* (MRSA) S-943 pa je aktivnost izvlečka 37L primerljiva s tetraciklinom in boljša od ampicilina. Pri *S. pseudintermedius* (MRSP) S-053 je aktivnost izvlečkov 37L boljša od kloramfenikola, kanamicina in ampicilina, aktivnost izvlečkov 41a in 45h pa primerljiva s kanamicinom in kloramfenikolom ter boljša od ampicilina. Pri *S. pseudintermedius* (MRSP) S-043 je aktivnost izvlečka 37L boljša od tetraciklina, kanamicina in ampicilina ter primerljiva s kloramfenikolom. *B. subtilis* EXB-V68 je bil po večini bolj občutljiv na antibiotike, razen v primeru izvlečka 37L in 45h, ki sta bila bolj učinkovita od kanamicina in ampicilina. *Macrococcus* sp. 1F in *Micrococcus* sp. 2F sta bila bolj občutljiva na antibiotike, občutljivost na izvlečke pri bakteriji *Listeria monocytogenes* pa se lahko primerja le z ampicilinom.

5.3 EKOLOŠKI POMEN IZVLEČKOV

Glede na šibko aktivnost izvlečkov proti komenzalnim in klinično pomembnim sevom v primerjavi z učinkovitostjo delovanja proti bakterijskim izolatom iz morske vode (Kosmina, 2012) lahko predpostavimo, da imajo biološko aktivne spojine iz sružev predvsem ekološki pomen in sružam služijo pri obrambi proti prerastu z bakterijami in diatomejami ter proti plenilcem, kot so morske zvezde in raki (McClintock in sod., 2005).

6 SKLEPI

- Po Gramu negativne bakterije so bile na etanolne izvlečke antarktičnih spužev slabše občutljive kot po Gramu pozitivne bakterije. Inhibicijo mikrobne rasti smo zasledili le pri 6 izvlečkih od 33 testiranih. Izvlečki so bili aktivni proti 7 od 11 testiranih po Gramu negativnih bakterij, najbolj občutljiv pa je bil komenzalni kožni izolat bakterije *Acinetobacter* sp.
- Pri po Gramu pozitivnih bakterijah smo opazili večjo protimikrobnoučinkovitost izvlečkov. Inhibicijo mikrobne rasti je kazalo 25 od 33 testiranih izvlečkov. Med bolj aktivnimi so bili izvlečki 37L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi*, ki je bil aktiven pri vseh bakterijskih izolatih, 41a iz vrste *Hemigellius bidens* in 45h iz vrste *Halichondria osculum*, ki sta bila enako aktivna pri 8 izolatih, 4 iz vrste *Hexactinellida* sp. aktiven pri 7 izolatih, 38 iz neznane *Demospongia* pri 5 izolatih in 58 iz vrste *Isodictya setifer*, ki je bil aktiven pri 4 izolatih. Izvlečki so bili najbolj učinkoviti pri inhibiciji *S. epidermidis* EXB-V55, *B. subtilis* EXB-V68, *Macrococcus* sp. 1F in *Micrococcus* sp. 2F.
- Vse bakterije, pri katerih smo po nanosu izvlečkov opazili inhibicijo rasti, so bile občutljive na izvleček 37L iz vrste *Latrunculia cf. lendenfeldi*, kar je v skladu s poročanjem v literaturi in bi bilo lahko povezano s širokim naborom bioaktivnih spojin, ki jih ta rod sružev premore.
- Nekatere po Gramu negativne in skoraj vse po Gramu pozitivne bakterije so bile občutljive tudi na izvleček 41a iz vrste *Hemigellius bidens*, kar nakazuje na nove biološko aktivne spojine.
- Izvlečki sružev *Xestospongia*, katerih rodove najdemo tudi v zmernih in tropskih območjih, niso pokazali protibakterijskega delovanja, za razliko od izvlečkov predstavnikov istega rodu iz tropskih in subtropskih morjih.
- Šibka protibakterijska aktivnost proti komenzalnim in klinično pomembnim sevom v primerjavi z močno protibakterijsko aktivnostjo proti morskim bakterijam in bakterijam, izoliranim iz ledu, kaže na ekološki pomen biološko aktivnih snovi.

7 POVZETEK

Povod za opravljene raziskave v tem magistrskem delu je bilo vse večje naraščanje pojavov neobčutljivosti klinično pomembnih bakterij na antibiotike. Z delom smo poskušali dokazati občutljivost klinično pomembnih bakterijskih izolatov na biološko pomembne spojine v etanolnih izvlečkih iz antarktičnih spužev. Ker raziskav, ki so se s tovrstno problematiko ukvarjale na področju polarnih spužev ni veliko, se nam je to zdelo dobra izhodiščna točka za iskanje novih, medicinsko pomembnih učinkovin.

Protibakterijske lastnosti smo opazili pri 25 od skupno 33 testiranih izvlečkov, pri čemer je bila protibakterijska aktivnost bolj opazna pri po Gramu pozitivnih bakterijah.

Potrdili smo močno protibakterijsko učinkovitost izvlečkov iz sružve *Latrunculia* cf. *lendenfeldi*, protibakterijske učinkovine izvlečkov iz sružve *Hemigeliaus bidens*, ki jih do sedaj, razen naše raziskovalne skupine, ni opisal še nihče drug, pa so dobri kandidati za nadaljnja testiranja in identifikacijo. Izvlečki antarktičnih sružev *Xestospongia*, za razliko izvlečkov predstavnikov istega rodu iz tropskih in subtropskih morjih, niso kazali protibakterijske aktivnosti.

Biološko aktivne spojine iz sružev imajo predvsem ekološki pomen.

8 VIRI

- Appelbaum P. C. 1992. Antimicrobial resistance in *Streptococcus pneumoniae*: An overview. Clinical Infectious Diseases, 15, 1: 77–83
- 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: 2423–2437
- Albrich W. C., Monnet D. L., Harbarth S. 2004. Antibiotic selection pressure and resistance in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. Emerging Infectious Diseases, 10, 3: 514–517
- Alexander T. W., Inglis G. D., Yanke L. J., Topp E., Read R. R., Reuter T., McAllister T. A. 2010. Farm-to-fork characterization of *Escherichia coli* associated with feedlot cattle with a known history of antimicrobial use. International Journal of Food Microbiology, 137: 40–48
- Armstrong E. S., Kostrub C. F., Cass R. T., Moser H. E., Serio A. W., Miller G. H. 2012. Aminoglycosides. V: Antibiotic discovery and development. Dougherty T. J., Pucci M. J. (eds.). New York, Springer: 229–269
- Allen H. K., Cloud-Hansen K. A., Wolinski J. M., Guan C., Greene S., Lu S., Boeyink M., Broderick N. A., Raffa K. F., Handelsman J. 2009. Resident microbiota of the gypsy moth midgut harbors antibiotic resistance determinants. DNA and Cell Biology, 28: 109–117
- Amsler C. D., Iken K. B., McClintock J. B., Baker B. J. 2001. Secondary metabolites from antarctic marine organisms and their ecological implications. V: Marine chemical ecology. McClintock J. B., Baker B. J. (eds.). Boca Raton, CRC Press: 267–300
- Ang K. K. H., Holmes M. J., Higa T., Hamann M. T., Kara U. A. K. 2000. *In vivo* antimalarial activity of the β-carboline alkaloid manzamine A. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 44, 6: 1645–1649
- Ang K. K. H., Holmes M. J., Kara U. A. K. 2001. Immunemediated parasite clearance in mice infected with *Plasmodium berghei* following treatment with manzamine A. Parasitology Research, 87, 9: 715–721
- Arhin F. F. et al. 2012. Glycopeptides and lipoglycopeptides. V: Antibiotic discovery and development. Dougherty T. J., Pucci M. J. (eds.). New York, Springer: 301–346
- Bai R. L., Paull K. D., Herald C. L., Malaspis L., Pettit G. R., Hamel E. 1991. Halichondrin B and hemochalichondrin B, marine natural products binding in the vinca domain of tubulin: discovery of tubulin-based mechanism of action by analysis of differential cytotoxicity data. Journal of Biological Chemistry, 266: 15882–15889

- Bai R., 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: 757–766
- Baker B. J., Kopitzke R. W., Yoshida W. Y., McClintock J. B. 1995. Chemical and ecological studies of the Antarctic sponge *Dendrilla membranosa*. *Jornual of Natural Products*, 58, 9: 1459–1462
- Bakus G. J., Green G. 1974. Toxicity in sponges and holothurians: A geographic pattern. *Science*, 185, 4155: 951–953
- Baquero F., Martinez J. L., Canton R. 2008. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 19: 260–265
- Bennet C. F., Mong S., Clark M. A., Kruse L. J., Crooke S. T. 1987. Differential effects of manoalide on secreted intracellular phospholipases. *Biochemical Pharmacology*, 36: 2079–2086
- Benveniste R., Davies J. 1973. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70: 2276–2280
- Bergman W., Feeny R. J. 1951. Contributions to the study of marine products. XXXII. The nucleosides from sponges 1. *Journal of Organic Chemistry*, 16: 981–987
- 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. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 5565–5570
- Bondi A., Dietz C. C. 1945. Penicillin resistant staphylococci. *Experimental Biology and Medicine*, 60: 55–58
- Bonnedahl J., Drobni M., Gauthier-Clerc M., Hernandez J., Granholm S., Kayser Y., Melhus A., Kahlmeter G., Waldenstrom J., Johansson A., Olsen B. 2009. Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France. *PLoS One*, 4, 6: e5958, doi: 10.1371/journal.pone.0005958: S1–S6
- Bozdogan B., Esel1 D., Whitener C., Browne F. A., Appelbaum P. C. 2003. Antibacterial susceptibility of a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated at the Hershey Medical Center. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52: 864–868
- Bradshaw D., Hill C. H., Nixon J. S., Wilkinson S. E. 1993. Therapeutic potential of protein kinase C inhibitors. *Agents and Actions*, 35: 135–147

- Brown M. G., Balkwill D. L. 2009. Antibiotic resistance in bacteria isolated from the deep terrestrial subsurface. *Microbial Ecology*, 57: 484–493
- Bubb M. R., Spector I., Bershadsky A. D., Korn E. D. 1995. Swinholide A is a microfilament disrupting marine toxin that stabilizes actin dimers and severs actin filaments. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 3463–3466
- Burgoyne D. L., Andersen R. J. 1992. Contignasterol, a highly oxygenated steroid with the "unnatural" 14 β configuration from the marine sponge *Petrosia contignata* Thiele, 1899. *Journal of Organic Chemistry*, 57: 525–528
- Burres N. S., Clement J. J. 1989. Antitumor activity and the mechanism of action of the novel marine natural products mycalamide-A and -B and onnamide. *Cancer Research*, 49: 2935–2940
- Canton R., Coque T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9, 5: 466–475
- Capon R. J., MacLeod J. K., Will A. C. 1987. Trunculins A and B, norsesterterpene cyclic peroxides from a marine sponge, *Latrunculia brevis*. *Journal of Organic Chemistry*, 52: 339–342
- Chen M. H., Wang S. W., Hwang W. Z., Tsai S. J., Hsieh Y. C., Chiou C. S., Tsen H. Y. 2010. Contamination of *Salmonella* Schwarzengrund cells in chicken meat from traditional marketplaces in Taiwan and comparison of their antibiograms with those of the human isolates. *Poultry Science*, 89: 359–365
- Chopra I., Roberts M. 2001. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65, 2: 232–260
- Copp B. R., Fulton K. F., Perry N. B., Blunt J. W., Munro M. H. G. 1994. Natural and synthetic derivatives of discorhabdin C, a cytotoxic pigment from the New Zealand sponge *Latrunculia* cf. *bocagei*. *Journal of Organic Chemistry*, 59: 8233–8238
- Coque T.M., Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J., Peixe L., Baquero F., Cantón R., Nordmann P. 2008. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, 14: 195–200
- Cortés P., Blanc V., Mora A., Dahbi G., Blanco J. E., Blanco M., Lopez C., Andreu A., Navarro F., Alonso M. P., Bou G., Llagostera M. 2010. Isolation and characterization of potentially pathogenic antimicrobial-resistant *Escherichia coli* strains from chicken and pig farms in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 2799–2805

- Costantino V., Fattorusso E., Mangoni A., Di Rosa M., Ianaro A. 1999 Glycolipids from sponges, VII: simplexides, novel immunosuppressive glycolipids from the Caribbean sponge *Plakortis simplex*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9: 271–276
- Coue M., Brenner S. L., Spector I., Korn E. D. 1987. Inhibition of actin polymerization by latrunculin A. *FEBS Letters*, 213: 316–318
- Cundliffe E. 1989. How antibiotic-producing organisms avoid suicide. *Annual Review of Microbiology*, 43: 207–233
- D'Ambrosio M., Guerriero A., Debitus C., Pietra F. 1996. Leucascandrolide A, a new type of macrolide: the first powerfully bioactive metabolite of calcareous sponges (*Leucascandra caveolata*, a new genus from the coral sea). *Helvetica Chimica Acta*, 79, 1: 51–60
- D'Costa V. M., McGrann K. M., Hughes D. W., Wright G. D. 2006. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 311, 5759: 374–377
- De Guzman F. S., Carte B., Troupe N., Faulkner D. J., Harper M. K., Conception G. P., Mangalindan G. C., Matsumoto S. S., Barrows L. R., Ireland C. M. 1999. Neoamphimedine: a new pyridoacridine topoisomerase II inhibitor which catenates DNA. *Journal of Organic Chemistry*, 64: 1400–1402
- de Leone P. A., Redburn J., Hooper J. N. A., Quinn R. J. 2000. Polyoxygenated *Dysidea* sterols that inhibit the binding of [¹²⁵I] IL-8 to the human recombinant IL-8 receptor type A. *Journal of Natural Products*, 63: 694–697
- De Silva E. D., Scheuer P.J. 1980. Manoalide, an antibiotic sesterterpenoid from the marine sponge *Luffariella variabilis*. *Tetrahedron Letters*, 21: 1611–1614
- Demaneche S., Sanguin H., Pote J., Navarro E., Bernillon D., Mavingui P., Wildi W., Vogel T. M., Simonet P. 2008. Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105: 3957–3962
- Dennedy M. C., Houlihan D. D., McMillan H., Morrison J. J. 2002. β 2- and β 3-adrenoreceptor agonists: huma myometrial selectivity and effects on umbilical artery tone. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 187: 641–647
- Deurenberg R.H., Vink C., Kalenic S., Friedrich A. W., Bruggeman C. A., Stobberingh E.E. 2007. The molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*, 13, 3: 222–235
- De Smet P., Parys J. B., Callewaert G., Weidema A. F., Hill E., De Smedt H., Erneux C., Sorrentino V., Missiaen L. 1999. Xestospongin C is an equally potent inhibitor of the

- inositol 1,4,5-triphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca^{2+} pumps. *Cell Calcium*, 26: 9–13
- Edrada R. A., Proksch P., Wray V., Christ R., Witte L., Van Soest R. W. M. 1996a. Bioactive isoquinoline quinone from an undescribed philippine marine sponge of the genus *Xestospongia*. *Journal of Natural Products*, 59: 973–976
- Edrada R. A., Proksch P., Wray V., Witte L., Müller W. E. G., Van Soest R. W. M. 1996b. Four new bioactive manzamine -type alkaloids from Philippine marine sponge *Xestospongia ashmorica*. *Journal of Natural Products*, 59: 1056–1060
- Faulkner D. J. 2000. Marine natural products. *Natural Products Reports*, 17: 7–55
- Fenical W. 2006. Marine pharmaceuticals: Past, present, and future. *Oceanography*, 19, 2: 110–119
- Fleming A. 1929. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*, 10, 31: 226–236
- 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: 1527–1528
- Frank U., Taconelli E. 2012. Classification of the antibiotics. V: The Daschner guide to in-hospital antibiotic therapy. Küster H. (ed.). Heidelberg, Springer Medizin: 1–4
- Fukuoka K., Yamagishi T., Ichihara T., Nakaike S., Iguchi K., Yamada Y., Fukumoto H., Yoneda T., Samata K., Ikeya H., Nanaumi K., Hirayama N., Narita N., Saijo N., Nishio K. 2000. Mechanism of action of aragusterol A (YTA0040), a potent antitumor marine steroid targeting the G1 phase of the cell cycle. *International Journal of Cancer*, 88: 810–819
- Fusetani N., Matsunaga S., Matsumoto H., Takebayashi Y. 1990. Cyclotheonamides, potent thrombin inhibitors, from a marine sponge *Theonella* sp. *Journal of the American Chemical Society*, 112: 7053–7054
- Fusetani N., Takahashi M., Matsunaga S. 1994. Topsentiaosterol sulfates, antimicrobial sterol sulfates possessing novel side chains, from a marine sponge, *Topsentia* sp. *Tetrahedron*, 50: 7765–7770
- Fusetani N. 2004. Biofouling and antifouling. *Natural Product Reports*, 21: 94–104
- Gafni J., Munsch J. A., Lam T. H. 1997. Xestospongins: potent membrane permeable blockers of the inositol 1,4,5-triphosphate receptor. *Neuron*, 19: 723–733

- Gilliver M.A., Bennett M., Begon M., Hazel S. M., Hart C. A. 1999. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature*, 401: 233–234
- Green G. 1977. Ecology of toxicity in marine sponges. *Marine Biology*, 40, 3: 207–215
- Griffith O. W., Gross S. S. 1996. Inhibitors of nitric oxide synthases. V: Methods in nitric oxide research. Stamler J., Feelish M. (eds.) New York, John Wiley & Sons: 187–208
- Hartmann M., Berditsch M., Hawecker J., Ardakani M. F., D., Ulrich A. S. 2010. Damage of the bacterial cell envelope by antimicrobial peptides gramicidin S and PGLa as revealed by transmission and scanning electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 8: 3132–3142
- Hawkey P. M. 2000. Mechanisms of resistance to antibiotics. *Intensive Care Medicine*, 26: 9–13
- He M., Miyajima F., Roberts P., Ellison L., Pickard D. J., Martin M. J., Connot T. R., Harris S. R., Fairley D., Bamford K. B., D'Arc S., Brazier J., Brown D., Coia J. E., Douce G., Gerding D., Kim H. J., Koh T. H., Kato H., Senoh M., Louie T., Michell S., Butt E., Peacock S. J., Brown N. M., Riley T., Songer G., Wilcox M., Pirmohamed M., Kuijper E., Hawkey P., Wren B. W., Dougan G., Parkhill J., Lawley T. D. 2012. Emergence and global spread of epidemic healthcare-associated *Clostridium difficile*. *Nature Genetics*, 45, 1: 109–114
- Houbraken J., Frisvad J. C., Samson R. A. 2011. Fleming's penicillin producing strain is not *Penicillium chrysogenum* but *P. rubens*. *IMA Fungus*, 2, 1: 87–95
- Jiménes C., Crews P. 1990. Novel marine sponge amino acids, 10. Xestoaminols from *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*, 53, 4: 978–982
- Johnson S., Samore M. H., Farrow K. A., Killgore G. E., Tenover F. C., Lyras D., Rood J. I., DeGirolami P., Baltch A. L., Rafferty M. E., Pear S. M., Gerding D. N. 1999. Epidemics of diarrhea caused by a clindamycin-resistant strain of *Clostridium difficile* in four hospitals. *New England Journal of Medicine*, 341, 23: 1645–1651
- Juagdan E. G., Kalindindi R. S., Scheuer P. J., Kelly-Borges M. 1995. Elenic acid, an inhibitor of topoisomerase II, from a sponge, *Plakinastrella* sp. *Tetrahedron Letters*, 36: 2905–2908
- Kadavy D. R., Hornby J. M., Haverkost T., Nickerson K. W. 2000. Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 11: 4615–4619

- Katranitsas A., Castritsi-Catharios J., Persoone G. 2003. The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a nontarget marine organism. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 11: 1491–1494
- Kawsar S. M. A., Mamun S. M. A., Rahman M. S., Yasumitsu H., Ozeki Y. 2010. *In vitro* antibacterial and antifungal effects of a 30 kDa D-galactoside-specific lectin from the Demospongia, *Halichondria okadai*. *International Journal of Biological and Life Sciences*, 6, 1: 31–37
- Knapp C. W., Doling J., Ehlert P. A., Graham D. W. 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environmental Science & Technology*, 44: 580–587
- Knothe H., Shah P., Krcmery V., Antal M., Mitsuhashi S. 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11, 6: 315–317
- Kobayashi J., Ishida K., Naitoh K., Shigemori H., 1993. Xestokerols A, B, and C, new C29 steroids with a cyclopropane ring from the Okinawan marine sponge *Xestospongia* sp. *Journal of Natural Products*, 56, 8: 1350–1355
- Kohanski M. A., Dwyer D.J., Collins J.J. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 8: 423–435
- Konstantinou I. K., Albanis T. A. 2004. Worldwide occurrence and effects of antifouling paint booster biocides in the aquatic environment: a review. *Environment International*, 30, 2: 235–248
- Kosmina R. 2012. Biološka aktivnost v etanolnih izvlečkih izbranih antarktičnih morskih spužev (Porifera). Diplomsko delo. Ljubljana, Biotehniška fakultete, Oddelek za biologijo: 44 str.
- Kotra L. P., Mobashery S. 1998. β -lactam antibiotics, β -lactamases and bacterial resistance. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 96: 139–150
- Kumarasamy K. K., Toleman M. A., Walsh T. R., Bagaria J., Butt F., Balakrishnan R., Chaudhary U., Doumith M., Giske C. G., Irfan S., Krishnan P., Kumar A. V., Maharjan S., Mushtaq S., Noorie T., Paterson D. L., Pearson A., Perry C., Pike R., Rao B., Ray U., Sarma J. B., Sharma M., Sheridan E., Thirunarayan M. A., Turton J., Upadhyay S., Warner M., Welfare W., Livermore D. M., Woodford N. 2010. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infectious Diseases*, 10, 9: 597–602

Kuramoto M., Tong C., Yamada K., Chiba T., Hayashi Y., Uemura D. 1996. Halichlorine, an inhibitor of VCAM-1 induction from the marine sponge *Halichondria okadai* Kadota. *Tetrahedron Letters*, 37: 3867–3870

Larsen J., Schonheyder H. C., Lester C. H., Olsen S. S., Porsbo L. J., Garcia-Migura L., Jensen L. B., Bisgaard M., Hammerum A. M. 2010. Porcine-origin gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis* in humans, Denmark. *Emerging Infectious Diseases*, 16: 682–684

Lin Y.-Y., Risk M., Ray S. M., Van Engen D., Clardy J., Golik J., James J. C., Nakanishi K. 1981. Isolation and structure of brevetoxin B from the "red tide" dinoflagellate *Ptychodiscus brevis* (*Gymnodinium breve*). *Journal of the American Chemical Society*, 103: 6773–6776

Literak I., Dolejska M., Radimersky T., Klimes J., Friedman M., Aarestrup F. M., Hasman H., Cizek A. 2009. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*, 108: 1702–1711

Liu B., Timar J., Howlett J., Diglio C. A., Honn K. V. 1991. Lipoxygenase metabolites of arachidonic and linoleic acids modulate the adhesion of tumor cells to endothelium via regulation of protein kinase C. *Cell Regulation*, 2: 1045–1055

Livermore D. M. 1984. Penicillin-binding proteins, porins and outer-membrane permeability of carbenicillin-resistant and -susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Microbiology*, 18: 261–270

Livermore D. M. 2001. Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47: 247–250

Loo V. G., Poirier L., Miller M. A., Oughton M., Libman M. D., Michaud S., Bourgault A., Nguyen T., Frenette C., Kelly M., Vibien A., Brassard P., Fenn S., Dewar K., Hudson T. J., Horn R., René P., Monczak Y., Dascal A. 2005. A predominantly clonal multi-institutional outbreak of *Clostridium difficile*-associated diarrhea with high morbidity and mortality. *New England Journal of Medicine*, 353: 2442–2449

Look S. A., Fenical W., Jacobs R. S., Clardy J. 1986. The pseudopterosins: anti-inflammatory and analgesic natural products from the sea whip *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83,17: 6238–6240

Loya S., Hizi A. 1990. The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives. *FEBS Journal*, 269: 131–134

Luesch H., Moore R. E., Paul V. J., Mooberry S. L., Corbett T. H. 2001. Isolation of dolastatin 10 from the marine cyanobacterium *Symploca* species VP642 and total

stereochemistry and biological evaluation of its analogue symplostatin 1. *Journal of Natural Products*, 64, 7: 907–910

Madigan M. T., Martinko J. M. 2006. *Brock biology of microorganisms*. 11th ed., Upper Saddle River, Paerson Prentice Hall: 992 str.

Marshall C. G., Lessard I.A., Park I., Wright G.D. 1998. Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42: 2215–2220

Maryanoff B. E., Qiu X., Padmanabhan K. P., Tulinsky A., Almond H. R., Andrade-Gordon P., Greco M. N., Kauffman J. A., Nicolaou Liu K. C. A., Brungs P. H., Fusetani N. 1993. Molecular basis for the inhibition of human thrombin by the macrocyclic peptide cyclotheonamide A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 8048–8052

Mayer A. M. S. 2012. The global marine pharmaceutical pipeline. V: OECD global forum on biotechnology: marine biotechnology enabling solutions for ocean productivity and sustainability, Vancouver, 30–31 may. Vancouver, OECD: 62 str.
<http://www.oecd.org/sti/biotech/Session%204%20Mayer.pdf> (3. avg. 2013)

Mayer A. M. S. 2013. Marine pharmaceuticals: the clinical pipeline. Downer Grove, Illinois, Chicago College of Osteopathic Medicine, Midwestern University Downers Grove: 2 str.
<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm> (3. avg. 2013)

Mayer A. M. S., Jacobs R. S. 1988. Manoolide: an antiinflammatory and analgesic marine natural product. V: *Biomedical importance of marine organisms. Memoirs of the California Academy of Sciences*, 13. Fautin D. G. (ed.). San Francisco, California Academy of Sciences: 133–142

Mayer A. M. S., Glaser K. B., Cuevas C., Jacobs R. S., Kem W., Little R. D., McIntosh J. M., Newman D. J., Potts B C., Dale E. Shuster D. E. 2010. The odyssey of marine pharmaceuticals: a current pipeline perspective. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31, 6: 255–265

McClintock J. B., Baker B. J. 1997. A review of the chemical ecology of Antarctic marine invertebrates. *American Zoologist*, 37: 329–342

McClintock, J. B., Baker B. J. 1998. Chemical ecology in Antarctic seas. *American Scientist*, 86, 3: 254–263

McClintock J. B., Gauthier J. J. 1992. Antimicrobial activities of antarctic sponges. *Antarctic Science*, 4, 2: 179–183

- 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*, 28, 5: 134–135
- McClintock, J. B. Amsler C. D., Baker B. J., Van Soest R. W. M. 2005. Ecology of antarctic marine sponges: an overview. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 359–368
- Mehta A., Zitzmann N., Rudd P. M., Block T. M., Dwek R. A. 1998. α -glucosidase inhibitors as potential broad based anti-viral agents. *FEBS Letters*, 430: 17–22
- Mesaros N., Nordmann P., Plésiat P., Roussel-Delvallez M., Van Eldere J., Glupczynski Y., Van Laethem Y., Jacobs F., Lebecque P., Malfroot A., Tulkens P. M., Van Bambeke F. 2007. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*, 13: 560–578
- Miljanich G. P. 2004. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. *Current Medicinal Chemistry*, 11: 3029–3040
- Miyamoto S., Izumi M., Hori M., Kobayashi M., Ozaki H., Karaki H. 2000. Xestospongin C, a selective and membrane-permeable inhibitor of IP₃ receptor, attenuates the positive inotropic effect of a-adrenergic stimulation in guinea-pig papillary muscle. *British Journal of Pharmacology*, 130: 650–654
- Myaoka H., Shimomura M., Kimura H., Yamada Y., Kim H.-S., Wataya Y. 1998. Antimalarial activity of kalahinol A and new relative diterpenoids from the Okinawan sponge, *Acanthella* sp. *Tetrahedron*, 54: 13467–13474
- Moon B. H., Young P., 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 B., Baker B. J., McClintock J. B. 1998. Purine and nucleoside metabolites from the antarctic sponge *Isodictya erinacea*. *Journal of Natural Products*, 61: 116–118
- Muller W. E. G., Sobel C., Diehl-Seifert B., Maidhof A., Schroder 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: 1489–1494
- Murray B.E. 1997. Antibiotic resistance. *Advances in Internal Medicine*, 42: 339–367
- Na M., Ding Y., Wang B., Tekwani B. L., Schinazi R. F., Franzblau S., Kelly M., Stone R., Li X. C., Ferreira D., Hamann M. T. 2010. Anti-infective discorhabdins from a deep-water alaskan sponge of the genus *Latrunculia*. *Journal of Natural Products*, 73, 3: 383–387

Nagayama H., Hingtgen J. N., Aprison M. H. 1980. Pre and postsynaptic serotonergic manipulations in an animal model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 13: 575–579

Nakagawa Y., Moore G. A. 1995. Cytotoxic effects of postharvest fungicides, ortho-phenylphenol, thiabendazole and imazalil, on isolated rat hepatocytes. *Life Sciences*, 57: 1433–1440

Nakamura H., Ohizumi Y., Kaboyashi J. 1984. Keramadine, a novel antagonist of serotonergic receptors isolated from the Okinawan sea sponge *Agelas* sp. *Tetrahedron Letters*, 25: 2475–2478

Nicolas-Chanoine M. H., Blanco J., Leflon-Guibout V., Demarty R., Alonso M. P., Canic

- carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended spectrum β -lactamases. *Applied and Environmental Microbiology*, 74: 7439–7441
- Poeta P., Radhouani H., Pinto L., Martinho A., Rego V., Rodrigues R., Goncalves A., Rodrigues J., Estepa V., Torres C., Igrejas G. 2009. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*, 49: 584–588
- Poirel L., Kampfer P., Nordmann P. 2002. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extendedspectrum β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46: 4038–4040
- Quinn R. J., Gregson R. P., Cook A. F., Bartlett A. F. 1980. Isolation and synthesis of 1-methylisoguanidine, a potent pharmacologically active constituent from the marine sponge *Tedania digitata*. *Tetrahedron Letters*, 21: 567–568
- Radhouani H., Poeta P., Igrejas G., Goncalves A., Vinue L., Torres C. 2009. Antimicrobial resistance and phylogenetic groups in isolates of *Escherichia coli* from seagulls at the Berlengas nature reserve. *Veterinary Record*, 165: 138–142
- Rahden-Staron I. 2002. The inhibitory effect of the fungicides captan and captafol on eukaryotic topoisomerases *in vitro* and lack of recombinagenic activity in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 518: 205–213
- Ratner L., Vander Heyden N., Dedera D. 1991. Inhibition of HIV and SIV infectivity by blockade of α -glucosidase activity. *Virology*, 181: 180–192
- Rayamajhi N., Jung B. Y., Cha S. B., Shin M. K., Kim A., Kang M. S., Lee K. M., Yoo H. S. 2010. Antibiotic resistance patterns and detection of *bla*_{DHA-1} in *Salmonella* species isolates from chicken farms in South Korea. *Applied and Environmental Microbiology*, 76: 4760–4764
- Rogers B. A., Sidjabat H. E., Paterson D. L. 2011. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Jornal of Antimicrobial Chemotherapy*, 16: 1–14
- Romo D., Rzasa R. M., Shea H. A., Park K., Langenhan J. M., Sun L., Akhiezer A., Liu J.O. 1998. Total synthesis and immunosuppressive activity of (-)-pateamine A and related compounds: implementation of a β -lactam based macrocyclization. *Journal of the American Chemical Society*, 120: 12237–12254
- Saga T., Yamaguchi K. 2009. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. *Japan Medical Association Journal*, 52, 2: 103–108

- Sakai R., Higa T., Jefford C. W., Bernardinelli G. 1986. Manzamin A, a novel antitumor alkaloid from a sponge. *Journal of the American Chemical Society*, 108, 20: 6404–6405
- Sakai R., Kamiya H., Murata M., Shimamoto K. 1997. A new neurotoxic amino acid from the Micronesian marine sponge *Dysidea herbacea*. *Journal of the American Chemical Society*, 119: 4112–116
- Sakai R., Swanson G. T., Shimamoto K., Green T., Contractor A., Ghetti A., Tamura-Horikawa Y., Oiwa C., Kamiya H. 2001. Pharmacological properties of the potent epileptogenic amino acid dysiherbaine, a novel glutamate receptor agonist isolated from the marine sponge *Dysidea herbacea*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 296: 650–658
- Sepčić K., Batista U., Vacelet J., Maček P. Turk T. 1997. Biological activities of aqueous extracts from marine sponges and cytotoxic effects of 3 alkylpyridinium polymers from *Reniera sarai*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*, 117: 47–53
- Sepčić K., Turk T. 2006. 3-alkylpyridinium compounds as potential non-toxic antifouling agents. V: *Marine molecular biotechnology. Progress in molecular and subcellular biology*. Vol. 42. Fusetani N., Clare A. (eds.). Berlin, Springer: 105–124
- Singh S. B. 2012. Natural products in the 21st century. V: *Antibiotic discovery and development*. Dougherty T. J., Pucci M. J. (eds.). New York, Springer: 821–847
- Sipkema D., Franssen M. C. R., Osinga R., Tramper J. Wijffels R. H. 2004. Marine sponges as pharmacy. *Marine Biotechnology*, 7: 142–162.
- Springer T. A., Lasky L. A. 1991. Sticky sugars for selectins. *Nature*, 349: 196–197
- Stead P., Hiscox S., Robinson P. S., Pike N. B., Sidebottom P. J., Roberts A. D., Taylor N. L., Wright A. E., Pomponi S. A., Langley D. 2000. Eryloside F, a novel penasterol disaccharide possessing potent thrombin receptor antagonist activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10: 661–664
- Steenbergen J. N., Alder J., Thorne G.M., Tally F. P. 2005. Daptomycin: a lipopeptide antibiotic for the treatment of serious Gram-positive infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55: 283–288
- Strateva T., Yordanov D. 2009. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. *Journal of Medical Microbiology*, 58: 1133–1148
- Suzuki H., Shindo K., Ueno A., Miura T., Takei M., Sakakibara M., Fukamachi H., Tanaka J., Higa T. 1999. S1319: A novel β2-adrenoceptor agonist from a marine sponge *Dysidea* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9: 1361–1364

- Takei M., Burgoyn D. L., Andersen R. J. 1994. Effect of contignasterol on histamine release induced by antiimmunoglobulin E from rat peritoneal mast cells. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83: 1234–1235
- Tenover F. C. 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Medicine*, 119, Suppl. 1: S3– S10
- 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: 243–250
- Torres Y. R., Berlinck R. G. S., Nascimento G. G. F., Fortier S. C., Pessoa C., De Moraes M. O. 2002. Antibacterial activity against resistant bacteria and cytotoxicity of four alkaloid toxins isolated from the marine sponge *Arenosclera brasiliensis*. *Toxicon*, 40: 885–891
- Touati I., Chaieb K., Bakhrouf A., K. Gaddour. 2007. Screening of antimicrobial activity of marine sponge extracts collected from Tunisian coast. *Journal de Mycologie Médicale / Journal of Medical Mycology*, 17, 3: 183–187
- Tsiodras S, Gold H. S., Sakoulas G., Eliopoulos G. M., Wennersten C., Lata Venkataraman L., Moellering R. C. Jr, Ferraro M. J. 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*, 358: 207–208
- Tsukamoto S., Matsunaga S., Fusetani N., Van Soest R. W. M. 1998. Acanthosterol sulfates A–J: ten new antifungal steroid sulfates from a marine sponge *Acanthodendrilla* sp. *Journal of Natural Products*, 61, 11: 1374–1378
- 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*, 11: 1126–1139
- Turk T., Sepčić K., Mancini I., Guella G. 2008. 3-alkylpyridinium and 3-alkylpyridine compounds from marine sponges, their synthesis, biological activities and potential use. V: Bioactive natural products: Part O. Studies in natural products chemistry. Vol. 35. Rahman A. (ed.). Amsterdam, Elsevier: 355–397
- Vannuffel P., Cocito C. 1996. Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, 54, Suppl. 1: S20–S30
- Verner-Jeffreys D. W., Welch T. J., Schwarz T., Pond M. J., Woodward M. J., Haig S. J., Rimmer G. S., Roberts E., Morrison V., Baker-Austin C. 2009. High prevalence of multidrug-tolerant bacteria and associated antimicrobial resistance genes isolated from ornamental fish and their carriage water. *PLoS One*, 4: e8388, doi: 10.1371/journal.pone.0008388: 9 str.

- Wakimoto T., Maruyama A., Matsunaga S., Fusetani N., Shinoda K., Murphy P. T. 1999. Octa- and nonaprenylhydroquinone sulfates, inhibitors of α 1,3-fucosyltransferase VII, from an Australian marine sponge *Sarcotragus* sp. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 9: 727–730
- Waksman S. A. 1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? *Mycologia*, 39, 5: 565–569
- Wellington K. D., Cambie R. C., Rutledge P. S., Bergquist P.R. 2000. Chemistry of sponges, 19: Novel bioactive metabolites from *Hamigera tarangaensis*. *Journal of Natural Products*, 63: 79–85
- White R. J. 2012. The early history of antibiotic discovery: empiricism ruled. V: Antibiotic discovery and development. Dougherty T.J., Pucci M. J. (eds.). New York, Springer: 3–31
- Wratten S. J., Faulkner D. J. 1977. Carbonimidic dichlorides from the marine sponge *Pseudaxinyssa pitsy*. *Journal of the American Chemical Society*, 99: 7367–7368
- Wright G. D. 2012. Antibiotics: a new hope. *Chemistry & Biology*, 19, 1: 3–10
- Xu Z., Flavin M. T., Eiznhamer D. A., 2012. Macrolides and ketolides. V: Antibiotic discovery and development. Dougherty T. J., Pucci M. J. (eds.). New York, Springer: 181–228
- Yigit H., Queenan A. M., Anderson G. J., Domenech-Sanchez A., Biddle J. W., Steward C. D., Alberti S., Bush K., Tenover F. C. 2001. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 4: 1151–1161
- Yong D., Toleman M. A., Giske C. G., Cho H. S., Sundman K., Lee K., Walsh T. R. 2009. Characterization of a new metallo-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 12: 5046–5054
- Yoshiji H., Kuriyama S., Ways D. K., Yoshii J., Miyamoto Y., Kawata M., Ikenaka Y., Tsujinoue H., Nakatani T., Shibuya M., Fukui H. 1999. Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Research*, 59: 4413–4418
- 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 rnanzamine producing Indo-Pacific sponges. *Tetrahedron*, 58, 37: 7397–7402

Zhang X. X., Zhang T., Fang H. H. 2009. Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82: 397–414

ZAHVALA

Ob koncu študija bi se rad zahvalil vsem, ki so mi pri nastajanju magistrskega dela tako in drugače pomagali.

Mentorju, prof. dr. Tomu Turku za omogočanje opravljanja tega zanimivega dela in odlične predavateljske sposobnosti, ki so popestire vsako predavanje.

Prof. dr. Kristini Sepčić za velikodušno pomoč pri delu v laboratoriju, recenzijo, številne drobne nasvete in pripravljenost pomagati v vsakem trenutku.

Kolegici Urški za pomoč pri praktičnem delu, brez katere bi bilo delo v laboratoriju manj zabavno in barvito.

Prijateljicam Maji, Niki, Tini in Sandri za vso podporo pri pisanju, druženje v času študija in peko tort. Brez vas bi bil študij v vseh teh letih manj vesel in prijeten.

Matjažu za jeklene živce in profesionalno preudarnost, predvsem pa za številne nasvete in izpostavljena dejstva, brez katerih naloga ne bi bila takšna kot je.

Nini Orehar in ostalim kolegom iz biokemijskega laboratorija za potrpežljivost in ustrežljivost ob (pre)mnogih vprašanjih.

Na koncu pa bi se rad zahvalil še staršema, za nesebično podporo tekom celotnega študija, s katero sta mi omogočila doseči zastavljene cilje.

PRILOGE

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Homaxinella</i>	5,6:8,9-Diepoksi steroli	Polioxygenirani steroli	Metanol	Proti celičnim linijam različnih tumorjev	Mansoor in sod., 2006
<i>Microcionidae</i>	Euripamidi A in B	Ciklični peptidi	Ni podatka	Zavirajo kopičenje lipidnih kapljic v makrofagih	Ito in sod., 2004
<i>Latrunculia</i>	Kalipeltini A - C	Aciklični peptidi	Etanol	Protiglivična in anti-HIV aktivnost, zaviralec Na^+ / Ca^{2+} izmenjevalca, pozitiven inotropni agent v levem atriju morskega prašička, citotoksičnost proti 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	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti celicam opičjih ledvic in P388 mišjih levkemičnih celic. Antimikrobrovo delovanje proti Gram + in Gram - bakterijam in givam	Copp in sod., 1994

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Latrunculia</i>	Diskorabdin W, D	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Metanol/ Diklorometan (1:1)	Delovanje proti mišjim levkemičnim celicam. Protimikrobro in protitumorsko delovanje	Lang in sod., 2005
	Diskorabdin I, L	Piroloiminokinoninski alkaloidi	2-propanol	Citotoksičnost proti tumorskim celičnim linijam.	Reyes in sod., 2004
	Diskorabdin R	Piroloiminokinoninski alkaloidi	Etanol	Protibakterijsko delovanje	Ford in sod., 2000
	Latrunkulinosid A - B	Dekalaktonski glikozidi	Butanol	Inhibicija prehranjevanja zlatih ribic	Rezanka in sod., 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
	Latrunkulin A	Ketidne aminokisline	Ni podatka	Zavira tumorske celice prostate, aktivacija celic raka prsi	El Sayed in sod., 2008
	Latrunkulin A in B	Ketidne aminokisline	Petrolejski eter	Učinki na celične linije mišjih nevroblastov in fibroblastov, povzročijo reorganizacijo mikrofilamentov v celicah	Kashman in sod., 1980

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Latrunculia</i>	(+)-latrunkulin A	Ketidne aminokisline	Ni podatka	Povzroči reverzibilne spremembe v morfologiji celic, ogrozi organizacijo mikrofilamenov, in zavira posredovanje mikrofilamentov med celično delitvijo	Smith in sod., 1992
	(+)-latrunkulin B				
	Latrunkulina C in M				
	(+)-latrunkulin A (1)	Ketidne aminokisline, knjugirani dieni	Ni podatka	Močan zaviralec mikrofilamentov med celično delitvijo	White in sod., 1992
	(+)-1Bepilatrunkulin A				
	Citaroksazol	Aromatični alkaloid	Etanol	Citotoksično delovanje	Genta - Jouve in sod., 2011
	Epimikubilin	Norsesterterpenski peroksid	Metanol/ Diklorometan (1:1) in metanol	Zaviranje proizvodnje NO, protivnetni agensi	Cheenpracha in sod., 2010
	Mukubilon B				
	Epimukubilin B				
	Sigmosceptrelin A metil ester				
	Sigmosceptrelin A				
	Sigmosceptrelin B metil ester				

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Latrunculia</i>	Trunkulina A in B	Norsesterterpenski ciklični peroksidi	Etanol	Protimikrobnna aktivnost	Capon in sod., 1987
<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 + 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	Kažejo močno citotoksičnost in protitumorsko aktivnost	Suwanborirux in sod., 2003

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	Renieramicin O - S	Alkaloidi - Izokinolinski kinoni	Etil acetat	Citotoksičnost, protitumorske spojine	Amnuoypol in sod., 2004
	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	Protimikrobnna aktivnost, selektivna citotoksičnost proti tumorskim celicam	Harrison in sod., 1996
	Kestomanzamin A, B, X	Alkaloidi – β-Karbolinski Alkaloidi	Aceton	Citotoksičnost proti KB celicam	Kobayashi in sod., 1995
	Manzamin A Manzamin J, 3,4-Dihidromanzamin A 6-Deoksimanzamin X	Alkaloidi – β-Karbolinski Alkaloidi	Aceton in Metanol	Insekticidna aktivnost, delujejo proti Gram + bakterijam, citotoksičnost	Edrada in sod., 1996

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih sružev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	Manzamin A N-oksid	Alkaloidi – β-Karbolinski Alkaloidi	Aceton in Metanol	Insekticidna aktivnost, delujejo proti Gram + bakterijam, citotoksičnost	Edrada in sod., 1996
	Manzamin J N-oksid				
	3,4-Dihidromanzamin A N-oksid				
	(+)-3b,3'b-Dimetilksestospongin	Alkaloidi – Makrolitični Kinolizidini	Metanol	Protiglivično delovanje proti glivi <i>Candida</i> spp.	Moon in sod., 2002
	(+)-(7S)-Hidroksiksestospongin A				
	(+)-Araguspongin 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,				

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	Benzo[de][1,6]naptirid in derivat A - derivat D	Alkaloidi	Metanol	Citotoksičnost proti KB celicam	Calcul in sod., 2003
	Ampimedin	Alkaloidi	Metanol in Metanol/Kloroform	Citotoksičnost proti različnim vrstam tumorjev	Tasdemir in sod., 2001
	Neoampimedin				
	Deoksiampimedin				
	Halenakinon	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonična aktivnost	Roll in sod., 1983
	Halenakinol	Kinoni	Ni podatka	Kardiotonične aktivnosti	Kobayashi in sod., 1985
	Halenakinol sulfat				
	Ksestokinon	Kinoni	Metanol–Diklorometan	Inhibicija cdc25b fosfataze	Cao in sod., 2005
	Adociakinon A – B	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 crevesa	Concepcion in sod., 1995
	Sekoadoaciakinon A –B				
	14-Metoksiksestokinon				
	15-Metoksiksestokinon				
	15-Kloro-14-hidroksiksestokinon				
	14-Kloro-15-hidroksiksestokinon				
	41				

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	3-Ketoadociakinon A –B	Kinoni	Ni podatka	Strupeni v človeških tumorskih celicah debelega črevesa, citotoksična aktivnost	Cao in sod., 2005
	13-O-Metilksestokinol sulfat				
	Ksestosaprol C	Kinoni	Metanol	Inhibitor virusa HIV	Kubota in sod., 2008
	Ksestovanin A	Terpenoidi	Metanol	Protiglivično delovanje proti <i>Pythium ultimum</i>	Northcote in sod. 1989
	Sekoksestovanin A				
	Klionasterol	Steroli, konvencionalni steroli	Ni podatka	Inhibitor CP celic	Cerqueira in sod., 2003
	Ksestokerol A- B	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Protimikrobnno delovanje proti bakterijam	Kobayashi in sod., 1993
	Aragusterol A	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Močan protitumorski sterol	Iguchi in sod. 1993
	Aragusterol B	Steroli – Steroli s ciklopropanskim obročem	Metanol	Antiproliferativna aktivnosti proti KB <i>celicam in vitro</i> (aragusterol d nima tega učinka)	Iguchi in sod. 1993
	Aragusterol D (Ksestokerol C)				
	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
	Ksestobergsterol A - B	Steroli – Polihidroksi steroli	Ni podatka	Zavira sproščanje histamina iz podganjih celic, citotoksičnost proti celicam l-1210 mišje levkemije	Shoji in sod., 1992

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	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 sod., 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-bromoocadtadeca-9,17-diene-7,15-dinoat	Drugi steroli	Diklorometan	Inhibicija vezave ligandov na možganske podganje A1 receptorje	Pham in sod., 1999
	Ksestosterol (9E,17E)-18-bromoocadtadeka-9,17-dien-5,7,15-trinoat				
	Ksestospongienol A – L	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Metanol	Protiglivični in protimikrobnii učinki, zaviranje HIV-1 integraze, citotoksičnost	Liu in sod., 2011
	(9E,13E,17E)-18-Bromoocadtadeka-9,13,17-trien-5,7,15-trinoična kislina	Maščobne kisline – brominirane polinenasičene maščobne kisline	Etil acetat	Inhibicija HIV proteaze	Patil in sod., 1992
	Metil (9E,13E,17E)-18-bromoocadtadeka-9,13,17-trien-5,7,15-trinoat				

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

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

se nadaljuje

nadaljevanje

Priloga A: Preglednica dosedanjih objavljenih raziskav o bioloških aktivnostih v organskih izvlečkih iz preiskovanih spužev (Kosmina, 2012)

IME SPUŽVE	UČINKOVINA	VRSTA MOLEKULE	ORGANSKO TOPILO	AKTIVNOST	REFERENCA
<i>Xestospongia</i>	(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	Protigliivično delovanje, citotoksičnost, protivirusna aktivnost	Kobayashi in sod., 1994
	2-okso-2,5-dihidrofuran-5-octna kislina metil ester, Ksestin A -B	Maščobne kisline – druge	Diklorometan	Aktivna spojina proti P388 celicam mišje levkemije	Quinoa in sod., 1986
	Ksestoaminol A - C	Maščobne kisline – druge	Metanol	Aktivnosti proti parazitom, mikrobom in reverzni transkriptazi	Jimenez in sod., 1990