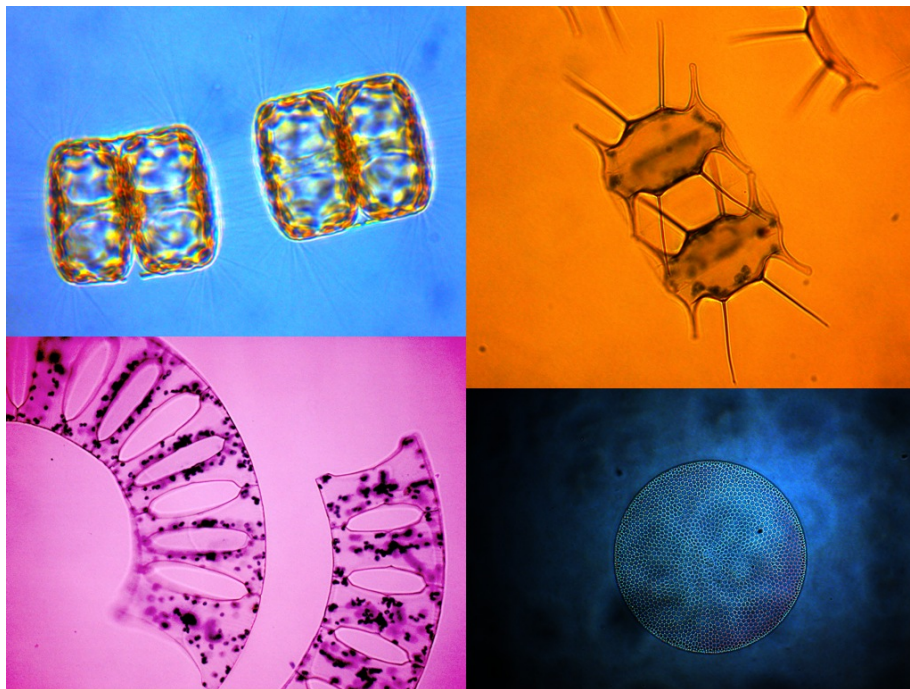


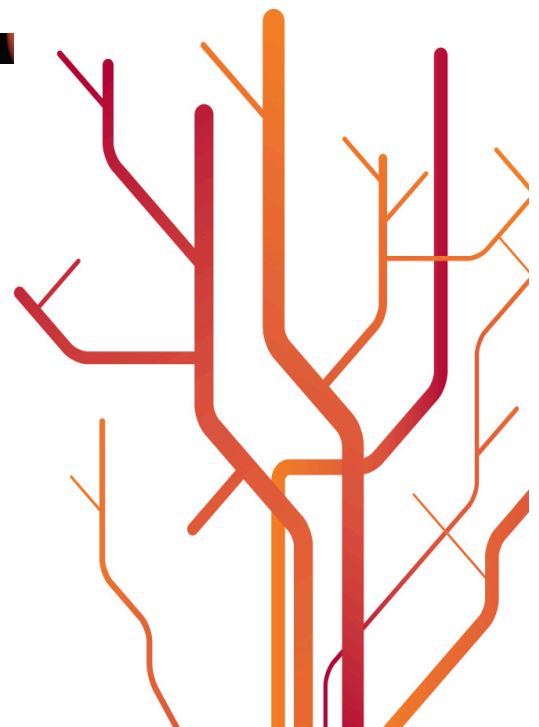
Antimikrobielle Forbindelser i Marine Diatomeer (Kiselalger)



Renate Døving Osvik

Masteroppgave i marin bioteknologi (60stp)

Mai 2013



Forord

Oppgaven ble gjennomført som et samarbeid mellom Norges Fiskerihøgskole (NFH) og Institutt for arktisk og marin biologi (AMB), ved fakultetet for biovitenskap, fiskeri og økonomi, Universitetet i Tromsø. Arbeidet ble utført vårsemesteret 2012, og 2013, med et lite avbrudd høstsemesteret 2012 da jeg tilbrakte et semester ved Simon Fraser University i Vancouver, Canada. Hovedveileder på oppgaven har vært professor Klara Stensvåg (NFH). I tillegg har førsteamanuensis Tor Haug (NFH) og professor Hans-Christian Eilertsen (AMB) vært med-veiledere.

Først og fremst vil jeg takke alle veilederne mine for å ha satt sammen en utrolig interessant oppgave til meg. Tusen takk til dere alle for all god hjelp, veiledning og ikke minst den kunnskapen dere jeg har gitt meg i løpet av det siste året. Videre skylder jeg Gunilla og Richard på algelaben en stor takk. Dere har vært en fantastisk kilde til inspirasjon og kunnskap. Jeg skylder dere også en enorm takk for at dere med et smil har hørt på mine rare historier, ideer og til tider vanvittige frustrasjon. Og takk Richard, for de fine bildene jeg kunne bruke på fremsiden min. Jeg vil også takke Ida og Runar for god veiledning i labarbeidet i 4. etasje, og ikke minst for trivelige samtaler under 2-kaffen. Dere har vært en god støtte.

En stor takk til alle mine studievenner her på NFH, og resten av Universitetet. Takk for de 5 fantastiske årene vi har hatt sammen. En ekstra takk må rettes mot Magnus og Alf for de timene vi har tilbrakt sammen på kontor D-251 under masteren. Og takk Magnus, for et fantastisk utvekslingssemester i Vancouver!

Til slutt, takk til mamma, pappa og min kjære søster, Guri. Takk for all støtte. Takk for at dere alltid er der for meg.

Renate

Tromsø, mai 2013

Sammendrag

Bioprospektering er definert som leting etter og karakterisering av nye bioaktive forbindelser fra naturens ressurser med den hensikt å benytte denne kunnskapen kommersielt til utvikling av medisiner, helsekost eller stoffer med annen anvendelse. Blant moderne medisiner er hele 40% basert kunnskap fra naturstoffer, og blant kreftmedisiner og medisiner mot infeksjøs sykdommer er andelen enda høyere. Verdenshavene dekker 70% av jordens overflate, og innehar en enorm biodiversitet som enda er lite utforsket, og derfor antas ressurser herfra å ha et potensiale som opphav til nye bioaktive forbindelser. I denne sammenheng antas de marine diatomeene å være viktige, både fordi de er de mest tallrike av alle mikroalger i det marine økosystemet, men også fordi de utgjør en enorm biodiversitet både i artsmangfold og biokjemi.

Dette studiet besto av massedyrking av fire ulike marine diatomeer i monokulturer (*Attheya longicornis*, *Cylindrotheca closterium*, *Porosira glacialis* og *Thalassiosira nordenskiöldii*), samt en blandingskultur av *P. glacialis* og *A. longicornis*. Naturstoffer fra disse artene ble ekstrahert, videre separert ved hjelp av fast-fase ekstraksjon (SPE) og testet for antimikrobiell aktivitet mot fire ulike bakteriestammer; *Eschericia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus Aureus* og *Corynebacterium glutamicum*. Det ble registret antimikrobiell aktivitet i SPE-eluatet fra alle de ulike artene dyrket i renkultur, samt i blandingskulturen. Noen av eluatene viste antimikrobiell effekt mot alle de fire bakteriestammene. Aktive SPE-eluatet ble fraksjonert ved hjelp av høytrykks-væskekromatografi (HPLC), og analysert med massespektrometri LC-MS.

Det ble oppdaget antimikrobielt riboflavin og flavin mononukleotid i 30% SPE-eluatene av *P. glacialis*, *T. nordenskiöldii* og blandingskulturen. Det ble i tillegg funnet et antimikrobielt protein med molekylvekt på ca. 11 kDa i 40% SPE-eluatet av *T. nordenskiöldii*. Én fraksjon fra 30% SPE-eluatet av *T. nordenskiöldii* inneholdt en lavmolekylær forbindelse som ble karakterisert til å være tryptofan eller tryptofan-lignende derivater.

Abstract

Bioprospecting is defined as research where one search for new bioactive components in natural resources that can be used as pharmaceuticals, nutraceuticals or compounds with other commercial applications. Among modern drugs as much as 40% are based on natural products, and among cancer medicines and drugs for infectious diseases, the proportion is even higher. The oceans covers 70% of Earth's surface and holds an enormous biodiversity that is still unexplored. The marine diatoms are the most numerous of all microalgae in the marine ecosystem, and represent an enormous biodiversity both in species diversity and biochemistry.

This study consisted of mass cultivation of four marine diatoms in monoculture (*Attheya longicornis*, *Cylindrotheca closterium*, *Porosira glacialis* and *Thalassiosira nordenskiöldii*), and a mixed culture of *P. glacialis* and *A. longicornis*. Natural compounds from these species were extracted. The extracts were separated by solid phase extraction (SPE) and tested for antimicrobial activity against four strains of bacteria, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Corynebacterium glutamicum*. Antimicrobial activity was registered in SPE-eluates from all species grown in monoculture, and in the mixed culture of *P. glacialis* and *A. longicornis*. Some of the SPE-eluates showed antimicrobial activity against all four strains of bacteria. Active SPE-eluates were fractionated by high-pressure column chromatography (HPLC) and analyzed by mass spectrometry (LC-MS).

It was discovered antimicrobial riboflavin and flavin mononucleotides in 30% SPE-eluates of *P. glacialis*, *T. nordenskiöldii* and the mixed culture of *P. glacialis* and *A. longicornis*. An antimicrobial protein having a molecular weight of approximately 11 kDa was found in the 40% SPE-eluate of *T. nordenskiöldii*. One fraction from the 30% SPE-eluate of *T. nordenskiöldii* contained a low molecular weight compound which was characterized to be tryptophan or tryptophan-like derivatives.

Innholdsfortegnelse

FORORD	I
SAMMENDRAG	II
ABSTRACT	III
INNHOLDSFORTEGNELSE	IV
FORKORTELSER	VII
1. INTRODUKSJON	1
1.1 BAKGRUNN	1
1.2 ANTIBIOTIKA	1
1.3 RESISTENS	3
1.4 NYE ANTIMIKROBIELLE FORBINDELSER	3
1.5 MARIN BIOPROSPEKTERING	5
1.4 DET MARINE MILJØET – EN LITE UTFORSKET KILDE	5
1.5 MARINE DIATOMEER (KISELALGER)	7
1.6 BIOAKTIVITET I MARINE DIATOMEER	11
1.6.1 ANTIMIKROBIELL AKTIVITET	13
1.7 BESKRIVELSE AV MARINE DIATOMEER BENYTTET I OPPGAVEN	15
1.7.1 <i>CYLINDROTHECA CLOSTERIUM</i>	15
1.7.2 <i>ATTHEYA LONGICORNIS</i>	16
1.7.3 <i>THALASSIOSIRA NORDENSKIOELDII</i>	16
1.7.4 <i>POROSIRA GLACIALIS</i>	17
1.8 METODIKK OG PRINSIPPER	18
1.8.1 DYRKING AV MARINE DIATOMEER	18
1.8.2 BIOASSAY BASERT SEPARASJON	19
1.8.4 KROMATOGRAFISK SEPARASJON	21
1.8.5 BIOLOGISK TESTING	22
1.8.6 MASSESPEKTROMETRI	22
1.9 MÅL FOR OPPGAVEN	23
2. MATERIAL OG METODE	24
2.1 METODEFORLØP	24

2.2 KJEMIKALIER	25
2.3 STAMKULTURER AV MARINE DIATOMEER	25
2.4 BLANDINGSKULTURER	26
2.5 MEDIER OG LØSNINGER TIL DYRKING AV MARINE DIATOMEER	27
2.5.1 GUILLARD'S F/10 DYRKINGSMEDIUM	27
2.5.2 MASSEDYRKINGSMEDIUM	27
2.6 DYRKING AV MARINE DIATOMEER (KISELALGER)	28
2.6.1 VEDLIKEHOLD AV STAMKULTURER AV MARINE DIATOMEER	28
2.6.2 MASSEDYRKING AV MARINE DIATOMEER	28
2.7 PREPARERING OG EKSTRAKSJON AV MATERIALE	30
2.8 BIOAKTIVITETSTESTING	32
2.8.1 BAKTERIESTAMMER	32
2.8.2 DYRKINGSMEDIER TIL DYRKING AV BAKTERIER	32
2.8.3 DYRKING AV BAKTERIER	33
2.8.4 MINIMUMS INHIBERENDE KONSENTRASJONS TEST (MIC)	34
2.9 REVERS-FASE HØYTRYKKS VÆSKEKROMATOGRAFI (RP-HPLC)	35
2.10 MASSESPEKTROMETRI (LC-MS)	36
3. RESULTATER	38
3.1 MASSEDYRKING AV MARINE DIATOMEER	38
3.1.1 DYRKINGSPROSESS AV <i>C. CLOSTERIUM</i>	38
3.1.2 DYRKINGSPROSESS AV <i>ATTHEYA LONGICORNIS</i>	40
3.2 EKSTRAKSJON	40
3.2.1 TØRRSTOFFUTBYTTE FRA ARTER DYRKET I MONOKULTUR	40
3.2.2 TØRRSTOFFUTBYTTE FRA BLANDINGSKULTURER	43
3.3 ANTIBAKTERIELL AKTIVITET	45
3.3.1 ANTIBAKTERIELL AKTIVITET I SPE ELUATER FRA OPPDYRKEDE KULTURER	45
3.3.2 ANTIBAKTERIELL AKTIVITET I ORGANISKE FASER FRA OPPDYRKEDE KULTURER	47
3.3.3 ANTIBAKTERIELL AKTIVITET I SPE-ELUATER FRA KULTURER SAMLET INN PÅ TOKT	48
3.3.2 ANTIBAKTERIELL AKTIVITET I HPLC FRAKSJONER AV SPE ELUATER	49
3.4 INNLEDENDE STRUKTUROPPLARING FOR NOEN ANTIMIKROBIELLE FORBINDELSER	54
3.4.1 LAVMOLEKYLÆRE FORBINDELSER	55
3.4.2 HØYMOLEKYLÆRE FORBINDELSER	58
4. DISKUSJON	62
4.1 DYRKINGSMETODER	62

4.2 EKSTRAKSJONSMETODE	66
4.3 ANTIMIKROBIELL AKTIVITET	68
4.4 INNLEDENDE KARAKTERISERING AV AKTIVE KOMPONENTER	69
4.4.1 RIBOFLAVIN OG FLAVIN MONONUKLEOTID	69
4.4.2 TRYPTOFAN ELLER TRYPTOFAN-LINGNENDE FORBINDELSE	70
4.4.3 ANTIMIKROBIELT PROTEIN	71
4.5 ØKOLOGISK SAMMENHENG	72
4.6 BIOKJEMI OG VEKSTFORHOLD	73
5. KONKLUSJON	75
6. REFERANSER	76
7. APPENDIKS	87
APPENDIKS 1	87
APPENDIKS 2	88
APPENDIKS 3	89
APPENDIKS 4	91
APPENDIKS 5	92

Forkortelser

ACN	Acetonitril
AMP	Antimikrobielle peptider
AU	Absorbansenheter (absorbance units)
ATCC	American type culture collection
CFU	Colony forming units
EPA	Eikosamentaensyre
FMN	Flavin mononukleotid
HPLC	Høytrykks-væskeskromatografi (high-pressure column chromatography)
m/z	Masse/ladnings ratio
MH	Mueller-Hinton medium
MIC	Minimums inhiberende konsentrasjons tes (minimum inhibitory concentration)
MS	Masse spektrometry (mass spectrometry)
NMR	Kjernemagnetisk resosnans (nuclear magnetic resonance)
OD	Optisk densitet (optical density)
PDA	Photodiode array detector
RP-HPLC	Revers fase høytrykkskromatografi
SPE	Fast-fase ekstraksjon (solid phase extraction)
TFA	Trifluoreddiksyre (Trifluoro acetic acid)
Trp	Tryptophan
UV-Vis	Ultrafiolett – Synlig lys (Ultraviolet-Visual)

1. Introduksjon

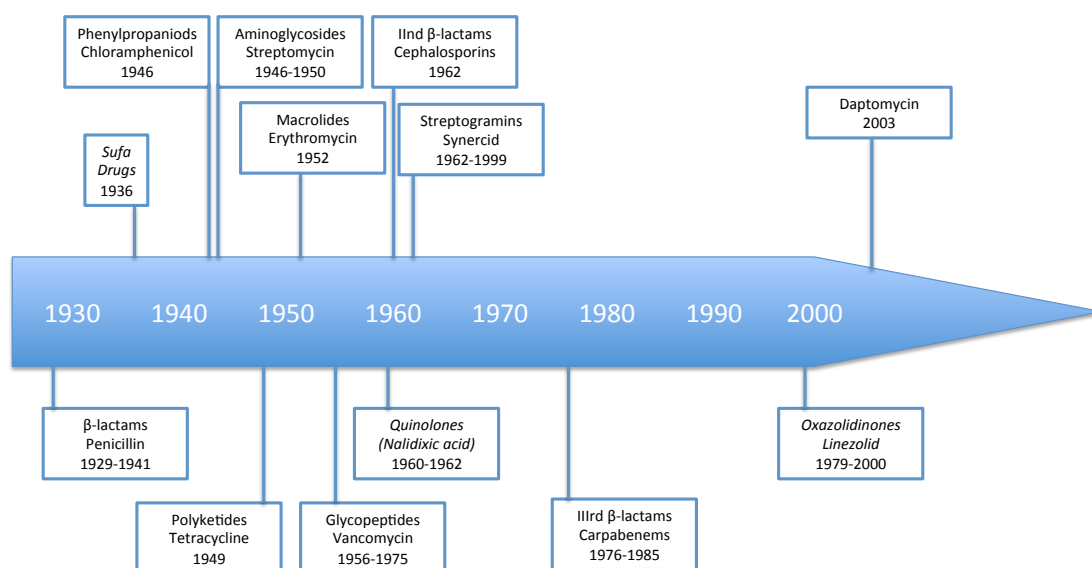
1.1 Bakgrunn

Mennesket har gjennom årtusener lært seg å utnytte naturens ressurser i kampen for å overleve. Den helbredende effekten av mange terrestriske planter ble oppdaget tidlig, og har tradisjonelt vært benyttet som medisin mot ulike sykdommer i ulike kulturer i lang tid. Tidlig i menneskets historie var kunnskapen om disse medisinene forbeholdt prester og sjamaner, og ble dermed sett på som magi. De helbredende plantene som ble oppdaget på den tiden har dannet et grunnlag for den tradisjonelle medisinen som fortsatt blir brukt i ulike deler av verden (Cragg & Newman, 2001). På 1700-tallet dukket begrepet farmakognosi opp innenfor legevitenskapen (Samuelsson & Bohlin, 2009). Farmakognosi omhandler læren om naturstoffer som anvendes til medisiner, en vitenskap som har stor betydning i dag. Blant moderne medisiner er hele 40% basert på naturstoffer. Blant kreftmedisiner og medisiner mot infeksjøs sykdommer er andelen høyere, opp mot 75% (Samuelsson & Bohlin, 2009). Disse medisinene er enten originale naturstoffer, semi-syntetiske medisiner med utgangspunkt i naturstoffer, eller medisiner syntetisert med naturstoffer som modell (Cragg *et al.*, 1997, Newman, 2008). Naturstoffer vil nok fortsette å spille en avgjørende rolle i utviklingen av nye medisiner da menneskeheten møter stadig nye sykdomsrelaterte utfordringer, og det er derfor et stort behov for medisiner med nye virkemekanismer som kan imøtekomme disse behovene (Cragg & Newman, 2001, Newman *et al.*, 2000).

1.2 Antibiotika

Antibiotika er vanligvis definert som naturlige eller semi-syntetiske forbindelser produsert av mikroorganismer som bakterier eller sopp for å inhibere eller drepe andre mikroorganismer (Madigan *et al.*, 2009). De fleste typer antibiotika fungerer ved å inhibere syntesen av celleveggen, eller proteinsyntesen til bakteriene. Et unntak er en type antibiotika kalt quinoloner som inhiberer syntesen av metabolitter ved å påvirke DNA syntesen (Butler & Buss, 2006). Omtrent 1% av alle kjente antibiotikum er ikke toksiske for menneske, og disse benyttes klinisk for å bekjempe patogene bakterier (Madigan *et al.*, 2009).

Perioden fra 1940 til 1962 omtales som antibiotikaenes "gullalder", en periode hvor de fleste grupper av antibiotika vi kjenner i dag ble oppdaget (Carter, 2008, Singh & Barrett, 2006, Wright, 2007). Antibiotika ble først oppdaget av Alexander Fleming i soppen *Penicillium* (Madigan *et al.*, 2009). Introduksjonen av antibiotika revolusjonerte legevitenenskapen, og førte til en dramatisk nedgang i antall dødsfall relatert til infeksjøs sykdommer (Butler & Buss, 2006). Penicillin ble først prøvd ut på soldater under 2. Verdenskrig, og i Norge ble det tatt i anvendelse etter krigen. I 1966 ble det uttalt i en artikkel i Times Magazine at "...eksperter er enige om at innen år 2000 vil virale og bakterielle sykdommer være eliminert" (Time, 1966). I dag, nesten 50 år senere er infeksjøs sykdommer fortsatt den nest største dødsårsaken globalt (Butler & Buss, 2006), og man må nok konkludere at man ikke har klart å opprettholde det samme tempoet i utviklingen av nye antibiotika som man kunne se i gullalderen (Wright, 2007). Siden 1970 er det bare oppdaget 3 nye grupper av antibiotika (Figur 1) (Butler & Buss, 2006, Singh & Barrett, 2006). To av disse er avledet fra naturstoffer: carpabenemer (tredje generasjons β -lactam antibiotika) utviklet i 1976 og daptomycin i 2003. Oxazolidinonet Linezolid er en type syntetisk antibiotika utviklet i 1979 (Butler & Buss, 2006).



Figur 1. Tidslinje som viser oppdagelsen av nye klasser med antibiotika og når de ble introdusert på markedet. Navn i kursiv viser syntetiske produkter, mens de andre er naturlige produkter. Figur er modifisert fra Singh & Barrett (2006)

1.3 Resistens

Helt siden introduksjonen av antibiotika har antibiotika-resistens vært et stort, og stadig økende problem (Davies & Davies, 2010). Mutasjoner som selekterer for antibiotika-resistens oppstår i bakterienes genom, og kan overføres med horisontal genoverføring mellom bakteriene, eller videre til neste generasjon via celledeling (Davies & Davies, 2010, Holman, 2013, Madigan *et al.*, 2009). Bakterier tilegner seg stadig nye metoder for utvikling av resistens ved blant annet; inaktivering av antibiotika ved hjelp av enzymatiske reaksjoner, mekanismer som pumper antibiotika ut av cellen, mutasjoner som fører til dårligere binding av antibiotika i cellen og ved lavere opptak av antibiotika (Singh & Barrett, 2006). Dette gjør det vanskeligere å bekjempe bakterielle infeksjoner, og den økende mengden av antibiotika-resistens kan relateres til den enorme bruken av antibiotika man har sett de siste 70 årene, også koblet til uforsvarlig bruk av legemidlene (Carter, 2008, Davies & Davies, 2010).

Flere patogene bakteriestammer har også utviklet multiresistens mot antibiotika. Et velkjent eksempel er Methicillin-resistent *Staphylococcus aureus* (MRSA), som er blitt et økende problem på sykehus (Enright *et al.*, 2002, Holman, 2013). Noen stammer av denne bakterien kan i dag kun bekjempes ved hjelp av en gruppe glykopeptid-antibiotika bl.a. vancomycin, et antibiotikum definert som en "siste utvei" i bekjempelsen av flere typer resistente bakterier (Carter, 2008). Den stadig økende mengden av antibiotikaresistens medfører et akutt behov for å utvikle nye typer antibiotika med andre virkningsmekanismer enn de vi har i dag. Det er derfor i dag et stadig økende fokus på å oppdage og utvikle nye typer antibiotika.

1.4 Nye antimikrobielle forbindelser

Mye av forskingen på ny antibiotika er metodisk en modifisering av allerede eksisterende typer antibiotika (Newman & Cragg, 2007). Basert på lovende forskningsresultater har også andre "nye" kjemiske forbindelser fått oppmerksomhet som potensiell erstatning for tradisjonell antibiotika. Alle organismer på jorden har utviklet et kjemisk forsvar mot patogene mikroorganismer. Antimikrobielle peptider (AMP) er et eksempel på slike

komponenter (Hancock & Patrzykat, 2002, Sperstad *et al.*, 2011, Zasloff, 2002). AMP er forsvarsmolekyler som finnes i de fleste terrestriske og akvatiske organismer, og er en del av det uspesifikke immunforsvaret til organismene (Sperstad *et al.*, 2011, Zasloff, 2002). Disse forsvarsmolekylene er spesielt viktige for de organismene som mangler det spesifikke immunforsvaret, som det man finner hos de høyerestående organismene. AMP har visse egenskaper som gjør dem til lovende antibiotika-kandidater; i motsetning til tradisjonell antibiotika som fungerer på svært spesifikke mekanismer i bakteriecellene så angriper AMP mer fundamentale cellestrukturer (Hancock, 1997). AMP har en netto positiv ladning, slik at de ved hjelp av elektrostatiske krefter kan binde seg til bakteriemembranen som er netto negativt ladet. I tillegg kan de danne amfipatiske strukturer og vil dermed kunne trenge gjennom membranen som består av et fosfolipid dobbeltlag (Brogden, 2005). For at bakteriene skal kunne utvikle resistens mot disse mekanismene må de forandre hele membransammensetningen, noe som vil kreve mye energi. Alle disse egenskapene minsker sannsynligheten for at bakterier vil kunne utvikle resistens mot de antimikrobielle peptidene, sammenlignet med tradisjonelle antibiotika (Hancock & Patrzykat, 2002).

AMP produseres i små mengder i naturen. Organismene kompenserer ofte for dette ved å produsere flere ulike peptider med overlappende aktivitet, eller ved å oppregulere produksjonen av peptidene når det er behov for dem (Hancock & Patrzykat, 2002).

I tillegg til AMP benytter de fleste organismer også lavmolekylære organiske komponenter som forsvarsmekanismer. Disse komponentene er sekundære metabolitter som finnes i de fleste terrestriske og akvatiske organismer. Sekundære metabolitter er molekyler som ikke er involvert i den primære metabolismen til organismen, men heller komponenter som kan gi dem fortrinn i konkurranse med andre (Gerwick, 2008). Eksempler på slike lavmolekylære forbindelser er lipider, alkaloider, terpenoider og andre toksiske stoffer som organismene produserer som forsvarsmekanismer mot både patogene bakterier og predatorer (Naviner *et al.*, 1999, Pietra, 1997, Vuorela *et al.*, 2004).

1.5 Marin bioprospektering

Bioprospektering er definert som forskning hvor man leter etter nye bioaktive komponenter i naturens ressurser som kan benyttes som medisiner, andre helsebringende kosttilskudd, eller ha en annen kommersiell anvendelse. Ekstrakter fra ulike organismer går gjennom detaljerte analyser som kan lede til isolasjon og karakterisering av nye bioaktive komponenter. Kun en liten del av verdens biodiversitet er så langt analysert. Som nevnt har landplanter har lenge vært hovedfokuset i jakten på bioaktive molekyler, og blant de rundt 250 000 artene av terrestriske planter på jorden, er kun 5-10% av disse hittil utforsket (Sarker *et al.*, 2006) og man må nok fortsatt se på naturen som en enorm potensiell kilde til nye legemidler.

Ulike strategier benyttes når man skal lete etter nye bioaktive komponenter;

- a) Valg av organismer basert på etnofarmakologisk informasjon, der man leter i organismer som har tradisjoner innenfor legevitenenskapen.
- b) Valg av organismer basert på taksonomi, eller kjemotaksonomi, der man leter innen for slekter av organismer der det finnes informasjon om tilstedeværelse av bioaktive komponenter.
- c) Tilfeldig valg av organismer, med fokus på arter der det tidligere ikke finnes informasjon.

Målsetningen med kunnskapen som opparbeides gjennom bioprospektering kan derfor vise seg å være essensiell for utvikling av nye medisiner, og vil kunne være med på å bekjempe eller kontrollere sykdommer som i dag utgjør en stor trussel mot mennesket.

1.4 Det marine miljøet – en lite utforsket kilde

Terrestriske planter kommer sannsynligvis fortsatt å være viktig innenfor utvikling av nye bioaktive forbindelser. I løpet av de siste tiårene har dog mer ukjente habitater kommet i fokus (Capon, 2001). Verdenshavene dekker 70% av jordklodens overflate, og strekker seg fra kalde polare havområder dekket av is, til varme tropiske farvann, og fra grunne kystområder til store havdyp. Alle

organismer på jorden er fordelt inn i 33 ulike fyla, 32 av disse er representert i det marine miljøet, og 15 er utelukkende marine fyla (Cragg & Newman, 2013). På grunn av at organismene i havområdene også har vært i evolusjonen, i utallige typer biotoper, over lengre tid enn land-organismene, inneholder havene en mye større biodiversitet enn landjorden. Dinoflagellatene (fureflagellatene) er et eksempel på organismer som "kom til" for 2000 millioner år siden, og har vært i konstant evolusjon siden da. Det marine miljøet er også utfordrende fysisk miljømessig, og antallet biologiske interaksjoner er potensielt flere på grunn av generelt mer komplekse livshistorier (livsstadier) og levesett. Eksempler er bunndyr som har flere stadier av pelagiske larver og anadrome fisk som lever både i ferskvann og sjøvann, og dermed beiter på vidt forskjellige organismer i løpet av livet. Disse faktorene har sannsynligvis ført til omfattende utvikling av kjemiske "avskrekkingsmekasmer" og signalstoffer (Hansen, 2004) og har dermed et stort potensiale for oppdagelse av nye bioaktive komponenter. Siden de marine organismene må tilpasse seg helt unike miljøfaktorer, har dette ført til at de har utviklet en helt annen biokjemi enn de terrestriske organismene (Gerwick, 2008). Systematisk utforskning av det marine miljøet startet for alvor på midten av 1970-tallet (Capon, 2001, Cragg & Newman, 2013). Siden den gang er flere tusen nye metabolitter fra marine organismer isolert og beskrevet, men det er det kun et fåtall ute på markedet som legemidler (Cragg & Newman, 2013, Faulkner, 2001).

Et av de første marine naturstoffene på markedet er det smertestillende legemiddelet; ziconotide markedsført som Prialt®. Dette stammer fra et toksin produsert av snegler i slekten *Conus*. Tre andre legemidler har også fullført klinisk fase III studier, og kommet på markedet, alle tre som kreftmedisiner; Yondelis®, bryostatin I og halicondrin B (Cragg & Newman, 2013). Alle disse stammer fra marine invertebrater, en gruppe organismer som gjennom evolusjonen har utviklet en hel rekke sekundærmetabolitter som benyttes som kjemisk forsvar. Det har vært et stort fokus på invertebrater innenfor marin bioprospektering, men har også andre organismer har fått økende oppmerksomhet, i tråd med utvikling av teknologi. Eksempler på dette er marine

mikroalger, bakterier og virus. Man har også muligheten til å studere gener og genprodukter selv om mikrobene ikke lar seg dyrke på laboratoriet.

Marine mikroalger utgjør en betydelig del av biodiversiteten i verdenshavene, og har skapt økt interesse på grunn av utallige kommersielle muligheter (Colwell, 1983, Faulkner, 2001, Shimizu, 1996). Mikroalger har høy næringsverdi og et betydelig innhold av marine fettsyrer som gjør dem til gode kandidater for produksjon av kosttilskudd eller fôr i akvakulturnæringen (Anon., 2011). I tillegg inneholder de en rekke interessante biokjemiske stoffer som kan være av interesse for utviklingen av nye legemidler (Spolaore *et al.*, 2006).

Det blir også stadig oppdaget at bioaktive molekyler isolert fra marine invertebrater ofte har sitt opphav i alger og andre mikroorganismer som lever i symbiose med disse dyrene (Radjasa & Sabdono, 2009, Sabdono, 2011)

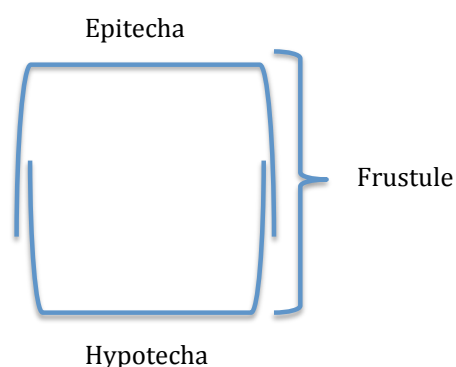
1.5 Marine Diatomeer (Kiselalger)

Diatomeer er, som andre mikroalger, encellede fotosyntetiserende (fotoautotrofe) eukaryote celler. Diatomeene, også kalt kiselalger tilhører fylum Heterokontophyta og klasse Bacillariophyceae. De er det mest tallrike av alle mikroalger i det akvatiske økosystemet, både når det gjelder antall arter og biomasse (Trainer *et al.*, 2008) Diatomeene består av 200 ulike slekter, og antallet arter er i dag estimert til rundt 200 000 (Choi *et al.*, 2012), men dette er usikkert også på grunn av at det finnes mange "kryptiske" arter, som er morfologisk like, men ulik kjemi (Lakeman *et al.*, 2009) . Siden diatomeene er kvantitativt viktige primærprodusenter er de helt essensielle i det globale økosystemet, da de står for store deler av oksygenproduksjonen. Mikroalgene i verdenshavene produserer 50% av totalt oksygen globalt. Diatomeene produserer 40-45% av totalt organisk karbon i verdenshavene, og er sammenlignbare med alle de terrestriske regnskogene i produktivitet (Armbrust, 2009), dette til tross for at de bare utgjør ca. 1% av fotoautotrof biomasse på jorda. Årsaken til denne høye biomasse-spesifikke produksjonen er den høye veksthastigheten, da de kan dele seg 0.5-2 x per dag.

Diatomeene er også svært viktige for andre biokjemiske sykluser og spiller en sentral rolle i sirkuleringen av nitrogen, fosfor og jern (Sarhou *et al.*, 2005). Celleveggen til diatomeene er laget av amorft silikat, og denne egenskapen fører til at de utgjør en viktig del av silikatsyklusen i havet. På grunn av denne celleveggen er cellene relativt tunge og synker lett. Dette fører til at de fungerer som en "biologisk pumpe" der de tar med seg organisk carbon, samt CO₂ fra overflaten og ned til havbunnen. Slik er de også viktige for klimaet på jorden (Sarhou *et al.*, 2005, Trainer *et al.*, 2008). I tillegg er de en essensiell næringskilde for alle akvatiske organismer. (Falciatore & Bowler, 2002, Trainer *et al.*, 2008). Alle disse faktorene fører til at diatomeene er avgjørende for å regulere stabiliteten i økosystemene på jorden.

Diatomeene skiller seg fra andre mikroalger ved at de har en høyst detaljert cellevegg av amorft silikat [(SiO₂)_n(H₂O)] (Falciatore & Bowler, 2002, Round *et al.*, 1990). Silikat er "glass", og diatomeene lever således i "gjennomsiktig glasshus", som er en stor fordel for organismer som får energi fra sollys. Denne celleveggen har også en viktig rolle som beskyttelse mot andre organismer som f. eks. bakterier. Porer i skallstrukturen fungerer som transportveier for opptak av næringsstoffer og utskilling av avfall fra cellen (Round *et al.*, 1990). Tradisjonelt er taksonomien til diatomeene basert på skallstrukturen og morfometriske mål (Hillebrand *et al.*, 1999), og det er en enorm variasjon mellom de ulike slektene.

Skallet til en diatomé kalles for frustule, og består av to halvdel; den større epitecha og den mindre hypotecha, og satt sammen som en petriskål (Figur 2). Ut



ifra skallstrukturen kan diatomeene grovt deles opp i to hovedgrupper; sentriske og pennate (Hasle & Syvertsen, 1997, Round *et al.*, 1990, Trainer *et al.*, 2008). Sentriske diatomeer er radially symmetriske, og gjerne sylindrerformede (Figur 4).

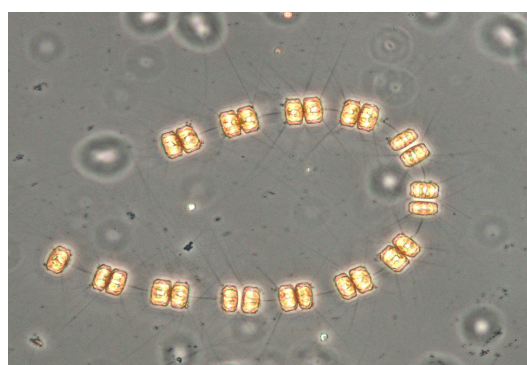
Figur 2. Skjematiske fremstilling av diatoméskallet. Skallet er satt sammen av den større delen epitecha og den mindre hypotecha. Hele skallet kalles for frustule.

Disse lever planktonisk, og holdes

flytende med havstrømmene. De pennate diatomeene er avlange, og bilateralt symmetriske (Figur 3). Disse cellene lever ofte bentisk på havbunnen, eller som epifytter på makroalger eller dyr (Round *et al.*, 1990, Trainer *et al.*, 2008), men det finnes også mange pelagiske arter. Flere av de pennate diatomeene kan bevege seg langs overflater, ofte koordinert med hverandre, men mekanismen bak denne bevegelsen er ikke helt klarlagt (Choi *et al.*, 2012). Mange diatomeer danner også lange kjeder av celler, koblet sammen med tråder av polysakkarider, eller silikat (Figur 4).



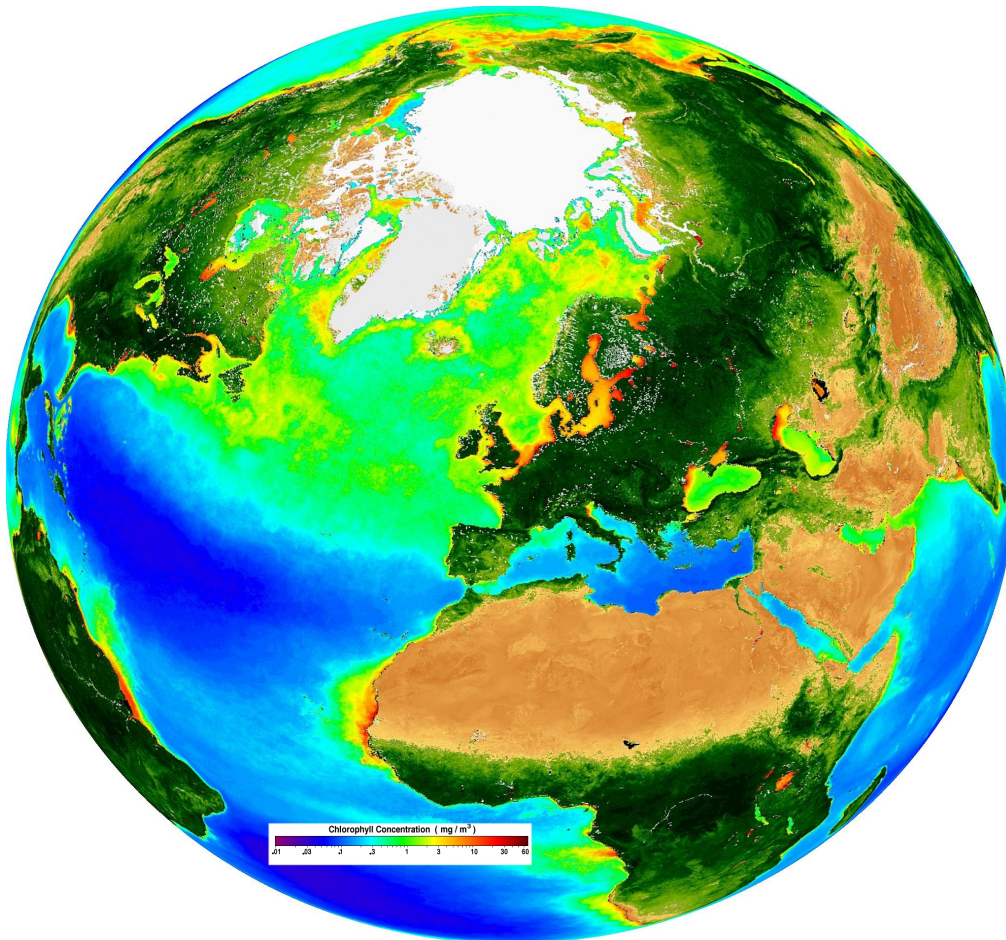
Figur 3. Pennat diatomé, her representert av *Navicula* sp. (Foto: R. Osvik).



Figur 4. Sentrisk diatomé, her representert av *P. glacialis* i kjede (Foto: R. Osvik).

Diatomeer utgjør den dominerende gruppen av fytoplankton i tempererte kystområder, områder med sterk "upwelling" og langs iskanten i polare strøk (Armbrust, 2009). Gjennom vintermånedene er sjøvannet i nordlige områder nesten fritt for fytoplankton, dette på grunn av mangel på sollys i mørketiden (Eilertsen & Whyatt, 2010). Den store forandringen skjer mot slutten av mars, etter vårjevndøgn (20. eller 21. mars). På denne tiden er lysmengden tilstrekkelig til planktonvekst, i tillegg får man en "upwelling" av næringsstoffer fra bunnsedimentene på grunn av temperaturforandringer og vind. Konsentrasjonen av primærprodusenter eksploderer på dette tidspunktet, og kalles for våroppblomstringen (Degerlund & Eilertsen, 2010). Figur 5 viser et satellittbilde over våroppblomstringen på den nordlige halvkule i april.

Algene danner også hvilesporer som ligger i bunnsedimentene. En "upwelling" vil bringe med seg hvilesporene og resuspendere dem i vannsøylen der de starter vegetativ vekst. (Eilertsen *et al.*, 1995, Eilertsen & Whyatt, 2010). Man



Figur 5. Kompositt "Ocean Color (NASA)" globalt satellittbilde som viser våroppblomstringen på den nordlige halvkule i april.

kan se visse mellomårsvariasjoner i våroppblomstringer når det gjelder tidspunkt og mengde biomasse som produseres i denne perioden (Eilertsen & Whyatt, 2010). Artsuksessjonen gjennom våroppblomstringen er på den annen side svært reproducerbar (Margalef, 1958). Tidlige arter som dukker opp er *Chaetoceros* sp. samt *Phaeocystis pouchetii* (Degerlund & Eilertsen, 2010, Eilertsen & Whyatt, 2010). *Fragilariopsis* sp. og *Skeletonema* sp. utgjør også en betydelig del av den tidlige oppblomstringen. Når konsentrasjonen av næringsstoffer avtar, og mengden bakterier samt organisk karbon i vannmassene øker mot midten av mai kan man se andre arter ta over. *Thalassisoira gravida*, *T. nordenskiöldii* er noen av artene som vokser opp på dette tidspunktet (Degerlund & Eilertsen, 2010), og når silikatet er brukt opp kan det dukke opp større mengder Dinoflagellater og *P. pouchetii*.

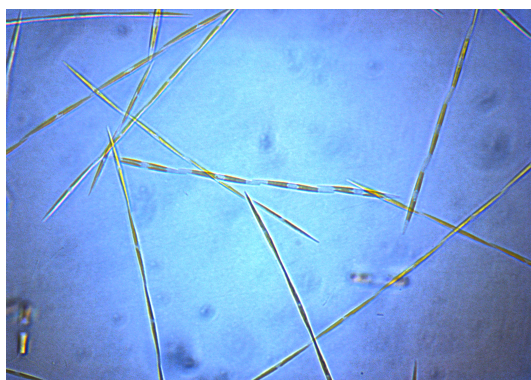
Skallstruktur og morfologi til diatomeene har vært nøye studert helt siden oppfinnelsen av mikroskopet (Round *et al.*, 1990), og man begynner nå å få mer informasjon om deres molekylærbiologi. To arter er så langt full genom-sekvensert; *Phaeodactylum tricornutum* og *Thalassiosira pseudonana* (Armbrust, 2004, Bowler *et al.*, 2008). Disse artene ble valgt ut da de har relativt små genomer til å være diatomeer. Størrelsen på genomene er henholdsvis 27,4 Mbp og 32,4 Mbp og inneholder mellom 10000 og 14000 gener. *P. tricornutum* er en pennat diatomé, mens *T. pseudonana* er sentrisk og de fungerer derfor som modellorganismer for de to ulike gruppene. Sekvenseringen av de to artene har gitt et nytt innblikk i den unike genetikken til disse organismene. Det er omtrent 90 millioner år siden disse to artene skilte lag, men likevel er genomene like forskjellige som om man skulle sammenligne pattedyr og fisk, som skilte lag for hele 550 millioner år siden (Armbrust, 2009).

Diatomeene har en kompleks evolusjonær historie, og skiller seg totalt fra terrestriske fotosyntetiserende organismer. Der plantene har sin opprinnelse fra den primære endosymbiosen, oppsto diatomeene gjennom sekundære endosymbiose; en heterotrof encellet organisme tok opp en rødalge. Dette kan bevises blant annet ved at diatomeene har rundt 170 gener fra rødalger i sitt genom (Armbrust, 2009). I tillegg til dette er det funnet en større mengde bakterielle gener i genomet. Det kan derfor se ut som at diatomeene kan drive horisontal genoverføring med bakterier (Bowler *et al.*, 2008, Bowler *et al.*, 2010). Man tror også at virus kan være med i genoverføringen til diatomeene, men utbredelsen av dette er ikke klarlagt (Armbrust, 2009). Alle disse faktorene er med på å beskrive den genetiske driften i diatomeene, og kan forklare den enorme diversiteten man ser mellom artene i denne gruppen.

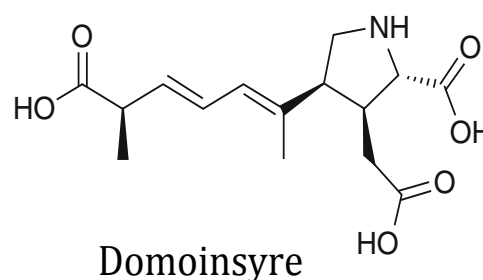
1.6 Bioaktivitet i marine Diatomeer

Mikroalger har vært benyttet i asiatisk medisin i lange tider, og algene har derfor vært et naturlig utgangspunkt for leting etter nye bioaktive molekyler med naturlig opprinnelse (Naviner *et al.*, 1999, Spolaore *et al.*, 2006). Selv om de marine diatomeene utgjør den største gruppen av marine mikroalger er bioaktive komponenter fra disse organismene lite studert (Choi *et al.*, 2012).

Algetoksiner har fått oppmerksomhet på grunn av sin innvirkning på det marine økosystemet, og oss mennesker. Flere velkjente arter av Dinoflagellater som *Alexandrium tamarense* og arter av *Gonyaulax* produserer toksiner som kan forårsake alvorlige forgiftninger via inntak av skalldyr. Enkelte arter av diatomeer produserer også slike toksiner. Arter i slekten *Pseudonitzschia* (Figur 6) produserer ett toksin med navnet domoinsyre (Figur 7). Domoinsyre er en nervegift, og fungerer som glutamatreseptor-agonist (Choi *et al.*, 2012, Trainer *et al.*, 2008) Dette toksinet kan akkumuleres i filterspisere, og igjen føre til skalldyrforgiftning hos dyr og mennesker. Et av symptomene på domoinsyre-forgiftning er varig tap av korttidshukommelsen, og forgiftning av domoinsyre kalles derfor "amnesic shellfish poisoning".



Figur 6. *Pseudonitzschia* sp. produserer domoinsyre som fører til "amnesic shellfish poisoning" ved inntak av forgiftede skalldyr (Foto: R. A. Ingebrigtsen).



Figur 7. Molekylstruktur av domoinstre. Algetoksin som forårsaker "amnesic shellfish poisoning". Modifisert fra Choi (2012)

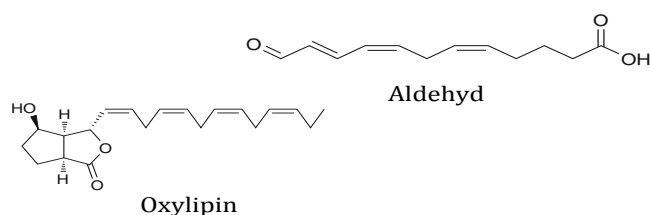
Som primærprodusenter legger diatomeene grunnlaget for de marine næringskjedene. De blir derfor utsatt for et stort beitetrykk av zooplankton under oppblomstringene. I tillegg lever diatomeene i et miljø hvor de er sterkt påvirket av bakterier. Mengden bakterier i sjøvann varierer, men har vært målt til 10^5 - 10^6 celler/ml sjøvann (Amin *et al.*, 2012, Sperstad *et al.*, 2011), og det er derfor naturlig at mikroalgene har utviklet et forsvar mot både zooplankton og bakterier. En av de tidligste oppdagelsene av antimikrobiell aktivitet i mikroalger var i 1960, da Sieburth oppdaget at *Phaeocystis pouchetii* produserte akrylsyre som antibakterielt forsvar i Antarktis (Sieburth, 1960).

Marine diatomeer og bakterier har eksistert side om side i verdenshavene i mer enn 200 millioner år, noe som gjennom evolusjonen har ført til en rekke interaksjoner mellom disse ulike mikroorganismene (Amin *et al.*, 2012). For å unngå angrep fra patogene bakterier trenger algene et forsvar for å styrke overlevelsen. Diatomeene er svært viktige i havets økosystem, men tidligere har man ikke undersøkt deres kjemiske forsvarsmekanismer i stor grad, da deres mekaniske forsvar i form av silikatskallet har fått mest oppmerksomhet (Caldwell, 2009).

1.6.1 Antimikrobiell aktivitet

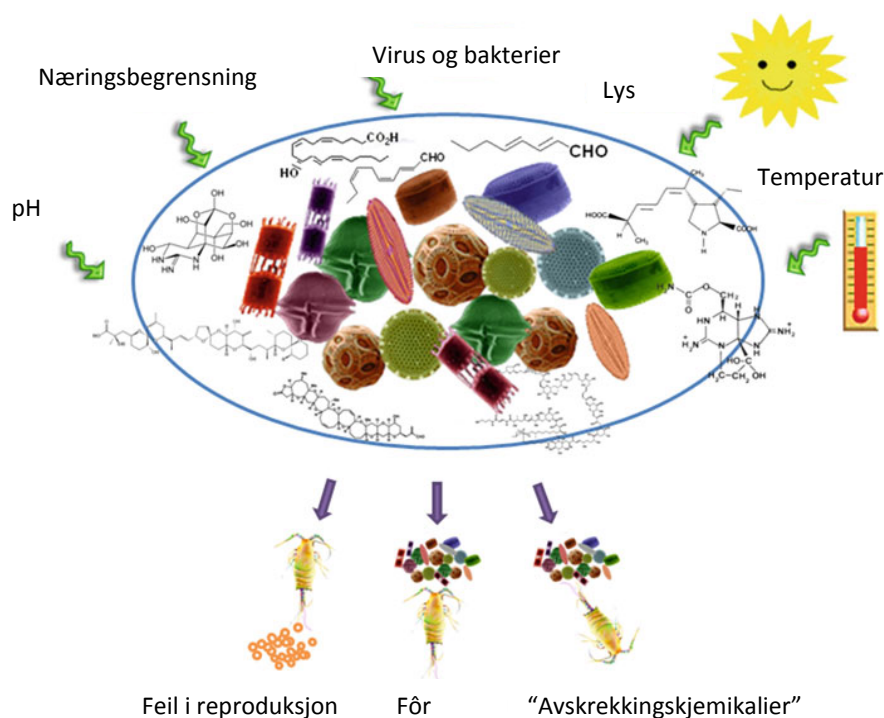
Forskere har den siste tiden fokusert med på de kjemiske forsvarsmekanismene, og det er påvist antibakteriell aktivitet i flere diatomeer, men svært få stoffer har hittil blitt isolert og karakterisert (Lebeau & Robert, 2003). Ser man på de ulike antibakterielle stoffene som er karakterisert, så er dette hovedsakelig fettsyrer samt flerumettede aldehyder (Figur 8) (Viso *et al.*, 1987). *Phaeodactylum tricornutum* produserer de antibakterielle stoffene eikosapentaensyre (EPA) i tillegg til en enumettet fettsyre; (9Z)-hexadecenoic acid, samt en flerumettet fettsyre; (6Z, 9Z, 12Z)-hexadecatrioenic acid (Desbois *et al.*, 2008). EPA funnet i *P. tricornutum* har vist aktivitet mot flere Gram positive og Gram negative bakterier, inkludert MRSA (Desbois *et al.*, 2009). Det er også påvist antibakteriell aktivitet ekstrakter av *Skeletonema costatum* (Naviner *et al.*, 1999), en art som er vanlig å finne i våroppblomstringen langs kysten av Nord-Norge (Degerlund & Eilertsen, 2010).

Enkelte diatomeer produserer oxylipiner (Figur 8). Oxylipinene er flerumettede fettsyrer, modifisert gjennom oksidasjons-reaksjoner (Choi *et al.*, 2012) Oxylipiner fra *S. Costatum* og *Thalassiosira rotula* har vist antibakteriell aktivitet (Smith *et al.*, 2010, Wichard *et al.*, 2005).



Figur 8 Eksempler på antimikrobielle stoffer isolert fra marine diatomeer. Både oxylipiner og aldehyder har tidligere vist slik aktivitet

Disse stoffene har, i tillegg til antibakteriell aktivitet, vist seg å føre til skade på reproduksjonen hos zooplankton, som kopepoder (Caldwell, 2009, Ianora & Miralto, 2010). Flere arter har utviklet et sterkt beiteforsvar mot zooplankton. Figur 9 viser en oversikt over fysiske miljøfaktorer som har innvirkning på algene, og hvordan algene igjen interagerer med predatorer.



Figur 9. Skjematisk fremstilling av ulike miljøfaktorer som påvirker produksjonen av sekundærmetabolitter i fytoplankton (grønne piler), og hvilke innvirkning disse stoffene har på beitere; zooplankton. Figur modifisert fra Ianora og medarbeidere (2012).

Det er vist at biokjemien i marine diatomeer varierer med hvilke ekstraksjonsmetoder som er benyttet, og det har derfor vært vanskelig å sammenligne de ulike resultatene (Naviner *et al.*, 1999). Det er ikke klarlagt om stoffene stammer fra ekstra- eller intracellulære komponenter (Lebeau & Robert, 2003). Det er antatt at dyrkingsvilkårene påvirker biokjemien til diatomeene, på samme måte som for andre organismer (f. eks bakterier). Biosyntese av forbindelser koster energi for alle organismer, og vil ikke foregå uten at det er nødvendig eller hensiktsmessig. Valg av medium og dyrkingsbetingelser er derfor avgjørende for uttrykk av en bioaktiv komponent.

1.7 Beskrivelse av marine diatomeer benyttet i oppgaven

Planktonlaben ved Institutt for arktisk og marin biologi (AMB) har rundt 30 ulike arter, i tillegg til mange stammer ("strains") av marine diatomeer i sin stamkultursamling. Artene har enten blitt samlet inn på tokt i Arktis (Barentshavet) eller de har blitt dyrket frem fra hvilesporer i sedimenter samlet inn langs de nordnorske kystområdene. Noen av artene har vært holdt i monokultur ved konstant temperatur og lysforhold (på temperaturregulerte rom) i > 10 år.

1.7.1 *Cylindrotheca closterium*

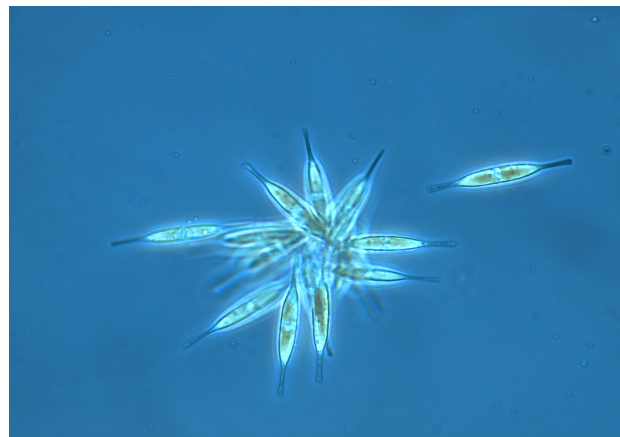
Klasse: Bacillariophyceae

Orden: Bacillariales

Familie: Bacillariaceae

Genus: *Cylindrotheca*

Cylindrotheca closterium er en pennat diatomé (Figur 10) som finnes i grunt kystvann. Arten har kosmopolitisk utbredelse. Arten kan leve bentisk på havbunnen og på overflaten av ulike



makroorganismer som f. eks. makroalger (Hasle & Syvertsen, 1997) Tidvis kan den også opptre planktonisk, spesielt under perioder med vertikal blanding i vannsøylen (Kingston, 2009). Siden den veksler mellom de to stadiene kan arten beskrives som meroplanktonisk. *C. closterium* har, når den er bentisk, evnen til å bevege seg. Cellene forflytter seg med et glidende bevegelsesmønster ved at de skiller ut en ekstracellulær matriks gjennom en rafe (spalte) på undersiden av cellen (Apoya-Horton *et al.*, 2006). Matriksen som skilles ut består av store mengder polysakkarider (Hoagland *et al.*, 1993), og fører ofte til biofilm som ligger rundt cellene, og danner aggregater av celler på overflatene (Staats *et al.*, 1999). Denne arten har ingen spesiell sesongopptreden.

Figur 10. *Cylindrotheca closterium* . Pennat diatomé som lever både bentisk og pelagisk (Foto: R. D. Osvik).

1.7.2 *Attheya longicornis*

Klasse: Bacillariophyceae

Subklasse: Coscinodiscophycidae

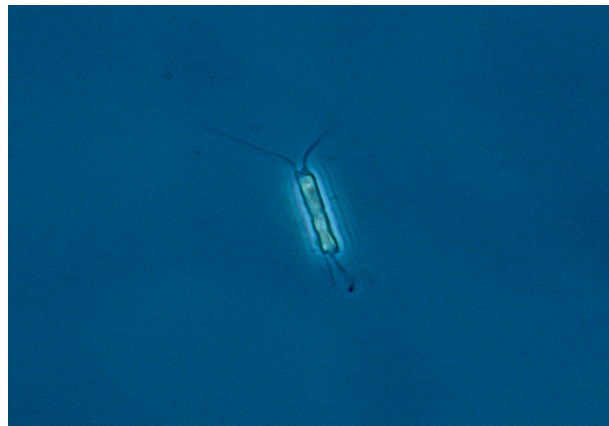
Orden: Chaetocerotanae incerate sedis

Familie: Attheyaceae

Genus: *Attheya*

Attheya longicornis (Figur 11) er en av de mindre artene. Cellene er ca 4-6 μm i diameter (Hasle & Syvertsen, 1997). Artene i slekten kan gjenkjennes av de fire hornene som stikker ut, to på hver

halvdel av skallet (Rampen *et al.*, 2009). Disse hornene hefter seg ofte inn i hverandre, noe som fører til at cellene ofte kan sees som celleaggregater. På bakgrunn av skallutformingen er denne arten plassert blant de sentriske diatomeene. Det er en planktonisk art som finnes i kystområdene i nordlige, kalde farvann ned til tempererte områder (Hasle & Syvertsen, 1997, Round *et al.*, 1990). *A. longicornis* opptrer tidlig i våroppblomstringen.



Figur 11. *Attheya longicornis*. Liten sentrisk diatomé som ofte opptrer tidlig i våroppblomstringen (Foto: R. D. Osvik)

1.7.3 *Thalassiosira nordenskiöldii*

Klasse: Bacillariophyceae

Subklasse: Coscinodiscophycidae

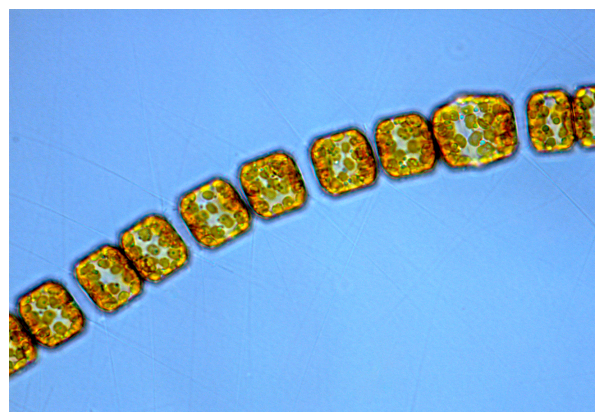
Orden: Thalassiosirales

Familie: Thalassiosiraceae

Genus: *Thalassiosira*

Thalassiosira nordenskiöldii (Figur 12) er en vanlig art i arktiske, sub-arktiske og tempererte havområder (Hasle &

Syvertsen, 1997). Arten er en av de sentriske artene, og opptrer pelagisk, gjerne i lange, løse kjeder sammenkoblet av tråder. (Round *et al.*, 1990). Båndsiden av



Figur 12. *Thalassiosira nordenskiöldii*. Sentrisk diatomé som ofte opptrer i lange kjeder. Blomstrer senere i våroppblomstringen (Foto: R. D. Osvik).

cellene er 8-kantet, og man kan se trådene som stråler ut fra hver enkelt celle (Figur 4). *Thalassiosira* er et stort genus med over 100 arter, der de aller fleste er marine arter. I våroppblomstringen spiller *T. nordenskiöldii* en stor rolle i de nordelige havområdene (Von Quillfeldt, 2000), der den dukker opp mot slutten av oppblomstringen (Degerlund & Eilertsen, 2010, Eilertsen *et al.*, 1981).

1.7.4 *Porosira glacialis*

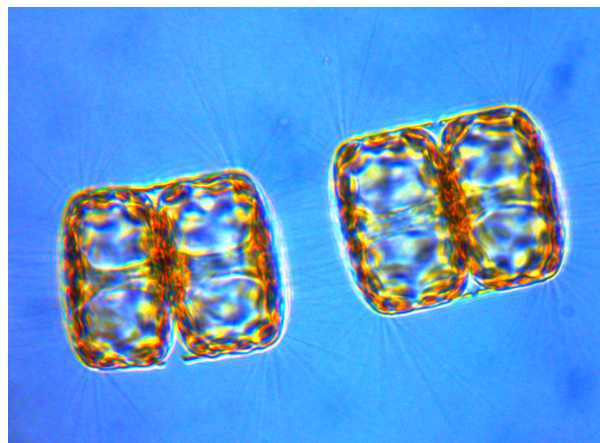
Klasse: Bacillariophyceae

Subklasse: Coscinodiscophycidae

Orden: Thalassiosirales

Familie: Thalassiosiraceae

Genus: *Porosira*



Porosira glacialis (Figur 13) er nært beslektet med *Thalassiosira*, og er en art med utbredelse i tempererte og spesielt i kalde havområder både på den nordlige og sørlige halvkule (Pike *et al.*,

2009). Arten er blant klassifisert de sentriske diatomeene, og cellene er sylinderformet. Tråder av polysakkarider strekker seg ut fra cellene, og disse fører til at *P. glacialis* ofte observeres koblet sammen til lengre kjeder (Round *et al.*, 1990). Cellene skiller også ut matriks som hjelper til med å holde cellene samlet i vannmassene, der de opptrer planktonisk (Hasle & Syvertsen, 1997). *P. glacialis* er ofte å finne blant artene som utgjør våroppblomstringen i april-mai, selv om den ikke er en av de dominerende artene (Degerlund & Eilertsen, 2010). Denne arten forekommer vanligvis mot slutten av oppblomstringene.

Figur 13. *Porosira glacialis*. Sentrisk diatomé som danner kjeder. Opptrer sent i våroppblomstringen, men er ikke en dominerende art (Foto: R. D. Osvik).

1.8 Metodikk og prinsipper

1.8.1 Dyrking av marine diatomeer

Mange av teknikkene som i dag brukes for dyrking av mikroalger ble utviklet på slutten av 1800-tallet, og på begynnelsen av 1900-tallet ble pionerarbeidet med massedyrking av alger i tette kulturer utført (Preisig & Andersen, 2005). Det er utviklet utallige systemer for dyrking av mikroalger, og det pågår en stadig forskning for mer effektive og økonomiske systemer (Carvalho, 2006). Dyrking av mikroalger kan hovedsakelig gjøres på to ulike måter:

- a) Fotoautotrof dyrking
- b) Heterotrof dyrking

Ved fotoautotrof dyrking benyttes kunstig eller naturlig sollys for å drive fotosyntesen. Dette kan enten foregå i åpne eller lukkede systemer. Et åpent system kan være naturlige dammer, tanker eller såkalte "raceway-ponds". Den siste av disse er mest brukt da man får god sirkulasjon av næringsstoffer og CO₂ (Querellou, 2010). Fordelen med åpne systemer er at de er lette å bygge og å vedlikeholde, og man kan dyrke blandede kulturer av mikroalger. I slike åpne systemer vil man ha problemer med fordamping av vann, og diffusjon av CO₂ til atmosfæren.

Et alternativ til åpne systemer er lukkede fotobioreaktorer. Disse blir opplyst av naturlig eller kunstig lys. I lukkede systemer kan man dyrke monokulturer av spesielle algearter som ikke kan dyrkes i åpne systemer, for å produsere komponenter som kan benyttes som helsekost eller legemidler (Querellou, 2010). Fotobioreaktorene er også lettere å kontrollere med tanke på temperatur og lys. Man unngår i tillegg fordamping og kontaminering av andre arter.

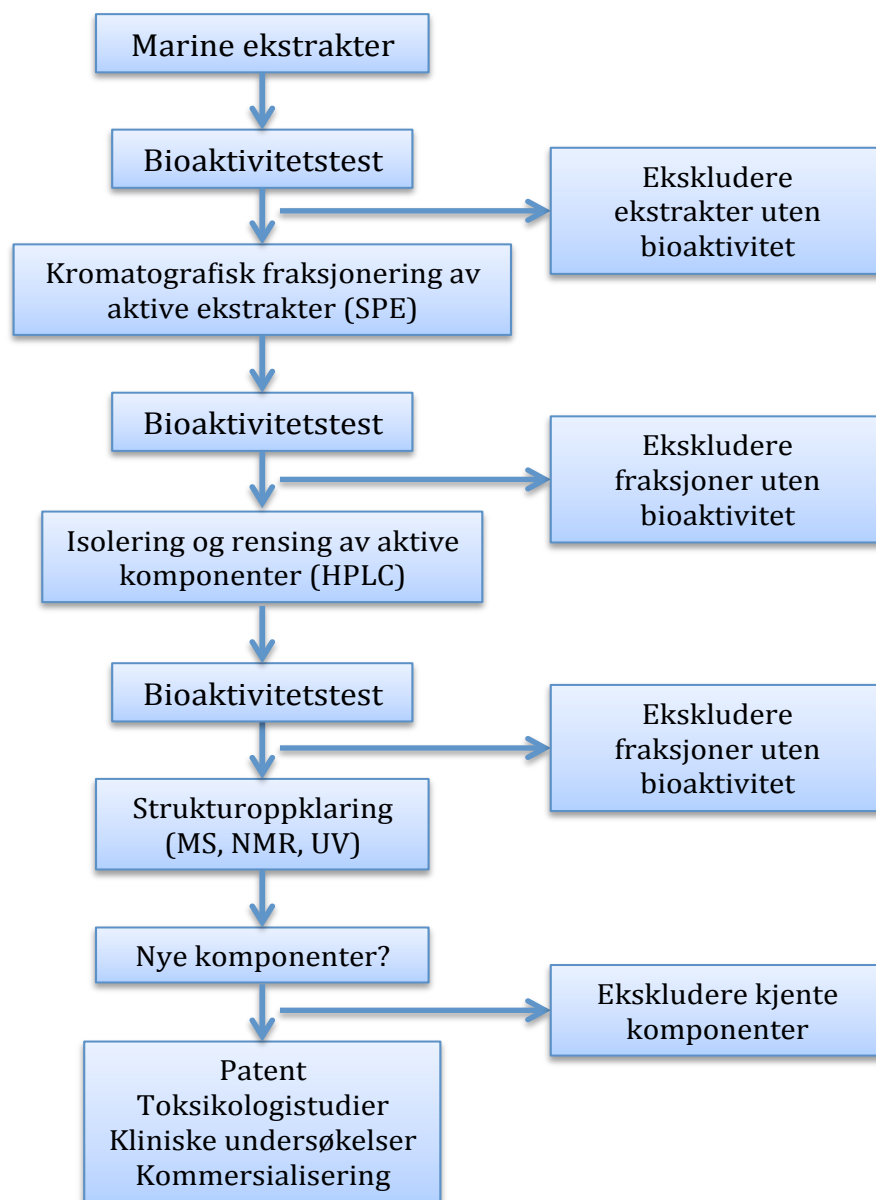
Noen arter mikroalger kan vokse uten sollys. Disse utøver heterotrof metabolisme i mørket ved at de får tilført organisk karbon som energikilde istedenfor lys. Den største fordelen med denne type dyrking er at mikroalgene kan dyrkes i store fermentorer beregnet på industriell produksjon av f.eks. medisiner, drikke eller

tilsetningsstoffer. Dette gjør produksjonen billigere enn fotoautotrof dyrkning dersom karbohydratet ikke blir for kostbart. Ved maksimalt utbytte kan celledettheten komme opp mot 50-100g per liter i motsetning til fotobioreaktorer som har en maksimal tetthet på 30g per liter (Chen, 1996). Dette gjør heterotrof dyrkning til et svært godt alternativ for storskala dyrkning, men med den begrensning at bare et fåtall arter kan vokse under disse betingelsene (Perez-Garcia, 2011).

Valg av dyrkingsmedium og også viktig for dyrkingsprosessen. Naturlig saltvann som dyrkingsmedium er lite effektivt, da man får lavt utbytte uten tilsetning av ekstra næringsstoffer og sporstoffer (Harrison & Berges, 2005). For å unngå kontaminering av prøver benyttes filtrert sjøvann, tilsatt anrikning av uorganiske næringsalter for å oppnå en tilstrekkelig konsentrasjon av næringsstoffer i mediet. Guillard's f/2 saltvannsanrikning er en vanlig tilsetning som passer for et bredt spekter av mikroalger (Guillard & Ryther, 1962) Ved dyrking av diatomeer tilsettes også ekstra også silikat (Na_2SiO_3) på grunn av at celleveggen syntetiseres av silikat.

1.8.2 Bioassay basert separasjon

Marine ekstrakter er svært komplekse blandinger av ulike kjemiske stoffer. Veien fra ekstrakt til karakterisering av eventuelle bioaktive komponenter er lang, og består av flere steg (Figur 14). Det er flere fremgangsmetoder for å lete etter bioaktive komponenter. Bioassay basert separasjon er en populær metode å benytte (Houssen & Jaspars, 2006). Med denne metoden gjennomfører man flere separasjonssteg, der man for hver separasjon vil gjennomføre nye bioaktivitetstester for å kunne ekskludere fraksjoner uten bioaktivitet. På denne måten vil man kun ta med seg bioaktive komponenter videre. Database-søk er også nødvendig for å finne ut om de aktive komponentene er tidligere oppdaget (Dinan, 2006).



Figur 14. Skjematisk fremstilling av bioassay basert separasjon. SPE; fast-fase ekstraksjon, HPLC; høytrykks-kromatografi, MS; masse spektrometri, NMR; kjernemagnetisk resnans, UV; UV-absorbans. Figuren er modifisert fra Sarker og medarbeidere (2006)

Påfølgende avsnitt vil gå nærmere inn på de ulike stegene av biassay basert separasjon som ble benyttet i dette studiet.

1.8.3 Ekstraksjon fra biologisk materiale

Naturstoffene må ekstraheres fra det biologiske materialet før man kan gå videre til isolering og bioaktivitets-testing. Ulike metoder for ekstraksjon er utviklet, og kan benyttes for ulike typer biologisk materiale. En metode som ofte brukes, er ekstraksjon ved hjelp av polare eller upolare løsemidler. Det biologiske materialet frysetørkes gjerne på forhånd, og knuses til et fint pulver. Dette øker overflatearealet til materialet og gir en mer homogen blanding, i tillegg vil løsemiddelet trenge inn i cellene slik at ekstraksjonsprosessen effektiviseres. Omrøring av løsningen under ekstraksjonsprosessen vil øke hastigheten ytterligere. Ekstraksjonen stopper når det oppstår en likevekt mellom stoffene i materialet og løsemiddelet. For videre ekstraksjon kan man gjenta prosessen i flere omganger (Seidel, 2006).

1.8.4 Kromatografisk separasjon

Bioaktive komponenter i marine ekstrakter kan separeres med ulike metoder. I mange tilfeller benyttes det kromatografiske metoder som separerer komponenter basert på fysiske og kjemiske egenskaper; størrelse, polaritet eller ladning. Det marine ekstraktet utgjør mobilfasen, og denne kjøres gjennom en stasjonærfase der komponentene separeres. For grovseparasjon av ekstrakter benyttes gjerne revers-fase kromatografi/fast-fase kromatografi der den kolonnen (stasjonær fase) er pakket med C-18 bundet til silika (Houssen & Jaspars, 2006). Den stasjonære fasen er i dette tilfellet upolar, og vil dermed holde tilbake de mest upolare forbindelsene. Ved å gradvis forandre polariteten i den mobile fasen vil stoffer med ulik polaritet vaskes ut i forskjellige eluater. Denne metoden vil også fjerne uønskede salter fra marine ekstrakter som ikke ønskes i videre testing av materialet (Dinan, 2006, Reid & Sarker, 2006)

Høytrykks-væskekromatografi er en annen kromatografisk separasjonsmetode. HPLC benytter spesielle kolonner som tåler høyt trykk, og dermed en hurtig væskegjennomstrømning. Denne teknikken har blitt en viktig del prosessen med å isolere naturstoffer, og kan benyttes til å rense de fleste klasser av stoffer (Latif, 2006). En mobil fase, som inneholder stoffene man ønsker å separere, presses gjennom en kolonne under høyt trykk. Separasjonen skjer på bakgrunn

av hvordan de ulike komponentene i den mobile fasen (og prøven) interagerer med den stasjonære fasen.

HPLC systemet er koblet opp mot en spektrofotometrisk detektor; PDA (Photodiode-array), som til enhver tid detekterer et spekter av absorpsjon fra ultrafiolett lys til synlig lys (UV-Vis; 600-200 nm). En PDA detektor inneholder serier av detektorer som måler absorpsjon av lys fra ulike bølgelengder, noe som gjør det mulig å sammenligne absorpsjonen for alle bølgelengdene mellom 600-200 nm (Dinan, 2006). UV-Vis spekteret og HPLC-retensjonstiden kan derfor være svært karakteristisk for enkelte komponenter, noe som gjør dette systemet til et nyttig hjelpemiddel i den innledende isolasjonen og karakteriseringen av bioaktive komponenter (Sarker & Nahar, 2006).

1.8.5 Biologisk testing

Antibakteriell testing av ekstrakter gjøres tidlig i prosessen, for å identifisere fraksjoner med biologisk aktivt materiale så raskt som mulig. MIC test blir sett på som den "gylne standard" for å teste *in vitro* antimikrobiell aktivitet i naturlige ekstrakter. Med denne testen bestemmer man den laveste konsentrasjonen av stoffer som må til for å inhibere vekst av ulike bakteriestammer (Andrews, 2001). Etter MIC-testing kan man velge ut de aktive ekstraktene til videre separasjon, og gjennomføre gjentatte antimikrobielle tester på delfraksjoner for å følge aktiviteten etter hvert som separasjonstrinn (kromatografiske steg) utføres.

1.8.6 Massespektrometri

Massespektrometri (MS) er en analysemetode som gjør det mulig å identifisere molekylvekten til de ulike stoffene i en prøve (Pavia *et al.*, 2009, Rodríguez *et al.*, 2012). Stoffene som injiseres i systemet gjøres om til gassform og ioniseres, enten som positivt eller negativt ladede ioner (ladning velges ut fra hvilke ioner man ønsker å detektere). Ionene blir deretter separert basert på masse-til-ladning (m/z) i en masseanalysator. Det er kun ioniserte komponenter som kan detekteres. Komponentene blir deretter kvantifisert og prosessert av et datasystem som gir resultatene i form av et masse-spekter. LC-MS er et system

der HPLC er kombinert med MS, slik at de ulike stoffene blir detektert av MS etter hvert som de elueres ut av HPLC-kolonnen (Dinan, 2006, Pavia *et al.*, 2009).

1.9 Mål for oppgaven

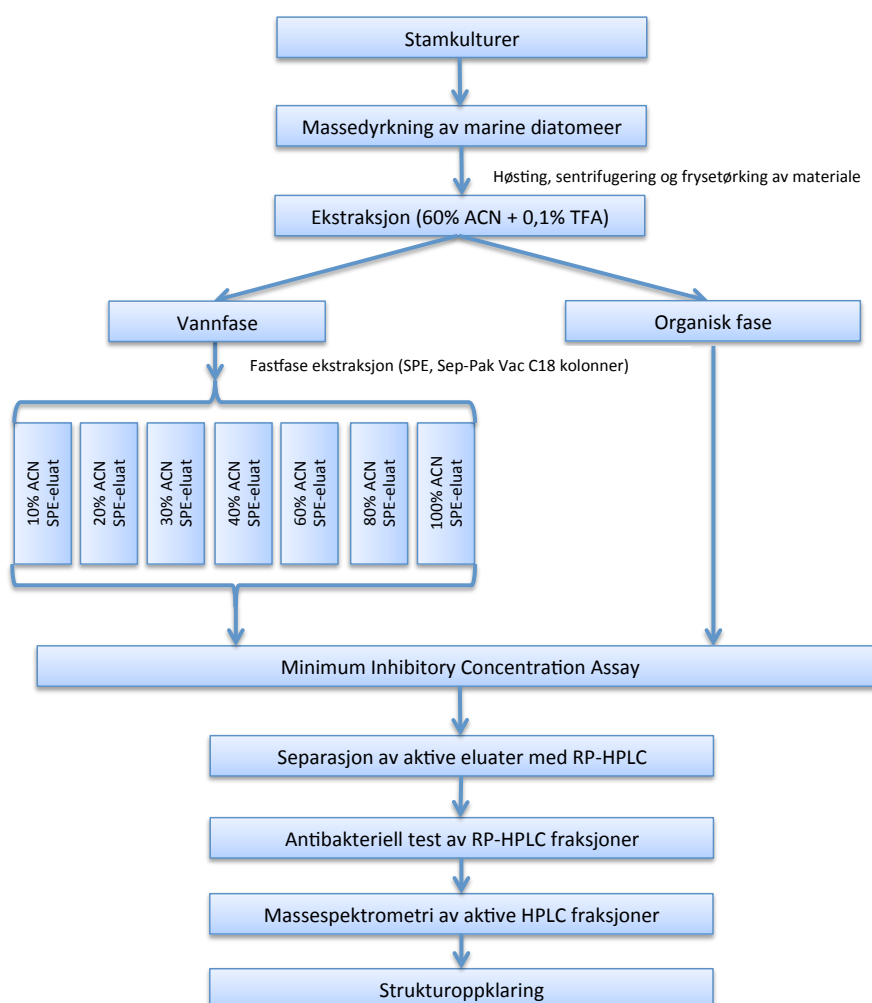
Hovedmål for denne oppgaven var å lete etter, og påvise forekomst av bioaktive forbindelser med antimikrobiell effekt i marine diatomeer. Oppgaven ble delt inn i 3 delmål:

1. Massedyrke fire ulike arter av marine diatomeer; *Attheya longicornis*, *Cylindrotheca closterium*, *Porosira glacialis* og *Thalassiosira nordenskiöldii*, og en blandingskultur av *P. glacialis* og *A. longicornis*.
2. Teste ekstrakter av de massedyrkede kulturene, i tillegg til to naturlige blandingskulturer samlet på tokt, for antimikrobiell aktivitet.
3. Isolere og utføre innledende studier til identifisering av aktive forbindelser .

2. Material og metode

2.1 Metodeforløp

Metodeforløpet i masteroppgaven oppsummeres i Figur 15. Stamkulturer av marine diatomeer ble benyttet som utgangspunkt for massedyrking av 4 ulike arter; *A. longicornis*, *C. closterium*, *P. glacialis* og *T. nordenskioldii*. Videre ble konsentret algebiomasse frysetørket, pulverisert og ekstrahert med 60% ACN + 0,1% TFA. Vannfase og organisk fase fra ekstraksjonen ble separert. Vannfasen ble rensset for salter, og grovseparert med fast-fase ekstraksjon (SPE). SPE-eluater og organisk fase ble videre testet for antibakteriell aktivitet, og aktive ekstrakter ble separert med HPLC før de gjennomgikk en ny antibakteriell test. Aktive fraksjoner ble så kjørt gjennom LC-MS for innledende strukturoppklaring.



Figur 15 Metodeforløpet for arbeidet som ble gjort i masteroppgaven. ACN: Acetonitril, TFA: Trifluoreddiksyre, SPE: fast-fase ekstraksjon, RP-HPLC: revers fase høytrykks søylekromatografi.

2.2 Kjemikalier

Tabell 1 viser en oversikt over de ulike kjemikaliene som ble benyttet i masteroppgaven.

Tabell 1. Oversikt over ulike kjemikalier og reagenser benyttet i masteroppgaven

Kjemikalier/reagenser	Leverandør
MilliQ-vann	Millipore Corp., MA, USA
Natrium meta-silikat nanohydrat (Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O)	Merck, Tyskland
HCl (37%)	Merck, Tyskland
Guillard's f/2 marin saltvannsanriking	Sigma-Aldrich, Tyskland
Substral	Scotts Celaflor GmbH & Co. KG, Tyskland
Flytende nitrogen	-
Acetonitril	Sigma-Aldrich, Tyskland
Trifluoreddiksyre	Sigma-Aldrich, Tyskland
Mueller-Hinton agar broth	BD, Difco, USA
Oxytetracyclin	
Riboflavin	Merck, Tyskland

2.3 Stamkulturer av marine diatomeer

Artene dyrket i monokultur som ble anvendt i denne masteroppgaven kom alle fra stamkultursamlingen på "planktonlaben" ved institutt for arktisk og marin biologi ved Universitetet i Tromsø. De artene som ble valgt var *Attheya longicornis*, *Cylindrotheca closterium*, *Porosira glacialis* og *Thalassiosira nordenskiöldii* (Art ID og slektstilhørighet vises i Tabell 2). Informasjon om hver enkelt art finnes i avsnitt (1.7)

Tabell 2. Oversikt over arter av marine diatomeer massedyrket fra stamkulturer i masteroppgaven.

Arter i monokultur	ID	Diameter (µm)	Biogeografisk utbredelse/ økologiske kjennetegn	Opprinnelse	Isolert
<i>Attheya longicornis</i>	AMB 20.2	4-6	Først i våroppblomstringen	Sediment, Rjipfjorden	09.03.07
<i>Cylindrotheca closterium</i>	AMB S8-11	30-200	Bentisk art	Sediment, Rjipfjorden	06.11.07
<i>Porosira glacialis</i>	AMB 49.2D	30-40	Temperert art	Tromsøsundet	28.02.07
<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i>	AMB 166	10-50	Sist i våroppblomstringen	Sediment, Rjipfjorden	28.11.11

2.4 Blandingskulturer

I tillegg til de 4 artene i monokultur, ble det også valgt ut 3 blandinger av arter som skulle testes for antimikrobiell aktivitet (Tabell 3). Blandingskultur 1 ble dyrket på laboratoriet. De to andre blandingskulturene ble samlet inn under Marisco tokt i 2005. Disse to kulturene ble brukt for å undersøke om ekstraksjonsmetoden fungerte for marine diatomeer.

Tabell 3. Kulturer som inneholdt flere arter av marine diatomeer. Blandingsforholdet ble beregnet på bakgrunn av celletall tatt ved undersøkelse i mikroskop.

Nr.	Arter i mikset kultur	Diameter (µm)	Biogeografisk utbredelse/ økologiske kjennetegn	Opprinnelse	Blandingsforhold
1	<i>Porosira glacialis</i>	30-40	Temperert art	Sediment, Rjipfjorden	50 %
	<i>Attheya longicornis</i>	4-6	Først i våroppblomstringen	Sediment, Rjipfjorden	50 %
2	<i>Chaetoceros socialis</i>	2-14	Tidlig i våroppblomstringen	Marisco tokt	40 %
	<i>Fragilariopsis oceanica</i>	15-20	Tidlig i våroppblomstringen	Marisco tokt	50 %
	<i>Phaeocystis pouchetii</i>	4-8	Ikke marin diatomé, men svepeflagellat	Marisco tokt	10 %
3	<i>Chaetoceros socialis</i>	2-14	Tidlig i våroppblomstringen	Marisco tokt	55 %
	<i>Thalassiosira nordenskiöldii</i>	10-50	Sist i våroppblomstringen	Marisco tokt	30 %
	Ukjente arter	-	-	Marisco tokt	15 %

2.5 Medier og løsninger til dyrking av marine diatomeer

2.5.1 Guillard's f/10 dyrkingsmedium

Guillard's f/10 medie (Guillard & Ryther, 1962) ble benyttet til vedlikehold (fortynning) av stamkulturer. Ingrediensene i dette mediet vises i Tabell 4.

Tabell 4. Innhold og mengde av ingredienser i Guillard's f/10 dyrkingsmedium for marine diatomeer. For oppskrift på silikatløsning se Appendiks 1

Guillard's f/10	
Innhold	Mengde
Filtrert søvann	1000 ml
Guillard's f/2 saltvannsanrikning (Sigma-Aldrich)	4 ml
Silikatløsning	1 ml

Sjøvann ble filtrert (Millidisc® 40-layer, 0,22 µm cartridge-filter, Millipore Corp., USA) og varmet opp til 90°C i vannbad for å pasteuriseres. Vannet ble deretter kjølt ned, og f/2 medium, samt silikatløsning ble tilsatt. Mediet ble oppbevart på kjølerom ved ca. 7°C.

2.5.2 Massedyrkingsmedium

Ingredienser i massedyrkingsmedium benyttet til massedyrking vises i Tabell 5.

Tabell 5. Innhold og mengde av reagenser benyttet i dyrkingsmedium for massedyrking av marine diatomeer. For oppskrift på silikatløsning og jordekstrakt se Appendiks 1.

Massedyrkingsmedium	
Innhold	Mengde
Substral (Scotts Celaflor GmbH & Co. KG, Tyskland)	0,25 ml/l
Silikatløsning	1 ml/l
Jordekstrakt	1 µl/l

Sjøvann, pumpet fra Tromsøysundet, ble filtrert over 3 seriekoblede 0,5 µm filter (GE Waters), samt et 0,22 µm 40-lags membranfilter (Millipore Corp.). Vannet

ble pumpet direkte over i dyrkningsøylene, og det ble tilsatt næring etter mengde vann i søylen. Hver gang søylen ble høstet, ble det tilsatt ny næring i henhold til vannmengden.

2.6 Dyrking av marine diatomeer (kiselalger)

2.6.1 Vedlikehold av stamkulturer av marine diatomeer

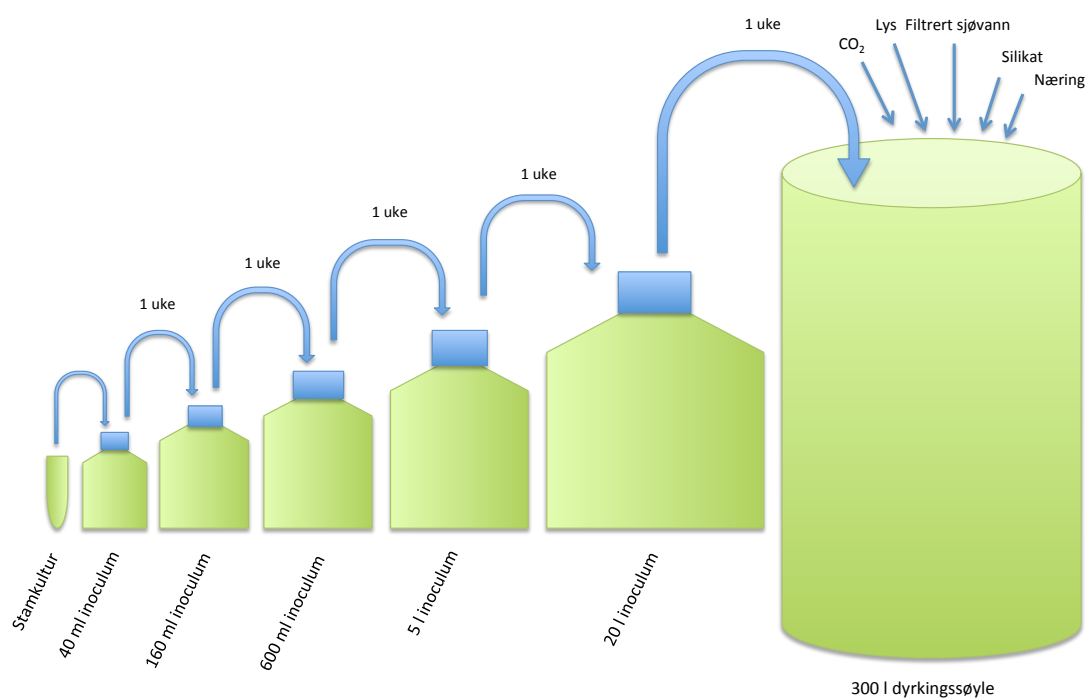
Stamkulturene ble dyrket i lys- (dagslys lysstoffrør, skalar irradians $100-150 \mu\text{mol kvanta cm}^{-2}, \text{s}^{-1}$) og temperaturkontrollerte (ca. 7°C) rom. Fotoperioden var 10:14t (lys:mørke). Kulturene ble holdt på Duran glassrør (15 ml). Vedlikehold av stamkulturene ble gjort ved jevnlig fortyninger, der ca. 5 ml stamkultur ble overført til et nytt glassrør og fortennet med Guillard's f/10 (Tabell 4). Fortynninger ble gjort ca. hver 3 uke. Det ble også gjort jevnlig kvalitative kontroller av stamkulturene i lysmikroskop (Zeiss Primo Vert, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Goettingen, Tyskland). Ca 2 ml av hver kultur ble overført til Nunc 2 ml 4-brønns sedimenteringskammer (Apogent, Roskilde, Danmark).

2.6.2 Massedyrking av marine diatomeer

Massedyrkningsprosessen ble startet ved at 5 ml kultur, fra stamkultursamlingen ble overført til 50 ml Nunc dyrkningsflasker (Apogent, Roskilde, Danmark) og fortennet til et samlet volum på 40 ml. Volumet ble deretter øket gradvis til man hadde opparbeidet et dyrkningsinokulum på ca. 20 L. Dette inokulumet ble så overført til dyrkningsøylene (250 L og 630 L). Prosessen fra start av inokulum til man har stort nok volum til å overføre til dyrkningsøylene tar ca. 4-5 uker. Figur 16 viser en skjematisk fremstilling av hvordan volum av inokulum ble opparbeidet.

Kulturen i søylen ble så fortennet med filtrert sjøvann. Sjøvannet ble pumpet gjennom to ulike filtreringssystemer. Vannet ble først pumpet gjennom 3 seriekoblede Hytrex $0,5 \mu\text{m}$ filter (GE Water), og videre gjennom et 40-lags Millidisc $0,22 \mu\text{m}$ filter (Millipore corp.) Vannet ble anrikt med Substral (0,25 ml/l) og silikatløsning (1 ml/l). I tillegg ble det tilsatt jordekstrakt (1 $\mu\text{l/l}$) som inneholder sporstoffer (bl. A. Fe, Mg) som diatomeene har behov for. I dyrkningsprosessen ble rensert luft boblet gjennom søylene for å sikre konstant

miksing og tilførsel av CO₂. Lys og temperatur ble kontrollert under hele dyrkingsprosessen (se avsnitt 2.3.1).



Figur 16. Skjematisk fremstilling av opparbeidelse av inokulum. Stamkultur er utgangspunkt for dyrkingen, og volum økes gradvis etterhvert som algene vokser. Fortynning gjøres omtrent én gang i uken i oppdyringsfasen.

Massedyrkningskulturene ble høstet da tettheten av algene var høy nok. Tetthet av kulturen ble ikke målt, men antatt ut fra farge på kulturen. Når fargen var brun, og kulturen ugjennomsiktig var den tett nok til å høste. Algekulturene ble høstet omtrent én gang i uken, over en periode på ca. 3 måneder. Høsting av algene ble gjort ved hjelp av en planktonhåv. Størrelsen på nettet ble valgt etter størrelsen på algene som skulle høstes. Både 5 µm og 10 µm håv ble benyttet. Prosessen med å høste en søyle tar ca 4-5t, avhengig av om planktonhåven tettes, eller om vannet renner lett gjennom. Algene ble overført fra dyrknings søylen og ned i håven med en slange som hadde uttak i bunnen av søyla. I bunnen av håven var det festet et 45 ml Falconrør for å samle opp diatomeene. Algene sank etter hvert til bunnen av Falconrøret. Dette ble fjernet fra planktonhåven, og prøven ble sentrifugert ved 2500 r.p.m./min i 5 min (Rotina 380, Hettich Zentrifugen, Tyskland). Supernatanten ble deretter fjernet, og pelleten med konsentrert

algebiomasse ble øyeblikkelig frosset ned på flytende nitrogen. Prøvene ble deretter satt til oppbevaring i fryseboks ved -20°C i påvente av videre ekstraksjon.

Etter høsting ble kulturene fortynnet til ønsket volum, og satt til videre vekst dersom mer biomasse trengtes, og næringsstoffer ble tilsatt i samme konsentrasjon som tidligere (Tabell 5). Ny høsting kunne da foretas etter ca 7 dager, avhengig av veksthastigheten til algearten.

Kulturene ble i løpet av dyrkings-sesjonen kvalitativt i mikroskop for å overvåke cellenes kondisjon; om cellene generelt så friske ut, og om det var mye døde celler eller cellerester til stede. Samtidig var rutinemessig kontroll viktig for å passe på at kulturene ikke var kontaminert av andre arter. Denne kvalitative kontrollen ble gjort i forkant av hver høsting.

2.7 Preparering og ekstraksjon av materiale

Frosset pellet med konsentrerte diatoméceller ble tørket ved hjelp av en VirTis Genesis (SP Scientific, NY, USA) frysetørker. Materialet ble deretter lagret i en biofryser ved -80°C .

Frysetørket materiale ble først knust i en morter. Dette ble gjort for å løse opp klumper, og oppnå et finkornet pulver. Materialet ble deretter veid, og tilsatt ekstraksjonsløsning som besto av 60% Acetonitril (ACN, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) + 0,1% Trifluoeddiksyre (TFA, Sigma-Aldrich, Missouri, USA) Mengde ekstraksjonsløsning varierte fra prøve til prøve. Alle prøvene ble først tilsatt 20 volum (v/w), og en vurdering ble gjort om det måtte tilsettes mer. Flere av prøvene ble svært tyktflytende ved tilsetting av 20 volum, og mengden ble derfor doblet for å oppnå en mer homogen løsning. Løsningen ble deretter satt til ekstraksjon i 24 t ved 4°C . Magnetrorer ble anvendt for å holde biomassen i suspensjon gjennom hele ekstraksjonsprosessen.

Etter ekstraksjon ble løsningen overført til 50ml Falconrør, og sentrifugert ved 5000 r.p.m./min i 10 min (Multifuge 1S-R Heraeus, Thermo Fisher Scientific,

Tyskland). Supernatanten ble deretter overført til en flaske, og lagret ved 4°C inntil videre. Pelleten ble så løst opp i 20 nye volum 60% ACN + 0,1% TFA og satt til ekstraksjon i 24 t. En tredje ekstraksjon ble så gjentatt etter samme prosedyre, og all væske ble til slutt samlet.

Ekstraktene ble deretter satt i fryser (-20°C) i 1-2 timer for å oppnå et klart skille mellom en saltrik vannfase (nederst) og de ACN-rik organisk fase (øverst). Fasene ble så skilt fra hverandre og overført til på forhånd veide 50ml Falconrør. Væske ble så fjernet fra prøvene i en ScanSpeed 40 vacuuminddamper med kjølefelle frysetørker (Scanvec AS, Danmark) og MD-4 Diaphragm vacuumpumpe (Vacuumbrand GMBH, Wertheim, Tyskland). De inndampede prøvene ble veid og tørrstoffutbytte ble beregnet. Prøvene ble deretter lagret ved -20° C inntil videre testing.

Tørrstoffet fra vannfasen ble løst opp i 0,1% TFA til en konsentrasjon på 100 mg/ml. Fastfase-ekstraksjonen (engelsk; solid phase extraction; SPE) ble gjennomført med Sep-Pak Vac 35cc (10 g) C18 SPE-kolonner (Waters). Før ekstraksjonen av selve prøvematerialet kunne gjennomføres måtte kolonnene klargjøres. De ble først kondisjonert med 30 ml ACN + 0,05% TFA, før de ble ekvilibrert med 30 ml 0,05% TFA. Prøven ble så applisert på kolonnen, og kjørt gjennom uten å samle opp noe materiale. Kolonnen ble deretter vasket med 40 ml 0,05% TFA. Videre ble prøvematerialet eluert ut med en stegvis økende konsentrasjon av ACN. Eluering ble gjort i rekkefølge med 10-, 20-, 30-, 40-, 60-, 80- og 100% ACN + 0,1% TFA. For hver stegvis fraksjonering ble 20 ml mobilfase kjørt gjennom kolonnen, og prøvene ble samlet opp i glassreagensrør. De 7 ulike eluatene ble overført til på forhånd veide 50 ml Falconrør, og deretter ble all væske dampet inn i vakuumsentrifuge (som tidligere beskrevet; avsnitt 2.4.1). Rørene ble veid på nytt, og tørrstoffutbytte ble beregnet. Tørrstoffet ble videre løst i MilliQ-vann til en konsentrasjon på 10mg/ml og lagret i fryseboks ved -20°C til videre testing. Tørrstoff fra organisk fase ble ikke kjørt gjennom fast-fase ekstraksjon. Denne fasen ble løst så godt som mulig opp i MilliQ-vann før bakterietesting.

2.8 Bioaktivitetstesting

2.8.1 Bakteriestammer

Det ble benyttet 4 ulike bakteriestammer til antibakteriell testing. En oversikt over de ulike stammene, samt stamme-ID vises i Tabell 6.

Tabell 6. Bakteriestammer benyttet til antibakteriell testing av ekstrakter.

Bakteriestamme	ID	Gram+/Gram-
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	ATCC 13032	Gram +
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 9144	Gram +
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922	Gram -
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 25853	Gram -

Bakteriestammene ble oppbevart som stamløsning på 80% glycerol i biofryser ved -80°C. Ut ifra disse stamløsningene ble det laget arbeidsløsninger, som ble benyttet til bakteriedyrking. Arbeidsløsningene ble også lagret på glycerol ved -80°C.

2.8.2 Dyrkingsmedier til dyrking av bakterier

2.8.2.1 Mueller-Hinton agar

Plater med Mueller-Hinton (MH) agar ble benyttet til oppdyrking av bakterier fra stamløsningene. Sammensetningen av MH-agar vises i Tabell 7.

Tabell 7. Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton agar

Mueller-Hinton agarplater	
Innhold	Mengde
MilliQ-vann	1000 ml
Mueller-Hinton Broth	121 g
Agar	20 g

Mueller-Hinton Broth og agar ble løst opp i MilliQ-vann med magnetrører. Løsningen ble deretter autoklavert, og overført til petriskåler (à 20 ml). HM-agar ble lagret på 4°C, pakket inn i plastposer.

2.8.2.2 Mueller Hinton dyrkingsmedium

Mueller-Hinton dyrkingsmedium ble benyttet til dyrking av bakterier i flytende medium til antibakterielle tester. Oppskrift på MH-broth vises i Tabell 8.

Tabell 8. Sammensetning av ingredienser i Mueller-Hinton dyrkingsmedium.

Mueller-Hinton dyrkingsmedium	
Innhold	Mengde
MilliQ-vann	1000 ml
Mueller-Hinton Broth	21 g

Mueller-Hinton broth ble løst opp i MilliQ-vann med magnetrører. Løsningen ble autoklavert og overført til reagensrør (5 ml/rør). Dyrkningsmediet ble deretter lagret på 4°C inntil videre bruk.

2.8.3 Dyrking av bakterier

Alle bakteriestammene som er angitt i Tabell 6 (se avsnitt 2.1.5), ble benyttet til antibakteriell testing. En liten alikvot av frossen arbeidsbakteriekultur ble strøket ut og dyrket på MH-agar plater ved romtemperatur i ca. 1-3 dager til det ble dannet kolonier. Arbeidet ble utført i bakterie sterilbenk som var vasket med 20% etanolløsning. Etter dyrking til synlige kolonier, ble bakterieskålene lagret ved 4°C i maksimum 2 uker. Etter denne tid ble det laget nye skåler fra arbeidskulturene for å sikre at en arbeidet med bakteriestammer som ikke hadde endret seg ved flere passasjer i laboratoriet.

Før bakterietesting ble én koloni fra hvert isolat overført fra bakterieskålen til 5 ml MH-dyrkingsmedium, og satt til risting over natta ved romtemperatur. Neste dag ble 20 µl fra hver kultur overført til 5ml MH-dyrkingsmedium og satt til risting i 2 t. Etter 2 t ble det gjort OD₆₀₀-målinger (BioMate 3 Spectrophotometer, Thermo, USA) av hver enkelt kultur, og mellom 3-20 µl av kulturen ble overført til nye 10 ml MH-medium for å få en bakteriekonsentrasjon på 2.5-3 x 10⁴ celler/ml. Mengden bakteriekultur som ble overført ble bestemt ut fra tidligere OD₆₀₀-målinger, av hver stamme, som er blitt utført, der OD₆₀₀ =

0,05/0,06 tilsvarer ca. $5-6 \times 10^7$ CFU/ml (CFU= colony forming unit). Oversikten vises i Tabell 9. Bakteriekulturen var deretter klar til å benyttes til antibakteriell testing.

Tabell 9. Mengde bakteriekultur tilsatt til nye 10 ml MH-dyrkingsmedium (basert på OD₆₀₀-målinger av bakteriekulturene) for å få en stock-løsning på $2,5-3 \times 10^4$ bakterier/ml

OD₆₀₀-verdi	Mengde bakteriekultur som overføres til 10 ml MH-dyrkingsmedium
0,003-0,010	20 µl
0,010-0,030	10 µl
0,030-0,075	5 µl
0,075-0,100	4 µl
0,100-0,150	3 µl

2.8.4 Minimums inhiberende konsentrasjons test (MIC)

Alle SPE-eluatere fra de ulike artene ble testet for antibakteriell aktivitet i 2-folds fortynninger for å bestemme hvor stor mengde tørrstoff som var tilstrekkelig til hemme vekst av de ulike bakteriene. Dette ble utført ved at tørrstoffet i fraksjonene ble løst i MilliQ-vann til en konsentrasjon på 10 mg/ml. MIC-assayet ble gjennomført i 96 brønners Nunc mikrotiterplater. Det ble gjort en to-ganger fortynning av hvert eluat på platen, og volumet av hver prøve var benyttet i testen var 50 µl. Etter fortynning av SPE-eluatene, ble 50 µl av bakteriesuspensjon tilsatt hver av brønnene. Dermed tilsvarte konsentrasjonen i den endelige fortynningsrekken 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313 og 0.156 mg tørrstoff/ml. Som positiv kontroll ble det brukt Oxytetracycline (40 µM), mens MilliQ-vann ble benyttet som negativ kontroll. Mengde væske i kontrollene var 50 µl kontroll og (som i de andre testbrønnene) 50 µl bakteriesuspensjon. Da alt var tilsatt til platene, ble disse forseglert med Nunc forseglings tape og en steril nål ble brukt for å stikke hull i tapen over alle brønner for å unngå kondens. Bakterievekst ble registrert hver time i 48 t under dyrking/inkubering ved 35°C med Perkin Elmer Envision 2103 Multilable Reader (Turku, Finland).

Absorbansen ble registret ved 595 nm. Dataprogrammet som ble benyttet til registrering av resultatene var Wallack Envision Manager v 1.12.

Etter endt test ble bakterievekst i ekstraktene sammenlignet med positiv og negativ kontroll for å vurdere antibakteriell aktivitet i de ulike SPE-eluatene (fraksjonene).

Antibakteriell test av organisk fase ble gjennomført på samme måte som for SPE-eluater. Konsentrasjonen var i dette tilfellet ikke kjent, da organisk fase var svært vanskelig å løse godt opp i vann.

2.9 Revers-fase høytrykks væskrokromatografi (RP-HPLC)

SPE eluater, som viste antibakteriell aktivitet, ble videre separert ved hjelp av revers fase høytrykks kromatografi (RP-HPLC). Et volum på 200 µl av hvert SPE-eluat ble injisert på kolonnen i HPLC-systemet. Systemet som ble benyttet besto av en Sunfire Prep C18 kolonne (5 µm; 10 x 250 mm), 717 autosampler, 600 E pumpe og 2996 PDA detektor (alle fra Waters Associates, Millipore Corp., Massachusetts, USA). Softwaren som ble benyttet til å registrere resultatene var Millennium v 4.00. Mobilfasen som ble benyttet bestod av: A) 0,05% TFA og B) ACN + 0,05% TFA.

Mobilfasen ble pumpet gjennom kolonnen og eluering av prøven ble utført med en lineær gradient over 90 min og en hastighet (flow) på 4 ml/min. Oversikt over ulike gradienter benyttet vises i Tabell 10. Detektoren registrerte absorbans ved 200-600 nm. Fraksjonene ble samlet opp med et volum på 4ml/min ved hjelp av en Gilson FC 240 fraksjonssamler (Gilson, Wisconsin, USA). Væsken i fraksjonene ble deretter dampet av i en vakuumsentrifuge (som tidligere beskrevet). Tørrstoffet fra fraksjonene ble løst opp i 500 µl MilliQ-vann, og antibakteriell test ble utført som angitt i avsnitt 2.4.5 med (unntak av at fraksjonene separert ved hjelp av RP-HPLC ikke ble fortynnet på platen).

Tabell 10. Gradientene som ble benyttet under RP-HPLC av SPE-eluat, samt organiske faser

SPE-eluat	HPLC-gradient	Minutter
20 %	Lineær gradient 0-40% ACN	90
30 %	Lineær gradient 0-40% ACN	90
40 %	Lineær gradient 0-60% ACN	90
Organisk fase	Lineær gradient 30-90% ACN	90

2.10 Massespektrometri (LC-MS)

Alle aktive HPLC-fraksjoner ble analysert ved hjelp av LC-MS for å få en oversikt over hvilke komponenter som var tilstede, og for å se renheten i fraksjonene. Systemet som ble benyttet i denne analysen var produsert av Waters (Waters Associates, Millipore Cor., MA, USA), og systemet besto av en Waters 2690 separasjonsmodul med en C18 kolonne (Sunfire 2,1 x 100 mm) og Waters Micromass ZQ analysator med Masslynx v 4.1 programvare. Betingelsene som ble brukt under LC-MS er vedlagt i Appendiks 2.

Det ble benyttet 2 ulike gradienter ved analyse med LC-MS. De ulike gradientene vises i Tabell 11.

Tabell 11. Gradienter benyttet ved analyse av SPE-eluat og fraksjoner i LC-MS. Det ble benyttet to ulike mobilfaser. A) 0,05% TFA B) ACN + 0,05% TFA.

Tid (min)	5-50% ACN		5-90% ACN	
	Mobilfase (%)		Mobilfase (%)	
	A	B	A	B
0	95	5	95	5
2	95	5	95	5
58	50	50	10	90
59	10	90	5	95
62	10	90	5	95
63	95	5	95	5
70	95	5	95	5

Ionene som detekteres, og vises i MS-spekteret kan benyttes til å kalkulere ladning og molekylvekt på forbindelsene. For lavmolekylære forbindelser (m/z-ioner med høy intensitet) og med ladning (z) = 1, ble molekylvekten (M) beregnet ved å trekke fra massen til ett proton (H⁺ = 1) fra m/z-verdien (altså M = m/z - 1).

For høymolekylære forbindelser (> 2 kDa) med multiple ladninger ble ladningen til to antatt tilhørende m/z-ioner (m/z_A og m/z_B) beregnet etter formelen:

$$z_B = \frac{(m/z_A - 1)}{(m/z_B - m/z_A)}$$

m/z_A = masse/ladning-verdi for ionet med laveste verdi (m/z_B > m/z_A)

m/z_B = masse/ladning-verdi for ionet med høyeste verdi

z_B = ladning til ionet m/z_B

Dersom man ved disse beregninger får et heltall (z_B for eksempel 2,00), er det stor sannsynlighet for at ionene tilhører samme forbindelse, men at molekylene har fått påkoblet ulikt antall protoner i ioniseringsprosessen. Dersom z_B har blitt beregnet til å være lik 2, da er z_A lik z_B+1=3.

Molekylvekten (M) til forbindelsen kan da også bli beregnet etter formelen:

$$M = z_B (m/z_B - 1) \text{ eller/og } z_A (m/z_A - 1)$$

3. Resultater

3.1 Massedyrking av marine diatomeer

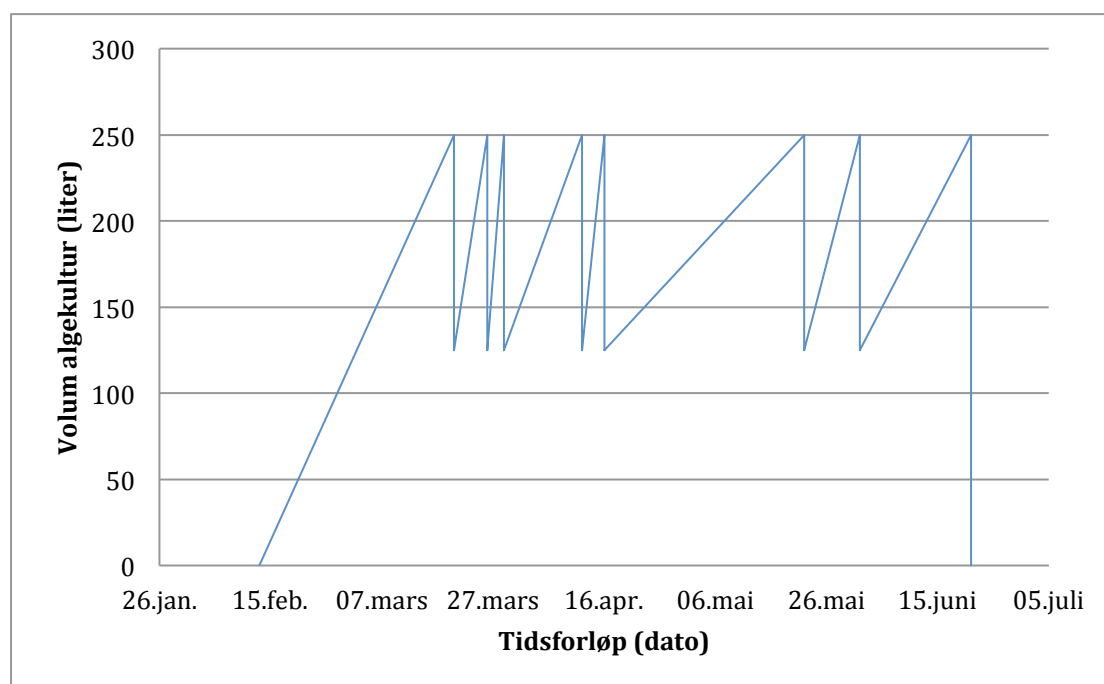
De marine diatomeene ble dyrket ved hjelp av fotoautotrof dyrkingsmetode. Under hele dyrkingsprosessen ble algekulturene jevnlig kontrollert i lysmikroskop for eventuell kontaminering av bakterier og/eller andre algearter. Denne kvalitative kontrollen ble også gjennomført for å overvåke kondisjonen til cellene.

Totalt ble 4 renkulturer, samt én blandingskultur (se Tabell 2 og 3) benyttet til massedyrking. På grunn av det lange tidsløpet og plassen som kreves for oppdyrking av algebiomasse, var det ikke mulig å dyrke opp ønsket mengde materiale av alle kulturene. Dyrkingsprosessen for én kultur foregikk i 2-5 mnd, og det ble derfor vanskelig å dyrke opp alle 5 kulturene. I løpet av en 5 måneders periode ble det dyrket opp ønsket mengde materiale av *C. closterium* og *A. longicornis* i henholdsvis 250 l og 600 l dyrkingssølyer. *A. longicornis* ble dyrket i samarbeid med ansatte på planktonlaben. De andre kulturene som ble benyttet i dette studiet (*P. glacialis*, *T. nordeskioeldii* og blandingskulturen med *P. glacialis* + *A. longicornis*) var prøver opparbeidet på planktonlaben fra tidligere massedyrking.

3.1.1 Dyrkingsprosess av *C. closterium*

C. closterium er en pennat diatomé, som i hovedsak lever på overflater, der cellene danner celleaggregater og biofilm. Dyrkingsøylene var derfor ofte dekket av brun biofilm i bunnen, og oppover langs kantene på søylen. Turbulensen som oppsto i søylen på grunn av CO₂-tilførsel var ikke nok til å løsne biofilmen fra overflatene. Ved høsting ble cellekulturen tappet fra bunnen av søylen, og det var derfor nødvendig å benytte en kost med langt skaft for å løse opp biofilmen, og suspendere cellene i dyrkingsmediet. *C. closterium* ble dyrket i en 250 L dyrkingssøyle, og det ble høstet 125 L ved hver høsting. Siden dyrkingsvolumet var relativt lite tok det 5 måneder fra oppstart av inokulum til det ble opparbeidet nok prøvemateriale til å kunne gjennomføre ekstrahering og

bioaktivitetstesting. Figur 17 viser en grafisk fremstilling av dyrkingsforløpet til *C. clostrium*. Grafen viser høstinger i forhold til tid.



Figur 17. Tidsforløp av dyrkingsprosessen til *C. clostrium*. X-aksen viser tidsforløp i form av datoer hvor det ble foretatt høsting av algekulturen. Y-aksen viser volum av algekultur i liter. For hver høsting ble det høstet 125 l av kulturen. Avstanden mellom hver høsting gir indikasjon om algeveksten i perioden.

Gjennom de 5 månedene dyrkingsprosessen foregikk, var cellene i god form. Cellestørrelsen varierte noe (50-150 μm), men dette er vanlig da diatomécellene blir gradvis mindre for hver celledeling. *C. clostrium* har en rafe langs undersiden av cellen, og kan derfor bevege seg langs overflaten. De fleste cellene som ble observert var under stadig bevegelse, og det kunne observeres at cellene bevegde seg mot hverandre og dannet celleaggregater av varierende størrelse. Bakterieinnholdet i kulturen var lavt under hele dyrkingsprosessen. Innholdet av bakterier ble sjekket i lysmikroskop, der man får et relativt overblikk over bakteriekonsentrasjonen. Mot slutten ble det observert en kontaminering av en ukjent liten flagellat (ca 1 μm i diameter). En vurdering ble gjort, og det ble konkludert med at denne flagellaten ikke ville samles opp under høsting siden det ble benyttet en 10 μm planktonhåv. Flagellatcellene ville derfor vaskes ut av håven, mens diatomécellene ville holdes tilbake.

Det ble observert en kontinuerlig vekst gjennom hele perioden, bortsett fra en liten stagnering fra midten av april, da veksten gikk noe saktere (Figur 17). Kulturen ble høstet i gjennomsnitt én gang per uke, til sammen 8 høstinger. Høstingsprosessen tok ca 3-4 t for hver høsting da man måtte la planktonhåven henge i 2 t for å la så mye vann som mulig renne ut. Arten var forholdsvis lett å høste. Siden volumet som ble høstet var forholdsvis lite, unngikk man problemet med at store mengder celler tettet igjen håven. Mengde totalt opparbeidet materiale vises i Tabell 12.

3.1.2 Dyrkingsprosess av *Attheya longicornis*

A. longicornis ble dyrket i en 600 L dyrkingssøyle. Denne arten er planktonisk, og cellene holdt seg derfor suspendert i dyrkingssøylen på grunn av turbulensen i søylen (grunnet luft/CO₂ tilførsel). Det ble høstet ca 300 L i hver høsting. Grunnet høyere dyrkingsvolum ble utbyttet av *A. longicornis* høyere enn for *C. closterium*. Denne arten kunne også vokse tettere på grunn av at cellene var suspendert i dyrkningsmediumet, og ikke vokste i biofilm på bunnen eller langs kantene på dyrkingssøylen. Kulturen holdt seg i god form gjennom hele dyrkningsperioden. Mot slutten ble det oppdaget kontaminering av en liten flagellat også i denne kulturen. Flagellaten førte til at veksten til slutt stagnerte, og dyrkningen ble avsluttet på dette tidspunktet.

3.2 Ekstraksjon

3.2.1 Tørrstoffutbytte fra arter dyrket i monokultur

Etter løsemiddelekstraksjon (60% ACN + 01,% TFA) ble vannfase og organisk fase tørket i vakuumsentrifuge. Tørrstoffet ble deretter veid og prosentvis utbytte ble beregnet (Tabell 12). Det ble gjennomført to ulike løsemiddelekstraksjoner av *T. nordenskiöldii*, der andre ekstraksjon ble gjennomført med en større mengde materiale (16,6 g) enn første ekstraksjon (3,4 g). *A. longicornis* hadde det høyeste tørrstoffutbyttet på 71,73%, mens *C. closterium* hadde lavest på 44,78%. Forskjellen på utbytte i vannfasen fra de to ulike ekstraksjonene av *T. nordenskiöldii* var liten.

Tabell 12. Tørrstoffutbytte i vannfase og organisk fase etter løsemiddelekstraksjon, samt restmateriale (pellet)

Art	Materiale/fraksjon	Tørrstoff (mg)	Tørrstoff (%)
<i>A. longicornis</i>	Materiale før ekstraksjon	4600,00	100,00
	Vannfase	3300,00	71,74
	Organisk fase	827,80	18,00
	Pellet (avfall)*	472,2	10,26
<i>C. closterium</i>	Materiale før ekstraksjon	2900,00	100,00
	Vannfase	1299,00	44,79
	Organisk fase	713,10	24,59
	Pellet (avfall)*	887,70	30,61
<i>P. glacialis</i>	Materiale før ekstraksjon	4500,00	100,00
	Vannfase	2530,00	56,22
	Organisk fase	425,30	9,45
	Pellet (avfall)*	1544,70	34,33
<i>T. nordenskiöldii (I)</i>	Materiale før ekstraksjon	3400,00	100,00
	Vannfase	2220,00	65,29
	Organisk fase	230,90	6,79
	Pellet (avfall)*	969,10	28,50
<i>T. nordenskiöldii (II)</i>	Materiale før ekstraksjon	16600,00	100,00
	Vannfase	10153,30	61,16
	Organisk fase	1367,00	8,23
	Pellet (avfall)*	5079,70	30,60

*: Pellet ble ikke veid, men beregnet ut fra materiale før ekstraksjon der tørrstoff i vannfase og organisk fase ble trukket fra.

Vannfaser ble grovseparert med fast-fase ekstraksjon for å fjerne salter, og andre uønskede (ekstremt polare/upolare) stoffer fra ekstraktene. Tørrstoff i alle eluater ble veid opp etter inndamping, og prosentvis utbytte ble beregnet ut fra mengden tørrstoff i vannfasen (Tabell 13). Tørrstoffutbytte etter fast-fase ekstraksjon varierte fra art til art. For artene *A. longicornis*, *P. glacialis* og *T. nordenskiöldii* (I) fikk man gjenvunnet materiale i alle eluater (10, 20, 30, 40, 60, 80 og 100% ACN). Det ble ikke gjenvunnet noe detekterbart materiale i 20 og 60% SPE-eluat fra *C. closterium*. I andre ekstraksjon av *T. nordenskiöldii* ble det ikke gjenvunnet materiale i 40 eller 100% SPE-eluat. Man kan se at utbyttet fra de ulike SPE-eluatene i de to ulike ekstraksjonene av *T. nordenskiöldii* er noe varierende.

Tabell 13. Tørrstoffutbytte etter fast-faseekstraksjon av vannfasene, samt andel salter fjernet fra vannfasen ved SPE-

Art	Materiale/fraksjon	Tørrstoff (mg)	Tørstoff (%)
<i>A. longicornis</i>	Vannfase før SPE	3300,00	100,00
	10% SPE	41,90	1,27
	20% SPE	25,70	0,78
	30% SPE	76,80	2,33
	40% SPE	16,30	0,49
	60% SPE	8,70	0,26
	80% SPE	0,70	0,02
	100% SPE	3,40	0,10
	Salter fjernet*	3126,50	94,74
<i>C. closterium</i>	Vannfase før SPE	1298,60	100,00
	10% SPE	4,00	0,31
	30% SPE	64,30	4,95
	40% SPE	10,80	0,83
	80% SPE	34,10	2,63
	100% SPE	0,30	0,02
	Salter fjernet*	1185,10	91,26
	<i>P. glacialis</i>	Vannfase før SPE	2530,00
10% SPE		59,30	2,34
20% SPE		49,20	1,94
30% SPE		35,90	1,42
40% SPE		13,80	0,55
60% SPE		21,40	0,85
80% SPE		22,80	0,90
100% SPE		12,90	0,51
Salter fjernet*		2314,70	91,49
<i>T. nordenskiöldii (I)</i>	Vannfase før SPE	2220,00	100,00
	10% SPE	44,70	2,01
	20% SPE	25,30	1,14
	30% SPE	25,20	1,14
	40% SPE	13,90	0,63
	60% SPE	31,70	1,43
	80% SPE	21,20	0,95
	100% SPE	25,00	1,13
	Salter fjernet*	2033,00	91,58
<i>T. nordenskiöldii (II)</i>	Vannfase før SPE	10153,30	100,00
	10% SPE	159,20	1,57
	20% SPE	16,50	0,16
	30% SPE	192,40	1,89
	60% SPE	44,00	0,43
	80% SPE	11,90	0,12
	Salter fjernet*	9729,30	95,82

*:Beregnet ved å trekke fra summen av tørrstoff i de ulike SPE-eluatene fra tørrstoff i vannfase før SPE.

3.2.2 Tørrstoffutbytte fra blandingskulturer

Tabell 14 viser en oversikt over tørrstoffutbytte i vannfase og organisk fase etter løsemiddelekstraksjon (60% ACN + 0,1% TFA).

Tabell 14. Tørrstoffutbytte i vannfase og organisk fase etter løsemiddelekstraksjon, samt restmateriale (pellet).

Arter	Materiale/fraksjon	Tørrstoff (mg)	Tørrstoff (%)
Blandingskultur 1 <i>P. glacialis</i> <i>A. longicornis</i>	Materiale før ekstraksjon	3600,00	100,00
	Vannfase før SPE	2220,00	61,67
	Organisk fase	483,30	13,43
	Pellet (avfall)*	896,70	24,91
Blandingskultur 2 <i>C. socialis</i> <i>F. oceanica</i> <i>P. pouchetii</i>	Materiale før ekstraksjon	1400,00	100,00
	Vannfase før SPE	1130,00	80,71
	Organisk fase	92,00	6,57
	Pellet (avfall)*	178,00	12,71
Blandingskultur 3 <i>C. socialis</i> <i>T. nordenskiöldii</i>	Materiale før ekstraksjon	1200,00	100,00
	Vannfase før SPE	970,00	80,83
	Organisk fase	56,00	5,77
	Pellet (avfall)*	174,00	14,50

*: Pellet ble ikke veid, men beregnet ut fra materiale før ekstraksjon der tørrstoff i vannfase og organisk fase ble trukket fra.

Blandingskultur 2 og 3 hadde høyest utbytte med henholdsvis 80,7 og 80,8%. Disse to kulturene hadde det høyeste tørrstoffutbytte i vannfase av alle prøver som ble ekstrahert. Utbyttet for blandingskultur 1 var noe lavere med 61,5%. Man ser også her at utbyttet for SPE-eluatene fra fast-fase ekstraksjon varierer. Det ble gjenvunnet materiale fra alle SPE-eluater i de 3 kulturene (Tabell 15).

Tabell 15. Tørrstoffutbytte etter fast-fase ekstraksjon av blandingskulturer, samt andel stoffer fjernet ved SPE-

Arter	Materiale/fraksjon	Tørrstoff (mg)	Tørrstoff (%)
Blandingskultur 1 <i>P. glacialis</i> <i>A. longicornis</i>	Vannfase før SPE	2220,00	100,00
	10% SPE	12,80	0,58
	20% SPE	5,90	0,27
	30% SPE	23,60	1,06
	40% SPE	10,10	0,45
	60% SPE	6,70	0,30
	80% SPE	2,50	0,11
	100% SPE	0,80	0,04
	Salter fjernet*	2157,60	97,19
Blandingskultur 2 <i>C. socialis</i> <i>F. oceanica</i> <i>P. pouchetii</i>	Vannfase før SPE	1130,00	100,00
	10% SPE	23,70	2,10
	20% SPE	32,90	2,91
	30% SPE	13,70	1,21
	40% SPE	26,10	2,31
	60% SPE	16,70	1,48
	80% SPE	16,40	1,45
	100% SPE	1,90	0,17
	Salter fjernet*	998,60	88,37
Blandingskultur 3 <i>C. socialis</i> <i>T. nordenskiöldii</i>	Vannfase før SPE	970,00	100,00
	10% SPE	23,70	2,44
	20% SPE	13,70	1,41
	30% SPE	19,80	2,04
	40% SPE	15,60	1,61
	60% SPE	8,50	0,88
	80% SPE	18,50	1,91
	100% SPE	1,80	0,19
	Salter fjernet*	868,40	89,53

*: Beregnet ved å trekke fra summen av tørrstoff i de ulike SPE-eluatene fra tørrstoff i vannfase før SPE

Generelt kan man se at størsteparten av tørrstoffet i vannfasen består av salter og uønskede stoffer, som vaskes vekk i fast-fase ekstraksjon (eller reduseres på kolonnen). Rundt 90% av den totale tørrstoffmengden forsvinner i fast-fase ekstraksjonen.

3.3 Antibakteriell aktivitet

3.3.1 Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatet fra oppdyrkede kulturer

SPE-eluatet fra alle prøvene ble testet for antimikrobiell aktivitet mot 4 ulike bakteriestammer; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* og *C. glutamicum*. Oversikten over antimikrobiell aktivitet i de ulike SPE-eluatene er vist i Tabell 16.

Tabell 16. Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatet fra renkulturer og blandingskulturer av diatomeer testet mot 4 bakteriestammer; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* og *C. glutamicum*. Høyeste konsentrasjon som ble testet var 5 mg/ml.

Art	SPE eluat	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. glutamicum</i>
<i>A. longicornis</i>	10 %	-	-	-	1,25
	20 %	-	-	5	2,5
	30 %	-	5	5	0,63
	40 %	-	-	5	0,16
	60 %	-	-	-	0,16
	80 %	*	*	*	0,16
<i>C. closterium</i>	10 %	1,25	0,63	0,31	1,25
	30 %	5	5	2,5	1,25
	40 %	5	5	1,25	0,63
	80 %	5	5	2,5	0,16
<i>P. glacialis</i>	10 %	5	5	2,5	2,5
	20 %	-	5	2,5	2,5
	30 %	-	5	2,5	0,16
	40 %	-	-	5	0,16
	60 %	-	-	-	1,25
	80 %	-	-	-	2,5
<i>T. nordenskiöldii</i> (I)	10 %	5	5	2,5	2,5
	20 %	-	5	5	0,16
	30 %	-	-	2,5	0,04
	40 %	-	-	-	0,04
	60 %	-	-	-	0,16
	80 %	-	-	-	2,5
<i>T. nordenskiöldii</i> (II)	10 %	-	5	-	2,5
	20 %	5	5	5	1,25
	30 %	-	5	5	0,31
	60 %	-	5	-	0,31
	80 %	-	-	-	0,16
<i>P. glacialis</i> + <i>A. longicornis</i>	10 %	2,5	5	2,5	1,25
	20 %	*	-	*	1,25
	30 %	-	5	2,5	1,25
	40 %	-	-	-	2,5
	60 %	-	-	5	1,25

-: Ingen aktivitet ved 5 mg/ml

*: Ikke nok materiale til å kunne gjennomføre antibakteriell test.

Det ble funnet antibakteriell aktivitet i SPE-eluatet fra alle arter av diatomeer som ble dyrket i monokultur. I tillegg ble det også registrert aktivitet i blandingskulturen av *A. longicornis* og *P. glacialis*. Aktiviteten var generelt mest aktivitet mot de to Gram positive bakteriene; *C. glutamicum* og *S. aureus*. Det ble registrert svak aktivitet i blandingskulturene 2 og 3. Det ble derfor valgt å se bort fra disse to ved senere analyser.

A. longicornis viste ingen aktivitet mot *E. coli*. Mot *S. aureus* var 20, 30 og 40% eluatene aktive, og 40% eluatet viste også aktivitet mot *P. aeruginosa*. All aktivitet mot *S. aureus* og *P. aeruginosa* ble registrert ved en konsentrasjon på 5 mg/ml. Alle SPE-eluatene viste aktivitet mot *C. glutamicum*, der 40 og 60% eluatet viste aktivitet ved lavest konsentrasjon; 0,16 mg/ml.

C. closterium viste aktivitet i alle eluater, mot alle 4 bakteriestammene. Aktivitet ved laveste konsentrasjon ble observert i 80% SPE-eluatet mot *C. glutamicum*; 0,16 mg/ml.

Alle SPE-eluater av *P. glacialis* viste også aktivitet mot *C. glutamicum*. Aktivitet mot *S. aureus* ble registrert i 10, 20, 30 og 40% eluatene, mens 10, 20 og 30% var aktive mot *P. aeruginosa*. Det var bare 10% eluatet som viste aktivitet mot *E. coli*.

Det var noe forskjell i aktiviteten i SPE-eluatene fra de to ulike ekstraksjonene av *T. nordenskioeldii*. I eluatene fra første ekstraksjon ble det registrert aktivitet mot *C. glutamicum* ved en konsentrasjon på 0,04 mg/ml (laveste konsentrasjon testet) i 30% SPE-eluatet, mens ved andre ekstraksjon ble aktiviteten målt ned til 0,31 mg/ml. Ett av eluatene viste i begge ekstraksjonene aktivitet mot *E. coli*; ved første ekstraksjon ble denne aktiviteten målt i 20% eluat, mens den var i 10% eluatet i andre ekstraksjon. Eluatene fra første ekstraksjon viste høyere aktivitet mot *S. aureus* enn de fra andre ekstraksjon. Det var aktivitet mot *P. aeruginosa* i 10, 20, 30 og 60% eluatene ved en konsentrasjon på 5 mg/ml i andre ekstraksjon, mens kun 10 og 20% eluatene i første ekstraksjon var aktive mot denne bakterien.

SPE-eluatene fra blandingskulturen (*P. glacialis* og *A. longicornis*) viste generelt lavere aktivitet enn de andre dyrkede artene. Aktivitet i 10, 20, 30 og 60% eluatene fra *P. glacialis* + *A. longicornis* mot *C. glutamicum* ble registrert ned til en konsentrasjon på 1,25 mg/ml. 40% SPE-eluatet hemmet vekst av *C. glutamicum* ved 2,5 mg/ml Det ble registrert aktivitet mot alle bakteriestammene i 10% SPE-eluatet.

3.3.2 Antibakteriell aktivitet I organiske faser fra oppdyrkede kulturer

Organiske faser fra alle arter dyrket i monokultur, samt blandingskulturen med *P. glacialis* og *A. longicornis* ble testet mot alle fire bakteriestammer. Konsentrasjonene som vises i Tabell 17 er noe usikre, da den organiske fasen var svært vanskelig å løse i vann. Tørrstoffet ble oppløst så godt som mulig i 2 ml MilliQ-vann, og konsentrasjonen ble regnet ut fra vekten på tørrstoffutbyttet.

Tabell 17. Antibakteriell aktivitet i organiske faser testet mot bakteriestammene; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* og *C. glutamicum*.

Art	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. glutamicum</i>
<i>A. longicornis</i>	10	10	1,25	1,25
<i>C. closterium</i>	12,5	12,5	6,25	3,125
<i>P. glacialis</i>	-	35	4,38	4,38
<i>T. nordenskiöldii</i> (I)	18,3	18,3	2,28	2,28
<i>T. nordenskiöldii</i> (II)	-	-	1,56	0,78
<i>A. longicornis</i> + <i>P. glacialis</i>	15	15	3,75	3,75

-: ingen aktivitet ved høyeste konsentrasjon testet

Alle artene viste aktivitet, i varierende grad, mot de to Gram - bakteriene; *C. glutamicum* og *S. aureus*. *A. longicornis*, *C. closterium*, *T. nordenskiöldii* (I) og *A. longicornis* + *P. glacialis* viste også aktivitet mot *E. coli* og *P. aeruginosa*. *P. glacialis* viste aktivitet mot *P. aeruginosa*, men ingen aktivitet mot *E. coli*. Aktiviteten mot de Gram positive bakteriene ble registrert ved høyere konsentrasjoner enn mot de Gram negative.

På bakgrunn av aktiviteten som ble registrert i de organiske fasene ble det kjørt HPLC på alle faser, og det ble samlet opp fraksjoner som ble testet mot alle fire

bakteriestammene. HPLC-fraksjonene fra de organiske fasene viste imidlertid ikke noe antibakteriell aktivitet.

3.3.3 Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatet fra kulturer samlet inn på tokt

SPE-eluatet fra blandingskultur 2 og 3, samlet inn på Marisco tokt, ble testet mot alle bakteriestammer (Tabell 18). I disse prøvene ble det ikke registrert noen aktivitet mot *E. coli* eller *P. aeruginosa*. Aktivitet ved lavest konsentrasjon ble registrert i 40% SPE-eluatet i blandingskultur 3; 1,25 mg/ml. 30% SPE-eluatet i blandingskultur 2 og 30 og 40% SPE-eluatene til blandingskultur 3 viste aktivitet mot *S. aureus* 5 mg/ml.

Tabell 18. Antibakteriell aktivitet i SPE-eluatet fra blandingskulturer samlet inn på tokt, testet mot 4 bakteriestammer; *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* og *C. glutamicum*. Høyeste konsentrasjon som ble testet var 5 mg/ml.

Art	SPE-eluat	Antimikrobiell aktivitet (MIC; mg/ml)			
		<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. glutamicum</i>
Blandingskultur 2 <i>C. socialis</i> <i>F. oceanica</i> <i>P. pouchetii</i>	10% SPE	-	-	-	5 mg/ml
	20% SPE	-	-	-	-
	30% SPE	-	-	5 mg/ml	2,5 mg/ml
	40% SPE	-	-	-	-
	60% SPE	-	-	-	5 mg/ml
Blandingskultur 3 <i>C. socialis</i> <i>T. nordenskiöldii</i>	10% SPE	-	-	-	-
	20% SPE	-	-	-	-
	30% SPE	-	-	5 mg/ml	2,5 mg/ml
	40% SPE	-	-	5 mg/ml	1,25 mg/ml
	60% SPE	-	-	-	2,5 mg/ml

-: Ingen aktivitet ved 5 mg/ml

3.3.2 Antibakteriell aktivitet i HPLC fraksjoner av SPE eluater

Alle SPE-eluater som viste antimikrobiell aktivitet i MIC-test ble fraksjonert ved hjelp av RP-HPLC. Ett-minutts-fraksjoner ble samlet opp og de ble så testet mot de samme bakteriestammene som ble benyttet i MIC-testen.

Ingen av fraksjonene fra *C. closterium* viste aktivitet mot noen av bakteriestammene. Antibakteriell aktivitet presenteres med HPLC-kromatogram der aktiviteten er avmerket. For interessante fraksjoner vises UV-Vis spekter og MS-spekter.

3.3.2.1 *Attheya longicornis*

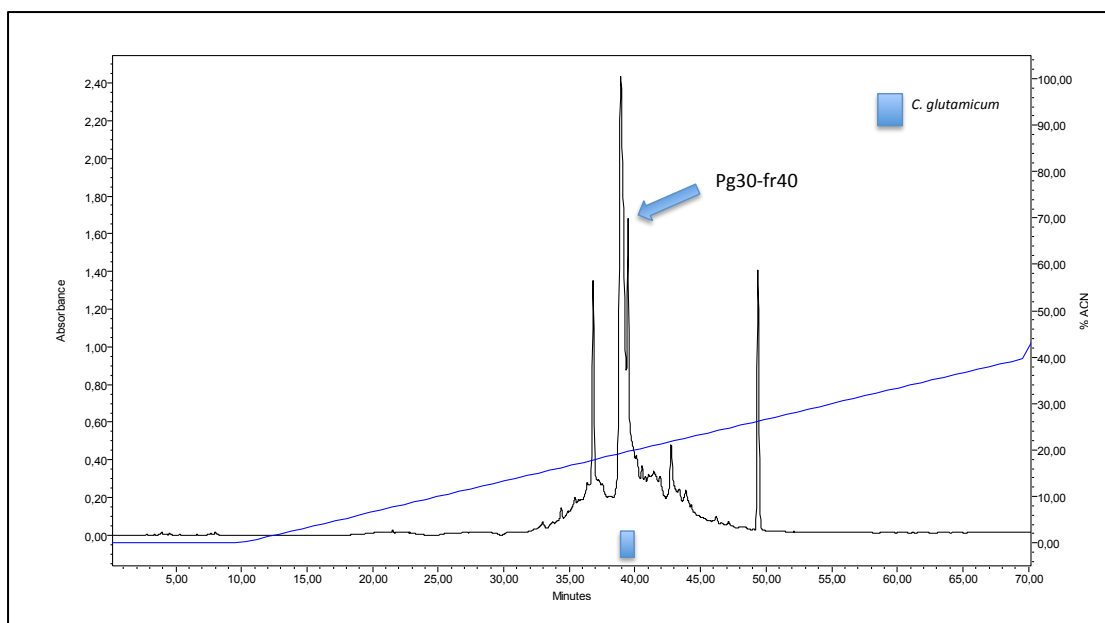
A. longicornis viste aktivitet mot *C. glutamicum* i 2 HPLC-fraksjoner, begge i 20% SPE-eluat (Appendiks 3).

3.3.2.2 *Cylindrotheca closterium*

Ingen av HPLC-fraksjonene av *C. closterium* viste aktivitet mot noen av de 4 bakteriestammene.

3.3.2.3 *Porosira glacialis*

Det ble registrert antimikrobiell aktivitet i HPLC-fraksjoner fra 30 og 40% SPE-eluatene fra *P. glacialis*. Totalt 8 fraksjoner fra denne arten var aktive mot *C. glutamicum*. HPLC-kromatogram av 30% SPE-eluatet fra *P. glacialis* vises i Figur 18. Én fraksjon var aktiv i dette eluatet, og er markert i Figur 18. HPLC-kromatogram av 40% SPE-eluatet er vedlagt i Appendiks 3.



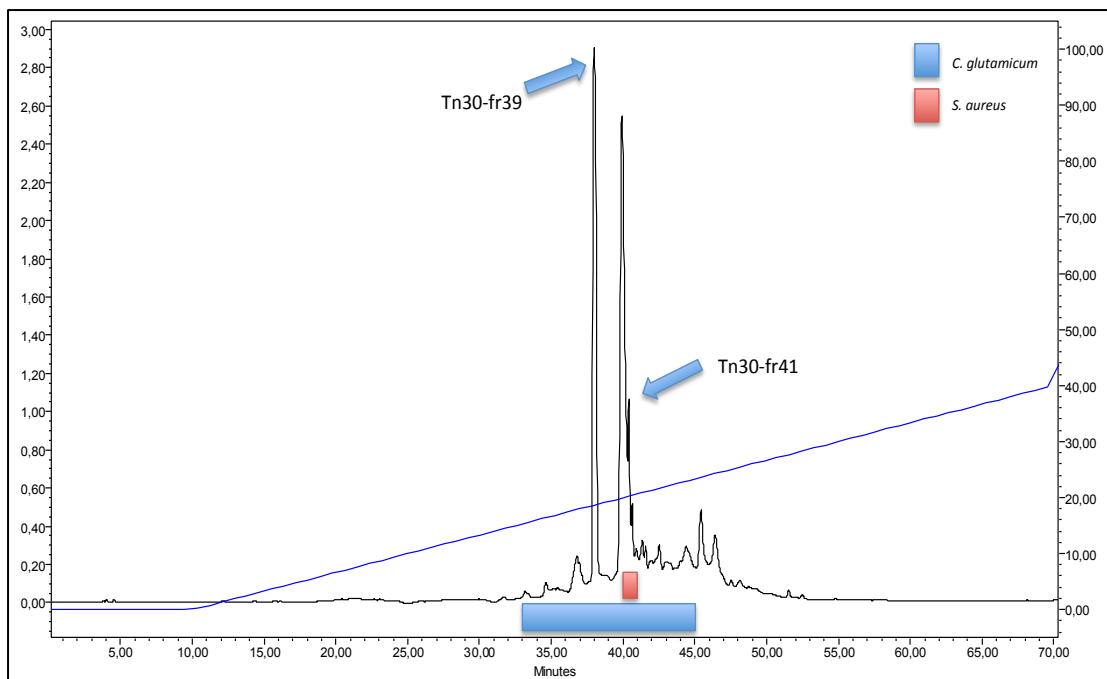
Figur 18 Kromatogram ved 220 nm av 30% SPE-eluatet fra *P. glacialis*. Antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en lineær ACN-gradient (0-40%). Pg30-fr40 står for *P. glacialis* 30% SPE-eluat, fraksjon 40 (39-40 min).

3.3.2.4 *Thalassiosira nordenskiöldii* (I) og (II)

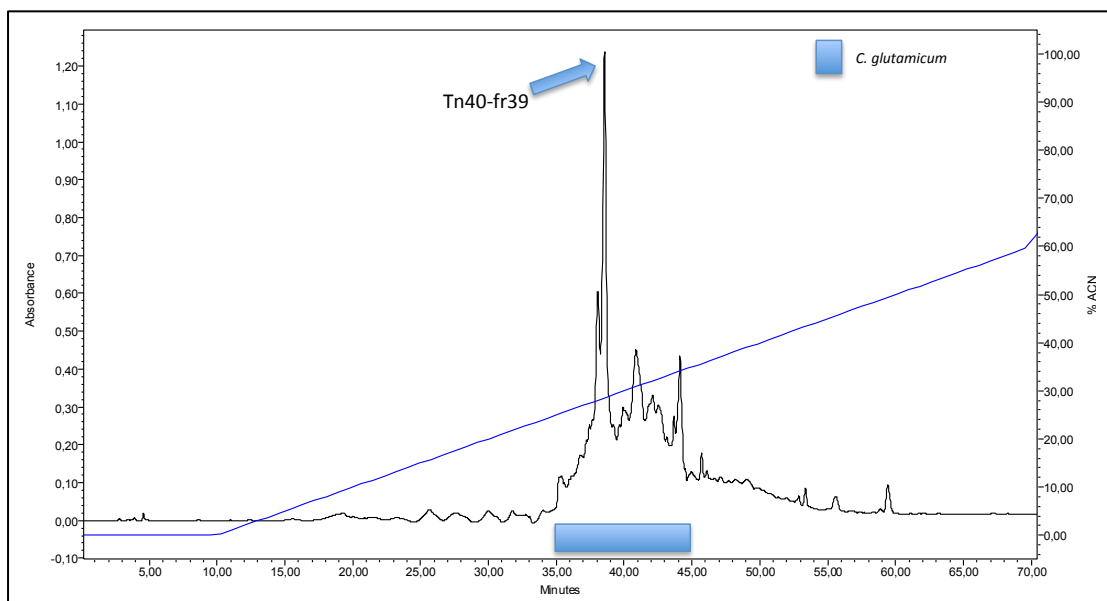
Totalt var det 26 aktive fraksjoner av *T. nordenskiöldii* (I). Alle disse viste aktivitet mot *C. glutamicum*, og én viste i tillegg aktivitet mot *S. aureus* (fr. 41). I 30% SPE-eluatet viste 12 fraksjoner antimikrobiell aktivitet (fr. 34-45) (Figur 19). To topper er markert i HPLC-kromatogrammet av 30% SPE-eluatet: Tn30-fr39 og Tn30-fr41 (Figur 19).

I 40% SPE-eluatet var 10 fraksjoner (fr. 36-45) aktive mot *C. glutamicum*. HPLC-kromatogram av 40% SPE-eluatet vises i Figur 20. Antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet. Én topp er markert i Figur 20: Tn40-fr39.

Det ble også registrert aktivitet i 20% SPE-eluatet fra *T. nordenskiöldii* (I). HPLC-kromatogram og oversikt over antimikrobiell aktivitet er vedlagt i Appendiks 2.

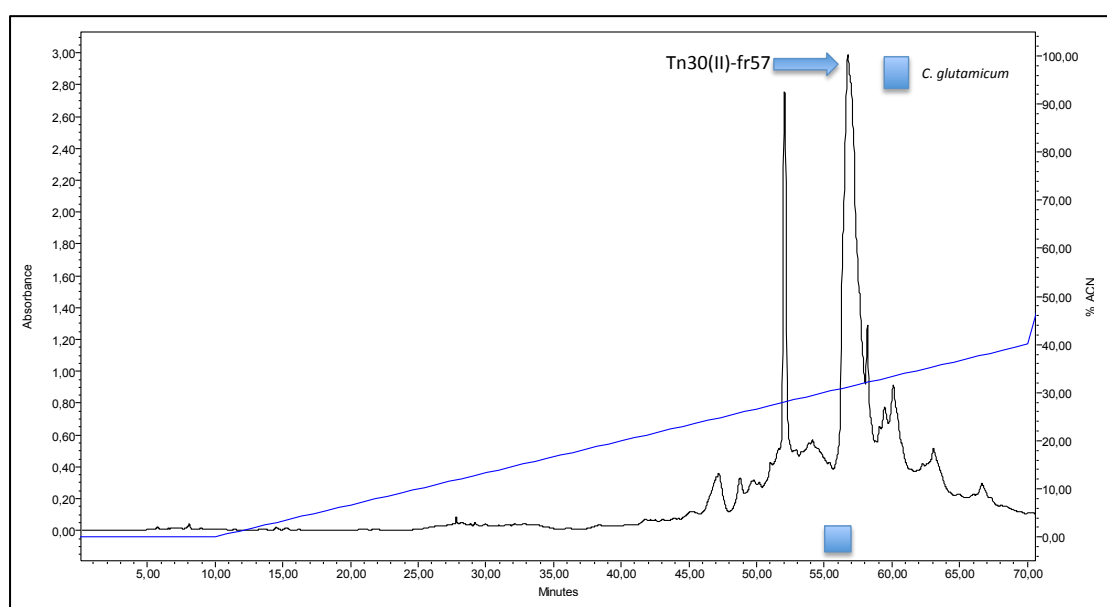


Figur 19 HPLC-kromatogram ved 220 nm av 30% SPE-eluat fra *T. nordenskiöldii* (I). Antimikrobiell aktivitet er markert under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en lineær ACN-gradient (0-40%). Tn30-fr39 står for *T. nordenskiöldii* (I) 30% SPE-eluat, fraksjon 39 (38-39 min), Tn30-fr41 viser fraksjon 41 (40-41 min).



Figur 20 HPLC-kromatogram ved 220 nm av 40% SPE-eluat fra *T. nordenskiöldii* (I). Antimikrobiell aktivitet er markert i blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en lineær ACN-gradient (0-60%). Tn40-fr39 står for *T. nordenskiöldii* (I) 40% SPE-eluat, fraksjon 39 (38-39 min).

Etter fraksjonering av aktive SPE-eluat fra *T. nordenskiöldii* (II), og ny bakterietest av HPLC-fraksjonene ble det registret aktivitet i 2 fraksjoner (fr. 56-57) mot *C. glutamicum*. HPLC-kromatogram for 30 % SPE-eluatet der antimikrobiell aktivitet er indikert i blått vises i Figur 21. Én topp er markert i HPLC-kromatogrammet: Tn30(II)-fr57.

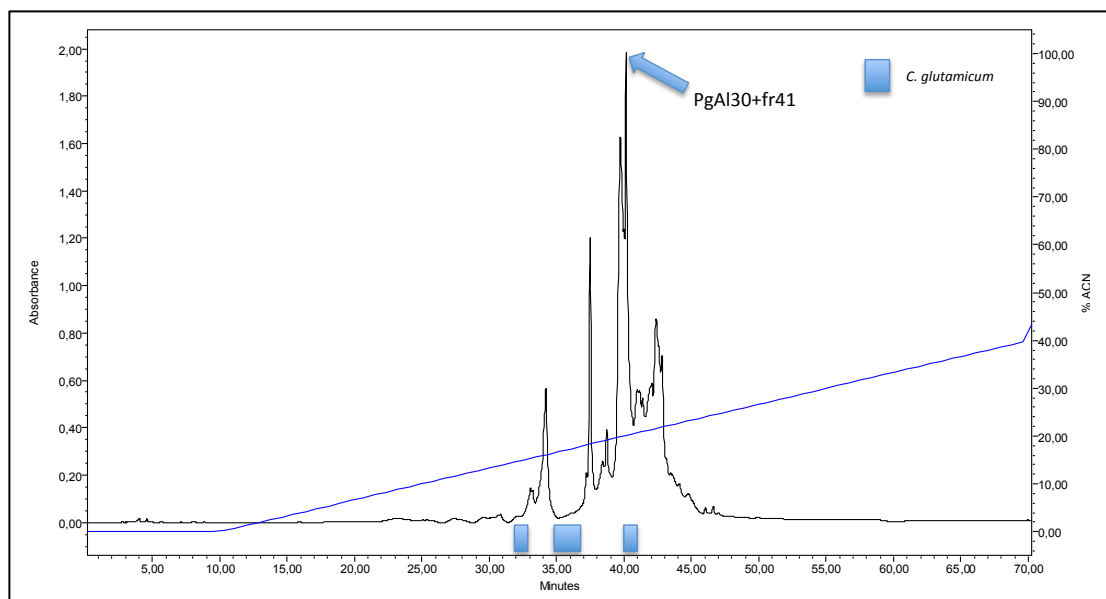


Figur 21 HPLC-kromatogram ved 220 nm av 30% SPE-eluat fra *T. nordenskiöldii* (II). Antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en lineær ACN-gradient (0-40%). Tn(II)30-fr57 sått for *T. nordenskiöldii* (II) 30% SPE-eluat, fraksjon 57 (56-57 min).

3.3.2.5 *Porosira glacialis* + *Attheya longicornis*

I 30% SPE-eluatet fra blandingskulturen med *P. glacialis* og *A. longicornis* ble det registret antimikrobiell aktivitet mot *C. glutamicum* i 4 fraksjoner (33, 36-37, 41). HPLC-kromatogram av 30% SPE-eluatet vises i Figur 22. Én topp er markert i kromatogrammet: PgAl30-fr41.

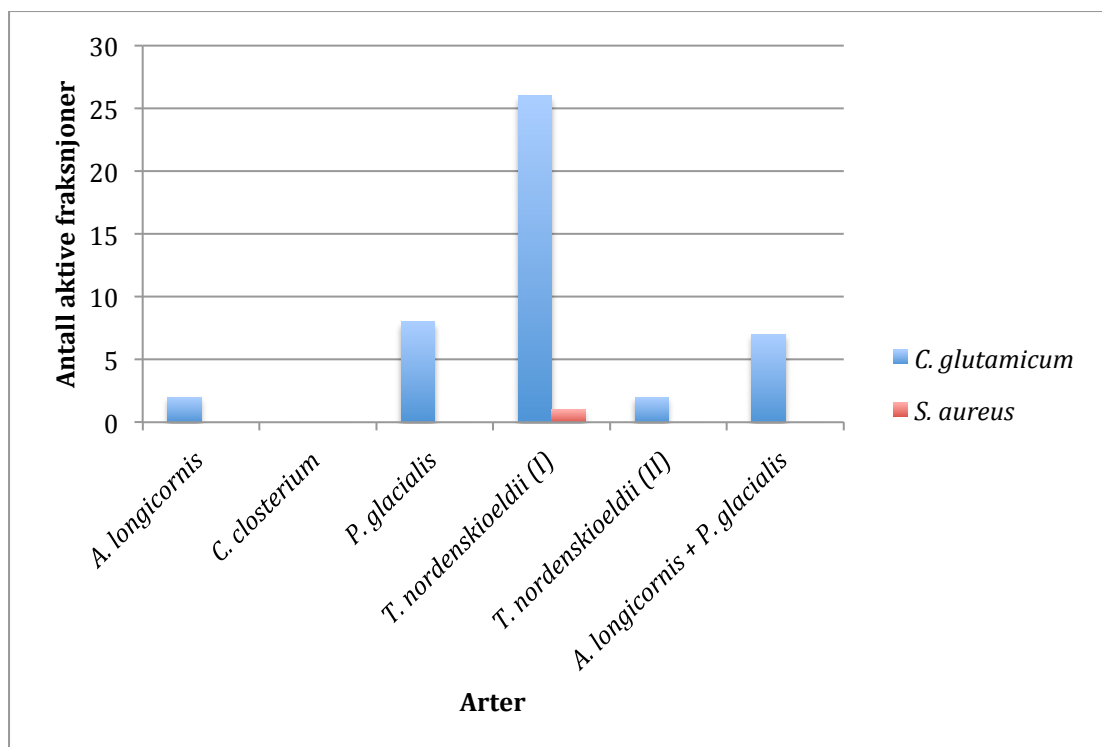
Det ble også registrert antimikrobiell aktivitet i 3 HPLC-fraksjoner fra 40% SPE-eluatet fra blandingskulturen. HPLC-kromatogram av 40% SPE-eluatet er vedlagt i Appendiks 3.



Figur 22 HPLC-kromatogram ved 220 nm av 30% SPE-eluat fra *P. glacialis* + *A. longicornis*. Antimikrobiell aktivitet er indikert i blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en lineær ACN-gradient (0-40%). PgAl30-fr41 sår for *P. glacialis* + *A. longicornis* 30% SPE-eluat, fraksjon 41 (40-41 min).

3.3.2.6 Antimikrobiell aktivitet i HPLC-fraksjoner – en oppsummering

Totalt, fra alle artene, var det 45 fraksjoner som viste antimikrobiell aktivitet (Figur 23). Av disse var 44 aktive mot *C. glutamicum*, mens én fraksjon viste aktivitet mot *S. aureus*. *T. nordenskiöldii* (I) var den prøven som viste mest aktivitet av alle med 27 aktive fraksjoner. Det var én av disse som var aktive mot *S. aureus* (Tn30-fr41, Figur 19). Det var ingen aktive fraksjoner fra *C. closterium*. Ingen fraksjoner viste aktivitet mot *E. coli* eller *P. aeruginosa*. Figur 23 viser en sammenligning av antallet aktive fraksjoner i de ulike mikroalgene.



Figur 23 Antall HPLC-fraksjoner med aktivitet mot *C. glutamicum* og *S. aureus*. Aktive fraksjoner ble funnet i 20, 30 og 40% SPE-eluatene fra de respektive artene.

3.4 Innledende strukturoppklaring for noen antimikrobielle forbindelser

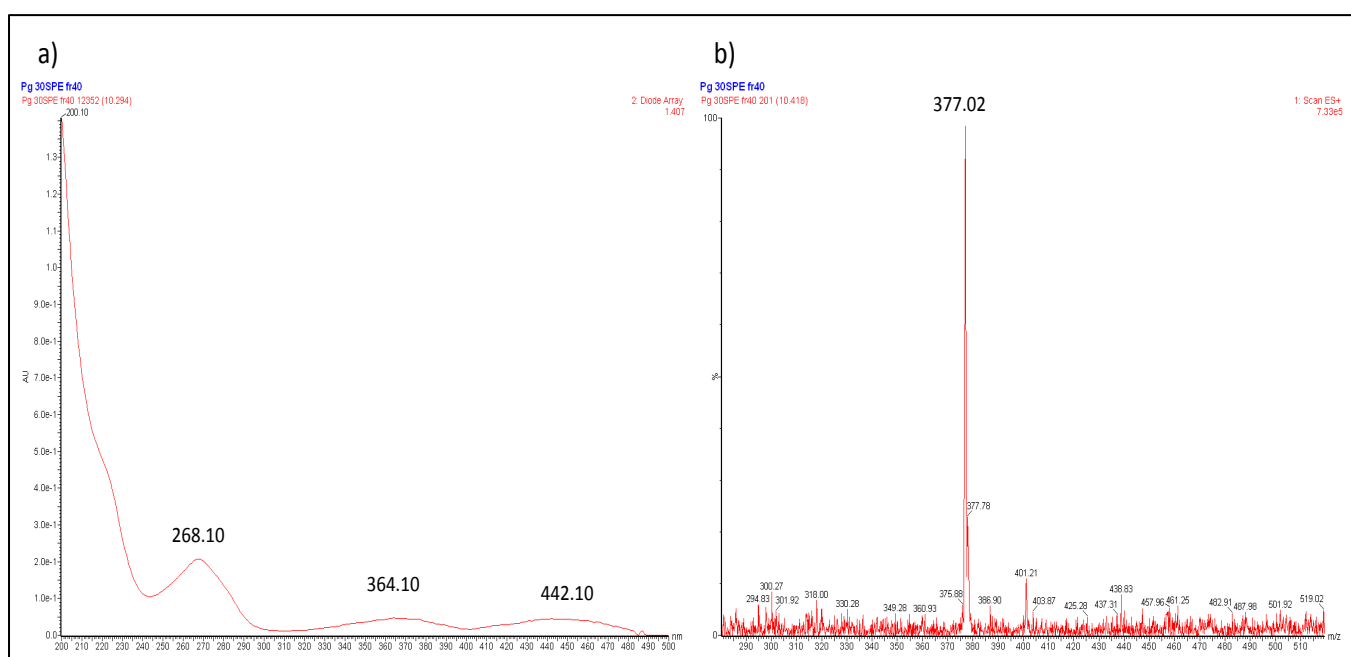
Det ble kjørt LC-MS av alle aktive SPE-eluatere av *T. nordenskiöldii* (I) og (II), *P. glacialis*, *A. longicornis*, *C. closterium* og blandingen av *P. glacialis* + *A. longicornis*. I tillegg ble alle aktive HPLC-fraksjoner analysert med LC-MS. Enkelte HPLC-fraksjoner var tilstrekkelig rene til å kunne utpeke enkelte komponenter ved hjelp av UV-Vis spekter og MS spekter.

Etter LC-MS analyse av SPE-eluatere og HPLC-fraksjoner fra *A. longicornis* og *C. glutamicum* ble det ikke funnet noen spesifikke komponenter som viste antimikrobiell aktivitet.

3.4.1 Lavmolekylære forbindelser

3.4.1.1 *Porosira glacialis* – Pg30-fr40

Etter analyse med LC-MS ble det funnet et karakteristisk UV-Vis spekter for én av forbindelsene i fraksjonen (Figur 24 a). UV-Vis spekteret viser 3 topper ved 268.10, 364.10 og 442.10 nm. MS-spekteret for forbindelsen (Figur 24 b) viser én topp med m/z verdi på 377.02.

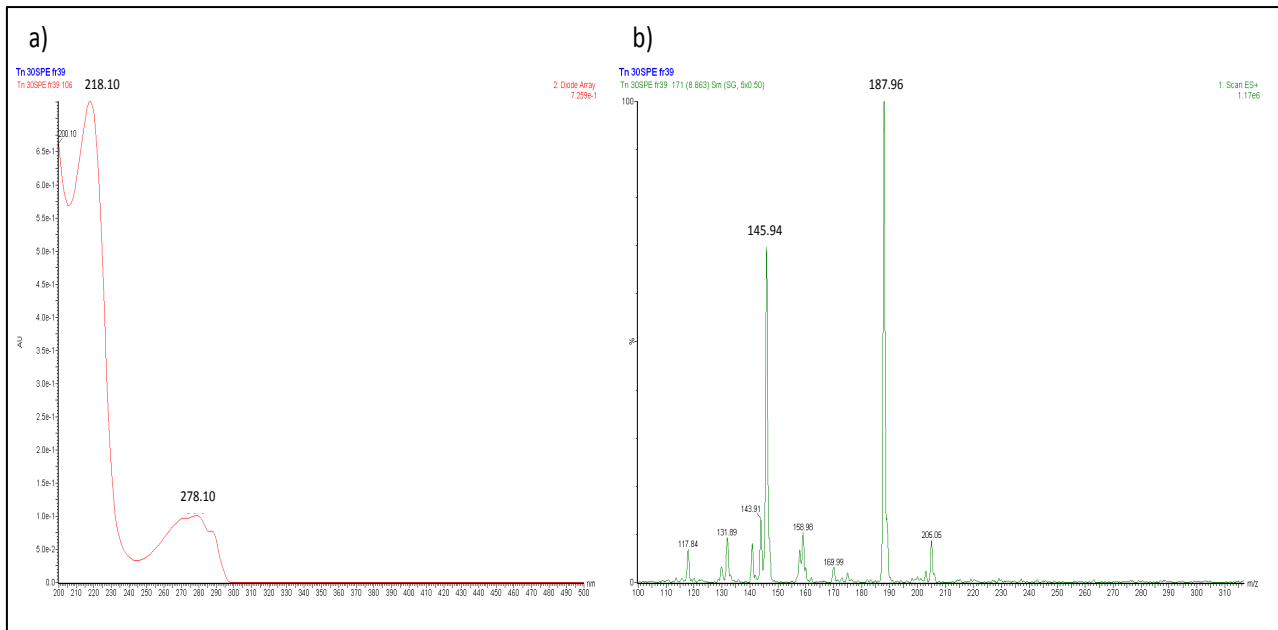


Figur 24 a) UV-Vis spekter for fraksjonen Pg30-fr40 b) Utsnitt av MS-spekter for fraksjonen Pg30-fr40.

Det ble også funnet en annen forbindelse i Pg30-fr40 med samme karakteristiske UV-absorbans som vises i Figur 24 a). MS-spekteret for denne forbindelsen hadde en topp med m/z verdi på 457.07 (Appendiks 4)

3.4.1.2 *Thalassiosira nordenskiöldii* – Tn30-fr39

I fraksjonen Tn30-fr39 ble det funnet en lavmolekylær forbindelse. UV-Vis spekteret til denne forbindelsen viser en topp ved 218.10 og en ved 278.10 nm (Figur 25 a). MS-spekteret til samme forbindelse viser en høyere topp med m/z verdi på 187.96 og en lavere med m/z verdi på 145.94 (Figur 25 b)



Figur 25 a) UV-Vis spekter for fraksjonen Tn30-fr39. b) Utsnitt av MS-spekter for Tn30-fr39.

3.4.1.3 *Thalassiosira nordenskioldii* (I) – Tn30-fr41

I 30% SPE-eluatet fra *T. nordenskioldii* (I) var fraksjonen Tn30-fr41 av interesse da denne viste antimikrobiell aktivitet mot både *S. aureus* og *C. glutamicum*.

Figur 26 a) viser et utsnitt av MS-spekteret for fraksjon Tn30-fr41. Man kan her se en tydelig, høy topp med m/z verdi på 438.96, samt en litt lavere med en m/z verdi på 457.07. UV-Vis spekteret viser karakteristiske topper; 267.10, 364.10 og 446.10 (Figur 26 b)

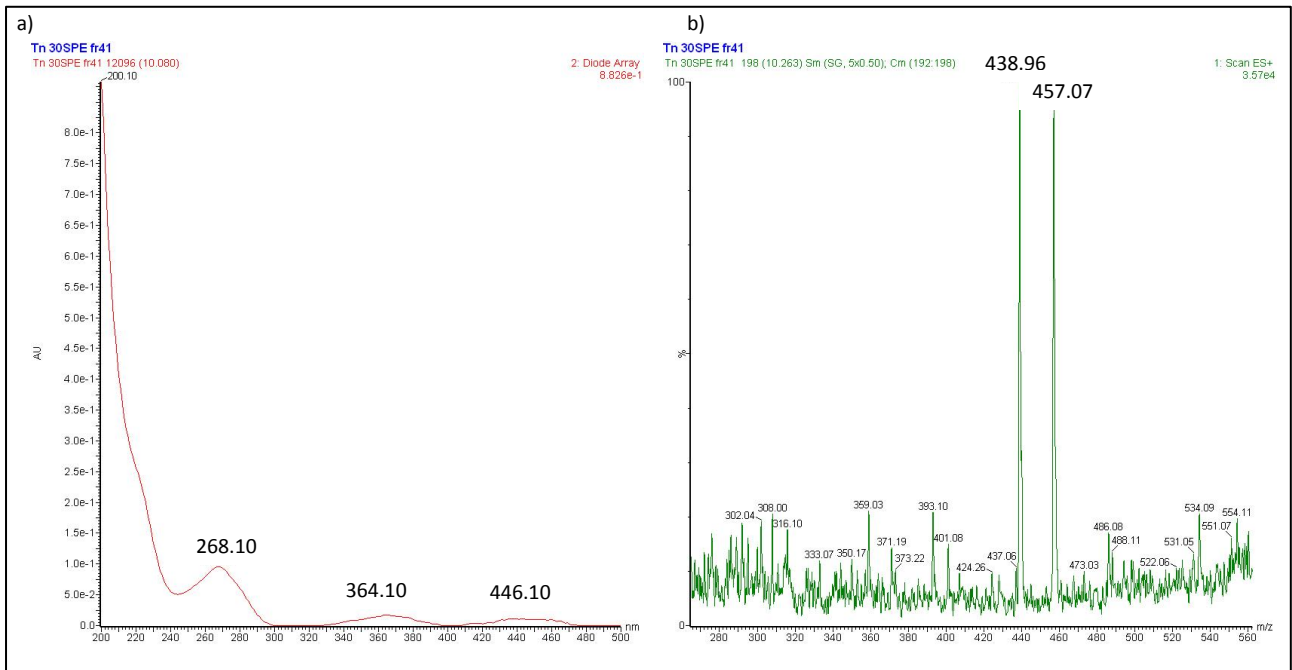


Figure 26 a) UV-Vis spekter for fraksjonen Tn30-fr41. b) Utsnitt av MS-spekter for fraksjonen Tn30-fr41.

3.4.1.4 Porosira glacialis + Athaya longicornis – PgAl30-fr41

Samme UV-Vis spekter og MS-spekter som ble funnet i Tn30-fr41 og Pg30-fr40 ble også funnet fraksjoner av andre arter. Figur 27 viser utsnitt av MS-spekter, samt UV-Vis spekter av 30% SPE-eluat av *P. glacialis* + *A. longicornis*. Man kan se de samme 3 karakteristiske toppene i UV-Vis spekteret, og to topper i MS-spekteret med m/z verdier på 438.96 og 457.07.

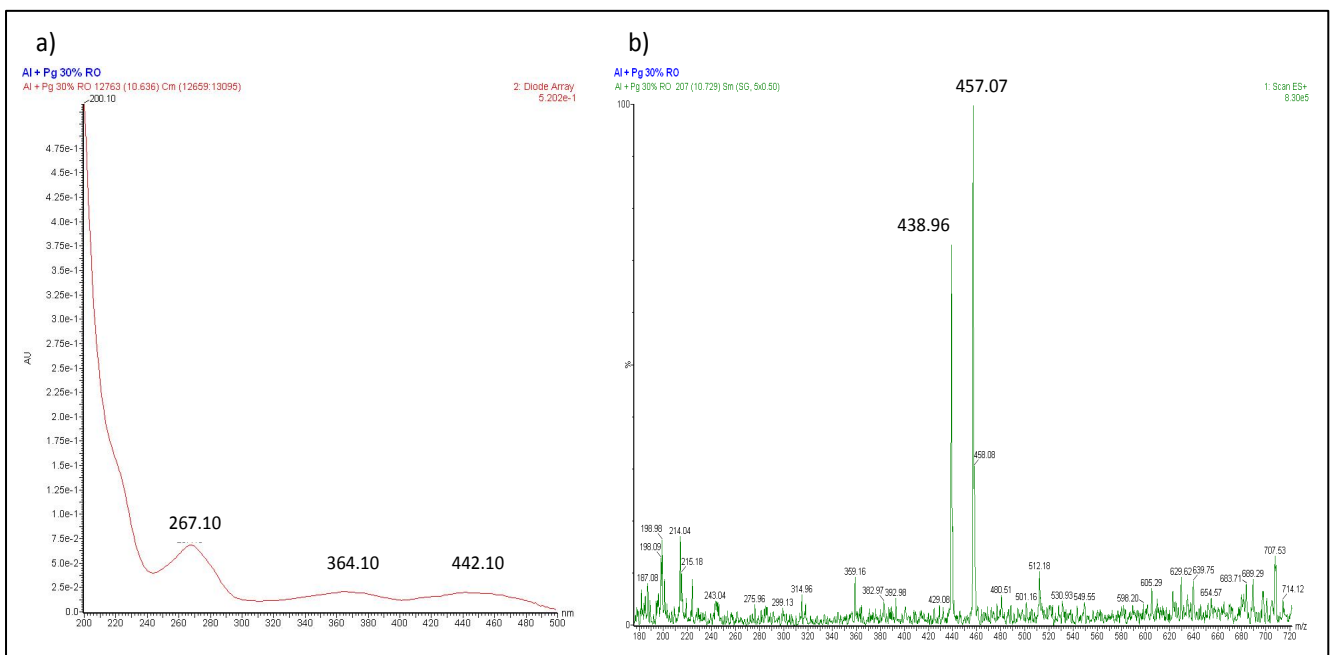


Figure 27 a) UV-Vis spekter for fraksjonen PgAl30-fr41. b) Utsnitt av MS-spekter for fraksjonen PgAl30-fr41.

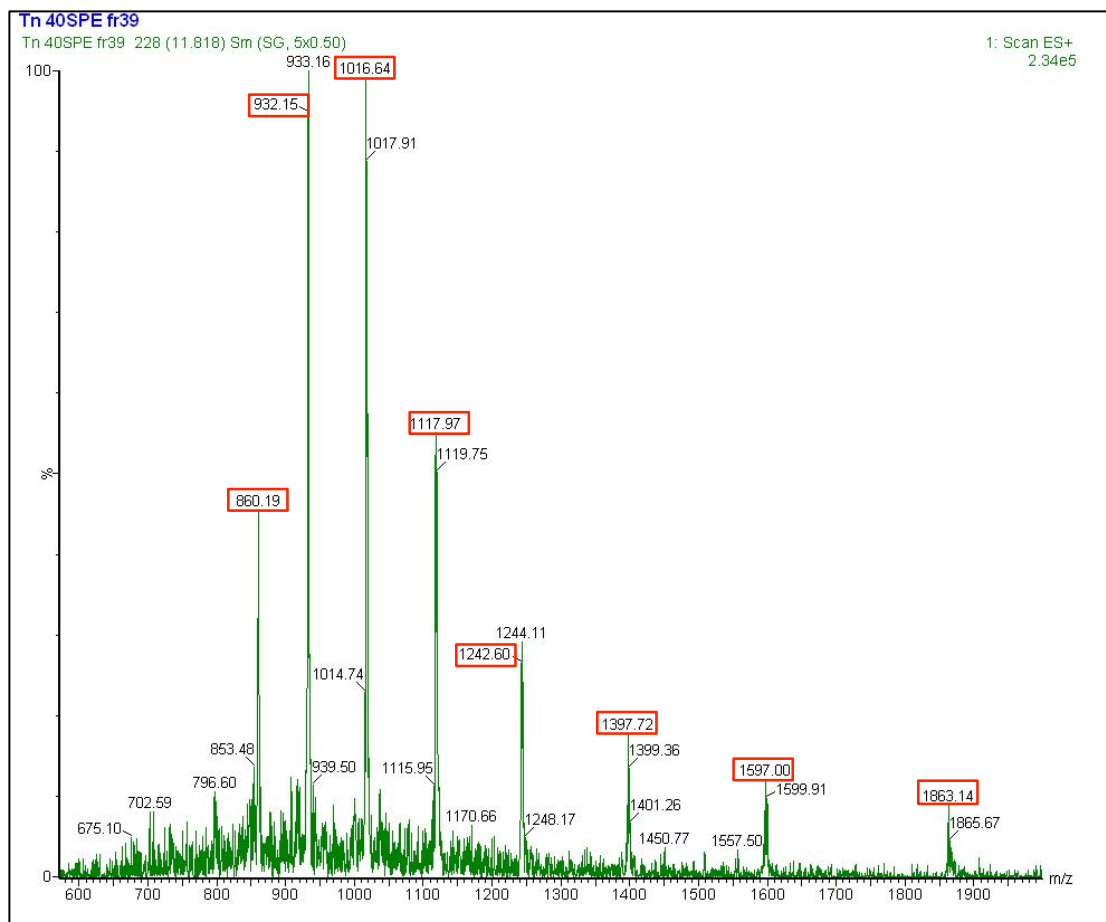
3.4.2 Høymolekylære forbindelser

3.4.2.1 *Thalssiosira nordenskiöldii* – Tn40-fr39

Analyse med LC-MS av fraksjon 39 i 40% SPE-eluat av *T. nordenskiöldii* (I) (tn40-fr39) viser at fraksjonen inneholder én stor forbindelse. MS-spekteret viser 9 ioner i et karakteristisk mønster (Figur 28). Ladning til de ulike m/z-ionene ble kalkulert og vises i Tabell 19. Ut fra gjennomsnittet av m/z verdiene, samt ladning av de ulike ionene ble den totale molekylvekten av molekylet kalkulert (Tabell 19). Den gjennomsnittlige molekylvekten til dette stoffet ble kalkulert til 11172 Da. Formler for kalkulering av molekylvekt og ladning vises i avsnitt 2.10.

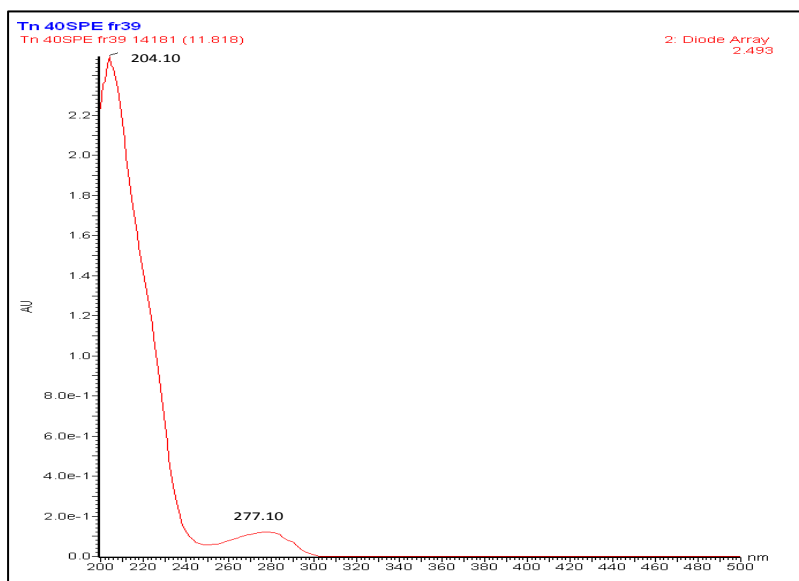
Tabell 19 Kalkulert ladning og molekylvekt for de markerte ionene i Figur 28. Molekylvekten ble kalkulert ut fra m/z verdiene til ionene.

Masse/ladning (m/z)	Ladning	Kalkulert molekylvekt (Da)
860.19	13	11169.47
932.15	12	11173.80
1016.64	11	11170.06
1117.97	10	11169.70
1242.60	9	11174.40
1397.72	8	11173.76
1597.00	7	11172.00
1863.14	6	11172.84
Gjennomsnittlig molekylvekt		11172.00



Figur 28 Utsnitt av MS-spekter for Tn40-fr39. Spekteret viser flere ioner, som til sammen gir en gjennomsnittlig molekylvekt på 11172 Da. m/z verdier markert i rødt var utgangspunkt for kalkulert molekylvekt i Tabell 19.

UV-Vis spekter av forbindelsen i Tn40-fr39 vises i Figur 29. Spekteret viser en topp ved 204.10 nm og en ved 277.10 nm.



Figur 29 UV-Vis spekter for fraksjonen Tn40-fr39.

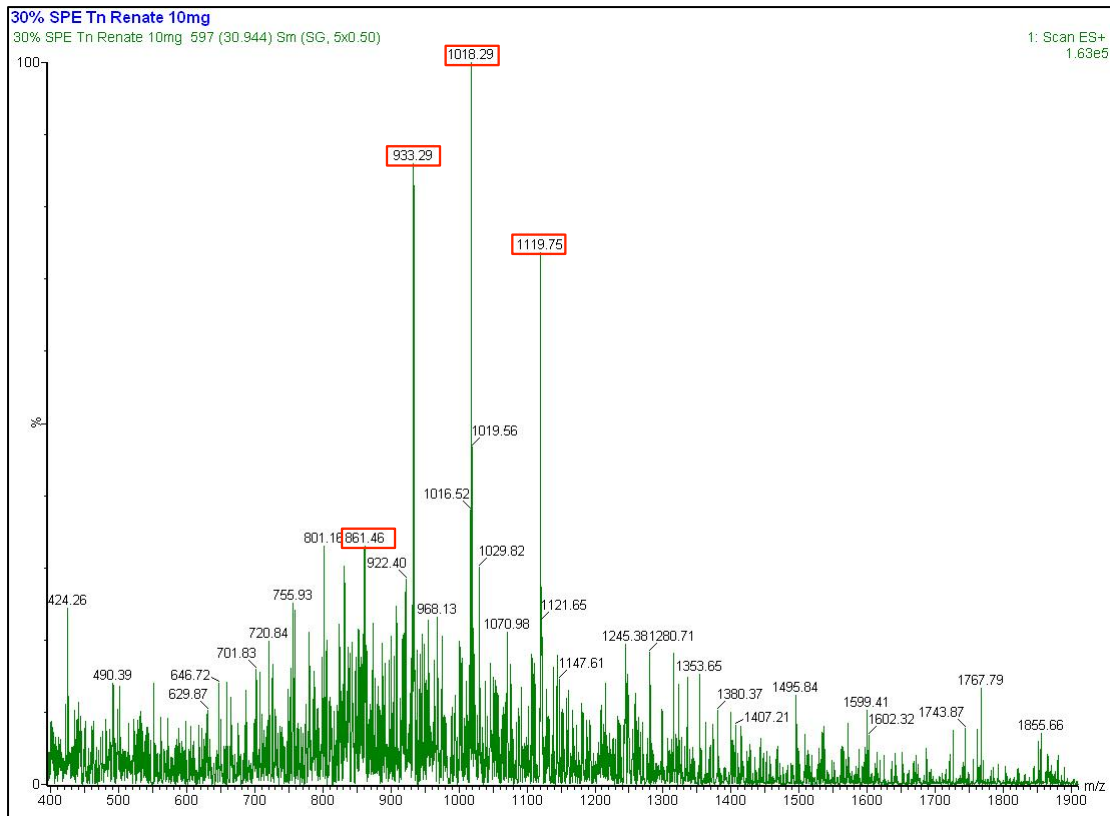
3.4.2.2 *Thalassiosira nordenskioldii* (II) - Tn(II)30-fr57

Ved LC-MS analyse av *T. nordenskioldii* (II) 30% SPE-eluat ble det funnet en komponent med nesten samme ione-sammensetning som den man ser i Figur 28. Figur 30 viser et utsnitt av MS-spekter for denne komponenten.

Molekylvekt ble kalkulert ut fra m/z verdiene og ladningen til ionene i spekteret. Gjennomsnittet av disse 4 beregningene indikerer at komponenten har en total masse på 11188 Da. Dette er nesten samme molekylvekt som komponenten i Tn40-fr30, med en differanse på ca. 16 Da. Tabell 20 viser en oversikt over beregnet ladning, m/z verdier og kalkulert masse for komponenten i Figur 30.

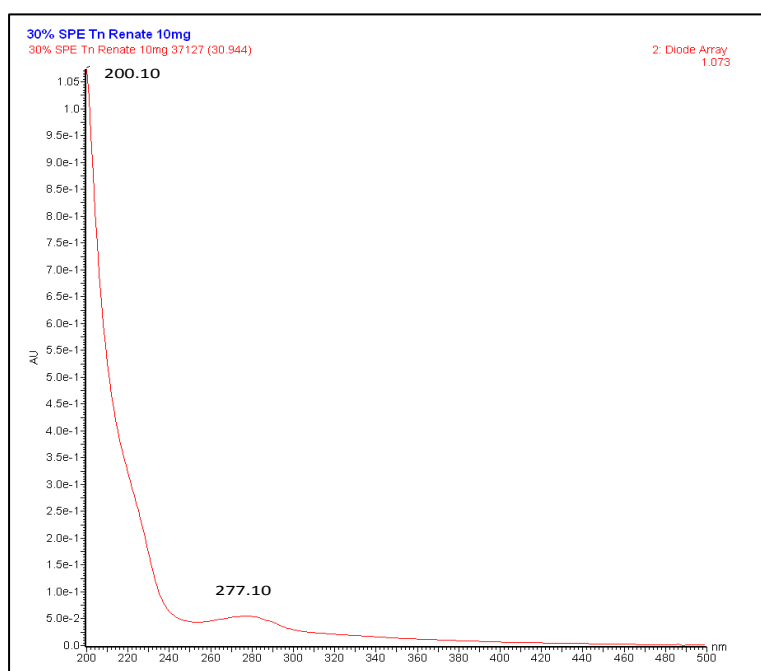
Tabell 20 Kalkulert ladning og molekylvekt for de markerte ionene i Figur 30. Molekylvekten ble kalkulert ut fra m/z verdiene til ionene.

<i>T. nordenskioldii</i> (II) 30% SPE-eluat fraksjon 57		
Masse/ladning (m/z)	Ladning	Kalkulert molekylvekt (Da)
861.46	13	11185.98
933.29	12	11187.48
1018.29	11	11190.19
1119.75	10	11187.50
Gjennomsnittlig molekylvekt		11187.79



Figur 30 Utsnitt av MS-spekter for Tn(II)30-fr57. Spekteret viser en rekke m/z-ioner, som tilsammen gir en gjennomsnittlig molekylvekt på 1118 Da. m/z verdier markert i rødt var utgangspunkt for kalkulering av molekylmassen i Tabell 20

UV-Vis spekter av forbindelsen i Tn(II)30-fr57 vises i Figur 31. Spekteret viser en topp ved 200.10 nm og en ved 277.10 nm.



Figur 31 UV-Vis spekter for fraksjonen Tn(II)30-fr57.

4. Diskusjon

Et av de store problemene innenfor marin bioprospektering er tilgang på biologisk materiale. Sekundære metabolitter produseres i lave konsentrasjoner i organismene, og man møter raskt problemer fordi det er behov for en tilstrekkelig mengde nok materiale til å kunne gjennomføre kliniske tester (Seidel, 2006). Marine mikroalger dyrket på laboratoriet, under betingelser som fremmer produksjon av sekundærmetabolitter vil i dette tilfellet være én måte for å overkomme dette problemet på.

I denne oppgaven ble de fire marine diatomeene *A. longicornis*, *C. closterium*, *P. glacialis* og *T. nordenskiöldii* massedyrket i fotobioreaktorer på laboratoriet. Materialet fra oppdyrkingen ble deretter ekstrahert, og testet for tilstedeværelse av antimikrobielle forbindelser. Aktive ekstrakter og fraksjoner ble videre analysert med HPLC og LC-MS for å starte en innledende karakterisering av eventuelle antimikrobielle forbindelser.

4.1 Dyrkingsmetoder

De artene som ble besluttet benyttet i dette studiet ble valgt på bakgrunn av at de er vanlig forekommende i tempererte/nordlige havområder (*A. longicornis*, *C. closterium*, *P. glacialis* og *T. nordenskiöldii*), samt også lett tilgjengelig fra stamkulturer. Valget av arter var også til dels basert på at artene tidligere hadde vist seg godt egnet til oppdyrking i store volum ved høye tettheter (pers. medd. G. K. Eriksen).

Kvalitativ kontroll og vedlikehold av stamkulturer er arbeidskrevende, og prosessen tar tid. Før man begynner med oppdyrking av mikroalger er det helt nødvendig å tilegne seg kunnskap om taksonomi, morfologi og hvordan man kvalitativt kontrollerer kulturens helse.

Tilstanden til kulturene avhenger sterkt av dyrkingsforholdene de holdes under (Naviner *et al.*, 1999). Variasjoner i lys-mørke sykluser, saltholdighet, temperatur og næringstilgang påvirker også algene både i forhold til

veksthastighet og biokjemi (Metting & Pyne, 1986). Dette kan være problematisk dersom man dyrker mikroalger med den målsetting å oppnå reproducerbare resultater. Variasjoner i dyrkingsforhold kan også benyttes for å oppnå en "ønsket" kjemisk sammensetning. En velkjent mekanisme her er at begrensning i næringsalter (spesielt Si) kan øke lipidinnholdet i cellene.

Når det gjelder litteratur innen området kultivering av mikroalger og fysiologi-kjemisk sammensetning er det publisert tusenvis av artikler opp gjennom årene. Disse omhandler alle aspekter ved algenes liv, som cellebiologi, fysiologi, biokjemi, kjemisk sammensetning, økologi og utnyttelse (Cohen, 1999, Stewart, 1974). Det må dog nevnes at det, fra disse kildene, er svært vanskelig å trekke klare konklusjoner med henhold til hva som er en enkeltarts typiske fysiologi og kjemisk innhold.

Alle artene som ble dyrket og analysert i dette studiet ble dyrket under de samme vekstbetingelsene for kunne sammenligne resultatene fra de ulike artene. Vekstbetingelsene vil allikevel forandre seg under dyrkingsprosessen, noe som kan påvirke resultatene. Med økende konsentrasjon av celler i kulturen vil lysforholdene endre seg, og det oppstår selvskygging. Konsentrasjon av næringsstoffer i kulturen vil også synke i løpet av en vekstsyklus, før kulturen fortynnes og tilsette nye næringsstoffer. Dette kan det derfor føre til ulike vekstforhold i de ulike kulturene.

Lys og temperatur ble kontrollert av datasystemer, og det ble tilsatt samme konsentrasjon av næringsstoffer og silikat ved hver fortynning. De fire artene som ble dyrket er alle isolert fra prøver samlet i Rippfjorden på Svalbard eller i Tromsøundet, og var derfor tilpasset lave temperaturer. For å etterligne naturlig veksttemperatur ble de derfor dyrket ved 7°C. Dette tilsvarer ca. sen vår-overflatetemperatur i kystvann utenfor den nordlige Norskekysten (Eilertsen & Skarøhamar, 2006). Vekstbetingelsene som ble benyttet i dyrkingsprosessen er tilnærmet ideelle forhold for marine diatomeer, og er tilpasset for høyest mulig vekstrate. Algene som ble dyrket opp hadde en god vekstrate, med eksponentiell vekst under dyrkingsprosessen, og veksthastighetene var oppe i 0,5 doblinger per døgn. Disse forholdene vil som

nevnt tidligere påvirke biokjemien til mikroalgene, og dermed ha en innvirkning på hvilke stoffer algene produserer, inkludert antimikrobielle forbindelser. Resultatene i dette studiet må derfor tolkes med det forbehold at de er representative for de dyrkingsforhold som rådet, og at de valgte artene dyrket under andre forhold muligens kan ha andre antimikrobielle egenskaper.

Kontaminering kan være et stort problem ved massedyrking av renkulturer. Slike problemer oppsto mot slutten av dyrkingsprosessen av *C. closterium* og *A. longicornis*. Det er helt avgjørende å holde alle stamkulturer rene for kontamineringer. Disse kulturene er utgangspunktet for alle forsøk som gjennomføres, og de må derfor holdes fri for andre arter. Stamkulturene dyrkes i pasteurisert saltvannsmedium (Harrison & Berges, 2005, Kawachi & Noël, 2005), og man er påpasselige med å jobbe så sterilt som mulig når man håndterer stamkulturene. Ved massedyrking av mikroalger er det vanskeligere å opprettholde de samme sterile forholdene.

Før oppdyrkingen startet ble søylene desinfisert med varmt vann (ca. 70°C). Denne temperaturen vil være høy nok til å drepe algeceller som er tilpasset tempererte og arktiske vekstforhold, men hardføre hvile-sporer kan i visse tilfeller overleve en slik behandling, og så spire igjen når man tilsetter dyrkingsmedium. Algene ble dyrket store volum (250 eller 600 l), og det blir dermed vanskelig å benytte pasteurisert medium. Det ble derfor benyttet filtrert sjøvann i massedyrkingen. Selv om dette vannet ble filtret gjennom to filtersystemer, (det siste filteret med 0,22 µm porestørrelse), kan det allikevel hende at noen algeceller kom seg gjennom dette filteret. Disse algene er ofte små flagellater, som raskt kan komme opp i en høy konsentrasjon i algekulturen og dermed utkonkurrere den opprinnelige kulturen. Det var slike flagellater som kontaminerte de to kulturene; *A. longicornis* og *C. closterium*, som tidligere ble nevnt. Dyrkningssøylene som ble benyttet er åpne på toppen, og var derfor også eksponert for kontamineringer fra luft eller vann. Dråper av ufiltrert vann som spres i rommet på grunn av uforsiktighet eller fra lekkasjer i rørsystemet, kan føre med seg andre mikroalger, i tillegg kan sporer eller små celler spres gjennom kjøleanlegg. Dyrkes det flere arter i samme rom, kan det også være fare

for spredning fra én søyle til en annen. Hvilke av disse faktorene som førte til kontaminering av *C. closterium* og *A. longicornis* er uvisst. Kontamineringen oppsto mot slutten av dyrkingsprosessen, og førte derfor trolig ikke til store problemer i forhold til opparbeidelse av materiale.

Da sjøvann naturlig kan inneholde store mengder bakterier (Amin *et al.*, 2012) er det svært vanskelig å holde kulturene fri for bakterier. Når kulturene blir tette, og får en større mengde døde eller ødelagte celler ser man at bakteriekonsentrasjonen øker i kulturen da diatomeene og også eksudater (fotorespiratoriske produkter) kan være "mat" for heterotrofe bakterier (Amin *et al.*, 2012). Hvis mikroalgene er under god vekst, kan bakterieveksten være noe lavere. Variasjoner i bakteriekonsentrasjon ble observert under kvalitativ kontroll av kulturene i lysmikroskop. Mesteparten av bakteriene vil også vaskes vekk ved høsting av algebiomassen da cellene er så små at de ikke holdes tilbake i planktonhåven.

Massedyrking av marine diatomeer er en lang, og arbeidskrevende prosess. Oppdyrking av *C. closterium* tok 5 måneder fra start av inokulum, til det ble opparbeidet nok materiale til å kunne gå videre med ekstraksjon og bioaktivitets-testing. Fra de 8 høstingene som ble gjort, ble det til sammen opparbeidet 2,9 g frysetørket materiale. Denne arten ble dyrket i en 250 l fotobioreaktor. Grunnen til at denne arten ikke kunne dyrkes i en større dyrkingssøyle var at den la seg som en biofilm langs veggene i søylen, som måtte skrapes av før høsting. Dette hadde vært vanskelig å gjennomføre i en større dyrkingssøyle. Arten var forholdsvis lett å dyrke i større volum. Til tross for at den dannet biofilm, var den lett å høste etter at man fikk resuspendert cellene i dyrkingsmediumet. Mot slutten av dyrkingsprosessen ble det, som tidligere nevnt, oppdaget en kontaminering i kulturen. Kontamineringen kom av en uidentifisert liten flagellat, og det ble avgjort å høste kulturen en siste gang. Flagellaten hadde en cellestørrelse på 2-4 μm , og ville derfor bli vasket ut da kulturen ble høstet med en planktonhåv med en nettstørrelse på 10 μm .

4.2 Ekstraksjonsmetode

Hvilke metode som velges for ekstraksjon av naturstoffer fra biologisk materiale har betydning for hvilke stoffer som ekstraheres. Metoden velges ut fra om det er enkelte kjente stoffer som skal isoleres, eller om man ønsker å ekstrahere et bredt spekter av stoffer (Seidel, 2006). I denne masteroppgaven ble naturstoffer ekstrahert med 60% ACN + 0,1% TFA, da denne metoden tidligere har vist gode resultater for ekstraksjon av antimikrobielle stoffer fra ulike marine organismer (Haug *et al.*, 2002a, Haug *et al.*, 2002b, Haug *et al.*, 2004, Tadesse *et al.*, 2008). Metoden har ikke tidligere vært benyttet på marine diatomeer av bioprospekteringsgruppen ved Norges Fiskerihøgskole. Det er heller ikke funnet publikasjoner som har benyttet denne metoden på mikroalger. De første prøvene som ble ekstrahert, ble derfor benyttet som en test for å finne ut om metoden egnet seg til ekstraksjon av naturstoffer fra marine diatomeer.

Blandingskultur 2 og 3 ble ekstrahert først, for å undersøke effektiviteten av metoden. Tørrstoffutbyttet for vannfase ble høyt, rundt 80% for begge prøvene (Tabell 3), og det ble derfor slått fast at ekstraksjonsmetoden fungerte. Tørrstoffutbyttet for de andre prøvene ble noe lavere, og varierte fra 44,79% (*C. closterium*) til 65,29% (*T. nordenskiöldii* (I)). Grunnen til at *C. closterium* hadde det laveste tørrstoff utbyttet kan være fordi dette er en pennat diatomé, som har spisser av silikat på hver ende av cellen (Hasle & Syvertsen, 1997, Round *et al.*, 1990). Disse fører til at mengden silikat utgjør en større del av vekten enn for de sentriske diatomeene (*A. longicornis*, *P. glacialis* og *T. nordenskiöldii*). Pelleten som ble filtrert bort ble ikke veid, men vekten ble senere kalkulert ut fra prosentvis ekstrahert materiale. Pelleten besto for det meste av skallrester og stoffer som ikke ble ekstrahert med ut i ekstraksjonsløsningen.

Diatomeer inneholder en relativt høy konsentrasjon av Na, noe som reflekterer NaCl konsentrasjonen i saltvannsmediumet de dyrkes i (Orcutt & Patterson, 1975). Salter er polare, og ender derfor i vannfasen etter ekstraksjon, og man vil av den grunn få et høyere tørrstoffutbytte av vannfasen enn av den organiske fasen, som inneholder de mest upolare stoffene som ble ekstrahert. Salter kan påvirke antimikrobielle tester, og disse må derfor bli fjernet fra ekstraktene.

Mengden gjenvunnet materiale i de organiske fasene var forholdsvis lik, uten noen nevneverdige unntak.

Vannfasen ble videre separert med bruk av såkalt fast-fase ekstraksjon. Metoden som ble benyttet separerer stoffer basert på polaritet, der den stasjonære fasen var upolar, slik at de polare stoffene ble eluert ut først, og mer upolare stoffer ble retardert og eluert ut senere. Det ble benyttet en stegvis gradient av elueringsløsemiddel, med synkende polaritet for hvert eluat (høyere konsentrasjon av ACN). Vannfasen inneholder en større mengde polare stoffer, som vaskes ut i de første eluatene med lavere ACN konsentrasjoner, og det vil derfor være høyere tørrstoffutbytte i de første eluatene. Dette ser man er en generell tendens for prøvene, bortsett fra for *C. closterium* og *T. nordenskiöldii* (I) som har høyere tørrstoffutbytte i 60% eluatet og blandingskultur 3 som har et høyere utbytte i 80% eluatet.

En stor andel av tørrstoffet i vannfasen forsvinner i fast-fase ekstraksjonen, dette er salter og andre uønskede stoffer som vaskes vekk fra kolonnen før man begynner oppsamlingen av de ulike SPE-eluatene. Mengden av "salter" fjernet ble kalkulert ut fra gjenvunnet tørrstoff i SPE-eluatene trukket fra total mengde tørrstoff i vannfasen etter løsemiddelekstraksjon.

Debois og medarbeidere (2009) undersøkte ekstrakter fra *Phaeodoctylum tricornutum* for tilstedeværelse av antimikrobielle forbindelser. I deres forsøk ble materialet ekstrahert med metanol:vann (5:1). To ulike flerumettede fettsyrer med antimikrobiell aktivitet ble isolert og karakterisert i dette forsøket. Samme metode ble benyttet i en masteroppgave av Varmedal (2009), for å undersøke antimikrobiell aktivitet i *P. glacialis*. Denne masteroppgaven synes å være den eneste undersøkelsen av antimikrobiell aktivitet i *P. glacialis* da det ikke er funnet andre publiserte resultater. Det ble ikke funnet noe aktivitet i arten med denne ekstraksjonsmetoden. Man kan derfor se at ekstraksjonsmetoden har betydning for hvilke stoffer som ekstraheres fra det biologiske materialet, og vil ha en betydning for resultatene.

4.3 Antimikrobiell aktivitet

Det ble registrert antibakteriell aktivitet i samtlige ekstrakter av renkulturer og blandingskulturen av *A. longicornis* + *P. glacialis*.

T. nordenskiöldii viste generelt størst antimikrobiell aktivitet. Eluater fra første ekstraksjon viste aktivitet mot *C. glutamicum* helt ned til 0,04 mg/ml, som var laveste konsentrasjon testet. Denne aktiviteten ble registrert i 30 og 40% eluatene. Det ble registrert aktivitet mot alle bakteriestammene i 10% eluatet fra denne arten.

Alle eluater fra samtlige prøver viste aktivitet i varierende grad mot den Gram-positive stammen *C. glutamicum*. Det ble påvist aktivitet mot denne stammen helt ned til en konsentrasjon på 0,04 mg/ml (*T. nordenskiöldii* I), som var laveste konsentrasjon testet. Høy aktivitet mot denne stammen har også vært registrert i tidligere studier (Haug *et al.*, 2004). Det kan derfor se ut som denne bakteriestammen er generelt mer sensitiv for marine ekstrakter enn de andre stammene som ble benyttet i dette studiet. Det ble også registret mye aktivitet mot *S. aureus*, men ved høyere konsentrasjoner enn mot *C. glutamicum*. *C. clostrerium* viste aktivitet mot *S. aureus* ned til 0,31 mg/ml i 10% SPE-eluatet. Konsentrasjonen i de andre eluatene som viste aktivitet mot denne stammen var på 2,5-5 mg/ml. *S. aureus* er derfor ikke like sensitiv som *C. glutamicum* for disse antibakterielle komponentene. Mindre aktivitet ble registrert mot de to Gram-negative bakteriestammene; *E. coli* og *P. aeruginosa*. Gram-negative bakterier er generelt mer motstandsdyktige mot antimikrobielle stoffer på grunn av lipopolysakkarid-laget (LPS) som ligger utenpå celleveggen (Madigan *et al.*, 2009). Høyest aktivitet mot *E. coli* ble registret i 10% SPE-eluat av *C. closterium*, med en aktivitet ned på 1,25 mg/ml. Som nevnt tidligere kan 10% SPE-eluat inneholde en høyere mengde av salter, noe som kan forstyrre resultatet i bakterietestene. *E. coli* er ikke en marin bakterie, og antas derfor å være mer sensitiv for salter.

Den laveste aktiviteten ble registrert i de to blandingskulturene (2 og 3) som var samlet inn på tokt. Høyest aktivitet ble registrert mot *C. glutamicum*, med 1,25

mg/ml i 40% SPE-eluatet fra blandingskultur 3. Det er vanskelig å se noen åpenbar grunn til at akkurat disse to prøvene skulle ha lavere aktivitet enn de andre. En grunn kan være at disse prøvene var noe eldre enn de andre (samlet i 2005). Ulike stoffer i prøvene kan ha blitt brutt ned, eller denaturert hvis disse prøvene ikke har blitt lagret ved lav nok temperatur (-20°C).

Til sammen 45 fraksjoner var aktive mot *C. glutamicum*, noe som igjen viser at denne bakteriestammen er mer sensitiv enn de andre. Det var også én aktiv fraksjon mot *S. aureus*, mens ingen av fraksjonene viste aktivitet mot bakteriestammene *P. aeruginosa* og *E. coli*. En grunn til at den antibakterielle aktiviteten forsvant eller ble lavere etter fraksjonering av SPE-eluatene kan være fordi konsentrasjonen av aktive stoffer ble for lav. Det kan også være at noen av stoffene kun fungerer sammen når de er tilstede i samme fraksjon, og denne synergieffekten forsvinner når de separeres ved kromatografi. Det er kjent at ulike antimikrobielle stoffer kan fungere sammen, og dermed forsterke den antimikrobielle effekten (Challis & Hopwood, 2003, Mccafferty *et al.*, 1999)

4.4 Innledende karakterisering av aktive komponenter

4.4.1 Riboflavin og flavin mononukleotid

Hele 26 fraksjoner av *T. nordenskiöldii* (I) viste antimikrobiell aktivitet mot *C. glutamicum*. Én av disse fraksjonene (Tn30-fr41) viste i tillegg aktivitet mot *S. aureus*. Ved LC-PDA-MS analyse av denne fraksjonen ble det funnet et karakteristisk UV-Vis spekter (Figur 26 a). De tre toppene (UV-Vis maksima) er karakteristisk for riboflavin, og derivater av riboflavin (flavin mononukleotid og flavin adenin dinukleotid) (Wang *et al.*, 2008). Lignende UV-spekter ble også oppdaget i *P. glacialis* 30% SPE-eluat, fraksjon 40 (Figur 24 a) og i *P. glacialis* + *A. longicornis* 30% SPE-eluat fraksjon 41 (Figur 27 a). Syntetisk, rent riboflavin (Merck, Tyskland) ble derfor analysert under samme betingelser på LA-PDA-MS for å sammenligne UV-Vis og MS-spekter, og verifisere stoffenes tilstedeværelse i algeekstraktene. Undersøkelsene viste at riboflavin har nesten identisk UV-Vis spekter som Tn30-fr42, PgAl30-fr41 og Pg30-fr40. De små variasjonene i UV-maxima skyldes mest sannsynlig variasjoner i konsentrasjon (Appendiks 5).

I Tn30-fr41 (Figur 26 b), PgAl30-fr41 (Figur 27 b) og Pg30-fr40 (Appendiks 4) kan man se en topp med m/z verdi 457.07 som representerer $[M+H]^+$. Denne toppen indikerer derfor tilstedeværelsen av FMN som har en molekylmasse på 456 Da. Ionet med m/z verdi 438.96 er mest sannsynlig et fragment av m/z 457.07, med tap av et vannmolekyl (18 Da). I Pg30-fr40 (Figur 24 b) ble det i tillegg funnet en topp med m/z verdi på 377.07 som representerer $[M+H]^+$. Denne toppen indikerer derfor tilstedeværelse av riboflavin som har molekylvekt på 376 Da. Dette stemmer også overens med MS-spekteret til rent riboflavin (Appendiks 5) som har en topp med m/z verdi på 377.15.

Riboflavin er kjent som vitamin B₂ og er utbredt både i plante- og dyreriket, i tillegg til å produseres av en rekke mikroorganismer (McCormick, 2012). Stoffet omdannes til flavin mononukleotid (FMN) og flavin adenin dinukleotid (FAD) i kroppen som er viktige koenzymmer i en rekke reduksjons-oksidasjons reaksjoner (McCormick, 2012, Nelson & Cox, 2010).

Det er kjent at riboflavin og FMN kan ha antimikrobiell aktivitet (Slotnick & Dougherty, 1965). Det er tidligere funnet at riboflavin sammen med UV-stråling har inhiberende effekt på *S. aureus* og *P. aeruginosa*, i tillegg til ulike arter sopp (Martins *et al.*, 2008, Schrier *et al.*, 2009). Det ble funnet både antimikrobielt riboflavin og FMN i denne oppgaven. FMN i *T. nordenskiöldii* viste aktivitet mot både *C. glutamicum* og *S. aureus*, mens FMN og riboflavin i de andre fraksjonene var aktive mot *C. glutamicum*. Litteratursøk har ikke gitt noe informasjon om at det er funnet antimikrobielt riboflavin eller FMN i marine diatomeer tidligere.

4.4.2 Tryptofan eller tryptofan-lingnende forbindelse

Fraksjonen Tn30-fr39 viste aktivitet mot *C. glutamicum*. Ved undersøkelse av MS-spekteret til denne fraksjonen ble det funnet en lavmolekylær forbindelse med m/z 187.96, samt en del andre lavere m/z-verdier. Mønsteret i dette MS-spekteret (Figur 25 b) er veldig likt det man finner ved fragmentering av tryptofan (Trp) (El Aribi *et al.*, 2004, Talbot *et al.*, 2005). Trp har en molekylvekt på 204 Da og ionet med m/z verdi 205.05 representerer kanskje $[M+H]^+$, noe som indikerer tilstedeværelse av Trp i fraksjonen Tn30-fr39. Ionet med m/z-

verdier 187.96 og 145.94 vises også ved fragmentering av Trp (El Aribi *et al.*, 2004). Det er derfor mulig at fraksjonen Tn30-fr39 inneholder Trp og/eller et Trp-lignende derivat. Trp har forøvrig også UV-absorpsjon rundt 280 nm, noe som vises i UV-Vis spekteret i Figur 25 b.

Tryptophan er en aminosyre med en upolar aromatisk sidekjede (Nelson & Cox, 2010). Tidligere studier har vist at Trp har vist seg å være en essensiell del av den antibakterielle aktiviteten i visse antimikrobielle peptider (Haug & Svendsen, 2001). Stoffet var i dette tilfellet viktig for peptidets interaksjon med cellemembranen til bakteriene. Subbalakshmi og medarbeidere viste i (2000) at Trp var viktig for den hemolytiske aktiviteten i ett av peptidene de har undersøkt.

4.4.3 Antimikrobielt protein

Fraksjonene Tn40-fr39 (Figur 28 og 29) og Tn(II)30-fr57 (Figur 30 og 31) viste aktivitet mot *C. glutamicum*. Ved LC-MS analyse av disse fraksjonene ble det oppdaget at MS-spekteret viste en rekke ioner som til sammen dannet en "bjelleform". Denne formen er typisk for proteiner og peptider (Crews *et al.*, 2010). Ut fra beregnet molekylmasse kan det se ut som begge proteinene har en masse på ca. 11 kDa. Det ble ikke gjennomført noen høyoppløselig MS-analyse av disse to proteinene, og det er derfor vanskelig å si noe om molekylsammensetningen.

Antimikrobielle peptider er funnet i en rekke marine organismer, særlig invertebrater (Faulkner, 2001, Haug *et al.*, 2002b, Hughes & Fenical, 2010). Ut fra litteratursøk er det ikke funnet publikasjoner om antimikrobielle peptider eller proteiner i marine diatomeer. Det er heller ikke funnet noen informasjon om antimikrobiell aktivitet i artene som ble undersøkt i denne oppgaven. Varmedal (2009) undersøkte *P. glacialis* i sin masteroppgave. Det ble imidlertid ikke funnet noe aktivitet i denne arten den gangen. *P. glacialis* var én av de artene som viste inhibering av bakterievekst ved lave konsentrasjoner (0,16 mg/ml mot *C. glutamicum*) i MIC-testen i dette studiet. Grunnen til forskjellene i resultat kan skrives til ekstraksjonsmetoden som ble benyttet (Se avsnitt 4.2).

Antimikrobiell aktivitet i marine diatomeer er oppdaget tidligere (Desbois *et al.*, 2009, Viso *et al.*, 1987). Denne aktiviteten er tilskrevet fettsyrer, samt flerumettede aldehyder. De flerumettede aldehydene har også i flere tilfeller vist seg å ha en negativ effekt på reproduksjonen til flere marine invertebrater (Ianora & Miralto, 2010, Jüttner, 2005, Wichard *et al.*, 2005). Man ser derfor at de marine diatomeene har utviklet et kjemisk forsvar for å frastøte seg bakterier og predatorer.

4.5 Økologisk sammenheng

Ser man på algene i et økologisk og biogeografisk perspektiv, er det nærliggende å anta at det er en sammenheng mellom mengden antimikrobielle stoffer som produseres og hvor og når algene blomstrer. *T. nordenskiöldii* og andre arter av *Thalassiosira* utgjør en betydelig del av artssammensetningen og biomassen i den tempererte/nordlige våroppblomstringen (Degerlund & Eilertsen, 2010, Eilertsen *et al.*, 1981). Disse artene opptrer i større mengder senere i denne våroppblomstringen (slutten av april- tidlig i mai), når konsentrasjonene av løst organisk materiale i vannet samtidig øker. På dette tidspunktet vil mengden av heterotrofe bakterier øke. *T. nordenskiöldii* kan derfor ha utviklet seg til å overleve i et miljø med mye bakterier. Dette kan være én av grunnene til at denne arten viste høyere aktivitet enn de andre.

A. longicornis er en liten art som blomster tidlig i våroppblomstringen. Denne arten viste noe antimikrobiell aktivitet, men ikke like mye som *T. nordenskiöldii*.

P. glacialis utgjør vanligvis ingen stor del av våroppblomstringen. I mange sammenhenger omtales *P. glacialis* som arktisk (Hasle & Syvertsen, 1997). *C. closterium* er en pennat diatomé som gjerne vokser i biofilm eller som celleaggregater på ulike overflater. Denne arten viste høy aktivitet i MIC-test, men all aktivitet forsvant etter fraksjonering med RP-HPLC. Siden den vokser i biofilm vil nok denne arten ha et kjemisk forsvar som hindrer kolonisering av bakterier som kan skade biofilmen. Ekstrakter kunne derfor være av interesse å teste mot bakterie-biofilm, for å undersøke om den viser aktivitet mot slike typer bakterier.

4.6 Biokjemi og vekstforhold

Diatomeene ble dyrket under ideelle forhold for vekst, og høstet mens de var i rask eksponentiell vekstfase. Det er vist tidligere at marine diatomeer forandrer biokjemien etter hvilke dyrkingsforhold de holdes under. Lebeau og Robert (2003) fant ut at dyrkingsbetingelsene og høstemetodene kunne påvirke innholdet av vitaminer i diatomeer (Lebeau & Robert, 2003). Bestemte dyrkingsbetingelser kan også være med på å styre produksjon og renhet av flerumettede fettsyrer i mikroalger. Forsøk er tidligere utført, der man har funnet at lipidinnholdet i cellene øker ved begrensning av næringsstoffer i dyrkingsmediet, spesielt ved begrensning av nitrogen (Chelf, 1990, Rodolfi *et al.*, 2009).

Det er ikke bare den kjemiske sammensetningen i dyrkingsmediet som påvirker den biokjemiske komposisjonen til mikroalgene. Fysiske miljøpåvirkninger er også med på å styre prosessen. UV-lys fører til høyere produksjon av pigmenter og antioksidanter i diatomeer (Buma *et al.*, 1996). Et sterkt beitepress fra zooplankton mot slutten av våroppblomstringen fører til økt produksjon av stoffer som frastøter beitere (Ianora & Miralto, 2010, Ianora *et al.*, 2003). Disse stoffene er spesielt flerumettede aldehyder som fører til skade på reproduksjonen til zooplankton (Jüttner, 2005).

Når man tar disse faktorene i betraktning, vil det også være mulig at diatomeene vil kunne produsere en større mengde sekundære metabolitter med antimikrobiell aktivitet om de utsettes for stress i form av høyere bakteriekonsentrasjon i dyrkingsmediet. Forsøk på tilpasning av dyrkningsbetingelser med tanke på antimikrobiell aktivitet er gjort i liten eller ingen grad frem til i dag, men det er forskning som kan by på interessante resultater. Så langt er det heller ikke klarlagt om slike stoffer lagres i cellene eller skilles ut i mediet (Lebeau & Robert, 2003). I denne masteroppgaven var det kun ekstrakter fra celler som ble testet, men det er også store muligheter for at slike stoffer skilles ut for å inhibere bakterievekst i miljøet rundt cellene.

Marine diatomeer har genomer som er 10-50 x større enn menneskegenomet (Armbrust, 2004, Bowler *et al.*, 2008). Full-genomsekvensering av *T. pseudonana* og *P. tricornutum* avslørte at de to artene kun hadde 60% likhet i genomene (Armbrust, 2004, Bowler *et al.*, 2008). Dette tyder på store forskjeller mellom de ulike artene av diatomeer, og er i tillegg et tegn på at disse organismene har en høy genetisk drift. Artene kan i tillegg forandre seg mye hvis de holdes lenge i monokulturer. Armbrust og medarbeidere (Armbrust, 2004) fant et ekstra kromosom i *T. pseudonana* som mest sannsynlig hadde oppstått i etter at algen var isolert. Faktorer som dette fører til at artsbegrepet blant diatomeene i visse tilfeller kan være vanskelig å definere. Med en slik genetisk drift tatt i betraktning kan det være vanskelig å velge ut arter for produksjon av antimikrobielle forbindelser. Siden vekstbetingelsene, og stress påvirker biokjemien til algene (Naviner *et al.*, 1999) kan det derfor tenkes at valg av dyrkingsmedium, samt stress under dyrking, er like viktig for produksjon av ulike sekundærmetabolitter, som valg av bestemte arter.

5. Konklusjon

Undersøkelsene i dette studiet viser at det finnes antimikrobielle forbindelser i marine diatomeer. Det ble påvist slike forbindelser i alle artene som ble dyrket i monokultur (*A. longicornis*, *C. closterium*, *P. glacialis* og *T. nordenskiöldii*) og i blandingskulturen dyrket på lab (*P. glacialis* + *A. longicornis*). Det ble i tillegg påvist antimikrobielle forbindelser i to blandingskulturer samlet inn på tokt (blandingskultur 2 og 3). Forbindelsene som ble karakterisert i dette studiet er andre forbindelser enn de som er blitt beskrevet i tidligere studier gjennomført på marine diatomeer.

Studiet har gitt en innblikk i den komplekse biokjemien til de marine diatomeene, og viser at det enda er mye man ikke vet om disse organismene. Det er derfor behov for videre studier for å forstå mer om produksjonen av antimikrobielle forbindelser i diatomeer, og mikroalger generelt.

6. Referanser

- Amin, S. A., Parker, M. S. and Armburst, E. V. (2012) Interactions between Diatoms and Bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **76**, 667-684.
- Andrews, J. M. (2001) Determination of Minimum Inhibitory Concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **48**, 5-16.
- Anon. (2011) Oligae report Academic Edition *Monograph*. pp. 312pp.
- Apoya-Horton, M. D., Yin, L., Underwood, G. J. C. and Gretz, M. J. (2006) Movement Modalities and Responses to Environmental Changes of the Mudflat Diatom *Cylindrotheca closterium* (Bacillariophyceae). *Journal of Phycology*, **42**, 379-390.
- Armbrust, E. V. (2009) The Life of Diatoms in the World's Oceans. *Nature*, **459**, 185-192.
- Armbrust, E. V. E. A. (2004) The Genome of the Diatom *Thalassiosira pseudonana*: Ecology, Evolution and Metabolism. *Science*, **306**, 79-86.
- Bowler, C., Allen, A. E., Badger, J. H., Grimwood, J., Jabbari, K., Kuo, A., Maheswari, U., Martens, C., Maumus, F. and Otilar, R. P. (2008) The *Phaeodactylum* Genome Reveals the Evolutionary History of Diatom Genomes. *Nature*, **456**, 239-244.
- Bowler, C., Vardi, A. and Allen, A. E. (2010) Oceanographic and Biochemical Insights from Diatom Genomes. *Annual Review of Marine Science*, **2**, 333-365.
- Brogden, K. A. (2005) Antimicrobial Peptides: Pore Formers or Metabolic Inhibitors in Bacteria? *Nature Reviews Microbiology* **3**, 238-250.
- Buma, A. G. J., Zemmeling, H. J., Sjollema, K. and Gieskes, W. W. C. (1996) UVB Radiation Modifies Protein and Photosynthetic Pigment Content, Volume and Ultrastructure of Marine Diatoms. *Marine Ecology Progress Series*, **142**, 47-54.
- Butler, M. S. and Buss, A. D. (2006) Natural products — The Future Scaffolds for Novel Antibiotics? *Biochemical Pharmacology*, **71**, 919-929.

- Caldwell, G. S. (2009) The Influence of Bioactive Oxylipins from Marine Diatoms on Invertebrate Reproduction and Development. *Marine Drugs*, **7**, 367-400.
- Capon, R. J. (2001) Marine Bioprospecting - Trawling for Treasure and Pleasure. *European Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 633-645.
- Carter, G. T. (2008) Discovering Anti-infectives from the Sea. In: P. J. Walsh, S. L. Smith, L. E. Fleming, H. M. Solo-Gabriele and W. H. Gerwick (eds) *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*. Academic Press, Burlington, MA, USA, pp. 644.
- Carvalho, A. P., Meireles, L. A., Malcata, F. X. (2006) Microalgal reactors: A review of Enclosed System Design and Performances. *Biotechnology Progress*, **22**, 1490-1506.
- Challis, G. L. and Hopwood, D. A. (2003) Synergy and Contingency as Driving Forces for the Evolution of Multiple Secondary Metabolite Production by *Streptomyces* Species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 14555-14561.
- Chelf, P. (1990) Environmental Control of Lipid and Biomass Production in Two Diatom Species. *Journal of Applied Phycology*, **2**, 121-129.
- Chen, F. (1996) High Cell Density Culture of Microalgae in Heterotrophic Growth. *Trends in Biotechnology*, **14**, 421-426.
- Choi, H., Pereira, A. R. and Gerwick, W. H. (2012) The Chemistry of Marine Algae and Cyanobacteria. In: E. Fattorusso, W. H. Gerwick and O. Tagliatalata-Scafati (eds) *Handbook of Marine Natural Products*. Springer, New York, NY, USA.
- Cohen, Z. (1999) *Chemicals from Microalgae*. Vol., Taylor & Francis Ltd., London, UK.
- Colwell, R. R. (1983) Biotechnology in the Marine Sciences. *Science*, **222**, 19-24.
- Cragg, G. M., Newman, D. J. and Snader, K. M. (1997) Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*, **60**, 52-60.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2001) Natural Product Drug Discovery in the Next Millennium. *Pharmaceutical Biology*, **39**, 8-17.
- Cragg, G. M. and Newman, D. J. (2013) Natural Products: A Continuing Source of Novel Drug Leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, **183**, 3670-3695.

- Crews, P., Rodríguez, J. and Jaspars, M. (2010) Mass Spectrometry Analysis of Small and Large Molecules *Organic structure analysis*. Oxford University Press Oxford, New York.
- Davies, J. and Davies, D. (2010) Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **74**, 417-433.
- Degerlund, M. and Eilertsen, H. (2010) Main Species Characteristics of Phytoplankton Spring Blooms in NE Atlantic and Arctic Waters (68–80° N). *Estuaries and Coasts*, **33**, 242-269.
- Desbois, A. P., Lebl, T., Yan, L. and Smith, V. J. (2008) Isolation and Structural Characterisation of Two Antibacterial Free Fatty Acids from the Marine Diatom, *Phaeodactylum tricornutum*. *Applied microbiology and biotechnology*, **81**, 755-764.
- Desbois, A. P., Mearns-Spragg, A. and Smith, V. (2009) A Fatty Acid from the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* is Antibacterial Against Diverse Bacteria Including Multi-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Marine Biotechnology*, **11**, 45-52.
- Dinan, L. (2006) Dereplication and Partial Identification of Compounds. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Eilertsen, H. C., Falk-Petersen, S., Hopkins, C. C. E. and Tande, K. (1981) Ecological investigations on the plankton community of Balsfjorden, Northern Norway. *Sarsia*, **66**, 25-34.
- Eilertsen, H. C., Sandberg, S. and Tøllefsen, H. (1995) Photoperiodic Control of Diatom Spore Growth: a Theory to Explain the Onset of Phytoplankton Blooms. *Marine Ecology Progress Series*, **116**, 303-307.
- Eilertsen, H. C. and Skarðhamar, J. (2006) Temperatures of North Norwegian Fjords and Coastal Waters: Variability, Significance of Local Processes and Airesea Heat Exchange. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* **67**, 530-538.
- Eilertsen, H. C. and Whyatt, T. (2010) Phytoplankton Models and Life History Strategies. *South African Journal of Marine Science*, **22**, 323-338.
- El Aribi, H., Orlova, G., Hopkinson, A. C. and Siu, K. W. M. (2004) Gas-Phase Fragmentation Reactions of Protonated Aromatic Amino Acids:

- Concomitant and Consecutive Neutral Eliminations and Radical Cation Formations. *The Journal of Physical Chemistry A*, **108**, 3844-3853.
- Enright, M. C., Robinson, D. A., Randle, G., Feil, E. J., Grundmann, H. and Spratt, B. G. (2002) The Evolutionary History of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**, 7687-7692.
- Falciatore, A. and Bowler, C. (2002) Revealing the Molecular Secrets of Marine Diatoms. *Annual Reviews of Plant Biology* **53**, 109-130.
- Faulkner, D. J. (2001) Marine Natural Products. *Natural Products Reports*, **18**, 1R-49R.
- Gerwick, W. (2008) Marine Remedies. In: P. J. Walsh, S. L. Smith, L. E. Fleming, H. M. Solo-Gabriele and W. H. Gerwick (eds) *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*. Academic Press, Burlington, MA, USA, pp. 644.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. (1962) Studies of Marine Planktonic Diatoms I. *Cycostella nana* Husted, and *Detonula confervacea* (Cleve). *Canadian Journal of Microbiology*, **8**, 229-239.
- Hancock, R. E. W. (1997) Peptide Antibiotics. *The Lancet*, **349**, 418-422.
- Hancock, R. E. W. and Patrzykat, A. (2002) Clinical Development of Cationic Antimicrobial Peptides: from Natural to Novel Antibiotics. *Current Drug Targets. Infectious Disorders*, **2**, 79-83.
- Hansen, E. (2004) *Toxin Production by the Marine Phytoplankter Phaeocystis pouchetii* (Hariot) Lagerheim. University of Tromsø.
- Harrison, P. J. and Berges, J. A. (2005) Marine Culture Media. In: R. A. Andersen (ed) *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, London, UK.
- Hasle, G. R. and Syvertsen, E. E. (1997) Marine Diatoms. In: C. R. Tomas (ed) *Identifying Marine Phytoplankton*. Academic Press, St. Petersburg, Florida, pp. 5-386.
- Haug, B. E. and Svendsen, J. S. (2001) The Role of Tryptophan in the Antibacterial Activity of a 15-residue Bovine Lactoferricin Peptide. *Journal of Peptide Science*, **7**, 190-196.

- Haug, T., Kjuul, A. K., Stensvåg, K., Sandsdalen, E. and Styrvold, O. B. (2002a) Antibacterial Activity in Four Marine Crustacean Decapods. *Fish & Shellfish Immunology*, **12**, 371-385.
- Haug, T., Kjuul, A. K., Styrvold, O. B., Sandsdalen, E., Olsen, Ø. M. and Stensvåg, K. (2002b) Antibacterial Activity in *Strongylocentrotus droebachiensis* (Echinoidea), *Cucumaria frondosa* (Holothuroidea), and *Asterias rubens* (Asteroidea). *Journal of Invertebrate Pathology*, **81**, 94-102.
- Haug, T., Stensvåg, K., Olsen, Ø. M., Sandsdalen, E. and Styrvold, O. B. (2004) Antibacterial Activities in Various Tissues of the Horse Mussel, *Modiolus modiolus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **85**, 112-119.
- Hillebrand, H., Dürselen, C.-D., Kirschtel, D., Pollinger, U. and Zohary, T. (1999) Biovolume Calculation for Pelagic and Benthic Microalgae. *Journal of Phycology*, **35**, 403-424.
- Hoagland, K. D., Rosowski, J. R., Gretz, M. R. and Roemer, S. C. (1993) Diatom Extracellular Polymeric Substances: Function, Fine Structure, Chemistry and Physiology. *Journal of Phycology*, **29**, 537-566.
- Holman, L. (2013) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Radiologic Technology*, **84**, 307-310.
- Houssen, W. E. and Jaspars, M. (2006) Isolation of Marine Natural Products. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Vol. 2nd. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Hughes, C. C. and Fenical, W. (2010) Antibacterials from the Sea. *Chemistry – A European Journal*, **16**, 12512-12525.
- Ianora, A. and Miralto, A. (2010) Toxigenic Effects of Diatoms on Grazers, Phytoplankton and Other Microbes: A Review. *Ecotoxicology*, **19**, 493-511.
- Ianora, A., Miralto, A. and Romano, G. (2012) Antipredatory Defensive Role of Planktonic Marine Natural Products. In: E. Fattorusso, W. H. Gerwick and O. Tagliatela-Scafati (eds) *Handbook of Marine Natural Products*. Springer, New York, NY, USA.
- Ianora, A., Poulet, S. A. and Miralto, A. (2003) The Effects of Diatoms on Copepod Reproduction: A Review. *Phycologia*, **42**, 351-363.
- Jüttner, F. (2005) Evidence that Polyunsaturated Aldehydes of Diatoms are Repellents for Pelagic Crustacean Grazers. *Aquatic Ecology*, **39**, 271-282.

- Kawachi, M. and Noël, M.-H. (2005) Sterilization and Sterile Technique. In: R. A. Andersen (ed) *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, London, UK.
- Kingston, M. B. (2009) Growth and Motility of the Diatom *Cylindrotheca closterium*: Implications for Commercial Applications. *Journal of the North Carolina Academy of Science*, **125**, 138-142.
- Lakeman, M. B., Von Dassow, P. and Cattolico, R. A. (2009) The Strain Concept in Phytoplankton Ecology. *Harmful Algae*, **8**, 746-758.
- Latif, Z. (2006) Isolation by Preparative High-Performance Liquid Chromatography. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Vol. 2nd. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Lebeau, T. and Robert, J.-M. (2003) Diatom Cultivation and Biotechnologically Relevant Products. Part II: Current and Putative Products. *Applied microbiology and biotechnology*, **60**, 624-632.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Dunlap, V., P. and Clark, D. P. (2009) *Brock Biology of Microorganisms*. Vol., Parson Benjamin Cummings, San Francisco, CA.
- Margalef, R. (1958) Temporal Succession and Spatial Heterogeneity in Phytoplankton. In: A. A. Buzzatti-Traverso (ed) *Perspectives in marine biology*. University of California Press.
- Martins, S. a. R., Combs, J. C., Noguera, G., Camacho, W., Wittmann, P., Walther, R., Cano, M., Dick, J. and Behrens, A. (2008) Antimicrobial Efficacy of Riboflavin/UVA Combination (365 nm) *In Vitro* for Bacterial and Fungal Isolates: a Potential New Treatment for Infectious Keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**, 3402-3408.
- Mccafferty, D. G., Cudic, P., Yu, M. K., Behenna, D. C. and Kruger, R. (1999) Synergy and Duality in Peptide Antibiotic Mechanisms. *Current Opinion in Chemical Biology*, **3**, 672-680.
- Mccormick, D. B. (2012) Riboflavin *Present Knowledge in Nutrition*. Wiley-Blackwell, pp. 280-292.
- Metting, B. and Pyne, J. W. (1986) Biologically Active Compounds from Microalgae. *Enzyme and Microbial Technology*, **8**, 386-394.
- Naviner, M., Bergé, J.-P., Durand, P. and Le Bris, H. (1999) Antibacterial Activity of the Marine Diatom *Skeletonema costatum* Against Aquacultural Pathogens. *Aquaculture*, **174**, 15-24.

- Nelson, D. L. and Cox, M. M. (2010) *Lehninger Principles of Biochemistry*. Vol., Wh Freeman.
- Newman, D. J. (2008) Natural Products as Leads to Potential Drugs: An Old Process or the New Hope for Drug Discovery? *Journal of Medicinal Chemistry*, **59**, 2589-2599.
- Newman, D. J. and Cragg, G. M. (2007) Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, **70**, 461-477.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. and Snader, K., M. (2000) The Influence of Natural Products upon Drug Discovery. *Natural Products Report*, **17**, 215-234.
- Orcutt, D. M. and Patterson, G. W. (1975) Sterol, Fatty Acid and Elemental Composition of Diatoms Grown in Chemically Defined Media. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, **50**, 579-583.
- Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kiriz, G. S. and Vyvyan, J. R. (2009) Mass Spectrometry. In: L. Lockwood (ed) *Introduction to Spectroscopy*. Vol. 4th. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, CA, USA.
- Perez-Garcia, O., Escalante, F. M. E., De-Bashan, L. E., Bashan, Y. (2011) Heterotrophic Cultures of Microalgae: Metabolism and Potential Products. *Water Research*, **45**, 11-36.
- Pietra, F. (1997) Secondary Metabolites from Marine Microorganisms: Bacteria, Protozoa, Algae and Fungi. Achievements and Prospects. *Natural Products Report*, **14**, 453-464.
- Pike, J., Crosta, X., Maddison, E. J., Stickley, C. E., Denis, D., Barbara, L. and Renssen, H. (2009) Observations on the Relationship Between the Antarctic Coastal Diatoms *Thalassiosira antarctica* Comber and *Porosira glacialis* (Grunow) Jørgensen and Sea Ice Concentrations During the Late Quaternary. *Marine Micropaleontology*, **73**, 14-25.
- Preisig, H. R. and Andersen, R. A. (2005) Historical Review of Algal Culturing Techniques. In: R. A. Andersen (ed) *Algal Culturing Techniques*. Academic Press, London, UK.
- Querellou, J., Børresen, T., Boyen, C., Dobson, A., Höfle, M., Ianora, A., Jaspars, M., Kijjoo, A., Olafsen, J., Rigos & G., Wijffels, R. (2010) Marine Biotechnology:

- A New Vision and Strategy for Europe. In: N. Mcdonough (ed) Vol. 15. Marine Board, pp. 91.
- Radjasa, O. K. and Sabdono, A. (2009) Bacterial Symbionts of Reef's Invertebrates as a Sustainable Source of Marine Natural Products. *Current Research in Bacteriology*, **2**, 7-13.
- Rampen, S. W., Schouten, S., Elda Panoto, F., Brink, M., Andersen, R. A., Muyzer, G., Abbas, B. and Sinninghe Damsté, J. S. (2009) Phylogenetic Position of *Attheya longicornis* and *Attheya septentrionalis* (Bacillariophyta). *Journal of Phycology*, **45**, 444-453.
- Reid, R. G. and Sarker, S. D. (2006) Isolation of Natural Products by Low-Pressure Column Chromatography. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Vol. 2nd. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G. and Tredici, M. R. (2009) Microalgae for Oil: Strain Selection, Induction of Lipid Synthesis and Outdoor Mass Cultivation in a Low-Cost Photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, **102**, 100-112.
- Rodríguez, J., Crews, P. and Jaspars, M. (2012) Contemporary Strategies in Natural Products Isolation. In: E. Fattorusso, W. Gerwick and O. Tagliatalata-Scafati (eds) *Handbook of Marine Natural Products*. Springer Science, New York, NY, USA
- Round, F. E., Crawford, R. M. and Mann, D. G. (1990) *The Diatoms*. Vol., Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Sabdono, A. (2011) Microbial Symbionts in Marine Sponges: Marine Natural Product Factory. *JOURNAL OF COASTAL DEVELOPMENT*, **11**, 57-61.
- Samuelsson, G. and Bohlin, L. (2009) *Drugs of Natural Origin*. Vol., Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden.
- Sarker, S. D., Latif, Z. and Gray, A. I. (2006) Natural Product Isolation. In: S. D. Sarker (ed) *Natural Product Isolation*. 2nd ed. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 515.
- Sarker, S. D. and Nahar, L. (2006) Hyphanated Techniques. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Vol. 2nd. Humana Press Totowa, NJ, USA.

- Sarthou, G., Timmermans, K. R., Blain, S. and Tréguer, P. (2005) Growth Physiology and Fate of Diatoms in the Ocean: A Review. *Journal of Sea Research*, **53**, 25-42.
- Schrier, A., Greebel, G., Attia, H., Trokel, S. and Smith, E. F. (2009) *In Vitro* Antimicrobial Efficacy of Riboflavin and Ultraviolet Light on *Staphylococcus aureus*, Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of refractive surgery (Thorofare, NJ: 1995)*, **25**, S799.
- Seidel, V. (2006) Initial and Bulk Extraction. In: S. D. Sarker, Z. Latif and A. I. Gray (eds) *Natural Products Isolation*. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Shimizu, Y. (1996) Microalgal metabolites: A New Perspective. *Annual Reviews in Microbiology*, **50**, 431-465.
- Sieburth, J. M. (1960) Acrylic Acid, an "Antibiotic" Principle in *Phaeocystis* Blooms in Antarctic Waters. *Science*, **132**, 676-677.
- Singh, S. B. and Barrett, J. F. (2006) Empirical Antibacterial Drug Discovery—Foundation in Natural Products. *Biochemical Pharmacology*, **71**, 1006-1015.
- Slotnick, I. J. and Dougherty, M. (1965) Unusual Toxicity of Riboflavin and Flavin Mononucleotide for *Cardiobacterium hominis*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **31**, 355-360.
- Smith, V. J., Desbois, A. P. and Dyrzynda, E. A. (2010) Conventional and Unconventional Antimicrobials from Fish, Marine Invertebrates and Micro-Algae. *Marine drugs*, **8**, 1213-1262.
- Sperstad, S. V., Haug, T., Blencke, H.-M., Styrvold, O. B., Li, C. and Stensvåg, K. (2011) Antimicrobial Peptides from Marine Invertebrates: Challenges and Perspectives in Marine Antimicrobial Peptide Discovery. *Biotechnology Advances*, **29**, 519-530.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. (2006) Commercial Applications of Microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **101**, 87-96.
- Staats, N., De Winder, B., Stal, L. and Mur, L. (1999) Isolation and Characterization of Extracellular Polysaccharides from the Epipelagic

- Diatoms *Cylindrotheca closterium* and *Navicula salinarum* European *Journal of Phycology*, **34**, 161-169.
- Stewart, W. D. P. (1974) *Algal Physiology and Biochemistry*. Vol. 10, Blackwell Scientific Publications, England.
- Subbalakshmi, C., Bikshapathy, E., Sitaram, N. and Nagaraj, R. (2000) Antibacterial and Hemolytic Activities of Single Tryptophan Analogs of Indolicidin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **274**, 714-716.
- Tadesse, M., Gulliksen, B., Strøm, M. B., Styrvold, O. B. and Haug, T. (2008) Screening for Antibacterial and Antifungal Activities in Marine Benthic Invertebrates from Northern Norway. *Journal of Invertebrate Pathology*, **99**, 286-293.
- Talbot, F. O., Tabarin, T., Antoine, R., Broyer, M. and Dugourd, P. (2005) Photodissociation Spectroscopy of Trapped Protonated Tryptophan. *The Journal of chemical physics*, **122**, 074310.
- Time (1966) The Futurists of 1966 Looking Toward A.D. 2000 *Time Magazine*. pp. 28-29.
- Trainer, V. L., Hickey, B. M. and Bates, S. S. (2008) Toxic Diatoms. In: P. J. Walsh, S. L. Smith, L. E. Fleming, H. M. Solo-Gabriele and W. H. Gerwick (eds) *Oceans and Human Health: Risks and Remedies from the Seas*. Academic Press, Burlington, MA, USA, pp. 644.
- Varmedal, I. (2009) *Bioactive Molecules Extracted from the Marine Sponge *Aplysilla sulfurea* and the Marine Phytoplankton *Porosira glacialis**. University of Tromsø.
- Viso, A. C., Pesando, D. and Baby, C. (1987) Antibacterial and Antifungal Properties of Some Marine Diatoms in Culture. *Botanica Marina*, **30**, 41-45.
- Von Quillfeldt, C. H. (2000) Common Diatom Species in Arctic Spring Blooms: Their Distribution and Abundance. *Botanica Marina*, **43**, 499-516.
- Vuorela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Tammela, P., Rauha, J.-P., Wennberg, T. and Vuorela, H. (2004) Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. *Current Medicinal Chemistry*, **11**, 1375-1389.

- Wang, L., Chi, Z., Wang, X., Ju, L., Chi, Z. and Guo, N. (2008) Isolation and Characterization of *Candida membranifaciens* subsp. Flavinogenie W14-3, a Novel Riboflavin-Producing Marine Yeast. *Microbiological Research*, **163**, 255-266.
- Wichard, T., Poulet, S. A., Halsband-Lenk, C., Albaina, A., Harris, R., Liu, D. and Pohnert, G. (2005) Survey of the Chemical Defence Potential of Diatoms: Screening of Fifty Species for $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -unsaturated aldehydes. *Journal of Chemical Ecology*, **31**, 949-958.
- Wright, G. D. (2007) The Antibiotic Resistome: the Nexus of Chemical and Genetic Diversity. *Nature Reviews Microbiology*, **5**, 175-186.
- Zasloff, M. (2002) Antimicrobial Peptides of Multicellular Organisms. *Nature* **415**, 389-395.

7. Appendiks

Appendiks 1

Løsninger, og fremgangsmåte for tillaging.

Tabell 21. Innhold i jordekstrakt for massedyrking av diatomeer

Jordekstrakt	
Innhold	Mengde
Jord, tørket i ovn på ca. 50°C	300 ml
MilliQ-vann	600 ml

Jord ble først tørket i ovn på ca. 50°C. Jorden ble deretter blandet med vann og blandingen kokte i 30 minutter, og deretter nedkjølt. Den ble så filtrert stegvis med ulike filter i rekkefølgen: 1000, 250, 100, 50, 20 og 5 µm. Jordekstraktet ble så autoklavert med program p4 for flytende løsninger. Løsningen ble lagret på -20°C.

Tabell 22. Innhold i silikatløsning for dyrking av marine diatomeer.

Silikatløsning	
Innhold	Mengde
Natrium meta-silikat nonahydrat	3,5 g
MilliQ-vann	1000 ml
HCl (37%)	20 ml

Natrium-meta-silikat nanohydrat ble løst opp i MilliQ-vann med magnetrører. Etter at alt var oppløst ble det tilsatt HCl til løsningen.

Appendiks 2

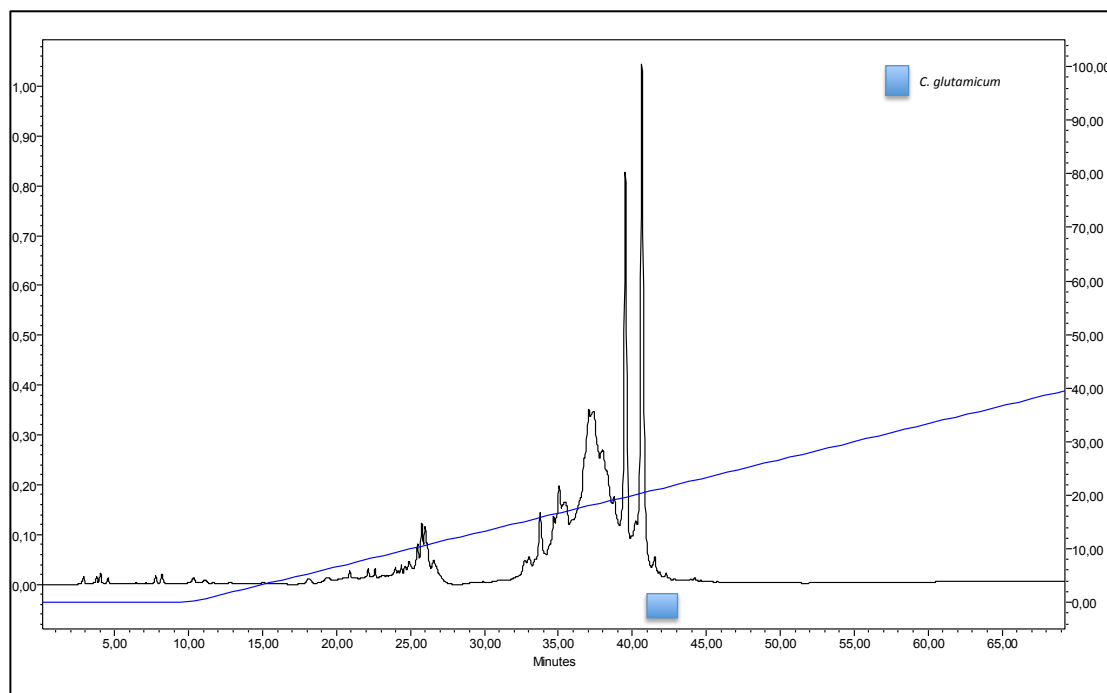
Betingelser og oppsett for LC-MS.

Tabell 23. Betingelser og oppsett for LC-MS.

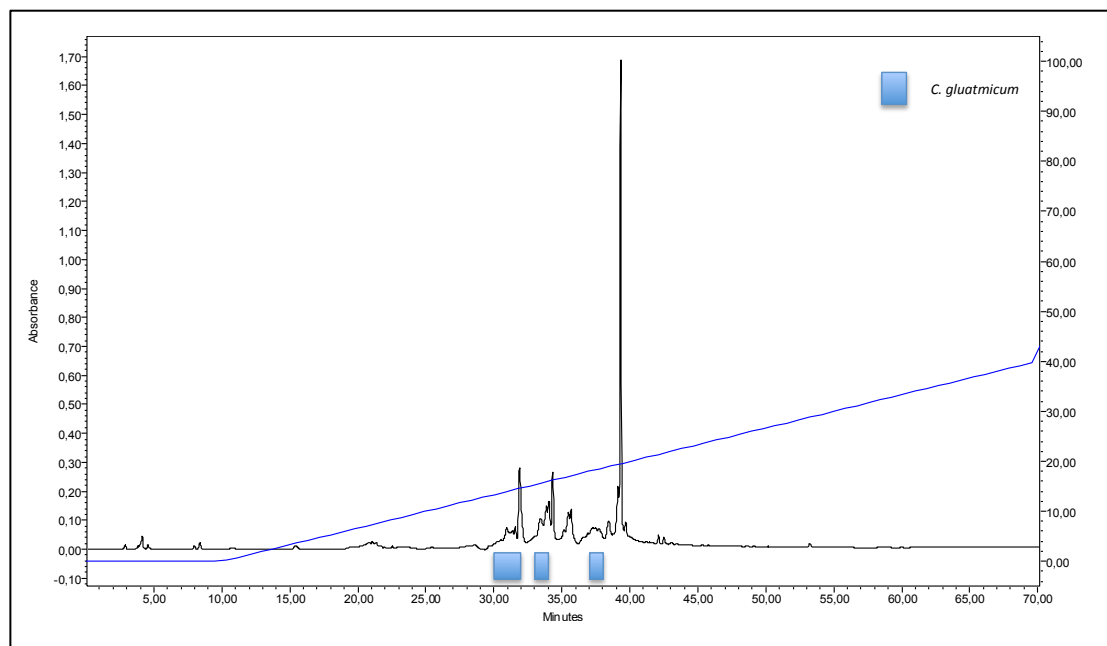
LC-MS	
Ionisering	ES+
Cone voltage (V)	30
Capillary voltage (kV)	3.5
Extractor (V)	3
RF lend (V)	0.5
Source temp. (°C)	125
Dessolvation temp. (C°)	400
Dessolvation gas flow (L/Hr)	750
Cone gas flow (L/Hr)	60
PDA Range (nm)	200-500

Appendiks 3

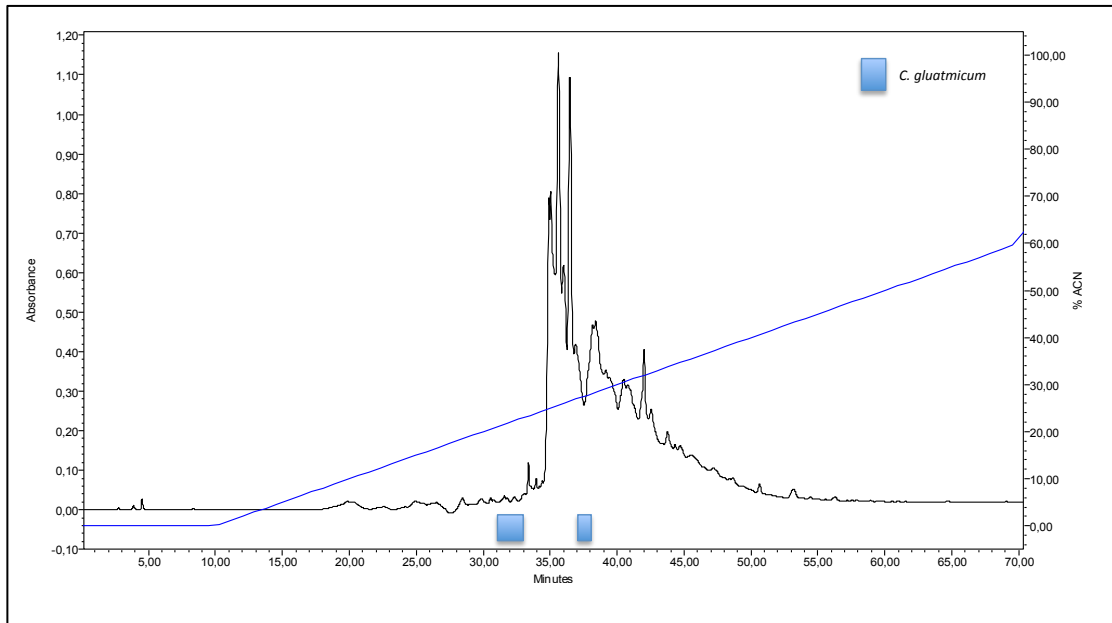
Antimikrobiell aktivitet i HPLC-fraksjoner



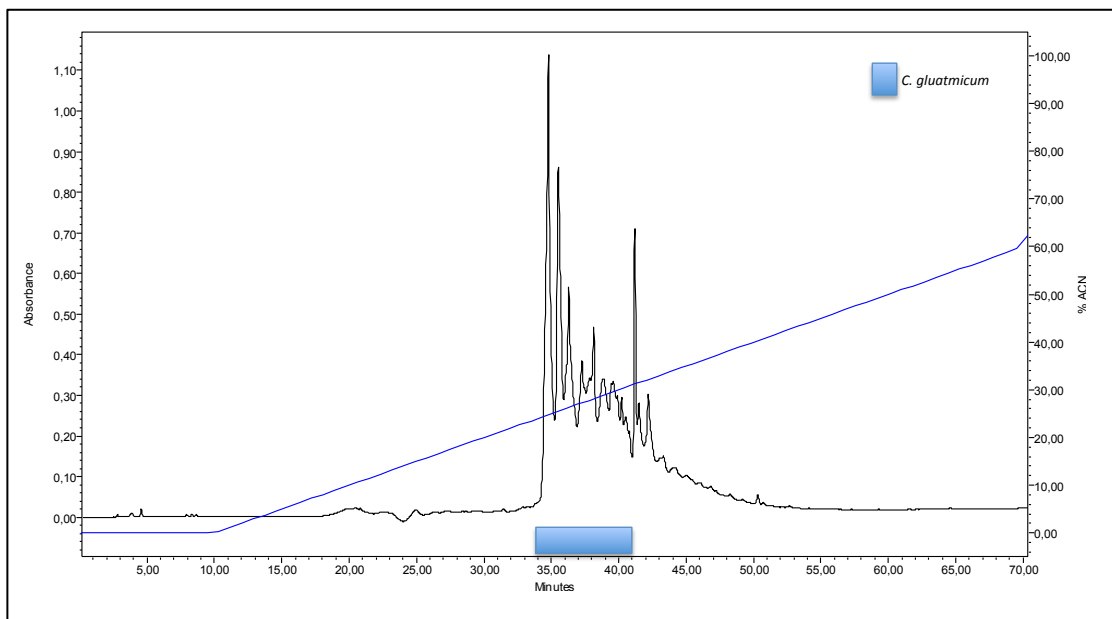
Figur 32. HPLC-kromatogram av 20% SPE-eluat fra *A. longicornis*. Antimikrobiell aktivitet er indikert med blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en linær ACN-gradient (0-40%).



Figur 33. HPLC-kromatogram av 20% SPE-eluat fra *T. nordenskiöldii*. Antimikrobiell aktivitet er indikert med blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en linær ACN-gradient (0-40%).



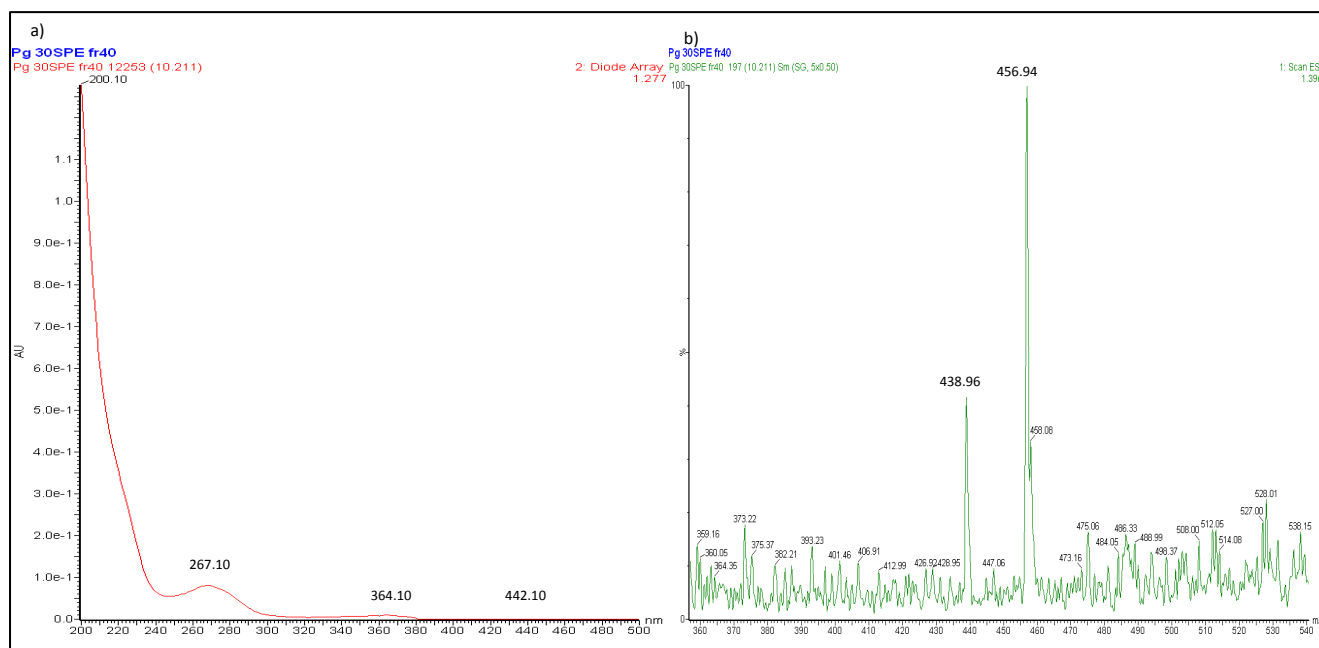
Figur 34 HPLC-kromatogram av 20% SPE-eluat fra *P. glacialis* + *A. longicornis*. Antimikrobiell aktivitet er indikert med blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en linær ACN-gradient (0-40%).



Figur 35 HPLC-kromatogram av 20% SPE-eluat fra *P. glacialis*. Antimikrobiell aktivitet er indikert med blått under kromatogrammet. Den blå linjen viser ACN-gradient i forhold til tid. Det ble benyttet en linær ACN-gradient (0-40%).

Appendiks 4

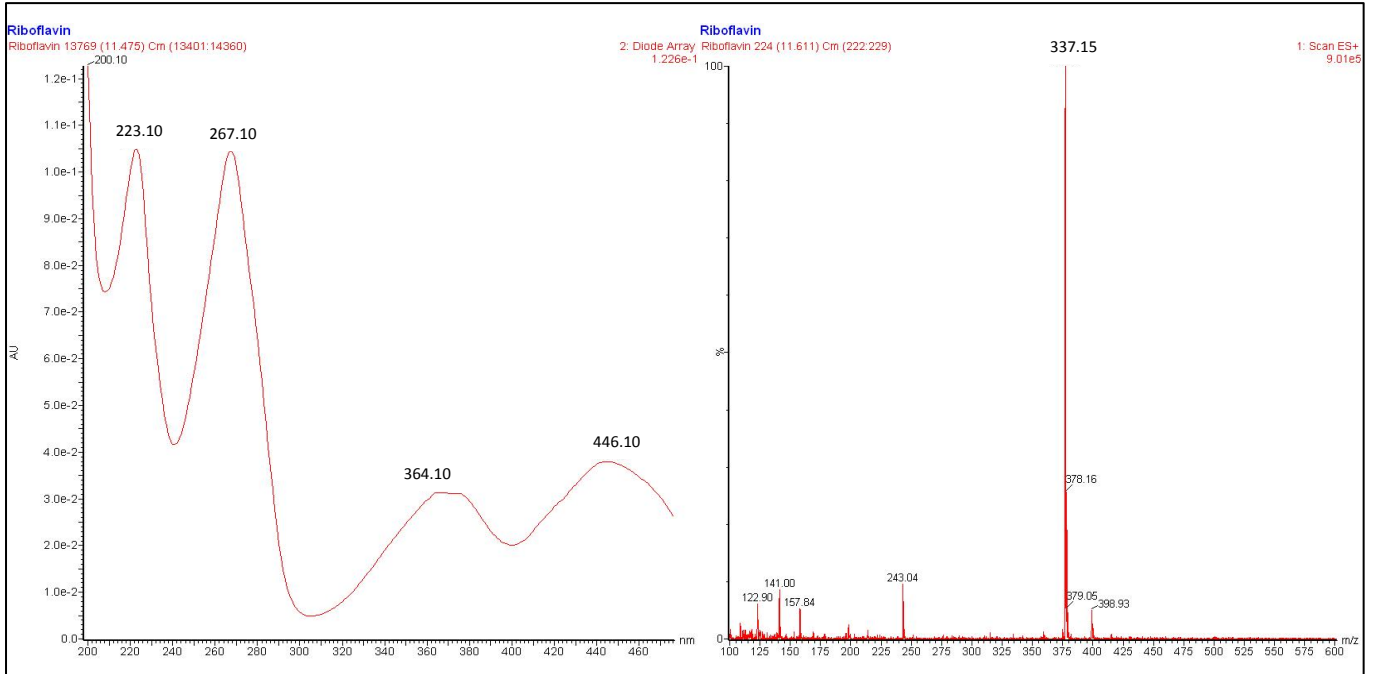
UV-Vis og MS-spekter av Pg30-fr40.



Figur 36 a) UV-Vis spekter for fraksjonen Pg30-fr40. b) UTsnitt av MS-spekter for fraksjonen Pg30-fr40.

Appendiks 5

UV-Vis og MS-spekter av rent riboflavin.



Figur 37 a) UV-Vis spekter av rent riboflavin b) Utsnitt av MS-spekter for rent riboflavin.