

# "Istraživanje antimikrobnog potencijala odabranih morskih organizama"

---

**Beloša, Romana**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2023**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Dubrovnik / Sveučilište u Dubrovniku**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:155:748688>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-27**



**SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU**  
UNIVERSITY OF DUBROVNIK

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Dubrovnik](#)



zir.nsk.hr



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJ

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU  
ODJEL ZA PRIMIJENJENU EKOLOGIJU  
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Romana Beloša

ISTRAŽIVANJE ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA ODABRANIH  
MORSKIH ORGANIZAMA

DIPLOMSKI RAD

Dubrovnik, 2023.

SVEUČILIŠTE U DUBROVNIKU  
ODJEL ZA PRIMIJENJENU EKOLOGIJU  
DIPLOMSKI STUDIJ MARIKULTURA

Romana Beloša

ISTRAŽIVANJE ANTIMIKROBNOG POTENCIJALA ODABRANIH  
MORSKIH ORGANIZAMA

DIPLOMSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Sanja Tomšić

Komentor: doc. dr. sc. Marina Brailo Šćepanović

Dubrovnik, 2023.

Ovaj diplomski rad izrađen je pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Sanje Tomšić i doc. dr. sc. Marine Brailo Šćepanović, u sklopu diplomskog studija Marikultura na Odjelu za primijenjenu ekologiju Sveučilišta u Dubrovniku i u suradnji sa Zavodom za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije.

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Odabrani morski organizmi u dostupnoj literaturi.....	4
1.2. Otpornost odabranih sojeva bakterija u dostupnoj literaturi.....	11
2. MATERIJALI I METODE .....	17
2.1. Lokalitet .....	17
2.2. Organizmi .....	17
2.3. Dobivanje ekstrakata odabranih morskih organizama.....	23
2.3.1. Homogenizacija .....	23
2.3.2. Ekstrakcija .....	25
2.4. Disk difuzijska metoda .....	26
3. REZULTATI .....	28
4. RASPRAVA .....	32
5. ZAKLJUČAK.....	34
6. LITERATURA .....	35

## SAŽETAK

Morski okoliš ima veliku važnost za život na Zemlji. Organizmi koji u njemu žive vitalni su za ekosustav, ali služe i kao neiscrpan izvor biološki aktivnih spojeva. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti antimikrobni učinak ekstrahiranih tvari iz morskih organizama prikupljenih s područja Dubrovačko-neretvanske županije. Materijali koji su korišteni u istraživanju obuhvaćali su meka tkiva morskih beskralježnjaka (školjkaša, puža i priljepka od mekušaca te ježinca od bodljikaša) i bentoskih makroalga (smeđih, zelenih i crvenih alga). Ekstrakcija aktivnih tvari iz uzoraka provedena je upotrebom dva različita otapala (etilni acetat i metanol). Ekstrakti su zatim testirani na bakterijskim kulturama (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes* i *Escherichia coli*) dobivenim od Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske Županije. Rezultati su pokazali značajan antimikrobni učinak ekstrahiranih tvari na rast bakterija. Najjače antimikrobno djelovanje zabilježeno je za ekstrakt zelene alge *Enteromorpha* sp. koji je inhibirao rast pet od sedam bakterija, dok ekstrakt crvene alge *Corallina officinalis* nije imao antibakterijski učinak niti na jednu ispitivanu bakteriju. Ova istraživanja pružaju vrijedne informacije o potencijalnoj primjeni morskih organizama kao izvora prirodnih antimikrobnih spojeva. Daljnja istraživanja trebaju se fokusirati na identifikaciji i karakterizaciji aktivnih spojeva kako bi se razumio mehanizam njihovih djelovanja i potencijalno pridonijelo razvoju novih antimikrobnih terapeutika.

Ključne riječi: antimikrobno djelovanje, morski beskralježnjaci, bentoske makroalge, bakterijske kulture, bioaktivni spojevi

## ABSTRACT

The marine environment holds significant importance for life on Earth. Organisms living within it are vital for ecosystems and serve as an inexhaustible source of biologically active compounds. The aim of this research was to investigate the antimicrobial effect of extracted substances from marine organisms collected in the Dubrovnik-Neretva County area. The materials used in the study included soft tissues of marine invertebrates (mollusks such as clams, snails, limpets, sea urchins), and benthic macroalgae (brown, green, and red algae). Active substances were extracted from the samples using two different solvents (ethyl acetate and methanol). The extracts were then tested on bacterial cultures (*Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, and *Escherichia coli*) obtained from the Public Health Institute of the Dubrovnik-Neretva County. The results demonstrated a significant antimicrobial effect of the extracted substances on bacterial growth. The strongest antimicrobial effect was observed for the extract of the green algae *Enteromorpha* sp. which inhibited the growth of five out of seven bacteria, while the extract of the red algae *Corallina officinalis* did not show antimicrobial activity against any bacterial strain. These findings provide valuable insights into the potential application of marine organisms as a source of natural antimicrobial compounds. Further research should focus on identifying and characterizing active compounds to understand their mechanisms of action and potentially contribute to the development of new antimicrobial therapeutics.

Keywords: antimicrobial activity, marine invertebrates, benthic macroalgae, bacterial cultures, bioactive compounds.

## 1. UVOD

Bakterije i plijesni kao neizbježni kontaminanti hrane (žitarica, voća i povrća i mesa) predstavljaju ozbiljan problem diljem svijeta, budući da njihovi toksični metaboliti mogu uzrokovati širok spektar bolesti kod ljudi i životinja. Intenzivna upotreba sintetičkih antibiotika za liječenje infekcija rezultirala je pojavom otpornih patogenih mikroorganizama, čime se stvorio ozbiljan izazov u području javnog zdravstva. Kako bi se borili protiv neučinkovitosti postojećih farmaceutika, uzrokovane pojavom sve otpornijih bakterijskih i gljivičnih sojeva, mnogi su istraživači u potrazi za novim izvorima spojeva antibakterijskog i antifungalnog djelovanja (Thawabteh i sur., 2023).

Svjetski oceani, koji prekrivaju više od 70% površine Zemlje, dugo su prepoznati kao kompleksan i misteriozan ekosustav koji obiluje raznovrsnim životom. Morski ekosustav je najveći i najvažniji ekosustav na Zemlji. Unutar mora i oceana krije se svijet nevjerojatne biološke raznolikosti, u kojem mnoštvo organizama, od mikroskopskog planktona do kitova, oblikuje složen ekosustav. Međutim, osim svoje ekološke važnosti, morski okoliš krije i bogatstvo kemijskih spojeva s potencijalom za suzbijanje mikrobni prijetnji ljudskom zdravlju. Morski mikroorganizmi, često nazvani „kemijskim rudnicima“, smatraju se izvrsnim izvorom novih terapeutika (Thawabteh i sur., 2023).

Zbog svoje bogate bioraznolikosti, morski organizmi predstavljaju iznimno vrijedne izvore biološki aktivnih spojeva. Njihovi ekstrakti su pokazali potencijal za otkrivanje novih bioaktivnih komponenti koje imaju između ostalog, antibakterijsko i antifungalno djelovanje (Thawabteh i sur., 2023).

Kako se infektivne bolesti razvijaju i postaju otporne na postojeće farmaceutske proizvode, morski okoliš pruža nove smjernice za borbu protiv gljivičnih, parazitskih, bakterijskih i virusnih bolesti. Mnogi prirodni ekstrakti iz mora uspješno su došli do kasnih faza kliničkih ispitivanja, uključujući *dolastatin 10*, *ecteinascidin-743*, *kahalalide F* i *aplidin*, a sve veći broj kandidata odabran je kao obećavajuće smjernice za proširenu pretkliničku procjenu. Iako su mnoga biomedicinska ispitivanja aktivnih



sastavnica iz mora usmjerena na otkrivanje protutumorskih spojeva, tako su i otpornost na lijekove, nastajanje infektivnih bolesti i prijetnja bioterorizmom doprinijeli interesu za procjenu prirodnih ekstrakata iz oceana u borbi protiv infektivnih organizama (Donia i Hamann, 2003).

Razvoj otpornosti na postojeće antibakterijske lijekove i dalje predstavlja ozbiljan izazov u liječenju infektivnih bolesti, stoga je otkriće i razvoj novih antibiotika postalo visoko prioritarno u biomedicinskim istraživanjima. U neke od dosada uspješno istraženih antimikrobnih spojeva ubrajamo Squalamine. To je prvi aminosterol izoliran iz morskog psa *Squalus acanthias* (Squalidae). Posjeduje snažnu antimikrobnu aktivnost s minimalnom inhibitornom koncentracijom (MIC) od 1·0 µg/mL protiv *Staphylococcus aureus*, kao i antiangiogenična i antitumorska svojstva. Nadalje, Cribrostatini su izolirani iz spužve *Cribrachalina* sp. i pokazali su snažnu antineoplastičku i antimikrobnu aktivnost. Cribrostatin 3 ima snažnu inhibicijsku aktivnost na rast bakterije *Neisseria gonorrhoeae*, s MIC-om od 0·09 µg/mL. *Sphaerococcus coronopifolius*, kozmopolitska crvena alga prikupljena duž atlantske obale Maroka, sadrži potentni antibakterijski diterpen, bromosferon koji pokazuje antibakterijsku aktivnost protiv bakterije *S. aureus*, s MIC-om od 0·047 µg/mL. Niže gljive izolirane s površine smeđe alge *Rosenvingea* sp. iz roda *Pestalotia*, prikupljene na Bahamima, kokultivirane su s morskom bakterijom kako bi se dobio pestalone. Pestalone ima snažnu antibiotsku aktivnost protiv meticilin-rezistentne bakterije *S. aureus*, s MIC-om od 0·037 µg/mL, te vancomycin-rezistentne vrste *Enterococcus faecium*, s MIC-om od 0·078 µg/mL. Ovi rezultati predstavljaju važno postignuće pokazujući da mješovita fermentacija može potaknuti biosintezu novih antibiotika, sugerirajući da bi ovu metodu mogli koristiti za otkrivanje lijekova u budućnosti. Jorumicin je dimerički izokinolinski alkaloid koji je izoliran iz plašta i sluzi pacifičkog stražnjoškržnjaka *Jorunna funebris*. Inhibira rast različitih Gram-pozitivnih bakterija, kao što su *Bacillus subtilis* i *S. aureus*, pri koncentraciji od 0·050 µg/mL, s zonom inhibicije od 16 mm. Unatoč visokoj učinkovitosti, postoje određena ograničenja za daljnja istraživanja, uključujući citotoksične učinke pri IC50 od 0·012 µg/mL i teškoće u dobivanju čistih i stabilnih pripravaka (Donia i Hamann, 2003).

Dosadašnja istraživanja biološkog potencijala na ekstraktima i frakcijama dobivenim iz morskih organizama Jadranskog mora, pokazala su da ekstrakti jednog jadranskog žarnjaka imaju izrazito jako antimikrobno, odnosno inhibitorno djelovanje na stafilokok

*Staphylococcus aureus*, uzročnika širokog spektra bolesti (Matulja i sur., 2021). Istraživanja provedena na ekstraktima smeđe alge *Dictyota sp.* pokazala su da ima jako inhibitorno djelovanje na fotobakteriju *Photobacterium damsela* koja se najčešće javlja kod riba izazivajući velike ekonomske gubitke u akvakulturi (Martić i sur., 2023). Istraživanja na mikroalgama Jadranskog mora iz rodova *Nitzschia*, *Nanofrustulum*, *Picochlorum*, *Tetraselmis* i *Euhalothece* pokazala su da one predstavljaju sve važniji izvor bioaktivnih spojeva s antimikrobnim, antitumorskim, antivirusnim, antioksidacijskim učincima te povoljno djeluju na rast kao i potpora imunosnom sustavu (Grubišić i sur., 2022).

Tijekom godina, stotine novih spojeva identificirano je iz morskih organizama, što doprinosi razvoju novih prirodnih bioaktivnih spojeva iz mora. Napredak u tehnikama uzorkovanja te metode vođene bioaktivnošću pri separaciji i pročišćavanju olakšali su otkriće novih spojeva s terapijskim potencijalom (Hu i sur., 2015).

Napredak "OMICS" tehnologija omogućio je znanstvenicima uvid u složenost mikrobnih zajednica. Pospiješeno je razumijevanje toga koji organizmi zauzimaju određene metaboličke niše, kako međusobno djeluju i kako iskorištavaju hranjive tvari iz okoliša. Jugoistočna obala Jadranskog mora još uvijek zaostaje s dostupnim podacima o bioaktivnim sastavnicama, njihovim proizvođačima i primjeni u raznim granama biotehnologije mora.

U sklopu ovog diplomskog rada analiziralo se djelovanje i antimikrobni učinak estrahiranih tvari iz mekih tkiva morskih beskralježnjaka i bentoskih makroalga koji su prikupljeni na području Dubrovačko-neretvanske županije.

Ovim istraživanjem želi se produbiti naše razumijevanje o biološkim procesima i kemijskim interakcijama koji se odvijaju u morskom okolišu te istražiti antimikrobni učinak s potencijalnim značajem u područjima poput farmakologije, prehrambene industrije ili biotehnologije. Analizirajući interakcije ekstrakata morskih organizama i mikroorganizama iz različitih tipova okoliša, želimo dokazati da pojedini morski organizmi, uobičajeni stanovnici Jadranskog mora proizvode metabolite antimikrobnog djelovanja.

Ovo istraživanje će pružiti doprinos znanju o bioraznolikosti i bioaktivnosti izoliranih tvari organizama s istraživnog područja, a pritom možda potaknuti buduća

molekularna i nova područja istraživanja inovativnih proizvoda i biomaterijala iz morskog okoliša.

### 1.1. Odabrani morski organizmi u dostupnoj literaturi

Kemijska raznolikost povezana s morskim bioaktivnim spojevima i potragom za novim lijekovima, naziva se i "plavo zlato". Posljedično, uočen je značajan porast u otkrićima i objavljenim podacima u literaturi u proteklim desetljećima, osobito kod morskih beskralješnjaka. Spojevi koje pronalazimo u moru nerijetko pokazuju više od samo jednog oblika djelovanja. Školjkaš *Mytilus galloprovincialis*, priljepak *Patella sp.*, pužić *Gibbula sp.*, ježinac *Arbaca lixula*, te bentoske makroalge; smeđa alga *Colpomenia sinuosa*, zelene alge *Enteromorpha sp.* i *Ulva lactuca* i crvena alga *Corallina officinalis* su uobičajeni stanovnici istraživanog područja premda i na širem području jugoistočnog Jadrana za njih ne postoje dostupni podatci o bioaktivnim sastavnicama. Pretpostavlja se da su morski obalni sustavi kao što je Jadransko more, bogati izvor novih spojeva za medicinsku i biotehnološku primjenu. Otkrivanjem neistraženih geografskih lokaliteta i novih skupina organizama povećava se i mogućnost pronalaženja novih bioaktivnih sastavnica, a pritom i terapeutika. U nastavku su prikazani dostupni literaturni podatci o istraživanim organizmima i opisane su razne zapažene bioaktivnosti na drugim geografskim lokalitetima.

#### Dagnja - *Mytilus galloprovincialis*

Carstvo: Animalia

Koljeno: Mollusca

Razred: Bivalvia

Red: Mytilida

Porodica: Mytilidae

Rod: *Mytilus*

Vrsta: *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819)

Sredozemna dagnja *Mytilus galloprovincialis*, posjeduje antimikrobna svojstva koja je čine potencijalnim kandidatom za farmaceutsku upotrebu. Izolirani su i proučeni brojni antimikrobni peptidi (AMP), uključujući mitiline i mitimicine (Tincu i Taylor, 2004).

Osim mitilina, kod ove dagnje identificirani su i drugi AMP-ovi s antimikrobnim svojstvima. Na primjer, antifungalni peptid, mytimicin prvotno izoliran iz dagnje, *Mytilus edulis* usporava rast određenih gljivica (Otero-González i sur., 2010). Prisutnost mitimicina je također zabilježena za vrstu *M. galloprovincialis*, s identificiranim varijantama (Rey-Campos i sur., 2021). Istodobno pokazuje i antifungalna svojstva, a dio je imunološkog obrambenog sustava dagnje (Rey-Campos i sur., 2021).

Drugi aspekt farmakološkog potencijala *M. galloprovincialis* je njena antivirusna aktivnost. Peptid micitin C, koji je identificirani u hemolimfi i hemocitima dagnji, pokazao je antivirusnu aktivnost protiv ostreidnog herpesvirusa 1 (OsHV-1) (Novoa i sur., 2016). Ovi rezultati sugeriraju da otkriveni peptidi mogu imati ulogu u antivirusnim mehanizmima obrane dagnji i mogu imati potencijalne primjene u razvoju antivirusnih terapija.

Provedena je i biokemijska karakterizacija prirodnog enzima  $\alpha$ -ugljičeve anhidraze (CA) pročišćene iz plašta *M. galloprovincialis* (Perfetto i sur., 2017). Ovaj enzim sudjeluje u biomineralizacijskim procesima koji dovode do taloženja kalcijevog karbonata u ljusci dagnje (Perfetto i sur., 2017). Biokemijska karakterizacija enzima pruža uvid u njegovu strukturu i funkciju, što može imati implikacije za razumijevanje procesa formiranja ljuske i potencijalne primjene u istraživanju biomineralizacije.

Provedena su istraživanja o upotrebi proteinskih adheziva dagnje za ekološki prihvatljiva ljepila u medicini i podvodnim aplikacijama. Proteini poput Mgfp-5 uspješno su proizvedeni u rekombinantnom obliku i pokazali su značajnu adhezijsku sposobnost, što ukazuje na njihov potencijal kao bioadheziva u medicinskim ili podvodnim istraživanjima (Hwang i sur., 2004).

Priljepak – *Patella sp.*

Carstvo: Animalia  
Koljeno: Mollusca  
Razred: Gastropoda  
Porodica: Patellidae  
Rod: *Patella* (Linnaeus, 1758)

Priljepci su morski organizmi koji sadrže bioaktivne spojeve s antibakterijskim i antimikrobnim svojstvima (Caramona i sur., 2022). Na primjer, stopalna sluz priljepka *Siphonaria pectinata* sadrži pectinat, antibiotik koji pokazuje aktivnost protiv Gram-pozitivnih bakterija i gljivica (Arboleda-Baena i sur., 2022).

Prisutnost bioaktivnih spojeva u priljepcima, poput alkaloida, lipida, polisaharida i proteina, ističe njihov potencijal za razvoj novih antimikrobnih sredstava za farmaceutsku upotrebu (Caramona i sur., 2022). Ti spojevi su pokazali različite bioaktivne funkcije, uključujući antimikrobnu, protuupalnu i antioksidacijsku aktivnost (Caramona i sur., 2022).

Ježinac - *Arbacia lixula*

Carstvo: Animalia  
Koljeno: Echinodermata  
Razred: Echinoidea  
Red: Arbacioida  
Porodica: Arbaciidae  
Rod: *Arbacia*  
Vrsta: *Arbacia lixula* (Linnaeus, 1758)

Ježinci su isto tako privukli pozornost kao potencijalni izvor bioaktivnih komponenti. Stabili i suradnici (2018) proveli su ispitivanje triju vrsta ježinaca, uključujući i vrstu *Arbacia lixula*, te su otkrili da posjeduju biološku aktivnost i antimikrobna svojstva. *A. Lixula* je posebno pokazala visoku antioksidacijsku aktivnost, što je čini potencijalnim

izvorom prirodnih antioksidansa (Stabili i sur., 2018). U drugom istraživanju koje su proveli Cirino i suradnici (2017), otkriveno je da je vrsta, *A. lixula* novi prirodni izvor astaksantina, karotenoida s raznim ljekovitim svojstvima. Istraživanje je istaknulo mogućnost uzgoja ove vrste kao novog potencijalnog izvora aktivnog stereoizomera astaksantina (Cirino i sur., 2017).

U istraživanju provedenom od strane Quarta i suradnika (2023) ježinci su također prepoznati po svojim antioksidacijskim svojstvima, koja igraju važnu ulogu u borbi protiv oksidativnog stresa, ključnog faktora u raznim kroničnim bolestima poput ateroskleroze i upalnih procesa. Oksidativni stres može dovesti do oštećenja tkiva i aktivacije proupalnih faktora. Stoga je razvoj antioksidacijskih spojeva važan terapijski cilj. U ovom istraživanju, ekstrakt ježinca *A. lixula*, pokazao je antioksidacijsku aktivnost, potencijalno zbog svojih fenolnih spojeva. Ti fenoli posjeduju snažna antioksidacijska svojstva, neutralizirajući reaktivne kisikove spojeve i regulirajući stanične antioksidacijske sustave. Ovaj ekstrakt može biti vrijedan izvor prirodnih antioksidansa. Iako je potrebna daljnja karakterizacija njegova fenolnog sastava, obećava u borbi protiv upala i disfunkcije endotela (Quarta i sur., 2023).

Pužić – *Gibbula* sp.

Carstvo: Animalia

Koljeno: Mollusca

Razred: Gastropoda

Porodica: Trochidae

Rod: *Gibbula* (Risso, 1826)

Puževi ovog roda predmet su malobrojnih biomedicinskih istraživanja. Silva i suradnici (2012) istraživali su prisutnost tetrodotoksina u puževima *Gibbula* sp. i identificirali su ih kao nove vektore za širenje ovih toksina. Njihovo otkriće ističe važnost razumijevanja distribucije i ekološke uloge prirodnih spojeva iz mora. Prirodni ekstrakti iz puževa pripadnika roda *Gibbula*, temeljito su proučavani zbog svojih raznovrsnih bioloških aktivnosti i potencijalnih primjena u različitim područjima (Silva i sur., 2012). Ova istraživanja naglašavaju bogatu kemijsku raznolikost i ekološki značaj ovih puževa te

navode njihov potencijal za otkrivanje novih spojeva s terapijskim primjenama. Nadalje, u istraživanju novih terapeutika za liječenje Alzheimerove bolesti, ističe se potencijal lijekova morskog podrijetla, uključujući one dobivene iz puževa pripadnika roda *Gibbula* (Samadi i Steiner, 2010).

#### Smeđa alga - *Colpomena sinuosa*

Carstvo: Protoctista

Odjeljak: Heterocontophyta

Razred: Phaeophyceae

Red: Ectocarpales

Porodica: Scytosiphonaceae

Rod: *Colpomenia*

Vrsta: *Colpomena sinuosa* ((Mertens ex Roth) Derbès & Solier, 1851)

Studija Batista i suradnika (2014) istraživala je inhibicijske učinke ekstrakata bentoskih makrofita, uključujući smeđu algu *Colpomenia sinuosa*, na osjetljivost bakterija - QS – quorum sensing. QS je sustav komunikacije između stanica koji bakterije koriste za koordinaciju različitih fizioloških procesa, uključujući proizvodnju virulentnih faktora. Studija je utvrdila da većina bakterija izoliranih s površine *C. sinuosa* proizvodi spojeve koji inhibiraju QS, što ukazuje na prisutnost biološki aktivnih spojeva s potencijalnim farmakološkim primjenama.

Studija Monla i suradnika (2020) fokusirala se na citotoksične i apoptotske učinke ekstrakata iz alge *C. sinuosa*. Studija je procijenila antineoplastičnu aktivnost ekstrakata na različitim tumorskim stanicama i utvrdila da induciraju apoptozu, što je potvrđeno povećanjem populacije subG1 i povećanjem izražajnosti proteina p21. Ekstrakti su također pokazali antioksidativnu aktivnost, što ukazuje na njihov potencijal kao terapijskih agensa.

Istražujući kemijski sastav i potencijalne primjene ove alge, otkriveno je da njena ekstrahirana isparljiva ulja pokazuju antimikrobnu aktivnost protiv bakterija *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* (Pasdaran i sur., 2016).

Također, istražen je potencijal ove alge za uklanjanje teških metala iz vodenog stupca, ističući je kao ekološki prihvatljivog adsorbenta (Cirik i sur., 2012).

Zelena alga - *Enteromorpha* sp.

Carstvo: Plantae

Odjeljak: Chlorophyta

Razred: Ulvophyceae

Red: Ulvales

Porodica: Ulvaceae

Rod: *Enteromorpha* (Link, 1820)

Istraživanje Wanga i suradnika (2014), koji su probirom biološke aktivnosti i molekularnih struktura sulfatnih polisaharida (SP) ukazali na potencijalne antioksidativne učinke ekstrakata zelenih bentoskih algi, uključujući svojte roda *Enteromorpha*. Ti SP-ovi djeluju kao inhibitori ili hvatači slobodnih radikala, doprinoseći njihovoj antioksidativnoj aktivnosti.

Istraživanje koje su proveli Gupta i Abu-Ghannam (2011) raspravljalo je o potencijalnoj primjeni bentoskih makrofita u proces poboljšanja sigurnosti i kvalitete hrane. Studija je predložila da bioaktivni spojevi iz zelenih algi, poput svojti roda *Enteromorpha* imaju antioksidativna svojstva koja mogu poboljšati sigurnost i kvalitetu hrane.

Osim toga, istraživani su citotoksični i apoptotični učinci ekstrakata iz ovog roda na različite tumorske stanice (Fouda, 2023). Ti ekstrakti induciraju apoptozu i pokazuju antioksidativnu aktivnost, što ukazuje na njihov potencijal kao terapijskih agensa.

Antimikrobna aktivnost svojti roda *Enteromorpha* također je istraživana (Eliuz i sur., 2019). Njihovi ekstrakti pokazali su potencijalnu antimikrobnu aktivnost protiv različitih patogena, što ukazuje na prisutnost bioaktivnih spojeva s antimikrobnim svojstvima.



Alge pripadnice roda *Enteromorpha* sadrže visoki udio fenola, flavonoida i karotenoida, a pokazuju i antioksidativnu aktivnost (Sivaramakrishnan i sur., 2017). Njihov metanolni ekstrakt potvrdio je upravo takva svojstva.

Zelena alga - *Ulva lactuca*

Carstvo: Plantae

Odjeljak: Chlorophyta

Razred: Ulvophyceae

Red: Ulvacea

Porodica: Ulvaceae

Rod: *Ulva*

Vrsta: *Ulva lactuca* (Linnaeus, 1753)

*Ulva lactuca*, poznata kao morska salata, prepoznata je po svojem farmakološkom potencijalu i smatra se vrijednim izvorom bioaktivnih spojeva (Gamal, 2010). Izvor je fikokoloida ulvalan, a koji nalazi primijenu u raznim industrijama (Gamal, 2010). Također je bogata hranjivim tvarima, uključujući željezo, bjelančevine, jod, vitamine (A, B1 i C) te elemente u tragovima (Zaatout i sur., 2019). Ove hranjive tvari doprinose njezinim potencijalnim učincima na poboljšanje zdravlja i zaštitu od bolesti (Praba i Sumaya, 2022).

Alga *U. lactuca* je pokazala prisutnost različitih sekundarnih metabolita, kao što su alkaloidi, triterpenoidi, steroidi, saponini, fenolni spojevi i flavonoidi (Ardita i sur., 2021). Ovi aktivni spojevi pokazali su antibakterijske, protuupalne, antioksidacijske i antikoagulacijske aktivnosti (Ardita i sur., 2021). Antioksidativnu aktivnost ove makroalge se pripisuje visokom sadržaju prirodnih pigmenata (Cadara i sur., 2022). Potencijalne farmakološke primjene ove alge protežu se izvan njezinih svojstava antioksidansa i protuupalnosti. Studije su pokazale da ekstrakti ove zelene alge imaju citotoksičnu aktivnost i kemijski zaštitne učinke (Zaatout i sur., 2019). Aktivni spojevi prisutni u ekstraktima su ubrzali proces zacjeljivanja rana i pokazali antibakterijsku aktivnost protiv MRSA (Ardita i sur., 2021).

Crvena alga - *Corallina officinalis*

Carstvo: Plantae

Odjeljak: Rhodophyta

Razred: Florideophyceae

Porodica: Corallinaceae

Red: Corallinales

Rod: *Corallina*

Vrsta: *Corallina officinalis* (Linnaeus, 1758)

*Corallina officinalis* prepoznata je kao vrijedni izvori bioaktivnih tvari s različitim primjenama u biomedicini i kozmoceuticima (Pereira, 2018). Poznata je po stvaranju i primarnih i sekundarnih metabolita, koji imaju potencijal za korištenje u nutraceuticima, farmaceuticima i kozmeceuticima kao na primjer u sastavu zubnih pasta, losiona, regeneratora za kosu, krema, lijekova, filtera za sunčeve zrake, krema za brijanje, šampona, dezodoransa, sprejeva i pjena. (Pereira, 2018).

Bioaktivni sastojci koji se nalaze u algi *C. officinalis* imaju izravnu povezanost s kozmetičkom industrijom pokazavši učinke poput pomoći u zaštiti kože od oksidativnog stresa, smanjenju upala i poticanju obnove kože (Pereira, 2018).

Osim toga, smatraju se bogatim izvorima esencijalnih hranjivih tvari i minerala. Sadrže visoki udio vitamina, minerala i elemenata u tragovima koji su korisni za opće zdravlje (Pereira, 2018). Ovi nutrijenti doprinose potencijalnim učincima na poboljšanje zdravlja i moguću upotrebu u nutraceuticima.

## 1.2. Otpornost odabranih sojeva bakterija u dostupnoj literaturi

*Escherichia coli*

Koljeno BXII. Proteobacteria

Razred III. Gammaproteobacteria

Red XIII. Enterobacteriales

Porodica I. Enterobacteriaceae

Rod I. *Escherichia*

*Escherichia coli* ((Migula, 1895) Castellani & Chalmers, 1919)

*Escherichia coli*, značajan je sudionik antimikrobne rezistencije, što predstavlja velike izazove u liječenju infekcija uzrokovanih ovim patogenom. Rezistencija na antimikrobne agense postala je glavni izvor morbiditeta i smrtnosti diljem svijeta, s mikroorganizmima sposobnim razviti otpornost na bilo koji od korištenih lijekova. Najčešći mehanizmi bakterija uključeni u unutarnju rezistenciju uključuju smanjenu propusnost vanjske membrane i prirodnu aktivnost izbacivačkih pumpi. Osim toga, *E. coli* može razviti otpornost ograničavanjem unosa lijeka, modificiranjem ciljeva lijeka, inaktiviranjem lijeka i aktivnim izbacivanjem lijeka. Pojava antimikrobne rezistencije u *E. coli* rezultat je kako unutarnjih mehanizama tako i stečene rezistencije od drugih mikroorganizama (Reygaert, 2018).

Neodgovorna uporaba antibiotika u kliničkoj praksi doprinijela je razvoju rezistencije kod bakterija (Kapoor i sur., 2017). Izolati *E. coli* pokazali su visoku rezistenciju na različite antibiotike, uključujući ampicilin, aminoglikozide i sulfonamide (Ashour i El-Sharif, 2009). Prisutnost gena rezistencije u *E. coli*, kao što su geni rezistencije na tetraciklin i sulfonamide, često je povezana s plazmidima i transpozonima, što olakšava njihov prijenos na druge bakterije (Pavelquesi i sur., 2021). Razumijevanje mehanizama rezistencije u *E. coli* ključno je za razvoj učinkovitih strategija liječenja i suzbijanje širenja antimikrobne rezistencije (Kapoor i sur., 2017).

*Enterobacter aerogenes*

Koljeno BXII. Proteobacteria NP

Razred III. Gammaproteobacteria

Red XIII. Enterobacteriales

Porodica I. Enterobacteriaceae

Rod XII. *Enterobacter*

*Enterobacter aerogenes* (Hormaeche and Edwards, 1960)

*Enterobacter aerogenes*, gram-negativna bakterija, prepoznata je kao važni prilagodljivi patogen povezan s infekcijama koje se stječu u bolnicama te pokazuje otpornost na različite antibiotike. Učestalost infekcija s *E. aerogenesom* u kliničkim okruženjima povećala se zbog uvođenja antibiotika iz skupine proširenih spektara cefalosporina i karbapenema. Mehanizmi otpornosti u *E. aerogenes* uključuju redundantne regulacijske kaskade koje kontroliraju propusnost membrane i izražavanje detoksikacijskih enzima, kao i stjecanje genetskih mobilnih elemenata koji doprinose antibiotskoj rezistenciji (Davin-Regli i Pagès, 2015).

Istraživanja su izvijestila o prisutnosti rezistencije na karbapeneme i produkciji karbapenemaza kod izolata *E. aerogenesa*. Pojava sojeva otpornih na karbapeneme i horizontalni prijenos gena za rezistenciju izazivaju zabrinutost zbog učinkovitosti antibiotskog liječenja i potrebe za metodama ranog otkrivanja (Khajuria i sur., 2014). Otpornosni obrasci i učestalost infekcija s *E. aerogenesom* proučavani su u različitim kliničkim okruženjima, uključujući jedinice intenzivne skrbi i bolnice (Intra i sur., 2023). Mogućnost *E. aerogenesa* da pokaže otpornost na više antibiotika postavlja izazove u liječenju i kontroli infekcija koje uzrokuje ovaj patogen (Jibola-Shittu i sur., 2022).

*Salmonella* sp

Koljeno BXII. Proteobacteria

Razred III. Gammaproteobacteria

Red XIII. Enterobacteriales

Porodica I. Enterobacteriaceae

Rod XXXIV. *Salmonella* (Lignieres 1900)

### *Salmonella* sp.

Salmonela je uobičajeni uzročnik trovanja hranom koji može izazvati teške oblike bolesti kod ljudi. U objavljenim rezultatima istraživanja, znanstvenici su analizirali različite metode za suzbijanje kontaminacije salmonelom.

U istraživanju provedenom od strane Alessani i sur. (2022) analizirani su sojevi *Salmonella* sp. izolirani iz hrane te je najveća rezistencija zabilježena prema ampicilinu, sulfametoksazolu i tetraciklinima.

Zbog sposobnosti salmonele da se prilagodi stresovima ekstremnih fizičkih i kemijskih uvjeta kao što su isušivanje, temperatura, pH, nedostatak hranjivih tvari itd., može opstati dugi niz godina u suhom okolišu. Iako organizam ne raste u proizvodima s niskim udjelom vlage poput suhog mlijeka u prahu, čokolade ili kikirikija i badema može ostati vijabilan dulje vrijeme, posebno kada se čuva na hladnim temperaturama. Stoga sojevi roda *Salmonella* predstavljaju potencijalnu opasnost za širok spektar proizvoda s niskim udjelom vlage ako nisu čuvani u kontroliranim uvjetima. Termalna otpornost salmonele značajno je pojačana u proizvodima s niskim udjelom vlage (Podolak i sur., 2010). Nadalje, prethodna istraživanja su pokazala da se toplotna otpornost *S. typhimurium* može mijenjati tijekom zagrijavanja na rastućim temperaturama (Mackey i Derrick, 1987).

### *Listeria monocytogenes*

Koljeno BXIII. Firmicutes

Razred III. Bacilli

Red I. Bacillales

Porodica IV. Listeriaceae

Rod I. *Listeria*

*Listeria monocytogenes* (Pirie, 1940)

Antibiotička rezistencija u *Listeria monocytogenes*, bakterije koja može uzrokovati trovanje hranom, predstavlja sve veći problem. Istraživanja su pokazala da se počinju pojavljivati različite vrste *Listeria-e*, uključujući *L. monocytogenes*, koji su otporni na antibiotike i to ne samo u prehrambenim proizvodima već i u okolišu te u kliničkim slučajevima listerioze. Rezistencija na antibiotike kao što su tetraciklin i penicilin često je zabilježena. Također, sugerira se da *Listeria sp.* ima sposobnost prenošenja gena za antibiotičku rezistenciju od drugih bakterijskih vrsta, kao što su *Enterococcus*, *Streptococcus* i *Staphylococcus*, putem horizontalnog prijenosa gena. Istraživanja provedena in vitro i in vivo su dokazala da se antibiotički rezistentni plazmidi mogu prenositi unutar roda *Listeria*, uključujući *L. monocytogenes*. Važno je napomenuti da se stope i profili rezistencije mogu razlikovati između različitih vrsta *Listeria*, pri čemu *L. innocua* pokazuje višu razinu rezistencije u usporedbi s *L. monocytogenes*. Kontinuirani nadzor i primjerena uporaba antibiotika od suštinskog su značaja kako bi se pratile i suzbile pojave antibiotičke rezistencije u *L. monocytogenes* te osigurala učinkovita terapija za infekcije uzrokovane ovim patogenom (Walsh i sur., 2001).

Rezistencija *L. monocytogenes* na stresne uvjete koji se javljaju u hrani i okolišu za obradu hrane predstavlja značajnu zabrinutost. *L. monocytogenes* pokazuje otpornost na širok raspon stresnih uvjeta, uključujući kiselost, oksidativni i osmotski stres, niske ili visoke temperature i prisutnost konzervirajućih aditiva. Ova otpornost predstavlja izazove u kontroli *L. monocytogenes* duž cijelog lanca proizvodnje hrane, od proizvodnje do skladištenja i konzumacije (Bucur i sur., 2018). Također, utvrđeno je da *L. monocytogenes* biofilmovi pokazuju otpornost na sredstva za dezinfekciju koja se često koriste u okruženjima za obradu hrane, poput kvaternarnih amonijevih spojeva, klora i peroksida (Pan i sur., 2006).

*Staphylococcus aureus*

Koljeno BXIII. Firmicutes

Razred III. Bacilli

Red I. Bacillales

## Porodica VIII. Staphylococcaceae

### Rod I. *Staphylococcus*

#### *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884)

Pojava i širenje antibiotske rezistencije u *Staphylococcus aureus* postavlja značajne izazove u zdravstvenim ustanovama. Stope rezistencije na konvencionalne antibiotike povećale su se na visoke razine u nekim bolnicama, a učestalost infekcija uzrokovanih *S. aureusom* koji se dobiva u zajednici i u bolnici također je porasla, posebno kod sojeva meticilin-rezistentnog *S. aureusa* (MRSA) (Foster, 2017; Ansari i sur., 2014). Mehanizmi rezistencije u *S. aureusu* mogu uključivati horizontalni prijenos determinanta rezistencije kodiranih mobilnim genetskim elementima ili mutacije u kromosomskim genima (Foster, 2017). Meticilinska rezistencija, koja predstavlja veliku zabrinutost, često je povezana s rezistencijom na više drugih antibiotika, što ograničava opcije liječenja (Ansari i sur., 2014). Razvijaju se novi antibiotici i istražuju informirane kombinacije lijekova kako bi se suzbila rezistencija (Foster, 2017). Također, istražuju se alternativni pristupi poput ciljanja faktora virulencije ili stvaranja rekombinantnih antitijela za detekciju (Jing i sur., 2022; Kim i sur., 2022). Učestalost MRSA i njegovi profili osjetljivosti na antibiotike ispitivani su u različitim kliničkim uzorcima (Ansari i sur., 2014; Ponmurugan i sur., 2022). Nadalje, istraživanja su ispitivala potencijal prirodnih spojeva poput kvercetina i lizobaktina za smanjenje virulencije *S. aureusa* i suzbijanje MRSA (Jing i sur., 2022; Watanabe i Arakawa, 2021).

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. Lokalitet

Uzorci su prikupljeni na području Dubrovačko-neretvanske županije, točnije u Gruškom zaljevu, na strani Lapadske obale (Slika 1).



Slika 1. Prikaz Gruškog zaljeva, crvena oznaka na lokaciji prikupljanja uzoraka na Lapadskoj obali. (Izvor: <https://www.google.com/maps>)

### 2.2. Organizmi

Za potrebe istraživanja antimikrobnog potencijala morskih organizama odabrane su i životinjske i algalne vrste; prikupljeno je osam morskih organizama, i to četiri beskralježnjaka i četiri bentoske makroalge. Ovaj odabir organizama omogućio nam je raznoliko proučavanje antimikrobnog učinka i određivanje potencijalno značajne metode ekstrakcije bioaktivnih spojeva prisutnih u morskim organizmima.



Predstavnicima beskraljeznjaka korišteni u ovom istraživanju su školjkaš mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* (Slika 2), priljepak *Patella sp* (Slika 3), pužić *Gibbula sp.* (Slika 4), te ježinac *Arbaca lixula* (Slika 5).



Slika 2. Mediteranska dagnja *Mytilus galloprovincialis* prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev.

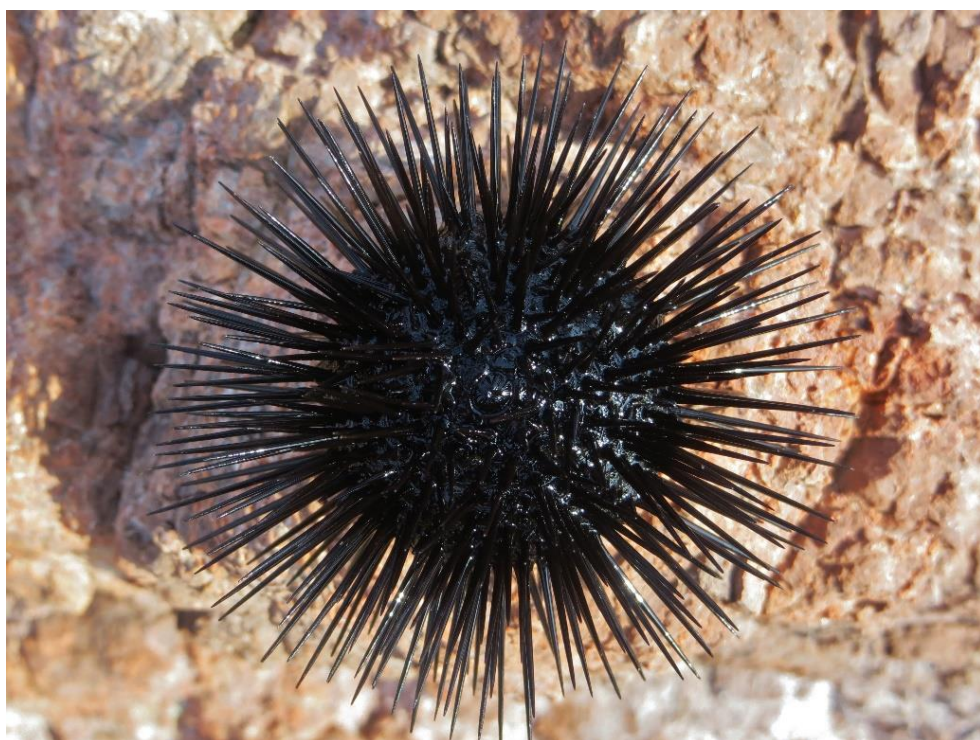


Slika 3. Priljepak *Patella sp.* prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev.



Slika 4. Pužić *Gibbula* sp. prikupljen na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev.

(Izvor: <https://en.wikipedia.org/>)



Slika 5. Ježinac *Arbacia lixula* prikupljen na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev.

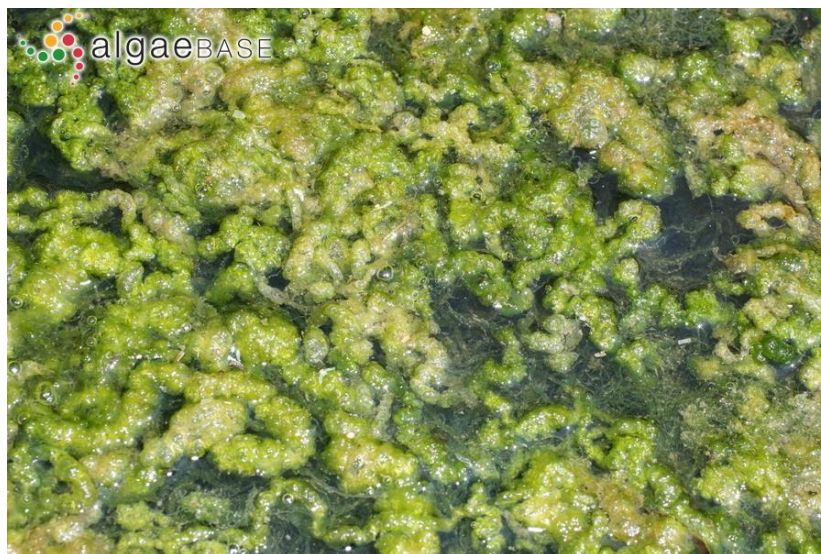
(Izvor: <https://en.wikipedia.org/>)

Predstavnici bentoskih makroalga korištenih u ovom istraživanju su smeđa alga, *Colpomenia sinuosa* (Slika 6), zelene alge, *Enteromorpha* sp. (Slika 7) i *Ulva lactuca* (Slika 8) i crvena alga, *Corallina officinalis* (Slika 9)



Slika 7. Smeđa alga, *Colpomenia sinuosa* prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev. (Izvor:

[https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img\\_id=21337](https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=21337))



Slika 8. Zelena alga, *Enteromorpha* sp. prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev. (Izvor:

[https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img\\_id=11458](https://www.algaebase.org/search/images/detail/?img_id=11458))



Slika 9. Zelena alga, *Ulva lactuca* prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev. (Izvor: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=39](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=39))



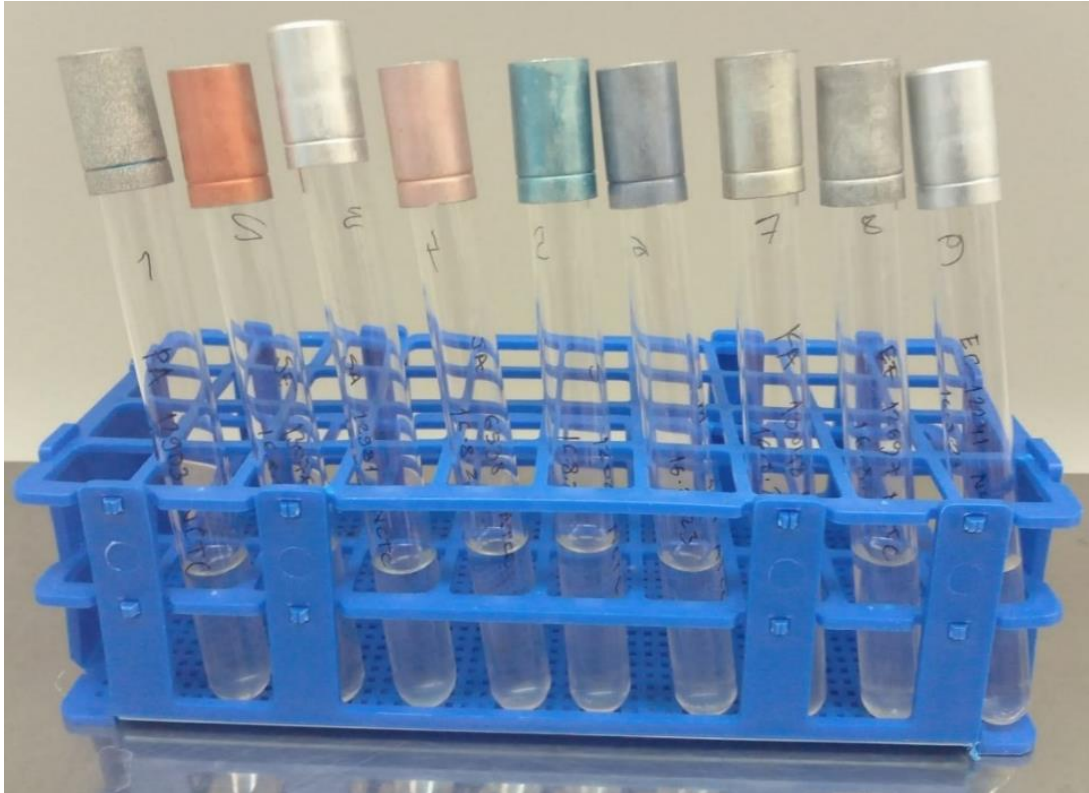
Slika 10. Crvena alga, *Corallina officinalis* prikupljena na lokalitetu Lapadska obala, Gruški zaljev. (Izvor: [https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species\\_id=107](https://www.algaebase.org/search/species/detail/?species_id=107))

Za određivanje taksonomskih razreda istraživanih organizama koristili su se izvori Riedl, 1989. i Brenner, 2005., te mrežne stranice World Register of Marine Species ([www.marinespecies.org](http://www.marinespecies.org)) i Algae Base ([www.algaebase.org](http://www.algaebase.org)).

Istraživanje antimikrobnog potencijala odabranih morskih organizama provodilo se na referentnim sojevima bakterija (Slika 11.) dobivenih iz Zavoda za javno zdravstvo Dubrovačko-neretvanske županije (ZZJZ DNŽ). Specifikacije referentnih sojeva bakterija korištenih u ovom istraživanju dane su u Tablici 1.

Tablica 1. Popis referentnih sojeva bakterija korištenih u ovom istraživanju

Redni broj	Referentni soj	izvor	oznaka
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Public Health England	NCTC 12903 (WDCM 00025)
2	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis	American Type Culture Collection	ATCC 13076 (WDCM 00030)
3	<i>Staphylococcus aureus</i>	Public Health England	NCTC 12981 (WDCM 00034)
4	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Rosenbach	American Type Culture Collection	ATCC 6538
5	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serotype Typhimurium	Public Health England	NCTC 12023 (WDCM 00031)
6	<i>Listeria monocytogenes</i>	American Type Culture Collection	ATCC 19111 (WDCM 00020)
7	<i>Enterobacter aerogenes</i>	American Type Culture Collection	ATCC 13048
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Public Health England	NCTC 12697 (WDCM 00087)
9	<i>Escherichia coli</i>	Public Health England	NCTC 12241 (WDCM 00013)



Slika 11. Referentni sojevi bakterija dobiveni iz ZZJZ DNŽ.

## 2.3. Dobivanje ekstrakata odabranih morskih organizama

### 2.3.1. Homogenizacija

Kako bi ekstrakcija antimikrobnih spojeva bila što uspješnija prvo je potrebno homogenizirati uzorke odabranih organizama. Prikupljeni organizmi su očišćeni od epifita, isprani vodovodnom vodom te usitnjeni.

Uzorci algi su sušeni u sušioniku Instrumentaria ST-06 (Zagreb, Hrvatska) na temperaturi od 105 °C. Nakon 24 sata, dobiveni potpuno suhi uzorci homogenizirani su pomoću keramičkog tučka i tarionika (Slika 12).

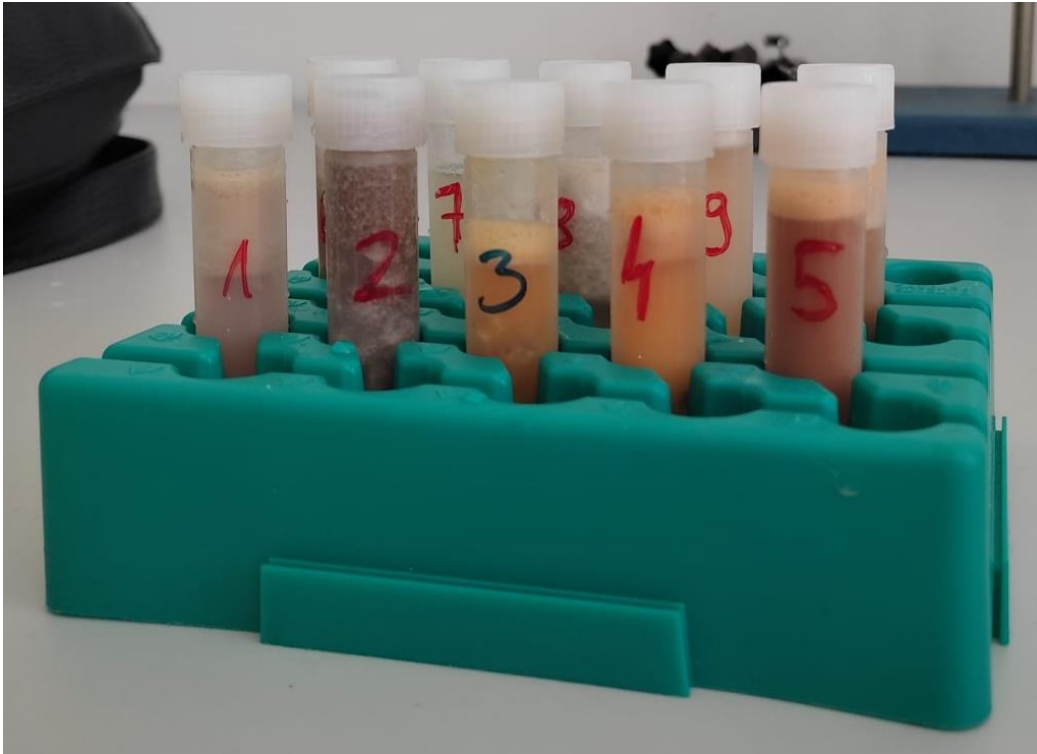


Slika 12. Usitnjavanje uzoraka algi nakon 24-satnog sušenja.

Uzorci životinjskog tkiva su homogenizirani pomoću keramičkih kuglica u homogenizatoru Bead ruptor (OMNI International) (Slika 13). Postupak se provodio uz povremeno hlađenje sve do dobivanja potpuno homogene smjese (Slika 14).



Slika 13. Homogeniziranje uzoraka u uređaju Bead ruptor (OMNI International).

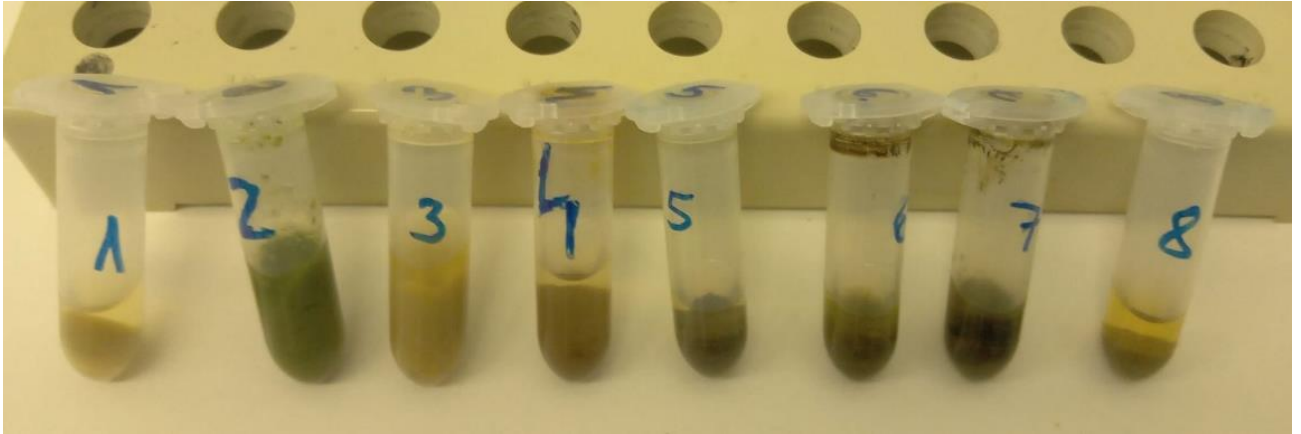


Slika 14. Homogenizirani uzorci odabranih životinjskih organizama.

### 2.3.2. Ekstrakcija

U mikroeprovete od 2 mL je kvantitativno preneseno po 0,5 mL uzorka praha suhih algi te po 1 mL homogene smjese životinjskih uzoraka. Zatim je dodan je 1 mL etilnog acetata (Kemika, Zagreb) te je takva smjesa stavljena u termomikser na 72 sata, pri brzini 1000 rpm i temperaturi od 35°C kako bi se postigla potpuna ekstrakciju bioaktivnih spojeva. Zatim je slijedilo uparavanje na sobnoj temperaturi 24 sata radi koncentriranja ekstrakta. Nakon toga je dodan 1 mL metanola (Kemika, Zagreb) te su uzorci opet stavljeni u termomikser na 72 sata, pri brzini 1000 rpm i temperaturi od 35°C. Opet je slijedilo uparavanje na sobnoj temperaturi 24 sata radi koncentriranja ekstrakta. Nakon toga je dodan 1 mL mješavine vode i metanola (50:50), te su uzorci ponovno stavljeni u termomikser na 72 sata, pri brzini 1000 rpm i temperaturi od 35°C nakon čega je ponovno slijedilo uparavanje na sobnoj temperaturi 24 sata. Tako dobiveni ekstrakti (Slika 15) korišteni su za ispitivanje njihovog antimikrobnog potencijala.





Slika 15. Prikaz ekstrakata odabranih morskih organizama.

## 2.4. Disk difuzijska metoda

Disk difuzijska metoda temelji se na difuziji ispitivane tvari s diska u hranjivu podlogu s ispitivanim mikroorganizmima pri čemu se antimikrobno djelovanje ispitivane tvari očituje kao inhibicija rasta mikroorganizama oko diska. Za rast bakterija korištena je *Tryptic glucose yeast agar* (Biolife, Milano) hranjiva podloga (Slika 16).



Slika 16. Prikaz pripreme *Tryptic glucose yeast agar* podloge.

Po 1 ml tekuće kulture referentnih sojeva bakterija dodan je u Petrijevu zdjelicu s autoklaviranom toplom podlogom, podloga je promiješana kružnim kretanjem kako bi se osigurao ravnomjeran rast bakterija te ostavljena da očvrсне.

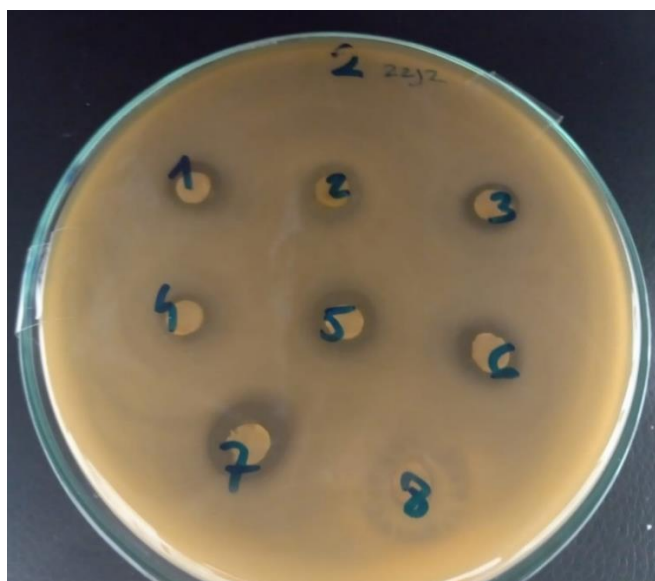


Slika 17. Prikaz steriliziranih filter papira.

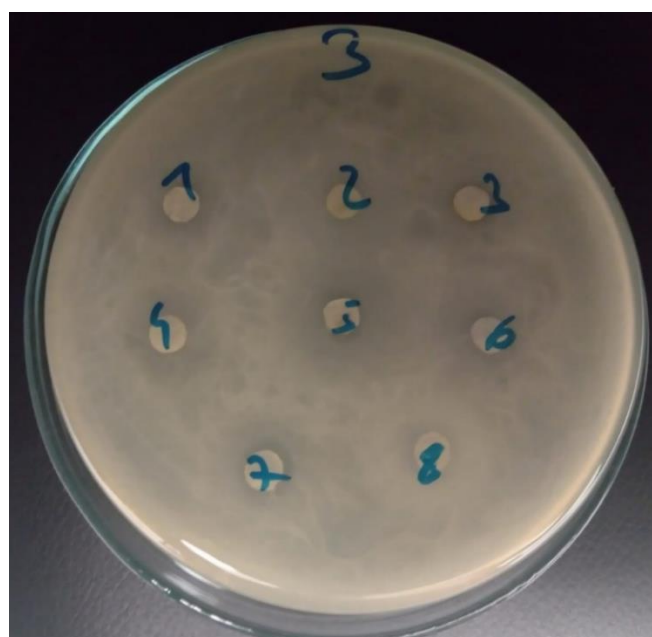
Diskovi filter papira promjera 5 mm sterilizirani su 24 sata pri temperaturi od 105 °C (Slika 17). Diskovi su natopljeni odgovarajućim ekstraktom i nanešeni na čvrste hranjive podloge s bakterijama. Podloge su inkubirane u inkubatoru Nuve 400 48 sati pri temperaturi od 37 °C nakon čega je slijedilo očitavanje rasta bakterija.

### 3. REZULTATI

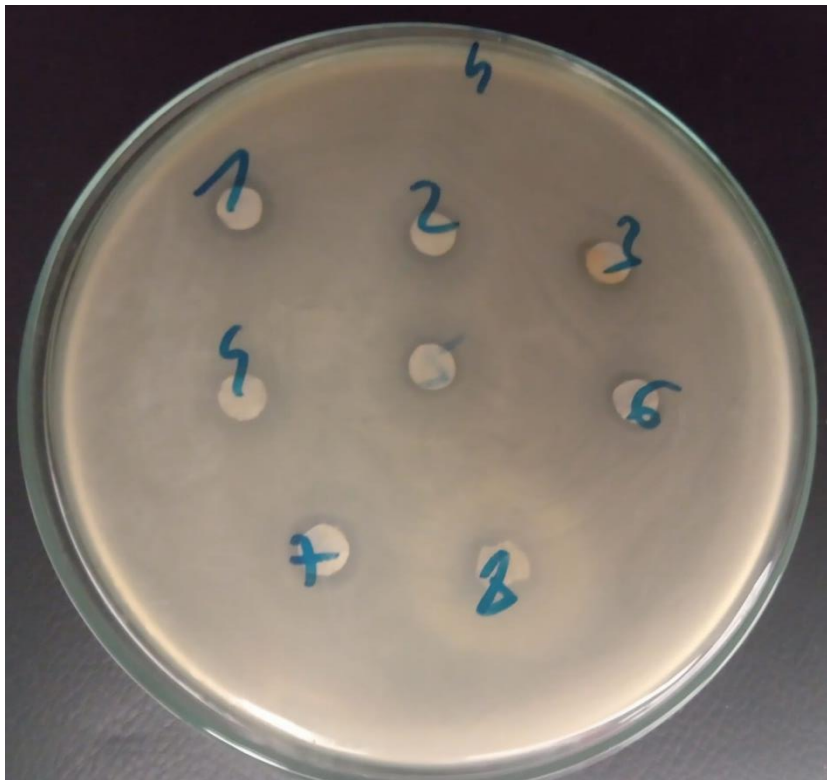
Rast ispitivanih referentnih sojeva bakterija na hranjivoj podlozi s diskovima prikazan je na slikama 18 – 24 pri čemu su jasno vidljive zone homogenog rasta, zone inhibicije te zone difuzije ekstrakta u podlogu. Rezultati rasta bakterija *Pseudomonas aeruginosa* i *Enterococcus faecalis* isključeni su radi kontaminacije. Rezultati istraživanja antimikrobnog potencijala odabranih morskih organizama prikazani su u tablici 2.



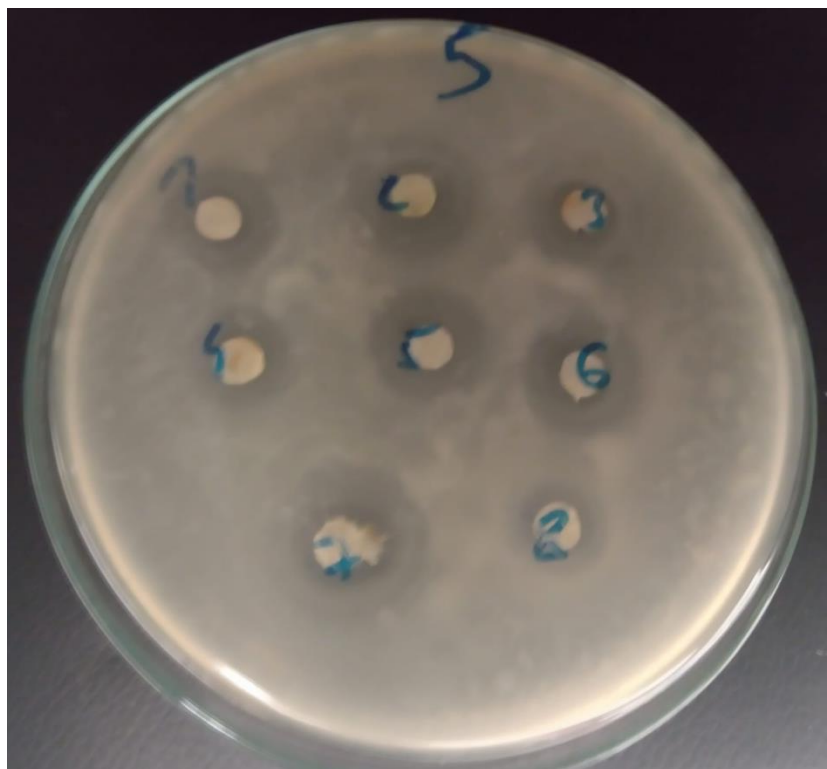
Slika 18. Referentni soj *Salmonella enterica* ATCC13076



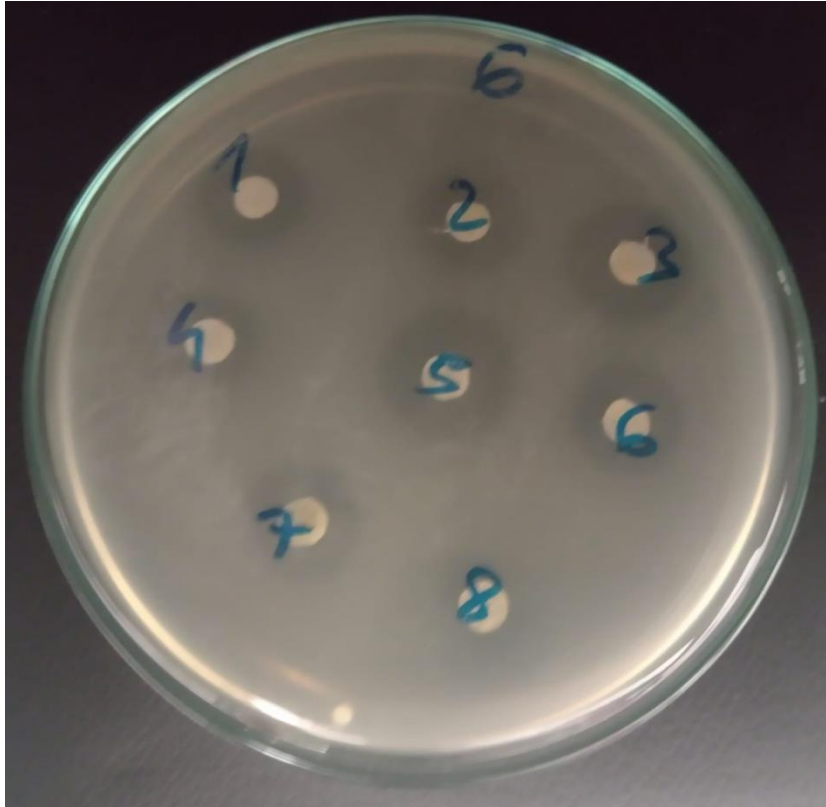
Slika 19. Referentni soj *Staphylococcus aureus* NCTC 12981



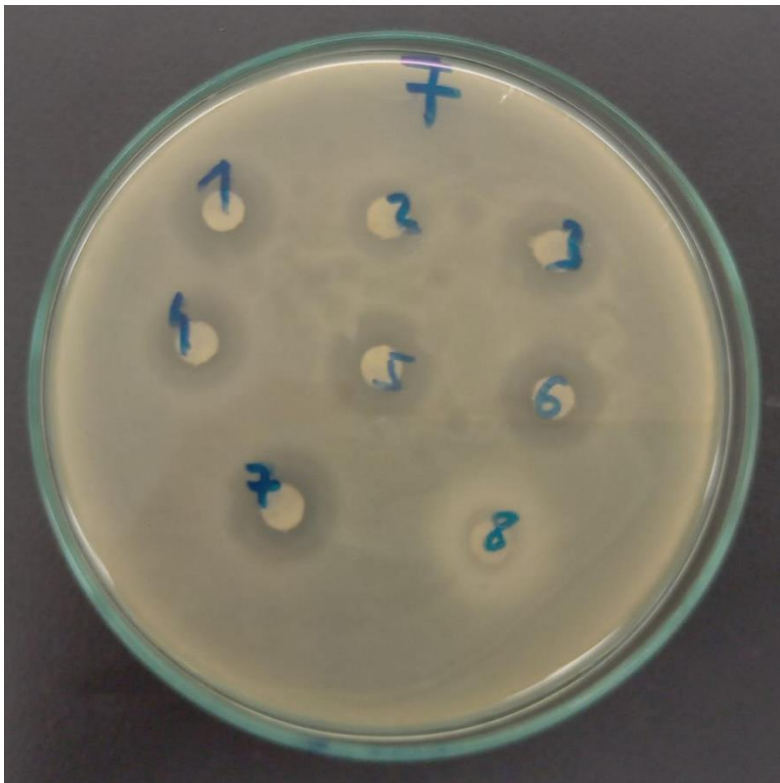
Slika 20. Referentni soj *Staphylococcus aureus* ATCC 6538



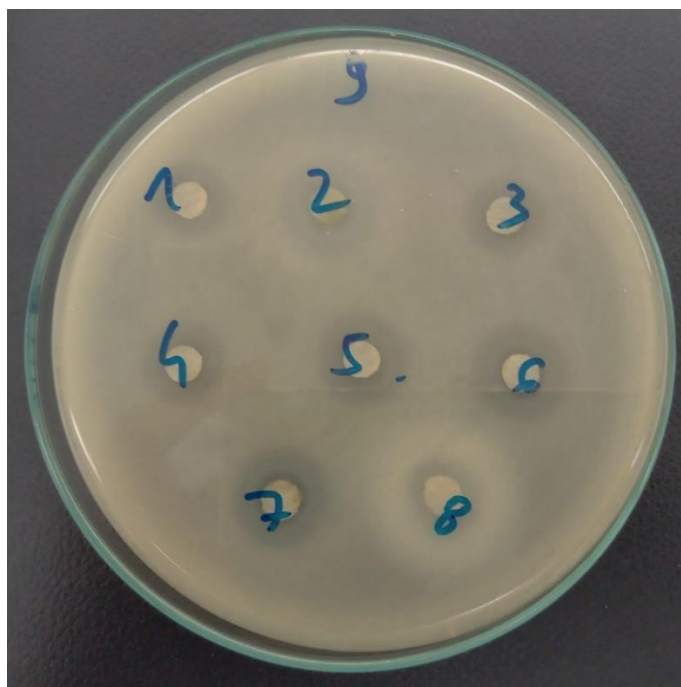
Slika 21. Referentni soj *Salmonella enterica* NCTC 12023



Slika 22. Referentni soj *Listeria monocytogenes* ATCC 19111



Slika 23. Referentni soj *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048



Slika 24. Referentni soj *Escherichia coli* NCTC 12241

Tablica 2. Rezultati istraživanja antimikrobnog potencijala odabranih morskih organizama. / – nije dokazano antibakterijsko djelovanje, ⊖ – dokazano antibakterijsko djelovanje, 2 – *Salmonella enterica* ATCC 1307, 3 – *Staphylococcus aureus* NCTC 12981, 4 – *S. aureus* ATCC 6538, 5 – *S. enterica* NCTC 12023, 6 – *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, 7 – *Enterobacter aerogenes* ATCC 13048, 9 – *Escherichia coli* NCTC 12241

bakterija / organizam	2	3	4	5	6	7	9
<i>Patella</i> sp.	⊖	/	⊖	⊖	⊖	/	/
<i>Gibbula</i> sp.	⊖	/	/	⊖	⊖	/	/
<i>Mytilus edulis</i>	⊖	/	⊖	⊖	⊖	/	/
<i>Arbacia lixula</i>	/	/	/	/	⊖	/	/
<i>Colpomena sinuosa</i>	⊖	/	/	⊖	⊖	/	/
<i>Enteromorpha</i> sp.	⊖	/	⊖	⊖	⊖	/	⊖
<i>Ulva lactuca</i>	⊖	/	⊖	⊖	⊖	/	/
<i>Corallina officinalis</i>	/	/	/	/	/	/	/

#### 4. RASPRAVA

U provedenom istraživanju kao najuspješniji organizam proizvođač spojeva antibakterijskog djelovanja pokazala se alga *Enteromorpha* sp. jer je antibakterijski učinak dokazan na pet od sedam korištenih bakterijskih sojeva; *S. enterica* ATCC 1307, *S. enterica* NCTC 12023, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 i *Escherichia coli* NCTC 12241. U dostupnoj literaturi postoje rezultati inhibicije rasta samo na bakterijama *S. aureus* i *E. coli* (Eliuz i sur., 2019; Wulanjati i sur., 2021; Rebecca i sur. 2012; Swathi i sur., 2022) pa se na temelju rezultata dobivenih ovim istraživanjem može zaključiti kako ova alga ima potencijal za daljnja biotehnoška istraživanja. Nadalje i zelena alga *U. lactuca* je pokazala visoku antibakterijsku aktivnost, učinak je dokazan na četiri od sedam bakterijskih sojeva; *S. enterica* ATCC 1307, *S. enterica* NCTC 12023, *S. aureus* ATCC 6538 i *L. monocytogenes* ATCC 19111. Do sada nisu objavljeni slični rezultati za ovu algu, ali su zabilježeni podaci o inhibiciji rasta kod roda *Ulva* na bakterijama *S. aureus* i *E. coli* (Rebecca i sur. 2012). Na iste bakterije je antibakterijski učinak dokazan i za ekstrakt priljepka *Patella* sp. te *M. galloprovincialis*. Vrsta *Patella* sp. je slabo istraživana pa pa je ovi rezultati smještaju na popis potencijalno zanimljivih vrsta. Istraživanja s dagnjom, *M. galloprovincialis* provode se dugi niz godina, njena antimikrobna svojstva čine je obećavajućim kandidatom za farmaceutsku upotrebu; raznolikost AMP-ova, poput mitilina i mitimicina, uz njihova komplementarna antimikrobna svojstva, pružaju potencijalne smjernice za razvoj novih antimikrobnih lijekova (Tincu i Taylor, 2004; Otero-González i sur., 2010; Rey-Campos i ur., 2021). Rezultati dobiveni u ovom istraživanju u skladu su s literaturnim podacima i mogu usmjeriti pažnju prema istraživanju upravo antibakterijskog učinka.

Nešto slabiji antibakterijski učinak, na tri od sedam ispitivanih bakterijskih sojeva; *S. enterica* ATCC 1307, *S. enterica* NCTC 12023 i *L. monocytogenes* ATCC 19111 dokazan je za ekstrakte pužića *Gibbula* sp., i smeđe alge *C. sinuosa*. Slična istraživanja za pužića, *Gibbula* sp. nisu pronađena, dok je za smeđu algu *C. sinuosa* zabilježeno antibakterijsko djelovanje na bakterije, *S. aureus* ATCC 6538-p i *S. aureus* ATCC 43300 (Demirel i sur., 2009). Ekstrakt ježinca *A. lixula* pokazao je antibakterijski učinak samo na jedan bakterijski soj; *L. monocytogenes* ATCC 19111. Međutim ranija istraživanja njegovih aktivnih spojeva potvrdila su biološku aktivnost i antimikrobna

svojstva (Stabili i suradnici, 2018). Također, *A. lixula* je vrsta koja nije jestiva i nije podložna intenzivnoj eksploataciji, kao što to trenutačno vrijedi za hridinskog ježinaca. Prirodne populacije su stoga i dalje abundantne. Istraživanje ježinca, *A. lixula* kao izvora bioaktivnih spojeva može doprinijeti razvoju novih antimikrobnih lijekova za suzbijanje rastućeg problema antimikrobne rezistencije.

Crvena alga *C. officinalis* nije pokazala antibakterijski učinak niti na jedan od bakterijskih sojeva, te u dostupnoj literaturi nisu pronađene informacije o antimikobnom djelovanju na odabrane organizme.

U provedenom istraživanju dva bakterijska soja, *S. aureus* NCTC 12981 i *E. aerogenes* ATCC 13048 su se pokazala kao najotpornija jer nije zabilježen antibakterijski učinak niti jednog ekstrakta od odabranih morskih organizama, dok je inhibiciju rasta bakterije *E. coli* NCTC 12241 uzrokovao samo ekstrakt zelene alge *Enteromorpha* sp. Iako se *S. aureus* NCTC 12981 pokazao najotpornijim, rast njegova srodnika *S. aureus* ATCC 6538 inhibirala su četiri ekstrakta, i to zelenih algi, priljepka i dagnje. Sojevi *S. enterica* ATCC 1307 i NCTC 12023 otporni su samo na ekstrakte ježinca i crvene alge, dok je samo na ekstrakt crvene alge otpornost pokazala *L. monocytogenes* ATCC 19111.

U literaturi su pronađena slična istraživanja provedena sa istim i srodnim sojevima bakterija, i morskim organizmima (Demirel i sur., 2009), ali se rezultati ne podudaraju s onima dobivenim u provedenom istraživanju što se može objasniti primjenom drugačijih metoda ekstrakcije. Metoda korištena u ovom istraživanju je modifikacija metoda ekstrakcije korištenih u istraživanjima Demirel i sur., 2009; Mokhlesi i sur., 2012; Abubakar i sur., 2012; Ibrahim, 2012; Eliuz i sur., 2019; Wulanjati i sur., 2020; Swath i sur., 2022. U navedenim istraživanjima ekstrakcije su rađene sa jednim otapalom u trajanju od 24 do 72 sata, dok su u ovom istraživanju provedene tri uzastopne ekstrakcije sa tri različita otapala u sveukupnom trajanju od 288 sati kako bi se dobio finalni produkt za daljnju analizu. Razlog ovog pristupa je u tome što svaka pojedinačna ekstrakcija cilja na određenu kemijsku grupu spojeva pa je pretpostavka da će provođenjem uzastopnih ekstrakcija s različitim otapalima ekstrakt biti kemijski raznolikiji i bogatiji od onoga dobivenog pomoću samo jednog otapala. S obzirom na dokazano antibakterijsko djelovanje ekstrakata dobivenih gore opisanom metodom, nameće se zaključak kako je metodu potrebno dodatno istražiti i optimizirati. Uz to, preporuča se i kemijska analiza dobivenih ekstrakata kako bi se otkrilo koji su to kemijski spojevi imali antibakterijska svojstva.



## 5. ZAKLJUČAK

Istraživanje antimikrobnog djelovanja različitih organizama, kako životinjskih tako i algalnih uzoraka, pruža značajan uvid u potencijalne izvore bioaktivnih spojeva s antibakterijskim svojstvima. Od životinjskih uzoraka, svi organizmi su pokazali obećavajuće antibakterijske učinke na različite bakterijske sojeve. Odabrane alge također su analizirane za antimikrobne učinke. Učinkovitost se razlikuje među vrstama algi, pri čemu alge *U. lactuca* i *Enteromorpha* sp. pokazuju najveću antimikrobnu aktivnost. *Enteromorpha* sp. kao najuspješniji organizam pokazuje antibakterijsko djelovanje na čak pet različitih sojeva, uključujući i *E. coli* na koju niti jedan drugi ekstrakt nije pokazao antibakterijsko djelovanje. Ovi rezultati ukazuju na veliki potencijal ovih algi kao izvora antibakterijskih spojeva.

Važno je napomenuti i da se naša modifikacija metode ekstrakcije čini obećavajućom. Metoda koja uključuje tri uzastopne ekstrakcije s različitim otapalima tijekom duljeg razdoblja pružila je pozitivne rezultate. Ovo istraživanje može poslužiti kao temelj za daljnje istraživanje i razvoj novih antibakterijskih lijekova, posebno u kontekstu rastuće antimikrobne rezistencije.

## 6. LITERATURA

Abubakar, L., Mwangi, C., Uku, J., Ndirangu, S. 2012. Antimicrobial activity of various extracts of the sea urchin *Tripneustes gratilla* (Echinoidea). African Journal of Pharmacology and Therapeutics. 1(1): 19-23.

Alessiani, A., Goffredo, E., Mancini, M., Occhiochiuso, G., Faleo, S., Didonna, A., Fischetto, R., Suglia, F., De Vito, D., Stallone, A., D'Attoli, L., Donatiello, A. 2022. Evaluation of antimicrobial resistance in *Salmonella* Strains isolated from food, animal and human samples between 2017 and 2021 in Southern Italy. Microorganisms. 10(4): 812.

Ansari, S., Nepal, H., Gautam, R., Rayamajhi, N., Shrestha, S., Upadhyay, G., Chapagain, M. 2014. Threat of drug resistant *Staphylococcus aureus* to health in Nepal. BMC Infectious Diseases. 14(1): 157.

Arboleda-Baena, C. M., Pareja, C. B., Pla, I., Logares, R., Iglesia, R. D. I., Navarrete, S. A. 2022. Hidden interactions in the intertidal Rocky Shore: variation in pedal mucus microbiota among marine grazers that feed on epilithic biofilm communities. PeerJ. 10: e13642.

Ardita, N., Mithasari, L., Untoro, D., Salasia, S. 2021. Potential antimicrobial properties of the *Ulva lactuca* extract against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*-infected wounds: a review. Veterinary World, 1116-1123.

Ashour, H., El-Sharif, A. 2009. Species distribution and antimicrobial susceptibility of gram-negative aerobic bacteria in hospitalized cancer patients. Journal of Translational Medicine, 7(1): 14.

Badiu, D., Balu, A., Barbes, L., Luque, R., Nita, R., Radu, M., Tanase, E., Rosoiu, N. 2008. Physico-chemical characterisation of lipids from *Mytilus galloprovincialis* (L.) and *Rapana venosa* and their healing properties on skin burns. Lipids. 9(43): 829-841.

Batista, D., Carvalho, A. M., Costa, R. d. S., Coutinho, R., Dobretsov, S. 2014. Extracts of macroalgae from the Brazilian coast inhibit bacterial quorum sensing. *Botanica Marina*. 6(57): 441-447.

Bordbar, S., Anwar, F., Saari, N. 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods - a Review. *Marine Drugs*. 10(9): 1761-1805.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., Garrity, G.M. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edition, vol. 2, parts A, B and C, Springer-Verlag, New York, str. 304.

Bucur, F., Grigore-Gurgu, L., Crauwels, P., Riedel, C., Nicolau, A. 2018. Resistance of *Listeria monocytogenes* to stress conditions encountered in food and food processing environments. *Frontiers in Microbiology*, str. 9.

Cadar, E., Negreanu-Pirjol, T., Negreanu-Pirjol, B. 2022. Antioxidant and antibacterial potential of *Ulva lactuca* species from romanian Black sea coast. *European Journal of Natural Sciences and Medicine*. 5(1): 27-39.

Caramona, A., Coimbra, I., Pinto, T., Aparício, S., Madeira, P. J. A., Ribeiro, H., Marto, J., Almeida, A. 2022. Repurposing of marine raw materials in the formulation of innovative plant protection products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 14(70): 4221-4242.

Cirik, Y., Bekçi, Z., Buyukates, Y., Ak, İ., Merdivan, M. 2012. heavy metals uptake from aqueous solutions using marine algae (*Colpomenia sinuosa*): Kinetics and Isotherms. *Chemistry and Ecology*. 5(28): 469-480.

Cirino, P., Brunet, C., Ciaravolo, M., Galasso, C., Musco, L., Fernández, T., Toscano, A. 2017. The sea urchin *Arbacia lixula*: a novel natural source of astaxanthin. *Marine Drugs*. 15(6): 187.

Davin-Regli, A., Pagès, J. 2015. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, str. 6.

Demirel, Z., Yilmaz-Koz, F. F., Karabay-Yavasoglu, U. N., Ozdemir, G., Sukatar, A. 2009. Antimicrobial and antioxidant activity of brown algae from the Aegean Sea. *Journal of the Serbian Chemical Society*. 74(6): 619-628.

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

Eliuz, E. A. E., Börekçi, N. S., Ayas, D. 2019. The antimicrobial activity of *Enteromorpha sp.* methanolic extract and gelatin film solution against some pathogens. *Marine Science and Technology Bulletin*. 2(8): 58-63.

Foster, T. 2017. Antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. Current status and future prospects. *Fems Microbiology Reviews*. 41(3): 430-449.

Fouda, F. 2023. Evaluation of photochemical components, antioxidant properties and cytotoxicity effects of some Egyptian algae extracts on some cancer cells. *Annals of Agricultural Science*. 61(1): 77-86.

Gamal, A. 2010. Biological importance of marine algae. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 18(1): 1-25.

Grubišić, M., Šantek, B., Zorić, Z., Cošić, Z., Vrana, I., Gašparović, B., Což-Rakovac, R., Ivančić Šantek, M. 2022. Bioprospecting of microalgae isolated from the Adriatic Sea: characterization of biomass, pigment, lipid and fatty acid composition, and antioxidant and antimicrobial activity. *Molecules*. (27): 1248.

Gupta, S., Abu-Ghannam, N. 2011. Recent developments in the application of seaweeds or seaweed extracts as a means for enhancing the safety and quality attributes of foods. *Innovative Food Science; Emerging Technologies*. 4(12): 600-609.

Hira, J., Wolfson, D., Andersen, A. J. C., Haug, T., Stensvåg, K. 2020. Autofluorescence mediated red spherulocyte sorting provides insights into the source of spinochromes in sea urchins. *Scientific reports*. 10(1): 1149.

Hossain, A. K., Dave, D., Shahidi, F. 2022. Antioxidant potential of sea cucumbers and their beneficial effects on human health. *Marine Drugs*. 8(20): 521.

Hwang, D. S., Yoo, H. J., Jun, J. K., Moon, W. K., Cha, H. J. 2004. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein mgfp-5 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(70): 3352-3359.

Jibola-Shittu, M., Badaki, J., Adown, M., Odewale, G. 2022. Antibiotic resistance: detection of extended-spectrum-beta-lactamase in *Enterobacteriaceae* from garden eggs. *Microbes and Infectious Diseases*. 4(3): 960-967.

Hu, Y., Chen, J., Hu, G., Yu, J., Zhu, X., Lin, Y., Chen, S., Yuan, J. 2015. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*. 13(1): 202-221.

Ibrahim, H. 2012. Antibacterial carotenoids of three *Holothuria* species in Hurghada, Egypt. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. 38: 185–194.

Intra, J., Carcione, D., Sala, R., Siracusa, C., Brambilla, P., Leoni, V. 2023. Antimicrobial resistance patterns of *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella aerogenes* strains isolated from clinical specimens: a twenty-year surveillance study. *Antibiotics*. 12(4): 775.

Jing, S., Kong, X., Wang, L., Wang, H., Feng, J., Wei, L., Meng, Y., Liu, C., Chang, X., Qu, Y., Guan, J., Yang, H., Zhang, C., Zhao, Y., Song, W. 2022. Quercetin reduces the virulence of *S. aureus* by targeting clpp to protect mice from mrsa-induced lethal pneumonia. *Microbiology Spectrum*, 10(2): e02340-21.

K., Moon, W. K., Cha, H. J. 2004. Expression of functional recombinant mussel adhesive protein mgfp-5 in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 6(70): 3352-3359.

Kapoor, G., Saigal, S., Elongavan, A. 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: a guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*. 33(3): 300.

Khajuria, A., Praharaj, A., Kumar, M., Grover, N. 2014. Carbapenem resistance among *Enterobacter* species in a tertiary care hospital in central India. *Chemotherapy Research and Practice*, 1-6.

Kim, J., Lim, G., Kim, E., Kim, W., Lee, C., Kim, B., Jeong, H. 2022. Generation of recombinant antibodies in hek293f cells for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Acs Omega*. 7(11): 9690-9700.

Lin, P., Shen, N., Yin, F., Guo, S. 2022. Sea cucumber-derived compounds for treatment of dyslipidemia: a Review. *Frontiers in Pharmacology*, str. 13.

Mackey, B., Derrick, C. 1987. Changes in the heat resistance of *Salmonella typhimurium* during heating at rising temperatures. *Letters in Applied Microbiology*. 4(1): 13-16.

Martić, A., Čižmek, L., Ul'yanovskii, N.V., Paradžik, T., Perković, L., Matijević, G., Vujović, T., Baković, M., Babić, S., Kosyakov, D.S., Trebaše, P., Což-Rakovac, R. 2023. Intra-species variations of bioactive compounds of Two *Dictyota* Species from the Adriatic Sea: antioxidant, antimicrobial, dermatological, dietary, and neuroprotective potential. *Antioxidants*. 12(4): 857.

Matulja, D., Grbcic, P., Bojanic, K., Topic-Popovic, N., Coz-Rakovac, R., Laclef, S., Smuc, T., Jovic, O., Markovic, D., Pavelic, S. 2021. Chemical evaluation, antioxidant, antiproliferative, anti-inflammatory and antibacterial activities of organic extract and semi-purified fractions of the Adriatic Sea Fan, *Eunicella cavolini*. *Molecules*. 26(19): 5751.

Mokhlesi, A., Saeidnia, S., Gohari, A., Shahverdi, Ahmad, R., Nasrolahi, A., Farahani, F., Khoshnood, R., Eshaghi, N., 2012. Biological activities of the sea cucumber *Holothuria leucospilota*. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 7(3): 243-249.

Monla, R. A., Dassouki, Z., Kouzayha, A., Salma, Y., Gali-Muhtasib, H., Mawlawi, H. 2020. The cytotoxic and apoptotic effects of the brown algae *Colpomenia sinuosa* are mediated by the generation of Reactive Oxygen Species. *Molecules*. 8(25): 1993.

Montuori, E., Capalbo, A., Lauritano, C. 2022. Marine compounds for melanoma treatment and prevention. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(23): 10284.

Novoa, B., Romero, A., Álvarez, Á., Moreira, R., Pereiro, P., Costa, M., Dios, S., Estepa, A., Parra, F., Figueras, A. 2016. Antiviral activity of Myticin C peptide from mussel: an ancient defense against herpesviruses. *Journal of Virology*. 17(90): 7692-7702.

Otero-González, A., Magalhães, B., Garcia-Villarino, M., López-Abarrategui, C., Sousa, D., Dias, S., Franco, O. 2010. Antimicrobial peptides from marine invertebrates as a new frontier for microbial infection control. *The FASEB Journal*. 24(5): 1320-1334

Pan, Y., Breidt, F., Kathariou, S. 2006. Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to sanitizing agents in a simulated food processing environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(12): 7711-7717.

Pasdaran, A., Hamed, A., Mamedov, N. A. 2016. Antibacterial and insecticidal activity of volatile compounds of three algae species of Oman Sea. *International Journal of Secondary Metabolite*, 66-73.

Pavelquesi, S., Ferreira, A., Rodrigues, A., Silva, C., Orsi, D., Silva, I. 2021. Presence of tetracycline and sulfonamide resistance genes in *Salmonella spp.*: literature review. *Antibiotics*. 10(11): 1314.

Pereira, L. 2018. Seaweeds as source of bioactive substances and skin care therapy—cosmeceuticals, algotherapy, and thalassotherapy. *Cosmetics*. 5(4): 68.

Perfetto, R., Vullo, D., Sansone, G., Barone, C., Rossi, M., Supuran, C. T., Capasso, C. 2017. Biochemical characterization of the native  $\alpha$ -Carbonic anhydrase purified from the mantle of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 1(32): 632-639.

Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G., Elliott, P. H. 2010. Sources and risk factors for contamination, survival, persistence, and heat resistance of *Salmonella* in low-moisture foods. *Journal of Food Protection*. 73(10): 1919–1936.

Ponmurugan, K., Raja, S., Poyil, M. 2022. Microbiological profile of diabetic foot infections and the detection of meca gene in predominant *Staphylococcus aureus*. *Zinc Supplementation Improves Heme Biosynthesis in Rats Exposed to Lead*. 41(2): 121-128.

Praba, N., Sumaya, D. 2022. Study on phytochemical and antioxidant properties of *Padina gymnospora* and *Ulva lactuca*. *International Journal of Life Science and Pharma Research*. 155-160.

Rebecca, J., Dhanalakshmi, V., Sharmila, D. 2012. Effect of the extract of *Ulva sp.* on pathogenic microorganisms. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 4(11): 4875-4878.

Rey-Campos, M., Novoa, B., Pallavicini, A., Gerdol, M., Figueras, A. 2021. Comparative genomics reveals 13 different isoforms of mytimycins (a-m) in *Mytilus galloprovincialis*. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(6): 3235.

Reygaert, W. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *Aims Microbiology*. 4(3): 482-501.

Riedl, R. 1983. *Fauna und Flora des Mittelmeeres*. Verlag Paul Parey Hamburg und Berlin, str. 836.



Samadi, L., Steiner, G. 2010. Expression of hox genes during the larval development of the snail, *Gibbula varia* (L.)—further evidence of non-colinearity in molluscs. *Development Genes and Evolution*. 220(5-6): 161-172.

Sanjeewa, K. K. A., Herath, K. H. I. N. M. 2023. Bioactive secondary metabolites in sea cucumbers and their potential to use in the functional food industry. *Fisheries and Aquatic Sciences*. 2(26): 69-86.

Silva, M., Azevedo, J., Rodríguez, P., Alfonso, A., Botana, L., Vasconcelos, V. 2012. New gastropod vectors and tetrodotoxin potential expansion in temperate waters of the Atlantic ocean. *Marine Drugs*. 10(12): 712-726.

Sivaramakrishnan, T., Swain, S., Saravanan, K., R, K., Roy, S., Biswas, L., Shalini, B. 2017. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity and chemometric approach to reveal their variability in green macroalgae from South Andaman Coast of India. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, str. 17.

Stabili, L., Acquaviva, M., Cavallo, R., Gerardi, C., Narracci, M., Pagliara, P. 2018. Screening of three echinoderm species as new opportunity for drug discovery: their bioactivities and antimicrobial properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-8.

Swathi, N., Anbazhagan, G. K., Vellaichamy, P., Sankarganesh, P. 2022. Isolation of *Enteromorpha* species and analyzing its crude extract for the determination of in vitro antioxidant and antibacterial activities. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-10.

Tamura, K., Stecher, G., Kumar, S. 2021. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 38(7): 3022–3027.

Tincu, J., Taylor, S. 2004. Antimicrobial peptides from marine invertebrates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 10(48): 3645-3654.

Thawabteh, A. M., Swaileh, Z., Ammar, M., Jaghama, W., Yousef, M., Karaman, R., A Bufo, S., Scrano, L. 2023. Antifungal and antibacterial activities of isolated marine compounds. *Toxins*. 15(2): 93.

Quarta, S., Scoditti, E., Zonno, V., Siculella, L., Damiano, F., Carluccio, M. A., Pagliara, P. 2023. In Vitro anti-inflammatory and vasculoprotective effects of red cell extract from the Black sea urchin *Arbacia lixula*. *Nutrients*. 15(7): 1672.

Walsh, D., Duffy, G., Sheridan, J., Blair, I., McDowell, D. 2001. Antibiotic resistance among *Listeria*, including *Listeria monocytogenes*, in retail foods. *Journal of Applied Microbiology*. 90(4): 517-522.

Yang, H., Zhang, Q., Zhang, B., Zhao, Y., Wang, N. 2023. Potential active marine peptides as anti-aging drugs or drug candidates. *Marine Drugs*. 3(21): 144.

Yuan, Y., Liu, Q., Zhao, F., Cao, J., Shen, X., Ding, Y. 2019. *Holothuria Leucospilota* polysaccharides ameliorate hyperlipidemia in high-fat diet-induced rats via short-chain fatty acids production and lipid metabolism regulation. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(20): 4738.

Yue, H., Tian, Y., Feng, X., Bo, Y., Xue, C., Dong, P., Wang, J. 2022. Novel peptides derived from sea cucumber intestine promotes osteogenesis by upregulating integrin-mediated transdifferentiation of growth plate chondrocytes to osteoblasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 41(70): 13212-13222.

Watanabe, Y., Arakawa, K. 2021. Complete genome sequences of two *Lysobacter* strains, isolated from seawater (*Lysobacter caseinilyticus*) and soil (*Lysobacter helvus*) in South Korea. *Microbiology Resource Announcements*. 10(28): e00337-21.

Wang, L., Wang, X., Wu, H., Liu, R. 2014. Overview on biological activities and molecular characteristics of sulfated polysaccharides from marine green algae in recent years. *Marine Drugs*. 9(12): 4984-5020.

Wulanjati, M., Indrianingsih, A., Darsih, C., Apriyana, W., Batrisya, 2020. Antioxidant and antibacterial activity of ethanolic extract from *Ulva* sp. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. 462: 12028.

Zaatout, H., Ghareeb, D., Abd-Elgwad, A., Ismael, A. 2019. Phytochemical, antioxidant, and anti-inflammatory screening of the egyptian *Ulva lactuca* methanolic extract. Records of Pharmaceutical and Biomedical Sciences. 33-38.

Mrežni izvori :

<https://www.algaebase.org> pristupljeno 3. 9. 2023.

<https://www.marinespecies.org> pristupljeno 4.9.2023.

## IZJAVA

S punom odgovornošću izjavljujem da sam završni rad izradila samostalno, služeći se navedenim izvorima podataka i uz stručno vodstvo mentora prof. dr. sc. Sanje Tomšić i doc. dr. sc. Marine Brailo Šćepanović

Romana Beloša

A handwritten signature in blue ink, reading "Romana Beloša". The signature is written in a cursive style with a large initial "R".