



UniMe
1548

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI MESSINA

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali

Corso di Dottorato in Biologia Applicata e Medicina Sperimentale

Coordinatore Prof.ssa Nunziacarla Spanò

(XXXVI ciclo; SSD BIO/07)

***Bacillus licheniformis* ceppo B3-15 isolato da una sorgente idrotermale
dell'isola di Vulcano: dai meccanismi di resistenza alle applicazioni
biotecnologiche dei suoi biopolimeri**

Tesi di Dottorato di:

Antonio Spanò

Supervisore:

Chiar.ma Prof.ssa Concetta Gugliandolo

Tutor:

Dott. Vincenzo Zammuto

ANNO ACCADEMICO 2022-2023

Indice

Indice	2
Riassunto	6
Introduzione	9
Gli ambienti estremi	9
Meccanismi di resistenza degli organismi estremofili	10
Esopolisaccaridi batterici	11
Biosurfattanti batterici	12
Biopolimeri da batteri estremofili e loro vantaggi	12
Le sorgenti idrotermali delle Isole Eolie	13
Esopolisaccaridi prodotti da batteri termofili isolati dalle sorgenti delle Isole Eolie e loro applicazioni biotecnologiche	17
<i>B. licheniformis</i> B3-15 produttore dell'EPS B3-15 e sue applicazioni biotecnologiche	18
Nuove possibili applicazioni biotecnologiche dei biopolimeri prodotti dal <i>B. licheniformis</i> B3-15	18
<i>Bioremediation dell'As</i>	18
<i>Attività antibiofilm</i>	20
Scopo della tesi	23
Materiali e Metodi	24
<i>B. licheniformis</i> ceppo B3-15	24
<i>Sito di isolamento</i>	24
<i>Caratteristiche fenotipiche</i>	25
<i>Caratteristiche genotipiche</i>	27
Valutazione della resistenza del ceppo <i>B. licheniformis</i> B3-15 a diverse forme (As^{III} e As^V) e diverse concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu g/ml$) di Arsenico	27
Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione dell'EPS B3-15	28
<i>Produzione e ottimizzazione della produzione dell'EPS B3-15</i>	28
<i>Caratterizzazione dell'EPS B3-15</i>	30
Applicazioni nella bioremediation dell'As dell'EPS B3-15	30
<i>Valutazione della capacità dell'EPS B3-15 di assorbire As^{III} or As^V mediante GF-AAS</i>	30
<i>Valutazione dei cambiamenti della struttura chimica dell'EPS B3-15 in presenza di As^{III} o As^V mediante ATR-FTIR</i>	32
Effetti dell'EPS B3-15 sulla tossicità dell'Arsenico mediante saggio della bioluminescenza	32
Screening per la capacità del <i>B. licheniformis</i> B3-15 di produrre biosurfattanti	33
<i>Saggio del blu di metilene</i>	33
<i>Curva di crescita e test dell'emulsione in differenti terreni di coltura e a differenti tempi</i>	33
Proprietà del supernatante del <i>B. licheniformis</i> B3-15	34
<i>Test dell'emulsione in presenza di differenti idrocarburi e oli vegetali</i>	34
<i>Test del collasso della goccia</i>	34
<i>Test della riduzione della tensione superficiale</i>	35
Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione del BS B3-15	35

<i>Produzione e ottimizzazione della produzione del BS B3-15</i>	35
<i>Caratterizzazione del BS B3-15</i>	35
Proprietà del BS B3-15	35
Ceppi patogeni	36
Attività antibatterica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15	36
Attività antibiofilm e meccanismi d'azione dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 contro <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> , selezionati organismi modello	37
<i>Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni</i>	37
<i>Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi</i>	38
<i>Osservazione del biofilm e dell'attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 al microscopio confocale</i>	39
<i>Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su un dispositivo medico in PVC</i>	39
Effetti dell'EPS B3-15 sull'adesione superficiale	40
<i>Saggio di rivestimento (Coating assay)</i>	40
<i>Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)</i>	40
<i>Aggregazione cellula-cellula</i>	41
Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 sulla regolazione dei fattori di adesione nella formazione del biofilm mediante qRT-PCR	41
<i>Analisi dell'espressione genica</i>	41
<i>Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa</i>	42
<i>Quantizzazione relativa dell'espressione genica (qRT-PCR)</i>	43
Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 a cellule epiteliali nasali umane (HNEpC)	44
<i>Cellule epiteliali nasali umane</i>	44
<i>Effetti dell'EPS e del BS B3-15 sull'adesione batterica di <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> sulle HNEpC</i>	44
<i>Citotossicità dell'EPS e del BS B3-15 sulle HNEpC</i>	45
Attività antibiofilm contro patogeni umani delle vie respiratorie	45
Attività sinergica dell'EPS e del BS B3-15 (BPS B3-15) sulla capacità dei ceppi patogeni <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> di formare biofilm e di aderire a superfici sia abiotiche che biotiche	45
Attività dell'EPS, del BS B3-15 e attività sinergica del BPS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> di formare biofilm su lenti a contatto	46
<i>Attività antibatterica di una soluzione per risciacquo di lenti a contatto (CL-care)</i>	46
<i>Attività antibiofilm della CL-care, dell'EPS, del BS e del BPS B3-15 su lenti a contatto (CL)</i>	46
<i>Attività antibiofilm dell'EPS, del BS e del BPS B3-15 su lenti a contatto (CL) in presenza di CL-care</i>	47
Risultati	48
Caratteristiche fenotipiche del ceppo <i>B. licheniformis</i> B3-15	48
Valutazione della resistenza del ceppo <i>B. licheniformis</i> B3-15 a diverse forme (As ^{III} e As ^V) e diverse concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 µg/ml) di arsenico	48
Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione dell'EPS B3-15	49

Applicazioni nella bioremediation dell'As dell'EPS B3-15	51
<i>Valutazione della capacità dell'EPS B3-15 di assorbire As^{III} or As^V mediante GF-AAS</i>	51
<i>Valutazione dei cambiamenti della struttura chimica dell'EPS B3-15 in presenza di As^{III} o As^V mediante ATR-FTIR</i>	52
Test di tossicità mediante saggio della bioluminescenza	54
Screening per la capacità del ceppo <i>B. licheniformis</i> B3-15 di produrre biosurfattanti	56
Proprietà biologiche del supernatante del <i>B. licheniformis</i> B3-15 ottenuto in MB + SAC	58
Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione del BS B3-15	59
Attività e proprietà del BS B3-15	61
Attività antibatterica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15	62
Attività antibiofilm e meccanismi d'azione dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 contro <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> , selezionati organismi modello	63
<i>Attività dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni</i>	63
<i>Attività dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi</i>	65
<i>Osservazione del biofilm e dell'attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 al microscopio confocale</i>	66
<i>Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su un dispositivo medico in PVC</i>	67
Effetti dell'EPS B3-15 sull'adesione superficiale	69
<i>Saggio di rivestimento (Coating assay)</i>	69
<i>Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)</i>	70
<i>Aggregazione cellula-cellula</i>	71
Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 sulla regolazione dei fattori di adesione nella formazione del biofilm mediante qRT-PCR	72
Effetti dell'aggiunta dell'EPS e del BS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> di aderire a cellule epiteliali nasali umane (HNEpC)	73
<i>Effetti dell'EPS e del BS B3-15 sull'adesione batterica di P. aeruginosa e S. aureus sulle HNEpC</i>	73
<i>Citotossicità dell'EPS e del BS B3-15 sulle HNEpC</i>	75
Attività antibiofilm e antiadesiva contro patogeni umani delle vie respiratorie	76
<i>Attività dell'EPS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni</i>	76
<i>Saggio di rivestimento (Coating assay)</i>	77
<i>Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)</i>	78
Attività sinergica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 (BPS B3-15) sulla capacità dei ceppi patogeni <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> di formare biofilm	79
<i>Attività antibatterica del BPS B3-15</i>	79
<i>Attività antibiofilm del BPS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni</i>	79
<i>Attività antibiofilm del BPS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi</i>	80
<i>Attività antibiofilm del BPS B3-15 su un dispositivo medico in PVC</i>	82
Proprietà tensioattive ed effetto sull'adesione superficiale del BPS B3-15	83
<i>Proprietà tensioattive</i>	83

<i>Saggio di rivestimento (Coating assay)</i>	83
<i>Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)</i>	84
Attività dell'EPS e del BS B3-15 e attività sinergica del BPS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> di formare biofilm su lenti a contatto	85
<i>Attività antibatterica di una soluzione per risciacquo di lenti a contatto (CL-care)</i>	85
<i>Attività antibiofilm della CL-care su lenti a contatto (CL)</i>	86
<i>Attività antibiofilm dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15 e dei biopolimeri in presenza della CL-care su CL</i>	87
Discussioni	90
Conclusioni	102
Bibliografia	104

Riassunto

Le sorgenti idrotermali delle isole Eolie rappresentano un ambiente estremo naturale e facilmente accessibile ideale per esplorare la biodiversità procariotica marina, per studiare come i microorganismi rispondono alla presenza di condizioni inusuali e per la ricerca e lo sfruttamento di nuove biomolecole con potenziale biotecnologico.

La produzione di biofilm, come densi aggregati cellulari racchiusi in una matrice polimerica extracellulare autosintetizzata dalle stesse cellule e costituita principalmente da esopolisaccaridi (EPS), rappresenta una delle strategie di resistenza più importanti utilizzate dai microorganismi estremofili per far fronte agli stress in ambienti marini estremi come le sorgenti idrotermali. Gli EPS consentono alle cellule di aderire a superfici solide, di mantenere la corretta idratazione e disponibilità di micronutrienti e svolgono un ruolo cruciale nella resistenza a vari composti tossici e nella competizione contro predatori e agenti patogeni.

Il ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15, isolato da una sorgente idrotermale superficiale dell'Isola di Vulcano (Italia), è in grado di crescere in presenza di kerosene come unica fonte di carbonio e in presenza di differenti forme di As (As^{III} e As^V) a varie concentrazioni. In aggiunta, esso produce differenti biopolimeri se coltivato in diverse condizioni colturali, nello specifico, un EPS (EPS-B3-15) e un biosurfattante (BS B3-15).

L'EPS B3-15 è costituito da una componente principale saccaridica, formata da unità ripetitive disaccaridiche con configurazione manno-piranosidica, e una proteica, attribuita alla presenza di acido poli- γ -glutammico. Esso è solubile in acqua e stabile ad elevate temperature (fino a 220°C), caratteristiche che lo rendono potenzialmente interessante per varie applicazioni biotecnologiche, come la sintesi "green" di nanoparticelle metalliche con attività antibatterica.

Per la sua composizione chimica, l'EPS è in grado di assorbire differenti forme di Arsenico (As^{III} e As^V) e il coinvolgimento di vari gruppi funzionali (cioè O-H, C=O, C-O, C=C e N-O) in tale assorbimento è stato dimostrato mediante tecniche spettroscopiche. Inoltre, come valutato mediante

un test della bioluminescenza, la presenza dell'EPS ha ridotto più del doppio la tossicità dell'arsenico, suggerendo un ruolo protettivo contro entrambe le forme di arsenico. Pertanto, l'EPS B3-15 potrebbe essere utilizzato, senza ulteriori trattamenti chimici, nel biorisanamento dell'arsenico come alternativa ecologica ai metodi fisici o chimici.

Oltre agli EPS, altre biomolecole con attività tensioattiva ed emulsionante stanno guadagnando crescente attenzione in diversi campi di applicazione, come il biorisanamento, l'industria farmaceutica e cosmetica, perché sono alternative ecocompatibili alle loro controparti prodotte industrialmente.

Quando coltivato in un differente terreno di coltura e alle idonee condizioni di crescita, il ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 è in grado di produrre un biosurfattante (BS B3-15) strutturalmente simile alla lichenisina con varie applicazioni biotecnologiche. Infatti, grazie alle sue capacità emulsionanti e di rimuovere oli da tessuti di cotone, esso potrebbe essere utilizzato nei trattamenti di terreni o di tessuti di cotone contaminati idrocarburi.

Senza mostrare attività antibatterica e citotossicità su cellule umane, sia l'EPS B3-15 che il BS B3-15 hanno mostrato, a basse concentrazioni (300 µg/ml) attività antibiofilm contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, batteri patogeni selezionati come organismi modello, con meccanismi coinvolti nella loro attività correlati alla diminuzione dell'idrofobicità dei patogeni e all'inibizione sia dell'adesione cellulare a superfici biotiche e abiotiche che dell'autoaggregazione cellula-cellula.

L'EPS B3-15 ha, inoltre, mostrato attività antibiofilm contro *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*, selezionati in quanto patogeni umani delle vie respiratorie.

Infine, la combinazione dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 possedeva un'attività antibiofilm e antiadesiva su differenti superfici sui batteri patogeni testati superiore rispetto a quelle delle biomolecole testate singolarmente.

Come composti solubili in acqua, non citotossici, biodegradabili e biocompatibili, l'EPS B3-15 e il BS B3-15 possiedono un'ampia gamma di possibili applicazioni biotecnologiche in ambito ambientale e biomedico.

Introduzione

Gli ambienti estremi

Gli habitat in cui le condizioni ambientali (ad esempio temperatura, concentrazione di ossigeno, salinità, acidità, ecc.) sono ritenute proibitive per la vita sono definiti ambienti “estremi”. Di contro viene definito “normale” un habitat in cui la temperatura è compresa tra i 4 e i 40°C, il valore del pH tra 5 e 8,5 e la salinità tra quella dell'acqua dolce (< 0,2 M NaCl) e quella del mare (circa 0,5 M NaCl). Diventa così naturale definire “organismi estremofili” qualsiasi forma di vita le cui condizioni ottimali di crescita sono differenti da quelle presenti in habitat “normali”. L'effetto più evidente delle caratteristiche fisico-chimiche degli ambienti estremi sul biota è quello di limitare la presenza degli eucarioti che rispetto ai procarioti sono meno tolleranti ai forti gradienti (Maugeri et al., 2009). La maggior parte degli estremofili quindi è costituita da microrganismi procarioti appartenenti ai domini dei *Batteri* ed *Archea* (Figura 1).

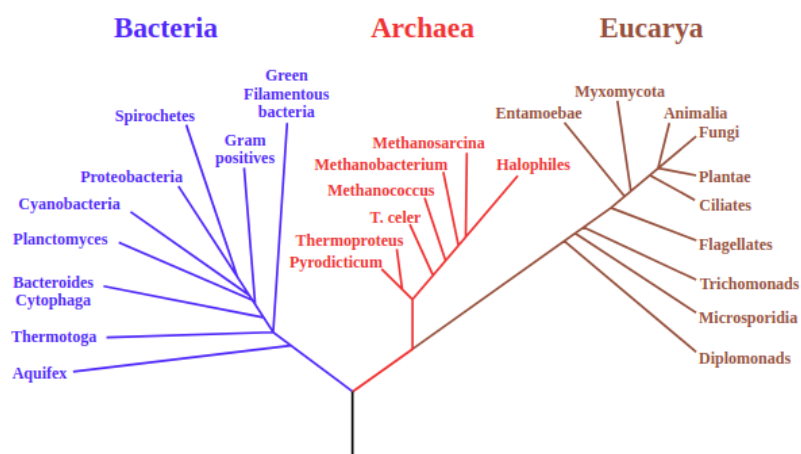


Figura 1: Albero filogenetico universale

Tra gli ambienti estremi, quelli marini offrono una straordinaria diversità microbica e rappresentano una fonte quasi inesplorata di microorganismi produttori di biomolecole (ad es. geni, enzimi, lipidi,

polimeri, soluti compatibili e antibiotici) che hanno funzioni utili *in situ* e possiedono un'ampia varietà di proprietà che spesso non sono riscontrate nelle loro controparti terrestri.

Meccanismi di resistenza degli organismi estremofili

I batteri estremofili hanno dovuto sviluppare molteplici meccanismi di resistenza e di adattamento necessari per contrastare lo stress incontrato nei propri habitat. Esplorare la diversità microbica di questi ambienti ed indagare quali siano questi meccanismi di adattamento risulta fondamentale per comprendere come questi microorganismi riescano a sopravvivere in queste condizioni estreme.

Una strategia di resistenza che gioca un ruolo chiave nell'affrontare condizioni fisico-chimiche estremi è la produzione di biofilm. Il biofilm è una comunità organizzata di cellule batteriche racchiuse in una matrice extracellulare prodotta dalle stesse cellule e composta principalmente da esopolisaccaridi (EPS) (40-95%), proteine (1-60%), DNA extracellulare (1-10%) e lipidi (1-40%) (Fleming et al., 2023; Karygianni et al., 2020). La formazione del biofilm è un processo complesso che inizia con l'adesione delle cellule batteriche a superfici solide, che dipende dalle interazioni fisico-chimiche, dalle caratteristiche della superficie abiotica o biotica, dalle proprietà della superficie cellulare e dall'idrofobicità (Elbourne et al., 2019; Kreve e Dos Reis, 2022). La colonizzazione delle superfici e la formazione del biofilm consta generalmente di cinque passaggi (Monds e O'Toole, 2009): (i) attacco reversibile: le cellule planctoniche si legano debolmente al substrato mediante interazioni deboli come interazioni elettrostatiche o idrofobiche e forze di van der Waals; (ii) attaccamento irreversibile: le cellule aderiscono stabilmente al substrato e formano ammassi di cellule; (iii) maturazione del biofilm-1: i cluster cellulari maturano e diventano progressivamente stratificati, incorporati nella matrice esopolisaccaridica autoprodotta, questa fase è accompagnata dall'attivazione della segnalazione di *quorum sensing*; (iv) maturazione del biofilm-2: i cluster cellulari raggiungono il loro massimo spessore; (v) dispersione del biofilm: le cellule lasciano la struttura del biofilm per contaminare altre superfici.

Risulta evidente come gli EPS giochino quindi un ruolo chiave tanto nella capacità dei batteri di produrre biofilm, quanto nel permettere ai batteri estremofili di sopravvivere negli ambienti estremi.

Esopolisaccaridi batterici

Gli EPS sono biopolimeri ad alto peso molecolare che (generalmente da 10 a 1000 kDa) costituiti da lunghe catene di glucidi, generalmente esosi e pentosi, legati mediante legami glicosidici (Kaur e Dey, 2023) con composizione variabile e possono presentarsi come una capsula che circonda la cellula batterica dove i polimeri sono legati covalentemente alla superficie cellulare o come ammassi mucosi (*slime* e biofilm) che si trovano nel mezzo extracellulare come matrice amorfa e che rimangono soltanto debolmente legati alla superficie cellulare (Poli et al., 2010). Questi polimeri possono avere come costituenti anche zuccheri carbossilati come acidi uronici e amminozuccheri, o elementi non glucidici come proteine, lipidi, piruvati, esteri, acidi nucleici e cationi quali Ca^{II} e Mg^{II} . Sebbene questi elementi siano presenti in quantità relativamente basse essi conferiscono agli EPS proprietà uniche. Il tipo, la distribuzione e la frequenza dei diversi gruppi funzionali nell'EPS influenza la sua struttura terziaria, le sue caratteristiche chimico-fisiche nonché le interazioni con l'ambiente circostante (Decho, 1990). Ad esempio, gli acidi uronici conferiscono agli EPS una carica netta negativa che attribuisce al polimero capacità chelanti ed adsorbenti (Mancuso Nichols et al., 2005).

La produzione di EPS è un processo notevolmente dispendioso per le cellule, in quanto richiede un elevato investimento di energia (Wolfaardt et al., 1999). Ma tale sforzo viene ampiamente ricompensato viste le svariate funzioni ecologiche e fisiologiche che questi polimeri svolgono. Oltre che nell'adesione a superfici solide, nella formazione e nella stabilizzazione dei biofilm e nell'aggregazione cellulare essi contribuiscono alla protezione delle cellule dall'essiccamento grazie alla capacità di ritenzione dell'acqua, dalla predazione, fungono da barriera protettiva contro biocidi o particelle virali e possono fungere da riserva di composti organici o inorganici (Wotton, 2004).

Biosurfattanti batterici

Le molecole tensioattive (SAM) sono prodotte da un'ampia varietà di microrganismi per aumentare la biodisponibilità dei composti idrofobici come potenziali fonti di carbonio ed energia (Kaczorek et al., 2018). Quelle di origine batterica possono essere distinte in due diverse classi in base al loro peso molecolare: biotensioattivi (BS) che comprendono lipopeptidi, glicolipidi e fosfolipidi, e sono composti caratterizzati da un basso peso molecolare e dalla capacità di ridurre efficacemente sia la tensione superficiale che quella interfacciale (De Franca et al., 2015; Janek et al., 2013; Perfumo et al., 2010), e bioemulsionanti che, invece, sono in grado di emulsionare efficacemente substrati idrofobici e hanno un peso molecolare più elevato, poiché sono costituiti da una miscela di biopolimeri (come polisaccaridi, lipopolisaccaridi, lipoproteine e proteine) (Perfumo et al., 2010; Smyth et al., 2010; Varvaresou e Iakovou, 2015). Rispetto ai tensioattivi sintetizzati industrialmente, le SAM di origine batterica possiedono migliori proprietà di emulsione, detergenza e dispersione e suscitano grande interesse in diversi campi di applicazione, tra cui il biorisanamento, la biodegradazione e il recupero del petrolio, nonché le industrie farmaceutiche, alimentari, di prodotti cosmetici e detergenti (Banat et al., 2010; De Almeida et al., 2016; Franzetti et al., 2010; Gudina et al., 2015).

Biopolimeri da batteri estremofili e loro vantaggi

L'interesse sempre crescente verso i microrganismi che abitano gli ambienti estremi sta principalmente nel fatto che per vivere e prosperare in condizioni così difficili essi hanno sviluppato meccanismi fisiologici altamente specializzati e producono biomolecole con proprietà strutturali uniche che fanno intravedere potenziali applicazioni in vari campi delle biotecnologie.

L'impiego delle biomolecole derivanti da microrganismi termofili in campo industriale, in cui vengono utilizzati processi ad alta temperatura, risulta particolarmente utile perché:

- ❖ riduce il rischio di contaminazione;
- ❖ aumenta la velocità di trasformazione;

- ❖ riduce la viscosità;
- ❖ aumenta la solubilità dei substrati.

Come precedentemente sottolineato, gli EPS, per le loro caratteristiche, per le svariate funzioni fisiologiche che essi svolgono e per il ruolo cruciale che essi hanno nel contribuire alla sopravvivenza dei microrganismi che vivono in condizioni estreme, sono fra tutte le biomolecole, tra le più interessanti e promettenti dal punto di vista biotecnologico.

A differenza degli EPS prodotti dai mesofili, molti dei quali sono patogeni, i microrganismi termofili non sono patogeni e forniscono prodotti ideali per applicazioni biotecnologiche (Nicolaus et al., 2010). Nonostante ciò, per quanto alto possa essere il potenziale industriale e biotecnologico di un nuovo EPS, perché esso trovi il suo posto nel mercato dei polimeri è importante che esso venga prodotto con dei costi che siano economicamente vantaggiosi. Quindi ottenere alti livelli e bassi costi di produzione è di fondamentale importanza per poter competere con i prodotti sintetici petrolchimici già sul mercato (Nicolaus et al., 2010).

Sono stati isolati microrganismi produttori di EPS in differenti nicchie ecologiche, ma indiscutibilmente la maggiore fonte è rappresentata dall'ambiente marino e in particolar modo dalle sorgenti idrotermali marine (Collic-Jouault et al., 2004; Guezennec, 2002).

Le sorgenti idrotermali marine delle isole Eolie

Le sorgenti idrotermali marine sono ambienti estremi che rappresentano siti di grande interesse per lo studio dei microrganismi. Le sorgenti idrotermali sottomarine sono formazioni vulcaniche presenti lungo le linee di collisione delle zolle continentali (Lonsdale, 1977). I siti idrotermali marini sono presenti in zone tettonicamente attive e sono ampiamente diffusi nel mondo (Figura 2).

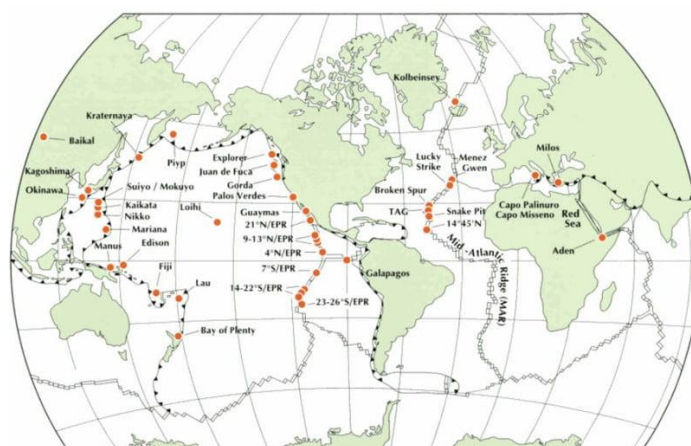


Figura 2: Mappa dei principali siti di idrotermalismo del pianeta.

Le sorgenti idrotermali si originano in prossimità delle dorsali in cui il basalto in via di raffreddamento e il magma sono molto vicini al fondo marino e formando nuova crosta terrestre determinano lo slittamento laterale della piattaforma basale. L'acqua marina filtra attraverso le fratture presenti in queste zone mescolandosi con i minerali, la cui temperatura è molto elevata, formando così il fluido idrotermale che viene poi emesso dalle sorgenti.

Nell'ambiente marino le sorgenti idrotermali vengono distinte in profonde (*deep vents*) e in superficiali (*shallow vents*) (Tarasov et al., 2005). Il confine tra esse è stato stabilito ad una profondità di 200 m, che corrisponde a quella in cui si ha un brusco cambiamento dei parametri ambientali e della struttura delle comunità biotiche. A differenza dei siti profondi, le sorgenti idrotermali marine superficiali sono ambienti più facili da raggiungere pur essendo altrettanto idonei allo sviluppo dei microrganismi estremofili.

Il Mar Mediterraneo presenta siti di idrotermalismo costiero poco profondi localizzati sia ad Est, nel Mar Egeo (Isola di Milos) che ad Ovest, nel Mar Tirreno, nell'area flegrea (golfo di Napoli) a capo Palinuro (Salerno) ed intorno alle Isole Eolie (Gugliandolo et al., 2006; Maugeri et al., 2009). Batteri appartenenti al genere *Bacillus*, noti per la loro tolleranza, sono ampiamente diffusi negli ambienti estremi come le sorgenti idrotermali (Gurunathan et al., 2021). Tra i batteri termofili e termotolleranti presenti in questo tipo di habitat, diversi studi sulla diversità microbica utilizzando terreni non

selettivi e selettivi per isolare e identificare batteri mediante sequenziamento del 16S rDNA hanno indicato il phylum *Firmicutes*, famiglia *Bacillaceae*, genere *Bacillus* come gruppo dominante (Gurunathan et al., 2021; Prieto Barajas et al., 2017).

Le sorgenti idrotermali sottomarine delle Isole Eolie (Figura 3) sono caratterizzate da emissioni di gas e di acque calde, con temperature fino a 130°C.



Figura 3: Mappa delle Isole Eolie

La comunità microbica del sistema idrotermale superficiale dell'isola di Panarea è stata studiata mediante combinazione di conteggi diretti, tecniche colturali e molecolari (Maugeri et al. 2009). L'utilizzo delle tecniche colturali ha portato all'isolamento di diversi ceppi termofili, termoresistenti e sporigeni identificati come appartenenti ai generi *Bacillus* e *Geobacillus*, noti per la loro capacità di prosperare in habitat simili. Una ricerca in cui è stata studiata la struttura e la composizione della comunità procariotica di un sito idrotermale denominato Black Point, al largo dell'isola di Panarea utilizzando tecniche molecolari (Illumina sequencing) ha riportato che il phylum *Firmicutes* (che comprende i bacilli) costituisce un gruppo filogenetico altamente diffuso nelle sorgenti idrotermali superficiali delle Isole Eolie (Lentini et al., 2014). In Tabella 1 è riportato un elenco di batteri appartenenti ai generi *Bacillus* e *Geobacillus* isolati dalle sorgenti idrotermali delle Isole Eolie.

Tabella 1: Ceppi appartenenti ai generi *Bacillus* e *Geobacillus* isolati dalle sorgenti idrotermali delle Isole Eolie.

Ceppo	Sito di isolamento	Bibliografia
<i>Bacillus aeolius</i> sp.nov.	Vulcano, Punta Conigliara	Gugliandolo et al., 2003
<i>Bacillus horneckiae</i> SBP3 DSM 103062	Panarea, Black point	Gugliandolo et al., 2012 Zammuto el., 2018
<i>Bacillus licheniformis</i> B3-15	Vulcano, Porto di levante	Maugeri et al., 2002a
<i>Bacillus licheniformis</i> T14	Panarea, Bottaro	Spanò et al., 2013
<i>Bacillus oceanosedimis</i> APA DSM 103063	Panarea, Campo 7	Gugliandolo et al., 2012 Zammuto el., 2018
<i>Geobacillus</i> sp. 1bw	Vulcano, Porto di levante	Maugeri et al., 2002b
<i>Geobacillus</i> sp. 5-2	Lipari, Inzolfata	Maugeri et al., 2002b
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> B3-72	Vulcano, Porto di levante	Nicolaus et al., 2000
<i>Geobacillus</i> sp. 10-1	Stromboli, Zurro	Maugeri et al., 2002b
<i>Geobacillus thermoleovorans</i> subsp. <i>stromboliensis</i> subsp. nov.	Stromboli, Pizzo sopra la Fossa	Romano et al., 2005

Questi microrganismi, oltre alla termofilia, hanno mostrato di possedere caratteristiche fisiologiche e processi metabolici altamente specializzati. In particolare, questi ceppi hanno mostrato elevata versatilità fisiologica, dimostrata dalla loro capacità di crescere in ampi range di temperatura, pH e concentrazione di NaCl, spesso sono capaci di crescere utilizzando idrocarburi come unica fonte di carbonio e sono dotati di resistenza a vari metalli pesanti. Inoltre, alcuni bacilli possiedono attività enzimatiche poco diffuse tra i microrganismi termofili quali idrolasi, lipasi e proteasi (Lentini et al., 2007; Zammuto et al., 2022).

Esopolisaccaridi prodotti da batteri termofili isolati dalle sorgenti delle Isole Eolie e loro applicazioni biotecnologiche

Numerosi batteri appartenenti ai generi *Bacillus* e *Geobacillus* isolati dalle sorgenti idrotermali delle isole Eolie sono stati riportati come in grado di produrre EPS. Un elenco di EPS prodotti da batteri isolati dalle sorgenti idrotermali marine delle isole Eolie, le loro principali caratteristiche chimiche e le loro possibili applicazioni biotecnologiche sono riportati nella Tabella 2.

Tabella 2: Elenco di alcuni EPS prodotti da microrganismi isolati dalle Isole Eolie, loro principali caratteristiche chimiche e le loro possibili applicazioni biotecnologiche.

Microorganismo	Origine	Composizione monosaccaridica	Caratteristiche della struttura chimica	Applicazioni biotecnologiche	Bibliografia
<i>Bacillus horneckiae</i> SBP3 DSM 103063	Panarea, Isole Eolie	N.D.	N.D.	Agente idratante	Gigliandolo et al., 2012 Caccamo et al., 2022
<i>Bacillus licheniformis</i> B3-15	Vulcano, Isole Eolie	Man	Unità ripetuta tetrasaccaridica con una configurazione manno-piranosidica	Attività antivirale	Maugeri et al., 2002a Arena et al., 2006 Spanò and Arena 2016 Gugliandolo et al., 2015 Scala et al., 2019 Caccamo et al., 2020
<i>Bacillus licheniformis</i> T14	Panarea, Isole Eolie	Fru/Fuc/Glu/GalN/Man (1.0:0.75:0.28:tr:tr)	Unità ripetuta trisaccaridica con una configurazione β -manno-piranosidica	Attività antivirale, immunostimolante ed antibiofilm	Spanò et al., 2013; 2016 Gugliandolo et al., 2014; 2015 Caccamo et al., 2018 Scala et al., 2019
<i>Geobacillus thermodenitrificans</i> B3-72	Vulcano, Isole Eolie	Man/Glc (1:0.2).	Unità ripetuta trisaccaridica con una configurazione manno-piranosidica	Attività immunoregolatrice ed antivirale	Nicolaus et al., 2000 Arena et al., 2009 Gugliandolo et al., 2015

N.D.= non determinato

L'EPS prodotto dal ceppo *B. horneckiae* SBP3 DSM 103063 ha mostrato capacità di trattenere acqua con conseguenti possibili applicazioni in ambito agricolo, cosmetico o alimentare (Caccamo et al. 2022). Gli EPS prodotti dal *B. licheniformis* T14 e dal *Geobacillus thermodenitrificans* B3-72, caratterizzati chimicamente in collaborazione con l'Istituto di Chimica Biomolecolare del CNR di Pozzuoli, hanno mostrato attività stimolante dell'immunità cellulo-mediata e attività antivirale contro

l'*Herpes virus* di tipo 2. Tali EPS potrebbero essere potenzialmente usati nella terapia di soggetti immunocompromessi quali agenti immunomodulatori (Arena et al., 2009; Gugliandolo et al., 2014; 2015). L'EPS-T14 inoltre ha mostrato attività antibiofilm contro isolati clinici multiresistenti di *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, e *Staphylococcus aureus* (Spanò et al., 2016).

***B. licheniformis* B3-15 produttore dell'EPS B3-15 e sue applicazioni biotecnologiche**

In questo studio ci siamo focalizzati sul ceppo *B. licheniformis* B3-15, isolato da una sorgente idrotermale superficiale dall'isola di Vulcano (Arcipelago delle Isole Eolie) nel sito Porto di Levante (Maugeri et al., 2002a). Il ceppo è già stato riportato come un batterio caratterizzato da un'elevata versatilità fisiologica e dalla capacità di resistere a vari stress di tipo fisico-chimico, come dimostrato dalla sua capacità di tollerare elevate temperature e concentrazioni di sale e la presenza di idrocarburi e di metalli pesanti (Maugeri et al., 2002a). Il ceppo inoltre è stato precedentemente riportato come in grado di produrre un EPS (EPS B3-15) con varie possibili applicazioni in ambito biotecnologico, per la sua attività antivirale, immunostimolante, immunomodulatoria, la sua resistenza ad alte temperature e il possibile utilizzo nella produzione e nella stabilizzazione di nanoparticelle di Au e Ag con attività antimicrobica (Arena et al., 2006; Caccamo et al., 2020; Gugliandolo et al., 2015; Maugeri et al., 2002a; Scala et al., 2019; Spanò and Arena, 2016).

Nuove possibili applicazioni biotecnologiche dei biopolimeri prodotti dal *Bacillus licheniformis* B3-15

Bioremediation dell'As

I metalli pesanti (Pb^{II} , Cr^{II}/Cr^{III} , Cd^{II} , Ni^{II}/Ni^{IV} , Zn^{II} , Cu^{II} , Hg^{II} ecc.) sono elementi naturali caratterizzati da una densità relativamente elevata rispetto all'acqua (Tchounwou et al., 2012). Alcuni di essi come Cu^{II} , Zn^{II} , Fe^{II}/Fe^{III} ecc. a concentrazioni notevolmente basse sono essenziali per

numerosi processi biologici vitali. Tuttavia, manifestazioni tossicologiche possono insorgere anche a concentrazioni di poco superiori rispetto alle concentrazioni fisiologiche. A causa delle loro applicazioni industriali su larga scala (prodotti farmaceutici, pesticidi, plastica, gomme, conterie, prodotti chimici organici e prodotti del legno), la presenza di forme libere di metalli pesanti in ambienti sia terrestri che acquatici è in continuo aumento (Lakherwal et al., 2014). La loro elevata solubilità in acqua innesca processi quali il bioaccumulo e la biomagnificazione che può portare a rischi per la salute umana in alcuni casi irreversibili (tra cui la potenziale cancerogenicità) anche a concentrazioni molto basse. Inoltre, hanno un impatto negativo sull'ambiente a causa della loro natura recalcitrante e non biodegradabile e della loro capacità, a determinate condizioni, di trasformarsi in forme chimiche maggiormente tossiche (Gupta e Diwan, 2017; Wang et al., 2006).

Fra i metalli pesanti, l'arsenico (As) è un metalloide diffuso nell'ambiente, di origine sia geogenica che antropica, la cui tossicità dipende dalla sua concentrazione e dalla forma chimica in cui si trova (Shaji et al., 2021). Le forme prevalenti e più tossiche nei sistemi acquosi sono l'arsenito (As^{III}), che è presente in condizioni anossiche o ridotte, e l'arsenato (As^{V}), che prevale nei suoli e nelle acque superficiali caratterizzate da una maggiore presenza di ossigeno (Smedley e Kinniburgh, 2013). Il consumo di acqua contenente concentrazioni di As sopra la norma può avere gravi ripercussioni sulla salute umana, provocando lesioni cutanee o varie forme tumorali (al cervello, al fegato, ai reni e allo stomaco). Pertanto, in diverse parti del mondo la presenza di As nell'acqua ne limita il suo possibile utilizzo come acqua potabile o per altri fini (Casentini et al., 2019; Leon et al., 2018; Singh et al., 2015). La Direttiva Europea 98/83/CE ha imposto il limite di As nell'acqua potabile a 10 $\mu\text{g}/\text{l}$. Le strategie convenzionali per la bonifica dell'acqua e del suolo sono costose e di solito generano sottoprodotti tossici con impatti negativi sugli ecosistemi. Pertanto, vi è un crescente interesse verso l'utilizzo di approcci di tipo biologico, più sicuri e a minore impatto ambientale, come il bioassorbimento, che prevede l'assorbimento dell'As mediante l'utilizzo di biomassa microbica e/o delle biomolecole prodotte da batteri (Gupta e Diwan, 2017).

In generale, i microrganismi che vivono in presenza di concentrazioni tossiche di As hanno sviluppato strategie di resistenza che includono sia meccanismi specifici, che coinvolgono reazioni metaboliche ed enzimatiche (Gupta e Diwan, 2017; Pintor et al., 2012), che aspecifici. Le vie metaboliche che conferiscono resistenza ai batteri sono codificate da geni che permettono la riduzione dell'arsenato (sistema *ars*) e l'ossidazione dell'arsenito (sistema *aiO*). Tra i meccanismi non specifici, la produzione di EPS contribuisce alla resistenza o alla tolleranza microbica all'As (Alluri et al., 2007; Leon et al., 2018; Wei et al., 2020). Gli EPS hanno attività di bioassorbimento per vari ioni metallici, tra cui l'As, ne favoriscono il sequestro e quindi impediscono loro di attraversare la parete e la membrana cellulare e di entrare quindi nella cellula (Gupta e Diwan, 2017). Come detto precedentemente, la presenza negli EPS di piccole proporzioni di proteine e acidi uronici carichi negativamente è strettamente correlata alla loro capacità di interagire con ioni metallici carichi positivamente e con la conseguente loro immobilizzazione, permettendo quindi il loro bioassorbimento.

Attività antibiofilm

Oltre a contribuire alla sopravvivenza degli estremofili in ambienti estremi, i biofilm conferiscono alle cellule batteriche una minore suscettibilità ai disinfettanti e agli agenti antimicrobici e le proteggono dalla risposta immunitaria dell'ospite, dando origine a infezioni croniche e ricorrenti notoriamente difficili da debellare.

Tipicamente in un'infezione batterica caratterizzata dalla presenza di biofilm, dopo l'attaccamento iniziale a un supporto solido, avvenuto durante le prime ore, i batteri formano delle microcolonie. Così, pochi microrganismi sessili aderenti, a seconda delle proprietà della superficie del substrato, favoriscono l'adesione di altri batteri fluttuanti, nel cosiddetto fenomeno detto di "co-adesione".

Tra i batteri patogeni in grado di produrre biofilm in questo studio l'attenzione è stata rivolta a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 e *Staphylococcus aureus* 29213.

P. aeruginosa ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 29213 sono considerati tra i batteri patogeni modello produttori di biofilm clinicamente più significativi (Rizzo, et al., 2021; Spagnuolo et al., 2022).

La formazione del biofilm in *P. aeruginosa* dipende da una serie di strutture cellulari coordinate e di specifiche vie metaboliche. I lipopolisaccaridi delle membrane esterne e le appendici extracellulari, come flagelli, pili di tipo IV e Cup fimbrie, sono coinvolti nell'attaccamento batterico iniziale ad una superficie solida (Berne et al., 2015). Inoltre, sia il rilevamento batterico che la risposta alle superfici dopo l'attaccamento iniziale, rappresentano passaggi cruciali nella formazione del biofilm. La transizione da mobile a sessile è spesso associata a (i) formazione di biofilm, (ii) motilità repressa, (iii) adesione irreversibile e (iv) produzione di EPS (Guttenplan e Kearns, 2013). L'adesione reversibile è determinata in alcuni ceppi di *Pseudomonas* da proteine in grado di legare carboidrati, le cosiddette lectine. In *P. aeruginosa* sono stati identificati due tipi di lectine, PA-IL e PA-IIL, sintetizzate rispettivamente dai geni *lecA* e *lecB* (Cooley et al., 2013; Franklin et al., 2011; Gajdos et al., 2022). PA-IIL è posizionato nella membrana esterna dove svolge un ruolo essenziale nell'adesione cellula-cellula e, indirettamente, nell'induzione della risposta del *quorum sensing* (QS). L'attivazione dei sistemi QS porta anche all'induzione di due geni, *pel* e *psl*, che codificano per la produzione di due EPS strutturalmente diversi, in grado di promuovere l'attaccamento irreversibile. Pel è stato descritto come un polisaccaride ricco di N-acetil glucosamina (GlcNAc) e N-acetil galattosamina (GalNAc) (Yin et al., 2022), mentre Psl, composto da subunità pentasaccaridica neutre che contiene mannosio, ramnosio e glucosio in un rapporto 3:1:1, con un ruolo essenziale nelle fasi preliminari della formazione del biofilm (Passos da Silva et al., 2019; Vandana, 2022).

Nella produzione di biofilm in *S. aureus*, l'attaccamento delle cellule alle superfici è mediato da proteine ancorate alla parete cellulare, inclusi i fattori di aggregazione ClfA e ClfB (Lu et al., 2022; Senok et al., 2020; Speziale et al., 2009). Anche l'espressione dell'operone *ica* è stata correlata alla produzione di polisaccaridi coinvolti nell'adesione (Harapanahally et al., 2015).

K. pneumoniae è un batterio gram-negativo, incapsulato, non mobile che risiede in ambienti quali suolo, acque superficiali e dispositivi medici (Navon-Venezia et al. 2017) e che è in grado di produrre

biofilm, di aderire a superfici della mucosa delle cavità corporee e di causare gravi infezioni generalmente soprattutto in pazienti immunocompromessi. Negli ultimi anni però, la recente comparsa e diffusione di ceppi ipervirulenti e resistenti ad un numero sempre maggiore di antibiotici ne ha ampliato il numero di individui soggetti a infezioni, includendo sempre più spesso anche individui sani e immunosufficienti (Paczosa e Meccas, 2016). Lo sviluppo di questi nuovi ceppi ha reso da una parte anche le più semplici infezioni, come quelle del tratto urinario, sempre più difficili da trattare, dall'altra le infezioni più gravi, come polmoniti e batteriemie, progressivamente sempre più pericolose per la sopravvivenza dei pazienti (Qian et al., 2020).

Str. pneumoniae, è un batterio Gram-positivo che causa varie malattie nell'uomo inizialmente colonizzando la rinofaringe umana formando biofilm (Simell et al., 2012) ed è responsabile di 1 milione di morti ogni anno (O'Brien et al., 2009). Esso può causare varie malattie quali meningiti batterica, polmoniti, otiti, sinusiti e congiuntiviti in bambini, anziani e soggetti immunocompromessi (Yadav et al., 2017).

Una conoscenza più approfondita delle fasi coinvolte nell'adesione e nello sviluppo del biofilm potrebbe aiutarci a capire come contrastare questo tipo di infezioni. La ricerca di nuove biomolecole in grado di prevenire l'adesione batterica iniziale e lo sviluppo dei biofilm potrebbe essere essenziale non solo per la tutela della salute umana, ma anche per le attività industriali e di trasformazione alimentare, in cui la formazione di biofilm rappresenta una grande problematica.

Sebbene coinvolti nella formazione del biofilm come principale costituente della matrice polisaccaridica che circonda le cellule, diversi EPS batterici sono anche in grado di contrastare l'adesione e la formazione del biofilm di un ampio spettro di batteri (Rendueles et al., 2013; Unepetty et al., 2022).

Scopo della tesi

Lo scopo della presente tesi è stato quello di approfondire le caratteristiche del ceppo *B. licheniformis* B3-15 e dei suoi biopolimeri (EPS B3-15 e BS B3-15), ottimizzandone la produzione e testandoli per differenti possibili applicazioni biotecnologiche. Nello specifico, gli obiettivi della tesi sono stati:

- i. verificare la resistenza del ceppo *B. licheniformis* B3-15 a diverse forme (As^{III} e As^{V}) e diverse concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) di As e alla presenza di differenti idrocarburi;
- ii. ottimizzare la produzione di EPS (EPS B3-15) del ceppo B3-15 e caratterizzare la biomolecola ottenuta mediante tecniche spettroscopiche;
- iii. verificare la capacità di adsorbimento dell'As dell'EPS B3-15 mediante *Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry* (GF-AAS) e identificare i gruppi funzionali coinvolti nell'interazione con l'As mediante *Attenuated Total Reflectance Fourier Transform Infrared* (ATR-FTIR);
- iv. valutare la capacità dell'EPS B3-15 di prevenire gli effetti tossici dell'As mediante il saggio di bioluminescenza;
- v. produrre un biosurfattante (BS B3-15) dal ceppo B3-15, ottimizzare la produzione, caratterizzare la biomolecola mediante tecniche spettroscopiche e analizzarne le proprietà;
- vi. valutare l'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 contro *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 29213, selezionati come ceppi patogeni modello clinicamente significativi tra i produttori di biofilm, su differenti superfici sia abiotiche che biotiche ed indagare i meccanismi di azione coinvolti nell'attività antibiofilm;
- vii. valutare l'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 contro *K. pneumoniae* ATCC 8047 e *Str. pneumoniae* ATCC 6303, selezionati come patogeni umani delle vie respiratorie;
- viii. testare l'attività sinergica dell'EPS e del BS B3-15 contro la capacità dei ceppi *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 29213 di aderire a differenti superfici sia biotiche che abiotiche, tra cui le lenti a contatto.

Materiali e Metodi

B. licheniformis ceppo B3-15

Sito di isolamento

Il ceppo *B. licheniformis* B3-15 è stato precedentemente descritto come produttore di un EPS (EPS B3-15) con varie applicazioni biotecnologiche (Arena et al., 2006; Caccamo et al., 2020; Maugeri et al., 2002a; Spanò and Arena, 2016). Il ceppo è stato isolato da un campione di acqua raccolto a 0.7 m di profondità da una sorgente idrotermale superficiale dall'isola di Vulcano (Arcipelago delle Isole Eolie) nel sito Porto di Levante (Figure 4-5). Il ceppo isolato in coltura pura è conservato presso il laboratorio di Ecologia Microbica del Dipartimento Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali in Tryptic Soy Agar (TSA, Sigma Aldrich, Milano, Italia) con l'aggiunta dell'1% di NaCl e congelato a -80°C in glicerolo al 40% per una conservazione a lungo termine.



Figura 4: Isola di Vulcano



Figura 5: Porto di Levante, isola di Vulcano

Caratteristiche fenotipiche

Le caratteristiche fenotipiche del ceppo B3-15 sono riportate in Maugeri et al., (2002a). Brevemente, il ceppo cresce aerobicamente fra i 25 e i 50°C con un optimum di 45°C, il range di crescita di pH è 5.5-9 con un optimum di 7 mentre quello di NaCl è 0-7% (w/v) con un optimum del 2% (Maugeri et al., 2002). Il ceppo è in grado di crescere in presenza dei seguenti metalli pesanti alle seguenti concentrazioni: Cd^{II} (120 µg/ml), Zn^{II} (150 µg/ml), As^V (1500 µg/ml) e Hg^{II} (1,5 µg/ml) (Maugeri et al., 2002a).

La Tabella 3 mostra le principali caratteristiche fenotipiche del ceppo B3-15, confrontate con quelle del ceppo di riferimento *B. licheniformis* DSM 13^T e del ceppo *B. licheniformis* T14, precedentemente isolato dall'isola di Panarea e identificato come appartenente alla specie *B. licheniformis*.

Tabella 3: Confronto delle caratteristiche fenotipiche del ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 con quelle dei ceppi *B. licheniformis* DSM 13^T e *B. licheniformis* T14, isolato dalla sorgente idrotermale dell'isola di Panarea, filogeneticamente più simili.

	<i>Bacillus licheniformis</i>		
	Ceppo B3-15 ^(a)	Ceppo T14	DSM 13 ^{T (b)}
Range di temperatura (°C)	25-60	25-60	15-55
Optimum di temperatura (°C)	45	50	37
Range di pH	5.5-9	4-10	5.5-7
Range di NaCl	0-7	2-10	3-10
Riduzione di nitrato a nitrito	-	+	+
Utilizzo di:			
Glucosio	+	+	-
Arabinosio	Nd	+	-
Produzione di acido da:			
L-arabinosio	-	+	+
L-xilosio	-	-	-
D-galattosio	-	+	+
D-glucosio	-	+	+
D-mannosio	+	+	+
Inositolo	-	+	+
D-mannitolo	-	+	+
D-sorbitolo	-	+	+
Metil- α D-glucopiranoside	-	+	+
Amigdalina	-	+	+
Arbutina	-	+	+
Salicina	-	+	+
D-cellobiosio	-	+	+
D-maltosio	-	+	+
D-melibiosio	+	-	-
D-saccarosio	-	+	+
Inulina	-	-	+
D-melezitosio	+	-	-
D-raffinosio	-	-	+
Glicogeno	-	-	+
Potassio 2-chetogluconato	+	-	-
Potassio 5-chetogluconato	+	-	-

^a Dati da Maugeri et al. (2002a)

^b Dati da Lentini et al. (2007)

Ulteriori caratteristiche fenotipiche sono state determinate come riportato in Zammuto et al., (2022).

L'idrolisi di Tween 20 (0,5% v/v) e Tween 80 (0,5% v/v) è stata testata sul terreno Sierra agar modificato (Sierra, 1957). La presenza degli enzimi esterasi (butirrato, C4), esterasi lipasi (caprilato,

C8) e lipasi (miristato, C14) è stata valutata utilizzando il sistema di test miniaturizzato API-ZYM (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia) in triplicato.

Per valutare la capacità dei ceppi di crescere in presenza di un idrocarburo come unica fonte di carbonio ed energia, un terreno di coltura minerale minimo contenente acqua di mare (NSW) è stato utilizzato. La composizione del terreno è stata la seguente: acqua di mare 800 ml/l; acqua distillata 200 ml/l, NH_4NO_3 1,0 g/l, K_2HPO_4 0,2 g/l, Fe-citrato 0,02 g/l. Il pH è stato aggiustato a 8 con NaOH 1N e il terreno è stato sterilizzato in autoclave a 121°C per 20 minuti. Cherosene (etere di petrolio 190–250 C, Panreac) o gasolio (dalla stazione di servizio Q8) mantenuti a 60°C, sono stati sterilizzati separatamente mediante filtrazione attraverso membrana 0,45 μm e aggiunti al terreno (2% v/v) (Maugeri et al., 2002b). I ceppi sono stati inoculati ($\text{OD}_{600\text{nm}} = 0,1$ equivalente a $1,5 \cdot 10^8$ batteri/ml) a 45°C per almeno 7 giorni e la crescita è stata valutata spettrofotometricamente (Ultraspec 3000; Amersham Pharmacia Biotech, Friburgo, Germania).

Caratteristiche genotipiche

La sequenza parziale del 16S rRNA è stata sottomessa alla GenBank sotto il seguente accession number: KC485000 (Maugeri et al., 2002a) ed ha mostrato una similarità elevata con il ceppo *Bacillus licheniformis* DSM 13.

Valutazione della resistenza del ceppo *B. licheniformis* B3-15 a diverse forme (As^{III} e As^{V}) e diverse concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) di arsenico

Il ceppo *B. licheniformis* B3-15 è stato testato per la sua capacità di crescere in presenza di diverse forme (As^{III} e As^{V}) e differenti concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) di As (Spanò et al., 2023). Per il test è stato utilizzato il terreno Marine Broth (MB, Condalab, Madrid, Spain) diluito un quarto ($\text{MB}^{1/4}$), per minimizzare la complessazione dei componenti organici presenti nel terreno con i metalli. Soluzioni di As alle concentrazioni finali sopra riportate sono state preparate sciogliendo opportune aliquote di NaAsO_2 (As^{III}) o $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (As^{V}) in acqua distillata e filtrandole con

membrane filtranti porose di nitrocellulosa con pori di diametro da 0.22 μm (Biogenerica, Catania, Italia).

Una coltura batterica overnight in Tryptone Soy Broth (TSB, Sigma Aldrich, Milano, Italia) con l'aggiunta dell'1% di NaCl (TSB1) incubata a 45°C è stata centrifugata a 8000 rpm per 10 minuti. Il pellet è stato risospeso in MB $\frac{1}{4}$ (OD $_{600\text{nm}}$ = 0,1) e inoculato (2 ml) in tubi contenenti (18 ml) As^{III}, As^V o senza As come controllo. I tubi sono stati incubati a 45°C in agitazione (200 rpm) e la crescita è stata valutata spettrofotometricamente (OD $_{600\text{nm}}$) dopo 24, 48 e 72 ore. Valori di assorbanza inferiori a 0,2 sono stati considerati come “nessuna crescita” (-), compresi fra 0,2 e 0,5 come “crescita moderata” (+), compresi 0,5 e 0,8 come “crescita media” (++), maggiori di 0,8 come crescita elevata (+++).

Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione dell'EPS B3-15

Produzione e ottimizzazione della produzione dell'EPS B3-15

Il ceppo *B. licheniformis* è stato precedentemente riportato come produttore di un EPS principalmente costituito da mannosio e glucosio con una resa di 165 mg/ml. Per aumentare la resa di EPS è stato utilizzato un nuovo terreno denominato SG17, la cui composizione è riportata in Tabella 4 (Spanò et al., 2023).

Tabella 4: Composizione del terreno SG-17

	Concentrazione (g/l)
NaCl	47,19
KCl	0,55
NaBr	0,07
H ₃ BO ₃	0,022
NaF	0,0024
NH ₄ Cl	1,07
K ₂ HPO ₄	0,8
KH ₂ PO ₄	0,2
NaHCO ₃	0,16
Yeast extract	1
Meat extract	1
Borate buffer 1 M	10
FeCl ₃ 6H ₂ O	0,001
MgSO ₄	1
SrCl ₂	0,01
Glucose	80
pH	7

Per ottenere l'EPS, dopo la crescita le cellule sono state allontanate mediante centrifugazione a 8000 rpm per 30 minuti con una centrifuga Beckman modello J-25 e rotore JA-14. Il supernatante (CFS) è stato filtrato con membrane filtranti (0,2 µm di porosità). Per confermare la totale assenza di cellule nel CFS, 100 µl sono stati seminati in piastre di TSA e incubate a 45°C per 24 ore. Per inattivare gli enzimi possibili responsabili della degradazione di EPS, il CFS è stato riscaldato a 100°C per 20 minuti. In seguito, il CFS è stato trattato con etanolo freddo concentrato al 96% (Carlo Erba) in rapporto 1:1 (v/v) aggiunto goccia a goccia e la miscela è stata incubata alla temperatura di -20°C per una notte. Il precipitato è stato recuperato mediante centrifugazione a 10000 rpm per 40 minuti a 4°C ed è stato sciolto in un volume di acqua distillata calda (80-90°C) pari a 1:10 del CFS iniziale. La soluzione acquosa contenente il precipitato è stata dializzata con membrane Spectra/Por MWCO (Molecular Weight Cut Off: 6,00-8,00) prima contro acqua di rubinetto per 48 ore e in seguito contro acqua distillata per 24 ore. Il dializzato è stato successivamente congelato, liofilizzato (liofilizzatore

LABCONCO, modello 4879030) e quindi pesato. I campioni di EPS (EPS B3-15) sono stati conservati a temperatura ambiente in un contenitore sterile ed anidro.

Caratterizzazione EPS B3-15

La caratterizzazione dell'EPS B3-15 ottenuto come sopra descritto è stata effettuata mediante risonanza magnetica nucleare ($^1\text{H-NMR}$ e $^{13}\text{C-NMR}$) e spettrofotometria infrarossa in riflettanza totale attenuata (ATR-FTIR) (Spanò et al., 2023). Gli spettri NMR dell'EPS (5 mg/ml in D_2O) sono stati registrati con uno spettrofotometro Varian 500MHz a temperatura ambiente e acetone- d_6 è stato utilizzato come controllo interno. Per l'ATR-FTIR, un'aliquota di 1 ml di una soluzione di EPS B3-15 in acqua ultrapura (concentrazione finale dell'EPS 300 $\mu\text{g/ml}$) è stata disidratata per evaporazione. Gli spettri sono stati registrati con uno spettrometro ATR-FTIR Vertex 70 V (Bruker Optics), che utilizza Platinum diamond ATR. Gli spettri sono stati ottenuti raccogliendo 48 scansioni con una risoluzione di 4 cm^{-1} nell'intervallo di lunghezze d'onda da 4000 a 400 cm^{-1} . Le seguenti procedure di pre-elaborazione sono state eseguite come riportato in Caccamo et al., (2020).

Applicazioni nella bioremediation dell'As dell'EPS B3-15

Valutazione della capacità dell'EPS B3-15 di assorbire As^{III} or As^{V} mediante GF-AAS

Le soluzioni sono state preparate in acqua ultrapura (resistività 18.2 MWcm) ottenuta con un sistema di purificazione Milli-Q (Semplicity, Newton, MA, USA, Millipore Milli-Q, Burlington, MA, USA). Tutta la vetreria è stata lavata con una soluzione di HNO_3 al 10% e sciacquata tre volte con acqua ultrapura. Polvere di palladio e $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ è stata fornita da Merck (Merck, Milan, Italy). Le soluzioni stock (100 ppm) di As sono state fornite da Agilent Technologies, Inc. (Santa Clara, CA, USA). Tutti i reagenti utilizzati erano di grado analitico (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

La determinazione dell'As nei campioni di acqua è stata effettuata in accordo con il metodo EPA 200.9, revisione 2.2, disponibile in formato elettronico dal seguente sito: <http://www.nemi.gov>.

Questo metodo riporta la procedura per la determinazione di 16 elementi chimici, tra cui l'As, mediante GF-AAS. In questo studio l'analisi è stata effettuata utilizzando uno spettrofotometro (AA Varian model 220/Zee-man) e un campionatore automatico a grafite (Varian Australia, Mulgrade, VIC, Australia) dotato di una lampada a catodo cavo a singolo elemento e di un modificatore di matrice contenente 0,015 mg di Pd e 0,01 mg di $Mg(NO_3)_2$. I dati sulla calibrazione e il settaggio dello strumento sono risultati accettabili (Tabella 5).

Tabella 5: Dati sulle prestazioni del metodo analitico

Dati sulle prestazioni	Risultati
Limite di rilevamento del metodo (MDL) ($\mu g/L$)	0.5
Limite di rilevamento dello strumento (IDL) ($\mu g/L$)	1.5
Linearità (R^2)	0.9991
Range di calibrazione ($\mu g/l$)	20–100
Recupero (%)	95

La capacità dell'EPS B3-15 di assorbire le diverse forme di As è stata valutata in accordo con Naveed et al. (2020) con alcune modifiche. L'EPS è stato disciolto in 2 ml di acqua ultrapura per ottenere due soluzioni con diverse concentrazioni finali (100 e 300 $\mu g/ml$). In seguito, le soluzioni di EPS sono state addizionate con una soluzione in acqua ultrapura di $NaAsO_2$ (As^{III}) o di $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (As^V) (concentrazione finale 2 mg/ml) con valori di pH rispettivamente di 7,8 e 7,4, e incubate a 30°C per 30 minuti in agitazione (150 rpm) per consentire il processo di bioassorbimento. Soluzioni As^{III} o As^V senza EPS sono state utilizzate come controllo. Tutte le soluzioni sono state dializzate attraverso una membrana cut-off da 6,00–8,00 kDa (SpectraPor®® Standard Grade RC) per 12 ore. L'As rimanente all'interno delle membrane dopo la dialisi (As legato all'EPS) è stato misurato mediante

spettrometria di assorbimento atomico e la percentuale di As assorbito dall'EPS è stata determinata mediante la seguente formula:

$$\text{As assorbito (\%)} = \frac{A_{se}}{A_{si}} \times 100$$

dove A_{se} rappresenta la concentrazione finale di As dopo la dialisi in presenza dell'EPS e A_{si} la concentrazione finale di As dopo la dialisi in assenza di EPS.

Valutazione dei cambiamenti della struttura chimica dell'EPS B3-15 in presenza di As^{III} o As^V mediante ATR-FTIR

Aliquote (100 μ l) di una soluzione di EPS B3-15 in acqua ultrapura (concentrazione finale 300 μ g/ml) sono state aggiunte in provette contenenti 900 μ l delle soluzioni madre di As^{III} o As^V preparate come descritto precedentemente alla concentrazione finale di 2 mg/ml. Le soluzioni sono state vortexate, incubate a temperatura ambiente per 30 minuti e infine disidratate per evaporazione. Gli spettri sono stati registrati come descritto precedentemente.

Effetti dell'EPS B3-15 sulla tossicità dell'As mediante saggio della bioluminescenza

La tossicità dell'EPS B3-15 è stata valutata mediante test di tossicità della bioluminescenza utilizzando il batterio luminoso *Vibrio harveyi* ceppo G5 (Zammuto et al., 2022). Il ceppo è stato inoculato nel terreno standard Sea Water Complete (triptone 5 g/l, estratto di lievito 3 g/l, glicerolo 3 ml/l, 250 ml/l di acqua di mare e 750 ml/l di acqua distillata) e incubato overnight a 28°C. Aliquote (80 μ l) di coltura overnight ($OD_{600nm} = 0,5$, equivalente a 5×10^8 batteri/ml) sono state versate nei pozzetti di una micropiastra da 96 pozzetti (Falcon®, Fisher Scientific, Milano, Italia) e 10 μ l di soluzione al 2% di NaCl di ciascuna forma di As (concentrazione finale compresa tra 500 e 4000

$\mu\text{g/ml}$) e $10\ \mu\text{l}$ di ogni soluzione stock di EPS B3-15 (100 o $300\ \mu\text{l/ml}$) sono state aggiunte a ciascun pozzetto. Pozzetti senza As o senza EPS sono stati utilizzati come controllo.

La luminescenza della sospensione cellulare è stata valutata dopo 15 minuti di incubazione a 25°C ed espressa come unità arbitrarie (u.a.). La tossicità è stata calcolata mediante EC_{50} , ovvero la concentrazione effettiva alla quale si è verificata una riduzione del 50% nell'emissione luminosa rispetto al controllo.

Screening per la capacità del *B. licheniformis* B3-15 di produrre e biosurfattanti

Saggio del blu di metilene

Il test dell'agar blu di metilene (BM), come test semiquantitativo per la rilevazione di tensioattivi anionici extracellulari, è stato utilizzato secondo quanto riportato in Siegmund e Wagner, (1991). Il blu di metilene è stato aggiunto al NSW agarizzato alla concentrazione finale di $0,2\ \text{mg/ml}$. Il ceppo è stato inoculato in tre repliche e dopo incubazione per 48 ore a 45°C , la formazione di un alone blu scuro attorno a ciascuna colonia è stata considerata positiva per la produzione di tensioattivo.

Curva di crescita e test dell'emulsione in differenti terreni di coltura e a differenti tempi

L'attività emulsionante sul kerosene dei CFS del ceppo B3-15 cresciuto aerobicamente in differenti terreni di coltura contenenti diverse fonti di azoto (organico o inorganico) e carbonio (saccarosio o glicerolo) è stata valutata come riportato da Cooper e Goldenberg, (1987), con alcune modifiche. I terreni utilizzati sono stati: NSW con l'aggiunta di cherosene ($2\% \text{ v/v}$) (NSW + KER); acqua di mare con aggiunta di estratto di lievito ($0,1\%$) e saccarosio (3%) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) (SWY + SAC), acqua di mare con l'aggiunta di estratto di lievito ($0,1\%$) e glicerolo (3%) (Sigma-Aldrich, Milano, Italia), (SWY + GLY), Marine Broth 2216 (MB), MB con l'aggiunta di glicerolo (3%) (MB + GLY) e MB con l'aggiunta di saccarosio (3%) (MB + SAC).

Il ceppo è stato inoculato ($\text{OD}_{600\ \text{nm}} = 0,1$) in triplicato in ogni terreno e incubato a 45°C con agitazione a 120 giri al minuto per 48 ore. Per ottenere i CFS, le brodoculture sono state centrifugate a $3800 \times g$

per 20 minuti a 4°C. Un'aliquota di ciascun CFS (2 ml) è stata miscelata con un egual volume di cherosene in un tubo di vetro (10 cm di altezza e 1 cm di diametro) e agitata nel vortex ad alta velocità per 2 minuti. I vari terreni non coltivati e Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Milano, Italia) sono stati utilizzati rispettivamente come controlli negativi e positivo. Dopo 24 ore, l'indice emulsionante (E_{24}) è stato calcolato come rapporto tra l'altezza dello strato di emulsione e l'altezza totale, moltiplicato per 100, e normalizzato dividendo i valori di E_{24} per le rispettive assorbanze (OD_{600nm}). Dopo 8, 20, 24, 30 e 48 ore sono stati valutati la crescita batterica spettrofotometricamente (OD_{600nm}) e l' E_{24} come descritto sopra.

Proprietà del supernatante del *B. licheniformis* B3-15

Per testare le proprietà tensioattive dei CFS è stata valutata la loro capacità di emulsionare differenti idrocarburi e oli vegetali e sono stati utilizzati il test di collasso della goccia d'olio e la riduzione della tensione superficiale (ST).

Test dell'emulsione in presenza di differenti idrocarburi e oli vegetali

Per valutare la capacità di emulsionare differenti idrocarburi e oli vegetali, 2 ml dei CFS risultati positivi ai test di screening sono stati miscelati con un egual volume di cloroformio, etil acetato, decano, benzina, esadecano, olio di ricino, olio di oliva o olio minerale. L' E_{24} è stata determinata come descritto precedentemente.

Test del collasso della goccia

Il test di collasso della goccia d'olio è stato effettuato su un coperchio in polistirene di una piastra da 96 micropozzetti. Brevemente, 100 μ l di CFS sono stati disposti sul coperchio della microplates, quindi 5 μ l di petrolio grezzo sono stati aggiunti alla superficie. La formazione di gocce piatte è stata considerata indice di produzione di biosurfattante.

Test della riduzione della tensione superficiale

La riduzione della ST è stata valutata (in triplicato) utilizzando il tensiometro digitale a piastre Wilhelmy K10T (Krüss, Amburgo, Germania) (Tuleva et al., 2005). È stata valutata la differenza fra la ST iniziale e finale, rispettivamente all'inizio e alla fine del tempo di incubazione di 48 ore.

Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione del BS B3-15

Produzione e ottimizzazione della produzione del BS B3-15

Per la produzione del BS B3-15, il ceppo B3-15 è stato coltivato nelle più idonee condizioni colturali determinate con i test fin qui descritti. Per estrarre il BS dal CFS, è stato utilizzato il metodo della precipitazione acida (Sharma et al., 2018). Il CFS è stato acidificato a pH 2,0 utilizzando HCl 2N, incubato per una notte, e sciolto in una miscela cloroformio-metanolo (2:1 v/v) e lo strato organico, contenente il BS, è stato separato utilizzando un processo di evaporazione con un rotavapor (Rotavapor® R-300, BUCHI Italia S.r.l, Cornaredo, Italia) e pesato.

Caratterizzazione del BS B3-15

Il BS liofilizzato è stato analizzato in triplicato mediante ATR-FTIR. Lo spettrometro ATR-FTIR Vertex 70 V (Bruker Optics GmbH & Co. KG, Ettlingen, Germania) che utilizza l'ATR con diamante in platino è stato impiegato per registrare gli spettri nell'intervallo di lunghezze d'onda da 4000 a 1000 cm^{-1} . L'analisi degli spettri IR è stata effettuata utilizzando il software OMNIC (Origin Lab Co., Northampton, MA, USA).

Proprietà del BS B3-15

La capacità dei BS di rimuovere differenti tipi di oli (minerale, grezzo e di ricino) da una matrice di tessuto di cotone è stata verificata mediante il test della rimozione dell'olio come riportato in Tripathi et al. (2020). Ciascun frammento di tessuto di cotone asciutto (2 cm × 2 cm) è stato imbevuto in uno degli oli selezionati (300 μl), lasciato ad asciugare per una notte a 60°C e quindi pesato. Ciascun

panno impregnato d'olio è stato lavato con una soluzione acquosa del BS B3-15 (1 g/l w/v) o con acqua di rubinetto come controllo negativo e incubato in agitazione a 30°C per 1 ora. I panni di cotone sono stati sciacquati in acqua (100 ml ciascuno) e asciugati a 60°C per una notte. La differenza di peso prima e dopo il trattamento con il BS B3-15 è stata misurata e la percentuale di rimozione dell'olio è stata calcolata come riportato da Chen et al., (2018).

Per valutare la capacità del BS B3-15 di modificare superfici idrofobiche a concentrazioni crescenti (da 0 a 1600 g/ml), l'angolo di contatto (θ) nella soluzione acquosa è stato misurato utilizzando la tecnica della goccia sessile. In breve, 5 μ l di BS B3-15 sono stati posti sul coperchio di una piastra per microtitolazione da 96 pozzetti, incubata a temperatura ambiente per 15 minuti e fotografata con una fotocamera ad alta risoluzione (Lowrence et al., 2014). Per misurare l'angolo (θ) sulle immagini della goccia sessile, le immagini sono state analizzate (in triplicato) utilizzando il software ImageJ 1.54d (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Sono stati calcolati il Drop Snake plugin, il valore medio e la deviazione standard.

Ceppi patogeni

I ceppi patogeni *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 sono stati acquistati dall'American Type Culture Collection (LGC Promochem). *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* sono stati mantenuti in Luria Bertani broth (LB, Sigma Aldrich, Milan, Italy) e LB agarizzato con l'aggiunta del 2% di agarosio (LA), *S. aureus* in TSB e in TSA, *Str. pneumoniae* ATCC 6303 in Brain heart infusion (BHI, Sigma Aldrich). In aggiunta, per una conservazione a lungo termine, i ceppi sono stati conservati a -80°C in glicerolo (40% v/v).

Attività antibatterica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15

I valori della concentrazione minima inibente (MIC) sono stati determinati in micropiastre da 96 pozzetti utilizzando il test della diluizione seriale, come accettato dall' "European Committee for

36

Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) dell’“European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (Eucast, 2003). Diluizioni seriali dell'EPS B3-15 (concentrazioni finali 2, 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/ml) e del BS B3-15 (concentrazioni finali 1, 0,5, 0,25 e 0,125 mg/ml) in Mueller Hinton Broth (MHB, Sigma Aldrich) sono state aggiunte ad opportune aliquote di una brodocoltura overnight ($OD_{600nm} = 0,1$) di ciascun ceppo ottenuta in MHB in pozzetti di micropiastre in polistirene da 96 pozzetti. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 24 ore e la crescita è stata stimata spettrofotometricamente (OD_{600nm}). Per confermare l’eventuale attività antibatterica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15, aliquote di 100 µl sono stati prelevati dai pozzetti in cui non vi era crescita visibile e sono stati inoculati su piastre di LA per *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*, di TSA per *S. aureus* e di BHI per *Str. pneumoniae* e incubate per una notte a 37°C.

Gli effetti dell'EPS B3-15 sulla crescita batterica dei ceppi patogeni testati sono stati determinati spettrofotometricamente. Aliquote (180 µl, $OD_{600nm} = 0,1$) di una coltura overnight di ciascun ceppo in MHB sono state distribuite in micropiastre in polistirene da 96 pozzetti (sei repliche) e a ciascun pozzetto sono stati aggiunti 20 µl di EPS B3-15 sciolti in tampone fosfato salino (PBS, Sigma Aldrich) alla concentrazione finale di 300 µg/ml o di PBS utilizzato come controllo. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 24 ore senza agitazione e valori di OD_{600nm} sono stati registrati ogni 2 ore.

Attività antibiofilm e meccanismi d’azione dell’EPS e del BS B3-15 contro *P. aeruginosa* e *S. aureus*, selezionati organismi modello

Attività antibiofilm dell’EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni

L'attività antibiofilm dell’EPS B3-15 e del BS B3-15 è stata valutata contro *P. aeruginosa* e *S. aureus*, selezionati come organismi modello, utilizzando micropiastre di polistirene a 96 pozzetti come precedentemente riportato da O'Toole et al. (2011). Colture overnight (180 µl) di *P. aeruginosa* coltivate in LB o di *S. aureus* coltivate in TSB sono state inoculate in pozzetti della micropiastra (6 repliche, $OD_{600nm} = 0,1$ equivalenti a $1,5 \times 10^8$ batteri/ml) e l’EPS B3-15 o il BS B3-15 (20 µl) disciolti in PBS, a diverse concentrazioni finali (50, 100, 200 o 300 µg/ml) o 20 µl di PBS come controllo,

sono stati aggiunti in ciascun pozzetto e le micropiastre sono state incubate a 37°C per 48 ore (per *P. aeruginosa*) o 24 ore (per *S. aureus*) senza agitazione. I batteri non aderenti sono stati rimossi lavando cinque volte con acqua distillata. I biofilm sono stati colorati con una soluzione di cristalvioletto allo 0,1% (w/v) per 20 minuti e il colorante in eccesso è stato eliminato mediante aspirazione, quindi, le piastre sono state lavate (5 volte) e asciugate all'aria (per 45 minuti). I biofilm colorati sono stati solubilizzati con etanolo assoluto e la massa del biofilm è stata determinata spettrofotometricamente (OD_{585 nm}) dal livello del cristalvioletto presente nella soluzione decolorante, utilizzando un lettore di micropiastre (Multiskan GO, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

La riduzione della formazione di biofilm di ciascun ceppo è stata espressa come attività antibiofilm (%) applicando la seguente formula:

$$\text{Riduzione della formazione di biofilm (\%)} = \frac{\text{OD}_{585\text{nm controllo}} - \text{OD}_{585\text{nm campione}}}{\text{OD}_{585\text{nm controllo}}} \times 100$$

Ogni valore è stato calcolato come media del valore di sei repliche ed è stata calcolata la deviazione standard (SD). La significatività statistica (**p ≤ 0,01 o *p ≤ 0,05) è stata determinata mediante ANOVA unidirezionale.

Attività dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi

Per valutare la capacità di interferire sulla formazione del biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus*, l'EPS B3-15 e il BS B3-15 alla concentrazione con la più alta attività antibiofilm, sono stati aggiunti in tempi diversi (0, 2, 4 e 8 ore) e dopo 48 ore per *P. aeruginosa* o 24 ore per *S. aureus*, quando il biofilm era completamente stabilito. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 48 ore (per *P. aeruginosa*) o 24 ore (per *S. aureus*) senza agitazione e la valutazione dell'attività antibiofilm è stata effettuata come descritto sopra.

Osservazione del biofilm e dell'attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 al microscopio confocale

Per osservare direttamente le strutture multicellulari nei biofilm sulla superficie del polistirene, con o senza l'aggiunta di EPS B3-15 o del BS B3-15, l'attività antibiofilm è stata valutata con microscopia confocale a scansione laser, utilizzando un microscopio TCS SP2 (Leica Microsystems Heidelberg, Mannheim, Germania), dotato di laser Ar/Kr, accoppiato ad un microscopio (Leica DMIRB). Aliquote (180 µl) di colture notturne ($OD_{600nm} = 0,1$) di *P. aeruginosa* in LB o *S. aureus* in TSB sono state distribuite in ciascun pozzetto contenente una striscia di polistirene sterile (0,5 cm × 1 cm) di una micropiastra a 96 pozzetti. Dopo l'aggiunta dell'EPS o del BS B3-15 (20 µl) disciolti in PBS (concentrazione finale 300 µg/ml), le micropiastre sono state incubate a 37°C per 48 ore (per *P. aeruginosa*) o 24 ore (per *S. aureus*). I batteri non attaccati sono stati rimossi mediante lavaggio con PBS e le cellule aderenti sulle strisce di polistirene sono state colorate con 20 µg/ml dei coloranti SYTO9 e ioduro di propidio (LIVE/DEAD Bac-light Thermo Fisher Scientific). Dopo incubazione a 30°C per 5 minuti al buio, le strisce sono state osservate al microscopio.

Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su un dispositivo medico in PVC

Per valutare la formazione di biofilm su un dispositivo medico in PVC è stato eseguito il saggio del cristalvioletto senza o in presenza di EPS B3-15 e del BS B3-15 a diverse concentrazioni (50, 100, 200 o 300 µg/ml) (Zammuto et al., 2023a). Segmenti sterili (1 cm × 0,5 cm) del tubo in PVC (diametro esterno e interno rispettivamente di 4,1 e 3 mm) (BENIFIS SRL, Genova, Italia) sono stati collocati in ciascun pozzetto di una micropiastra da 96 pozzetti, contenente 180 µl di ciascuna coltura ($OD_{600nm} = 0,1$) e sono stati aggiunti 20 µl di PBS come controllo o 20 µl di soluzione di EPS B3-15 o di BS B3-15 in PBS preparate per ottenere le concentrazioni finali sopra riportate. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 48 ore (per *P. aeruginosa*) o 24 ore (per *S. aureus*). Ciascun segmento di PVC è stato lavato con PBS, per rimuovere le cellule batteriche non aderenti, colorato con una soluzione di cristalvioletto allo 0,1% (v/v) e lavato (5 volte) con acqua distillata. Dopo essiccazione, i biofilm colorati sono stati solubilizzati con etanolo per 30 minuti a temperatura ambiente,

l'assorbanza della soluzione è stata misurata spettrofotometricamente (OD_{585nm}) e la riduzione della formazione di biofilm è stata calcolata come precedentemente riportato.

Effetti dell'EPS B3-15 B3-15 sull'adesione superficiale

Saggio di rivestimento (Coating assay)

Per valutare la capacità dell'EPS B3-15 di interferire con l'adesione dei ceppi patogeni su una superficie di polistirene, un volume di 20 μ l di una soluzione di EPS B3-15 sciolti in PBS o 20 μ l di PBS utilizzato come controllo, sono stati depositati al centro di ciascun pozzetto di una micropiastre in polistirene da 24 pozzetti (Falcon n. 353047) (Karwacki et al., 2013). Le piastre sono state incubate per 30 minuti a 37°C per consentire la completa evaporazione del liquido. Ciascun pozzetto è stato riempito con 1 ml di una coltura batterica overnight (contenente 10^5 CFU/ml) in LB per *P. aeruginosa* o TSB per *S. aureus*. Dopo incubazione a 37°C per 18 ore in condizioni statiche, i pozzetti sono stati svuotati delicatamente, lavati con acqua distillata e colorati con 1 ml di una soluzione di cristalvioletto allo 0,1% (w/v). I biofilm colorati sono stati lavati con acqua distillata e asciugati all'aria per rimuovere l'eccesso di cristalvioletto e infine fotografati.

Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)

Le proprietà superficiali delle cellule di *P. aeruginosa* e *S. aureus*, basate sul test dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH), sono state valutate come descritto in Bellon-Fontaine et al. (1996). Una coltura batterica overnight (in LB per *P. aeruginosa* o in TSB per *S. aureus*) a 37°C, è stata centrifugata ($8000 \times$ rpm per 10 min) per ottenere le cellule batteriche e il pellet è stato lavato due volte con PBS. Ogni sospensione batterica (2 ml) è stata trattata per 30 minuti con l'EPS B3-15 (300 μ g/ml in PBS) o con PBS come controllo. Le sospensioni batteriche trattate e non trattate sono state centrifugate ($6000 \times$ rpm per 10 min) e risospese in PBS ($OD_{400nm} = 0,5-0,7$) (A0). Aliquote di 3 ml di ciascuna sospensione batterica trattata e non trattata con l'EPS B3-15 sono state aggiunte a ciascuna provetta contenente 0,4 ml dei seguenti solventi idrofobici (Sigma Aldrich): acetato di etile, un

solvente fortemente basico; cloroformio, un solvente acido che presenta un carattere basico trascurabile; decano, un solvente non polare con attrazione intermolecolare paragonabile a quella dell'acetato di etile, ed esadecano, un solvente non polare con attrazione intermolecolare paragonabile a quella del cloroformio. Dopo vigorosa agitazione mediante vortex, le fasi sono state lasciate separare per 10 minuti a 30°C ed è stata misurata la densità ottica (OD_{400nm}) della fase acquosa (A1). Tutti i saggi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. La percentuale di affinità agli idrocarburi è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Affinità (\%)} = \frac{A0 - A1}{A0} \times 100$$

Aggregazione cellula-cellula

La valutazione delle interazioni cellula-cellula è stata eseguita secondo quanto riportato da Malik et al. (2003) con alcune modifiche. Cellule da colture overnight di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono state raccolte mediante centrifugazione (8000 × rpm per 10 minuti) e risospese in 3 ml di PBS (OD_{600nm}= 0,6). EPS B3-15, (concentrazione finale di 300 µg/ml) o PBS come controllo sono stati aggiunti a ciascuna sospensione batterica, quindi, le provette sono state incubate a 37°C per 2 ore, senza agitazione. La torbidità di aliquote di 1 ml di ciascuna sospensione batterica è stata misurata spettrofotometricamente (OD_{600nm}) e la percentuale di aggregazione è stata calcolata con la seguente formula:

$$\text{Aggregazione cellulare (\%)} = \frac{\text{OD600 finale}}{\text{OD600 iniziale}} \times 100$$

Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 sulla regolazione dei fattori di adesione nella formazione del biofilm mediante qRT-PCR

Analisi dell'espressione genica

I geni correlati all'adesione e alla formazione del biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* selezionati sono riportati nella Tabella 6. La specificità, la temperatura di melting (T_m) e le caratteristiche

termodinamiche di ciascun primer sono stati determinati utilizzando il Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific) e confermati mediante il programma Vector NTI (versione 10.3.0 Thermo Fisher Scientific).

Tabella 6: Geni target della PCR e sequenze dei primers

	Gene Target	Sequenza del Primer	Temperatura di appaiamento (°)	Taglia dell'amplicone (bp)	Bibliografia
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>lec</i> A-PA-I lettina galattofilica	F 5'-GAAGCAGGGCAGGTAACGTC-3' R 5'-CGGGCACGTCGTTGTAGATA-3'	58	277	Questo lavoro
	<i>psl</i> A-proteina per la formazione del biofilm	F 5'-ACACGGGCTGGATTCATCG-3' R 50-CAGGCGAAGAACATGATGCG-3'	56	245	Questo lavoro
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>clf</i> A-clumping fattore A	F 5'-ATTGGCGTGGCTTCAGTGCT-3' R 5'-CGTTTCTCCGTAGTTGCATTTG-3'	56	288	Arciola et al., 2012
	<i>ica</i> D-adesione D intercellulare	F 5'- ATGGTCAAGCCCAGACAGAG-3' R 5'-AGTATTTTCAATGTTTAAAGCAA-3'	56	198	Cucarella et al., 2004

L'ottimizzazione delle condizioni di PCR è stata convalidata per il DNA di *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 29213 e il gene *rpoD* (*RNA polymerase sigma factor* RpoD) è stato utilizzato come *housekeeping* per la quantificazione relativa (Savli et al., 2003; Theiss et al., 2007).

Isolamento dell'RNA e trascrizione inversa

P. aeruginosa e *S. aureus* sono stati coltivati in provette di polistirene da 15 ml (Falcon) contenenti 5 ml di terreno LB o TSB, incubate a 37°C rispettivamente per 48 o 24 ore senza agitazione, in presenza dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) o di PBS come controllo. L'RNA è stato estratto dalle cellule batteriche utilizzando il Trizol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), secondo le istruzioni del produttore. Il DNA residuo è stato rimosso mediante digestione per 30 minuti a 37°C con 1 U di DNasi RNasi-free (Promega Corporation, Madison, WI, USA). La reazione è stata interrotta aggiungendo 1 µl di soluzione RQ1 DNase stop ed incubando a 65°C per 10 minuti. I campioni di

RNA sono stati analizzati quantitativamente utilizzando uno spettrofotometro Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Un totale di 300 ng di RNA è stato utilizzato per la sintesi di DNA complementare (cDNA) e per ogni campione una quantità uguale di RNA è stata retrotrascritta in cDNA. La trascrizione inversa (RT) è stata effettuata in una miscela di reazione da 20 µl, contenente un tampone di reazione 1×, dNTP (0,5 mM), primer (20 pmol), MgCl₂ (3 mM), una RNasi inibitrice (20 U) e una trascrittasi inversa Improm II (200 U) (Promega Corporation, Stati Uniti d'America). La reazione è stata eseguita tramite incubazione a 25°C per 5 minuti, seguita da una a 37°C per 60 minuti e infine a 70°C per 15 minuti. Dopo la trascrizione inversa, il cDNA di ciascun campione è stato analizzato direttamente mediante reazione a catena della polimerasi quantitativa (qRT-PCR).

Quantizzazione relativa dell'espressione genica (qRT-PCR)

La quantizzazione relativa dell'espressione genica mediante qRT-PCR è stata eseguita in una miscela di reazione da 20 µl contenente 3 µl di cDNA, 0,5 µM di ciascun primer forward e reverse e 10 µl di SsoAdvanced universal SYBR1 Green supermix (2×) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, Stati Uniti d'America). L'amplificazione è stata effettuata utilizzando un Fast Real-Time PCR System 7500 alle seguenti condizioni: 3 minuti a 95°C, seguiti da 40 cicli di 15 secondi a 95°C, 45 secondi alle temperature riportate in Tabella 7 per ciascun primer, e infine 40 secondi a 60°C. L'analisi della curva di melting è stata eseguita utilizzando le impostazioni predefinite dello strumento.

Tutti i campioni sono stati testati in triplicato e i relativi livelli di espressione sono stati valutati utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t(Ct)}$. I risultati sono stati espressi come variazione della curva (aumento o diminuzione) dell'espressione genica nella coltura batterica trattata con EPS B3-15 rispetto ai trascritti nelle colture non trattate.

Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 a cellule epiteliali nasali umane (HNEpC)

Cellule epiteliali nasali umane

Cellule epiteliali nasali umane monostratificate (HNEpC, PromoCell, Cat. Num. C-12620, Heidelberg, Germania) sono state coltivate in RPMI 1640 (Invitrogen Cergy Pontoise, Francia) con l'aggiunta di antibiotici (penicillina e streptomina) e siero di vitello fetale al 10%, in fiasche da 75 cm² e incubate a 37°C in presenza di CO₂ al 5%. I monostrati di cellule confluenti sono stati trattati con 5 ml di tripsina EDTA, risospesi nel mezzo di coltura (concentrazione di $2,5 \pm 10^5$ cellule/ml) e inoculati in ciascun pozzetto di una micropiastra per colture cellulari da 96 pozzetti. Le cellule sono state incubate fino all'ottenimento di monostrati confluenti.

Effetti dell'EPS e del BS B3-15 sull'adesione batterica di P. aeruginosa e S. aureus sulle HNEpC

L'adesione di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sulle HNEpC è stata valutata come riportato da Fernandes de Oliveira et al., (2021). Brevemente, l'RPMI è stato rimosso dai monostrati confluenti di cellule presenti nei 96 pozzetti e le HNEpC sono state lavate tre volte con RPMI 1640 senza antibiotici e siero (RPMI-1). Aliquote di 100 µl di sospensioni di *P. aeruginosa* o *S. aureus* in RPMI-1 ($1,0 \times 10^6$ CFU/ml) sono state aggiunte alle HNEpC. Per valutare l'effetto dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 sull'adesione batterica iniziale (T0), in ciascun pozzetto l'EPS e il BS, disciolti in RPMI-1 a diverse concentrazioni finali (50, 100, 200 e 300 µg/ml), o RPMI-1 utilizzato come controllo, sono stati aggiunti alle HNEpC e le micropiastre sono state incubate per 2 ore a 37°C con il 5% di CO₂. Per rimuovere le cellule batteriche non aderenti, la piastra è stata lavata due volte con RPMI-1 e poi con PBS. Per lisare le cellule monostratificate, 100 µl di acqua sterile distillata fredda sono stati aggiunti alle HNEpC e i 100 µl contenenti cellule lisate e le cellule batteriche aderenti sono stati recuperati, immediatamente diluiti serialmente dieci volte in PBS e quindi piastrati su agar cetrimide (Difco, BD Life Sciences) per *P. aeruginosa* o su mannitol salt agar (Oxoid) per *S. aureus*. Le piastre sono state incubate a 37°C per 18-24 ore e sono state determinate le CFU/ml di cellule batteriche aderenti alle HNEpC precedentemente trattate o non trattate con l'EPS.

Citotossicità dell'EPS e del BS B3-15 sulle HNEpC

Per valutare la citotossicità dell'EPS e del BS B3-15, la vitalità delle cellule HNEpC è stata valutata in presenza di differenti concentrazioni di EPS e di BS. HNEpC trattate o non trattate con l'EPS B3-15 o il BS B3-15 (concentrazione finale da 50 a 300 µg/ml) sono state incubate per 24 ore a 37°C con incubatore al 5% di CO₂. Successivamente, le cellule sono state colorate con una soluzione diluita (1:2000, v/v) di TO-PRO3 (Thermo Fisher Scientifics) e incubate a 4°C per 15 minuti al buio. La vitalità delle cellule colorate è stata valutata mediante citometria a flusso (FACS Canto II).

Attività antibiofilm contro patogeni umani delle vie respiratorie

L'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 è stata testata in aggiunta contro i due ceppi *K. pneumoniae* ATCC 8047 e *Str. pneumoniae* ATCC 6303, patogeni umani delle vie respiratorie. L'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 a diverse concentrazioni (da 50 a 300 µg/ml) è stata effettuata in micropiastre di polistirene a 96 pozzetti come sopra riportato. I meccanismi di azione dell'EPS sono stati valutati mediante saggio di rivestimento (Coating assay) e MATH effettuati come precedentemente riportato.

Attività sinergica dell'EPS e del BS B3-15 (BPS B3-15) sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm e di aderire a superfici sia abiotiche che biotiche

Per testare l'attività sinergica dell'EPS e il BS B3-15, equamente combinati, sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm e di aderire a differenti superfici l'EPS e il BS B3-15 sono stati disciolti in egual volume in PBS (1:1, w/w) e sterilizzati per filtrazione con filtri su membrane diporosità di 0,22 µm. Le attività antibiofilm e antiadesiva sono state testate come descritto in precedenza per i singoli biopolimeri.

Attività dell'EPS, del BS B3-15 e attività sinergica del BPS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm su lenti a contatto

Attività antibatterica di una soluzione per risciacquo di lenti a contatto (CL-care)

Per testare la capacità dei biopolimeri prodotti dal ceppo B3-15 (EPS, BS e BPS B3-15) di inibire la capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm su lenti a contatto (CL) in presenza di una soluzione di risciacquo per lenti è stata utilizzata una soluzione per risciacquo di lenti a contatto isotonica sterile (CL-care) disponibile in commercio nel mercato italiano, con la seguente composizione: EDTA 0,01%, poliesametilenebiguanide 0,0002%, idrossietilcellulosa, polossamero 407 0,18% e poliquaternio 0,004%.

L'attività antibatterica della soluzione CL-care sui ceppi modello è stata valutata a diverse concentrazioni finali (0, 10, 20, 30, 50% e 100% v/v) in MHB e in aggiunta, 100 µl di ciascuna coltura sono stati distribuiti su piastre di MHA in triplicato. Le piastre sono state incubate a 37°C per 24 ore e le unità formanti colonie (CFU) sono state contate. I risultati sono stati espressi come media di CFU/ml.

Attività antibiofilm della CL-care, dell'EPS, del BS e del BPS B3-15 su lenti a contatto (CL)

Per valutare l'attività antibiofilm su CL giornaliera della CL-care, dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15, 900 µl di ciascuna una coltura batterica overnight di *P. aeruginosa* e *S. aureus* rispettivamente in LB e TSB, ($OD_{600\text{ nm}} = 0,1$), sono stati aggiunti a ciascun pozzetto di micropiastre in polistirene da 24 pozzetti contenenti una lente a contatto giornaliera (Zeiss, Jena, Germania), composta da Dayfilcon A 42% e acqua 58%, precedentemente lavata con PBS sterile, come riportato da Mordmuang et al. (2021). Un'aliquota (100 µl) della CL-care (30, 50 e 100%) o di ciascuna soluzione di EPS, BS o BPS B3-15 (a concentrazioni finali da 50 a 300 µg/ml) disciolta in PBS o PBS (come controllo) sono stati aggiunti in ciascun pozzetto. Le micropiastre sono state incubate a 37°C per 48 ore (per *P. aeruginosa*) o 24 ore (per *S. aureus*), come sopra riportato, senza agitazione. Dopo l'incubazione, le CL sono state trasferite in nuovi pozzetti e i batteri non aderenti sono stati

rimossi lavando 5 volte con acqua distillata. I biofilm sono stati colorati con una soluzione ottimizzata di cristalvioletto (0,001% w/v) per 20 minuti per evitare una colorazione eccessiva delle lenti. Il colorante in eccesso è stato rimosso mediante aspirazione e le CL sono state lavate 10 volte con acqua distillata e asciugate all'aria per 15 minuti. I biofilm colorati sono stati solubilizzati con acido acetico al 33% (v/v) (Mordmuang et al., 2021) e la massa del biofilm è stata determinata spettrofotometricamente ($OD_{585\text{ nm}}$) come riportato sopra.

Attività antibiofilm dell'EPS, del BS e del BPS B3-15 su lenti a contatto (CL) in presenza di CL-care

La CS-care a diverse concentrazioni o gli esopolimeri (EPS B3-15, BS B3-15 o BPS B3-15) disciolti in CS alla concentrazione più efficace sono stati aggiunti a ciascuna coltura notturna di *P. aeruginosa* o *S. aureus* in LB o TSB ($OD_{600\text{ nm}} = 0,1$) in pozzetti di micropiastre in polistirene da 24 pozzetti contenenti CL. Le micropiastre sono state incubate a 37°C e l'attività antibiofilm è stata determinata come precedentemente descritto. L'attività antibiofilm del CS è stata calcolata normalizzando la massa del biofilm ($OD_{585\text{ nm}}$) rispetto alla crescita batterica ($OD_{600\text{ nm}}$) come segue: $OD_{\text{normalizzata}} = OD_{585\text{ nm}}/OD_{600\text{ nm}}$ (Mordmuang et al., 2021).

Analisi statistica

Tutti gli esperimenti sono stati effettuati almeno in triplicato e i risultati sono stati espressi come media \pm deviazione standard. Le differenze significative tra i campioni trattati e i controlli sono state valutate mediante ANOVA ad una via mentre, dove appropriato, le differenze significative tra i campioni sottoposti e differenti trattamenti sono stati valutati mediante ANOVA a due vie seguita dal test di Tukey. Infine, le differenze con $p \leq 0,05$ sono state considerate significative, quelle con $p \leq 0,01$ sono state considerate altamente significative.

Risultati

Caratteristiche fenotipiche del ceppo *B. licheniformis* B3-15

Il ceppo B3-15 ha confermato la sua elevata versatilità fisiologica dimostrando la capacità di idrolizzare il Tween 20 e il Tween 80 e per la presenza degli enzimi esterasi (butirrato, C4), esterasi lipasi (caprilato, C8) e lipasi (miristato, C14).

Il ceppo B3-15 ha mostrato la capacità di crescere, se coltivato in un terreno di coltura minerale minimo, in presenza di kerosene come unica fonte di carbonio, ma non di gasolio.

Valutazione della resistenza del ceppo *B. licheniformis* B3-15 a diverse forme (As^{III} e As^V) e diverse concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) di arsenico

L'abilità del ceppo B3-15 di crescere nel terreno MB $\frac{1}{4}$ in presenza di As^{III} e As^V a differenti concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$) è riportata in Tabella 7.

Tabella 7: Crescita del ceppo *B. licheniformis* B3-15 in MB $\frac{1}{4}$ in presenza di As^{III} e As^V a differenti concentrazioni (500, 1000, 1500 e 2000 $\mu\text{g/ml}$). Valori di assorbanza ($OD_{600\text{nm}}$) < 0,2 sono stati considerati come “nessuna crescita (-), compresi fra 0,2 e 0,5 come “crescita moderata” (+), compresi 0,5 e 0,8 come “crescita media” (++) , > di 0,8 come crescita elevata (+++).

Tempo (ore)	As^{III} ($\mu\text{g/ml}$)				Tempo (ore)	As^V ($\mu\text{g/ml}$)			
	500	1000	1500	2000		500	1000	1500	2000
24	-	-	-	-	24	+	-	-	-
48	+	-	-	-	48	++	+	+	-
72	+	-	-	-	72	+++	+	+	+

B. licheniformis B3-15 ha mostrato crescita moderata in presenza di As^{III} a 500 µg/ml dopo incubazione a 45°C per 48 e 72 ore. In presenza di As^V a 500 µg/ml invece la sua crescita è stata moderata dopo 24 ore, media dopo 48 ore ed elevata dopo 72 ore di incubazione. Inoltre, il ceppo ha mostrato una crescita moderata anche in presenza di una concentrazione di 1000 e 1500 µg/ml dopo 48 e 72 ore e di 2000 µg/ml dopo 72 ore.

Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione dell'EPS B3-15

Coltivato alle condizioni ottimali di crescita (temperatura 45°C, pH 8 e concentrazione di NaCl del 2%), il ceppo B3-15 nel terreno SG17 ha raggiunto la crescita maggiore ($OD_{600} = 1.19 \pm 0.03$) dopo 48 ore di incubazione e la resa di EPS B3-15 è stata 240 mg/ml.

Gli spettri ¹H-NMR, ¹³C-NMR e ATR-FTIR sono riportati in Figura 6.

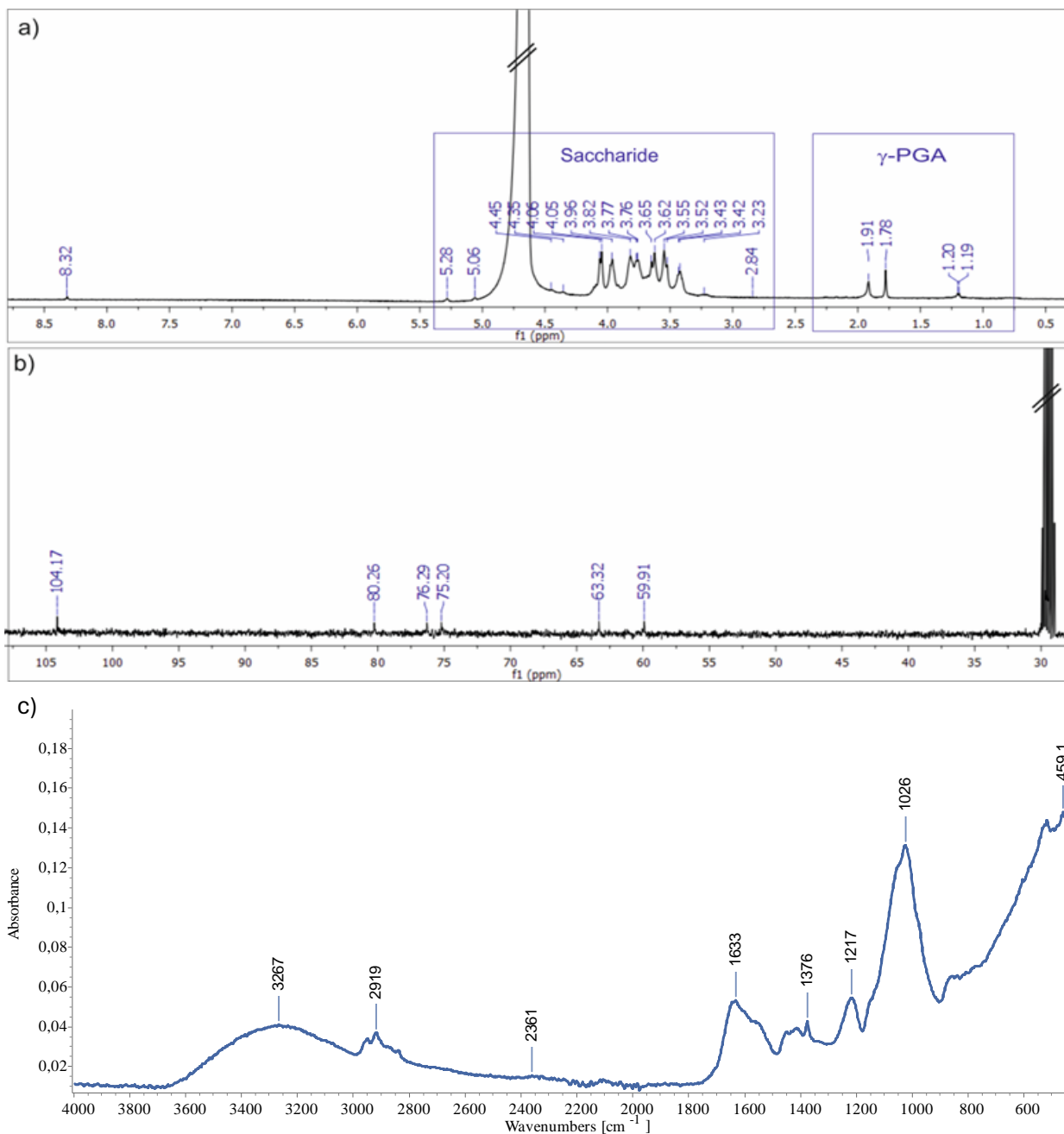


Figura 6: Spettri a) $^1\text{H-NMR}$, b) $^{13}\text{C-NMR}$ e c) ATR-FTIR dell'EPS B3-15.

Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ registrati in D_2O (Figura 6) hanno mostrato segnali anomeric a 5,28 e 5,06, suggerendo la presenza di un'unità ripetuta disaccarica come principale componente, con monomeri connessi da legami α -1,4-glicosidici probabilmente correlato ad una manno-configurazione. Queste osservazioni sono state confermate dallo spettro $^{13}\text{C-NMR}$ (Figura 6), poiché un segnale evidente è stato trovato nella regione del carbonio anomeric a 104,15 ppm attribuibile al C1, con un ampio shift

dovuto all'accoppiamento fra il carbonio anomero nel legame 1-4 col mannosio. In aggiunta, il segnale a 59,91 ppm nello spettro ^{13}C -NMR potrebbe essere attribuito al C6 e i rimanenti segnali (80,26-76,29-75,20 e 63,32 ppm) sono tipici delle unità monosaccaridiche e confermano la presenza di un esoso piranosidico.

La regione dello spettro ^1H -NMR compresa fra 1 e 2 ppm contiene segnali a 1,92 e 1,78, ascrivibili rispettivamente ai protoni β -CH₂ e γ -CH degli acidi poligluttammici (γ -PGA). Il segnale correlato al protone del α -CH dei γ -PGA è nascosto sotto il picco del protone principale dell'EPS. Un aspetto particolarmente interessante è che, quando lo spettro è stato registrato con lo 0,1% di acetone-d₆ come standard interno, il picco singolo a 1,92 si divide in due singoletti (1,92 e 1,93 ppm) correlati ai due protoni β -CH₂, confermando ulteriormente la presenza di γ -PGA nell'EPS. Più in generale lo spettro dell'EPS B3-15 mostra picchi caratteristici degli EPS (1200-950 cm⁻¹) e picchi che possono essere associati a legami α -(1-4)-glicosidici (970-920 cm⁻¹).

L'analisi spettroscopica ATR-FTIR ha mostrato un picco a 1647 cm⁻¹ tipico del CO stretching e uno a 1542 cm⁻¹ che possono essere attribuiti rispettivamente ad unità monosaccaridiche e a γ -PGA.

Dall'analisi NMR e ATR-FTIR risulta quindi che l'EPS B3-15 è composto principalmente da carboidrati, con mannosio e glucosio come maggiori monosaccaridi, e contiene in aggiunta una componente minoritaria costituita da γ -PGA.

Applicazioni nella bioremediation dell'As dell'EPS B3-15

Valutazione della capacità dell'EPS B3-15 di assorbire As^{III} or As^V mediante GF-AAS

L'abilità dell'EPS B3-15 (100 e 300 $\mu\text{g/ml}$) di assorbire As^{III} e As^V è riportata in Figura 7.

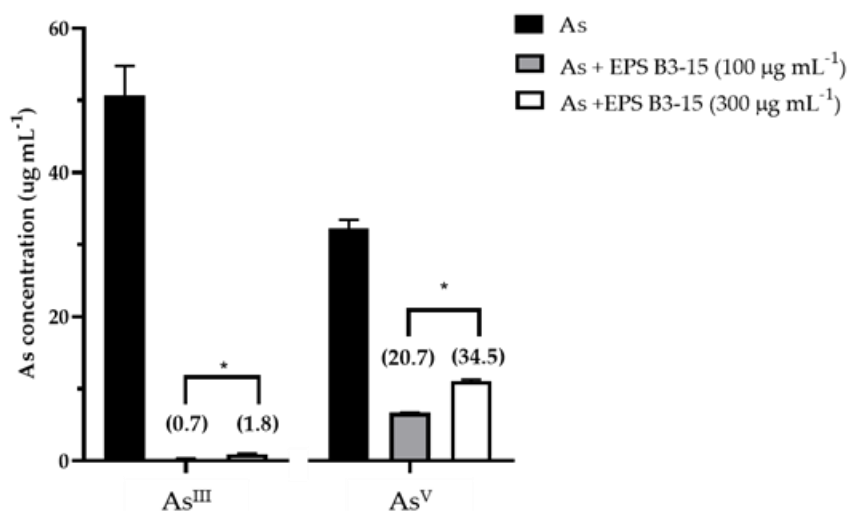


Figura 7: Concentrazione dell'As^{III} e As^V prima e dopo trattamento con EPS B3-15 (100 o 300 $\mu\text{g/ml}$). In parentesi i dati dell'assorbimento dell'EPS espressi in percentuale ($p \leq 0,01$).

Dopo 30 min di trattamento, l'EPS B3-15 ha mostrato un'elevata capacità di assorbire l'As, con una variazione statisticamente significativa rispetto al controllo. L'assorbimento dell'EPS B3-15 a 100 o 300 $\mu\text{g/mL}$ è stato maggiore per l'As^V (rispettivamente 6,7 e 11,1 $\mu\text{g/ml}$) rispetto all'As^{III} (rispettivamente 0,3 e 0,9 $\mu\text{g/ml}$).

Valutazione dei cambiamenti della struttura chimica dell'EPS B3-15 in presenza di As^{III} o As^V mediante ATR-FTIR

L'ATR-FTIR è stata utilizzata per determinare i cambiamenti molecolari e conformazionali dell'EPS B3-15 dopo esposizione ad As^{III} o As^V a 2000 $\mu\text{g/ml}$. I valori delle lunghezze d'onda e la loro assegnazione ai diversi gruppi funzionali degli EPS e delle diverse forme di As sono riportati in Tabella 8.

Tabella 8: valori delle lunghezze d'onda ATR-FTIR e loro assegnazione ai diversi gruppi funzionali degli EPS e delle diverse forme di arsenico.

Lunghezza d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione	Referenza
4000–2500	OH ₂ stretching	Wang et al., 2022
3300–3200	Amide A	Naumann et., 2009
3000–2800	CH ₂ e CH ₃ dei lipidi	Yoshida et al., 1997
1710–1590	C=O	El Farissi et al., 2022
1550–1500	N-O stretching	Wiercigroch et al., 2017
~1548	Conformazione del peptide Amide II	Naumann et., 2009
1456–1453	CH ₂ dei lipidi	Naumann et., 2009
1300–1200	C-O stretching	El Farissi et al., 2022
~1250	CH-NH stretching	Ramani et al., 2012
~1066	(R-O- <i>p</i> -O-R) dalla vibrazione anulare dei carboidrati	Lee et al., 2007
1060–1000	C-O	El Farissi et al., 2022
890–870	OH bending e stretching del legame glicosidico	El Farissi et al., 2022
840–820	AsO ₃ (OH)	Questo studio
878–792	AsO ₄	Questo studio
840–790	C=C bending	El Farissi et al., 2022
580–530	C-C-N	El Farissi et al., 2022
546–534	As	Questo studio
480–430	C-C	El Farissi et al., 2022

Gli spettri ATR-FTIR dell'As^{III} o As^V e dell'EPS B3-15 in presenza o meno di As^{III} o As^V sono riportati in Figura 8.

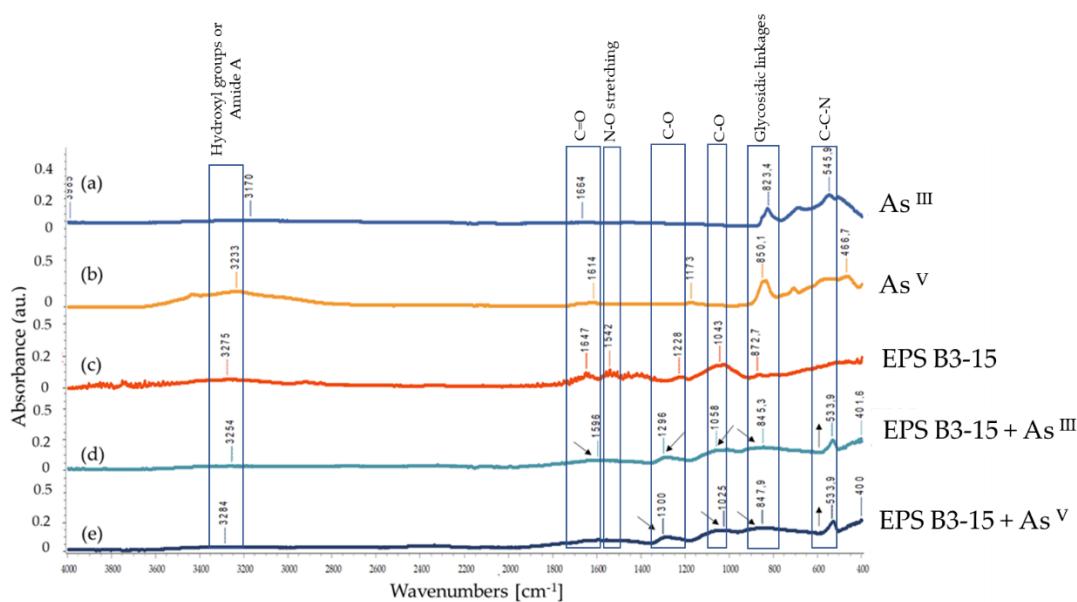


Figura 8: Confronto degli spettri ATR-FTIR di: (a) As^{III}, (b) As^V, (c) EPS B3-15 (300 µg/ml), (d) EPS B3-15 in presenza di As^{III}, (e) EPS B3-15 in presenza di As^V. I principali cambiamenti negli spettri sono evidenziati da frecce in su (nuovi picchi) o frecce verso destra o sinistra (shift dei picchi).

In tutti gli spettri, il contributo dello stretching nella regione di frequenza 3500-3200 cm^{-1} è correlato alle vibrazioni dei gruppi idrossilici o dell'ammide A (Caccamo et al., 2020; Zammuto et al., 2022a). Gli spettri dell'EPS B3-15 in presenza di As^{III} o As^{V} hanno mostrato diversi cambiamenti e, più specificamente, sono stati osservati sia il verificarsi di nuovi picchi, sia lo shift di picchi già presenti nello spettro dell'EPS B3-15 (come indicato dalle frecce nella Figura 8d e 8e). Il picco attribuito ai legami glicosidici dell'EPS (872,7 cm^{-1}) (Figura 8c) si è spostato a 845,3 cm^{-1} in presenza di As^{III} (Figura 8d) e a 847,9 cm^{-1} in presenza di As^{V} (Figura 8e), questi shift potrebbero essere attribuiti alla formazione di nuovi legami tra l'EPS e As^{III} e As^{V} . Dopo il trattamento con As^{III} , il picco dell'ammide II (1542 cm^{-1}) è scomparso ed è stato sostituito da un nuovo picco a 1596 cm^{-1} , indicando che il γ -PGA presente nel polimero potrebbe svolgere un ruolo nell'adsorbimento dell' As^{III} (Figura 8d). Al contrario, in presenza dell' As^{V} , non sono stati rilevati alcuni picchi nello spettro dell'EPS B3-15, suggerendo una diversa disposizione intramolecolare dello stesso EPS (Figura 8e). Il picco centrato a 1228 cm^{-1} nello spettro EPS (Figura 8c) si è spostato a 1296 cm^{-1} in presenza di As^{III} (Figura 8d) e a 1300 cm^{-1} in presenza di As^{V} (Figura 8e), indicando un'interazione più forte tra l'EPS e l' As^{V} rispetto all' As^{III} . È interessante notare che il picco corrispondente allo stretching del legame C–O (1043 cm^{-1}) si è spostato a un valore di frequenza più alto in presenza di As^{III} (Figura 8d), mentre si è spostato a 1025 cm^{-1} in presenza di As^{V} (Figura 8e). Questi risultati suggeriscono la probabile formazione di nuovi legami tra l'EPS B3-15 e l' As^{V} .

Test di tossicità dell'EPS B3-15 mediante saggio della bioluminescenza

Gli effetti dell' As^{III} o As^{V} a diverse concentrazioni (da 0 a 4000 $\mu\text{g/ml}$) sulla luminescenza del ceppo G5, in assenza o in presenza dell'EPS B3-15 (100 o 300 $\mu\text{g/ml}$) sono riportati in Figura 9.

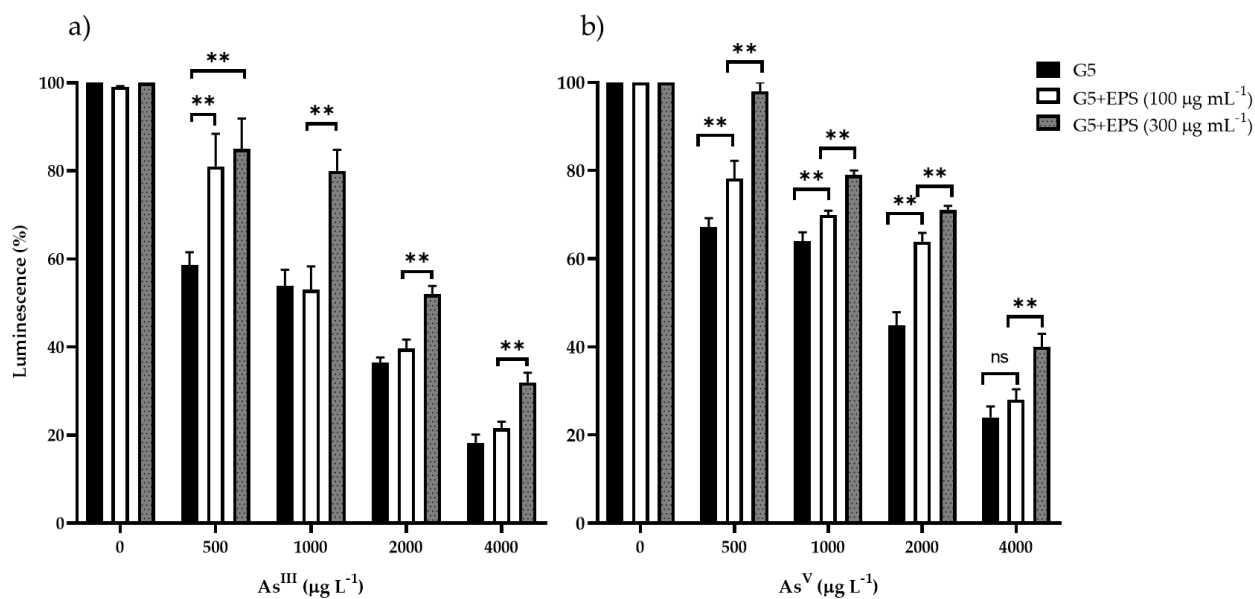


Figure 9: (a) Tossicità dell' As^{III} o (b) dell' As^{V} espressa come percentuale di luminescenza emessa da *Vibrio harveyi* G5 (G5) dopo 15 minuti di incubazione in presenza dell'EPS B3-15 a due diverse concentrazioni (100 o 300 $\mu\text{g/ml}$). *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$).

L'intensità della luminescenza mostrava una brusca diminuzione quando la concentrazione di As^{III} o As^{V} superava i 2000 $\mu\text{g/ml}$.

Gli effetti sulla luminescenza del ceppo G5 sono stati valutati mediante determinazione dell' EC_{50} (Figura 10).

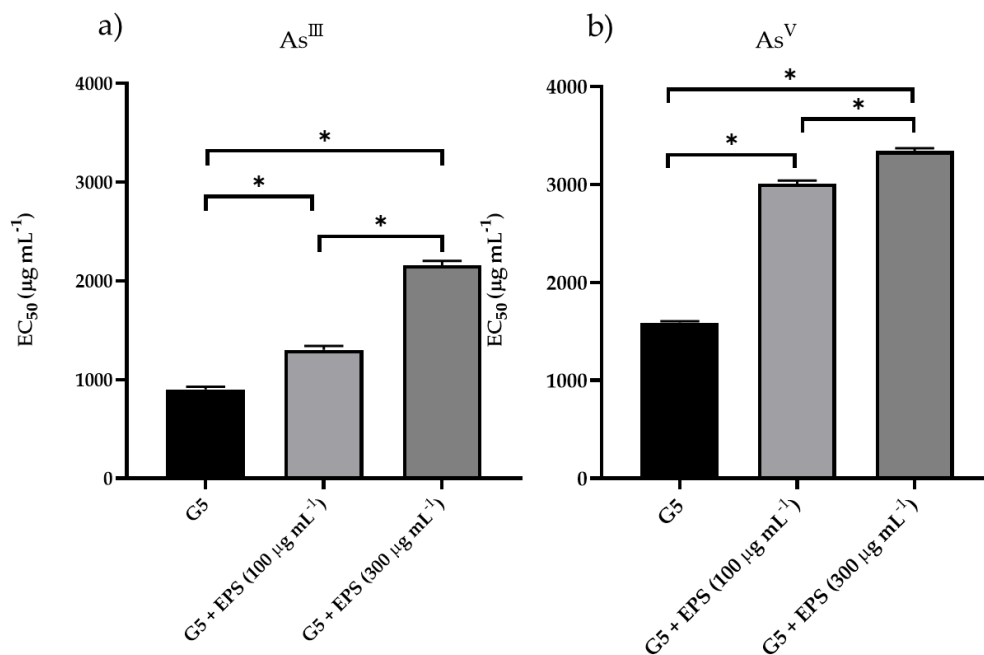


Figura 10: Tossicità dell'As^{III} (a) o dell'As^V (b) espressa come EC₅₀ sulla capacità di emettere luce di *Vibrio harveyi* G5 (G5) dopo 15 minuti di incubazione in presenza dell'EPS B3-15 (100 o 300 µg/ml). * Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$).

I valori di EC₅₀ in presenza di As^{III} o As^V erano rispettivamente $902 \pm 26,8$ µg/ml (Figura 10a) e $1591,5 \pm 13,9$ µg/ml (Figura 10b). L'aggiunta dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) ha raddoppiato i valori di EC₅₀ di entrambe le forme di arsenico ($2159 \pm 26,4$ µg/ml per As^{III} e $3343 \pm 28,9$ µg/ml per As^V). Questi risultati suggeriscono un ruolo protettivo dell'EPS B3-15 contro gli effetti tossici dell'As.

Screening per la capacità del ceppo *B. licheniformis* B3-15 di produrre biosurfattanti

Il ceppo *B. licheniformis* B3-15 è risultato positivo al saggio del Blu di Metilene in NSW dopo 48 ore di incubazione con un valore dell'E₂₄ di $51,4 \pm 1,4$.

La crescita e l'attività emulsionante dei CSF del ceppo B3-15 è stata valutata in differenti condizioni nutrizionali, valutando differenti fonti di azoto e di carbonio e i risultati sono riportati in Figura 11.

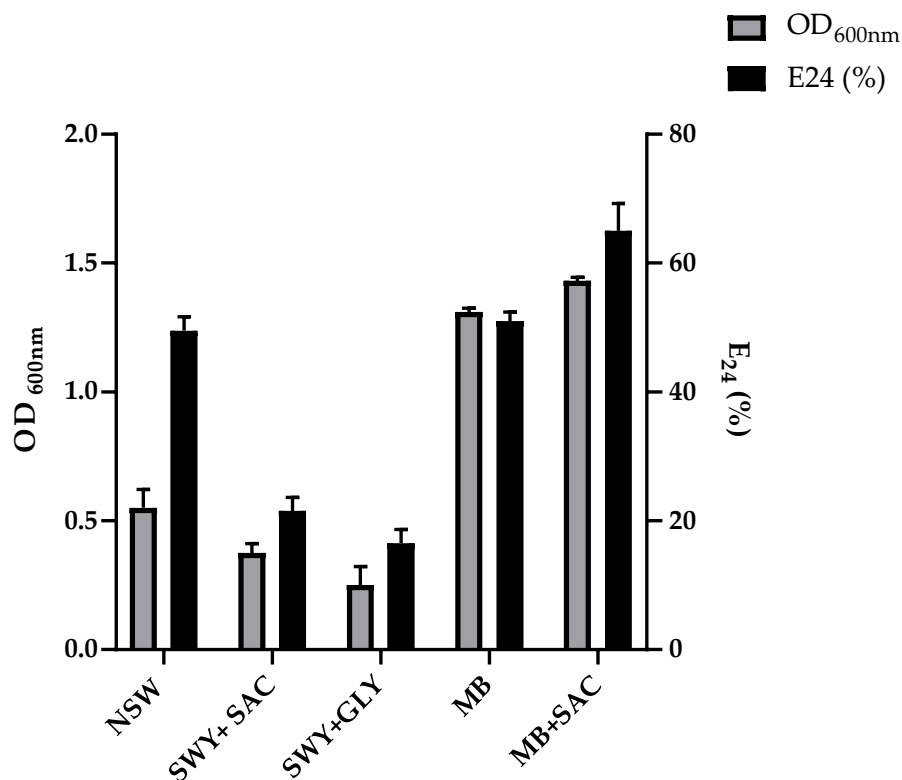


Figura 11: Crescita del ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 (OD_{600nm}) e indice di emulsione (E₂₄) dei suoi CFS in presenza di cherosene (1:1 v/v), ottenuti in terreni diversi dopo incubazione a 45°C per 48 ore. NSW + KER: NSW + 2% di kerosene, SWY + GLY: acqua di mare con aggiunta di estratto di lievito (0,1%) e glicerolo (3%); SWY + SAC: acqua di mare con l'aggiunta di estratto di lievito (0,1%) e saccarosio (3%); MB: Marine Broth; MB + GLY, Marine Broth con l'aggiunta di glicerolo (3%); MB + SAC: Marine Broth con l'aggiunta di saccarosio (3%).

Il ceppo è stato in grado di crescere in tutti i terreni di coltura utilizzati, con la crescita maggiore registrata nel terreno MB + SAC (OD_{600nm}= 1,4), seguito dai terreni MB, MB + GLY. Valori di OD_{600nm} inferiori sono stati registrati, invece, per i terreni NSW + KER (0.7) ed SWY + GLY e SWY + SAC (<0.4).

Anche il valore di E₂₄ più alto è stato registrato per il CFS ottenuto dal terreno MB + SAC (Figura 11) di conseguenza questo terreno è stato selezionato per ulteriori esperimenti di produzione e ottimizzazione della produzione del biosurfattante.

Per determinare le condizioni ottimali di crescita per la produzione di biosurfattante, la curva di crescita del ceppo B3-15 in MB + SAC e l'E₂₄ con kerosene del CFS dopo determinati tempi di incubazione (0, 8, 20, 24, 30 e 48 ore) sono stati determinati e i risultati sono riportati in Figura 12.

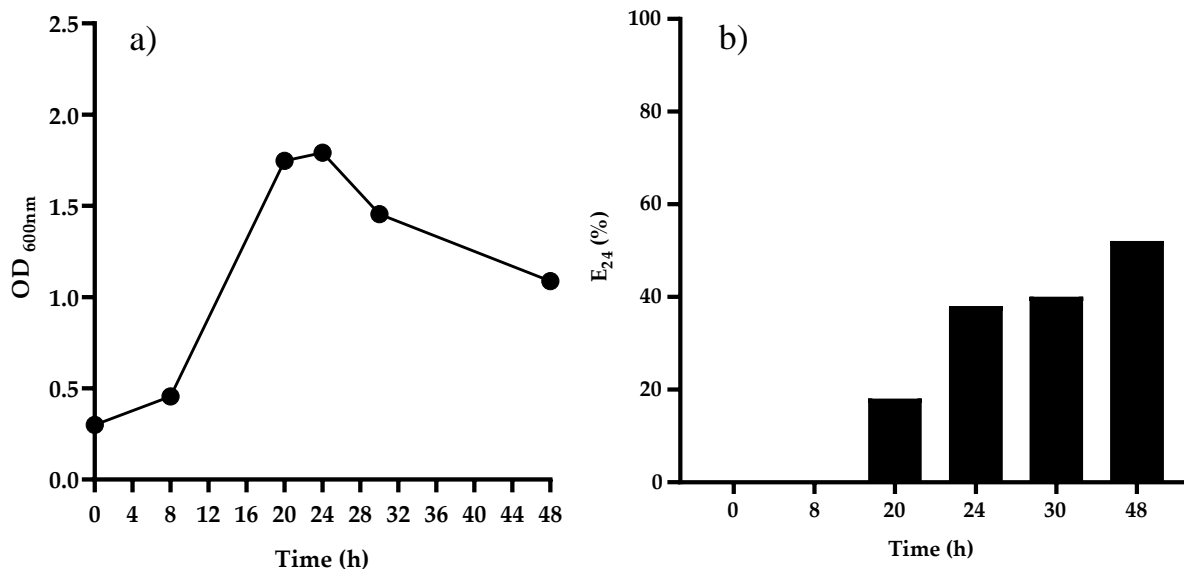


Figura 12: (a) Curva di crescita del ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 in MB + SAC incubata a 45°C per 48 ore e (b) trend del E₂₄ del CFS in presenza di cherosene (1:1 v/v) durante la fermentazione. * Differenze statisticamente significative ($p < 0,05$).

Il valore di OD_{600nm} più alto stato registrato dopo 24 ore di incubazione mentre i valori di E₂₄ sono aumentati anche con periodi di incubazione più lunghi raggiungendo il valore massimo dopo 48 ore. Questi risultati hanno indicato che le condizioni nutrizionali selezionate determinano una rapida crescita con una grande quantità di cellule che, una volta entrate in fase stazionaria producono elevate quantità di biosurfattante.

Proprietà del supernatante del *B. licheniformis* B3-15 ottenuto in MB + SAC

La Figura 13 mostra l'abilità del CFS del ceppo B3-15 ottenuto in MB + SAC di emulsificare differenti idrocarburi e oli vegetali (cloroformio, etil acetato, decano, benzina, esadecano, olio di ricino, olio di oliva o olio minerale).

CSF B3-15

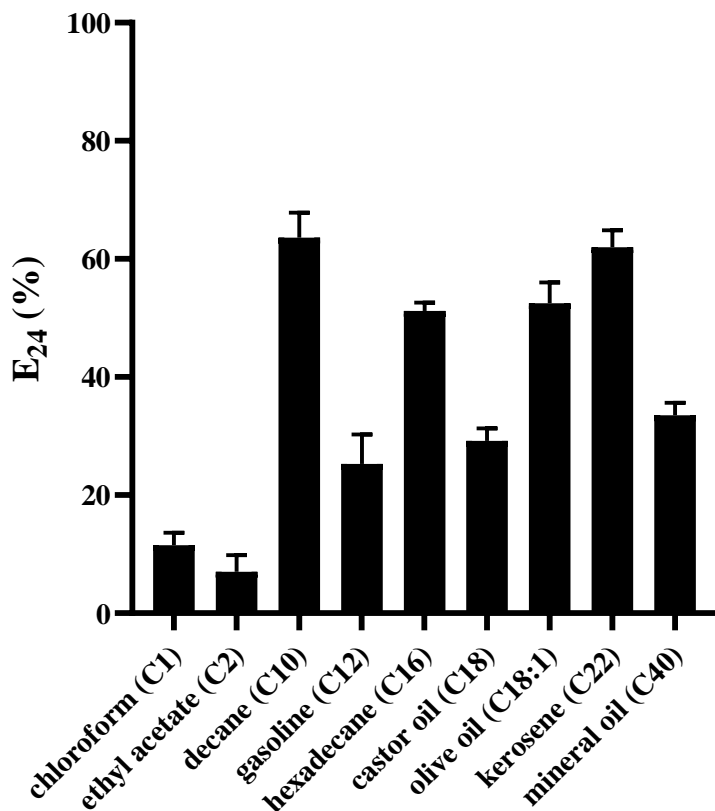


Figura 13: Abilità del CFS del ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 di emulsificare differenti idrocarburi (1:1 v/v) e oli vegetali. I dati sono espressi come media e deviazione standard di tre repliche (n= 3). *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$).

Il CFS ha mostrato elevati valori di E₂₄ in presenza di decano (64%) e kerosene (62%), seguito da olio di oliva (53%) ed esadecano (51%).

Il CFS inoltre è risultato positivo al test del collasso della goccia, portando all'espansione della goccia d'acqua mediante riduzione della tensione interfacciale, e ha mostrato la capacità di abbassare la tensione superficiale, dal valore di $68,3 \pm 1.2$ al valore di $52,0 \pm 1.4$.

Produzione, ottimizzazione della produzione e caratterizzazione del BS B3-15

Dopo precipitazione acida del CFS del ceppo B3-15 ottenuto in MB + SAC dopo 48 ore di incubazione a 45°C, la resa di BS è stata 910 ± 15 mg. L'analisi ATR-FTIR è stata utilizzata per

determinare le caratteristiche strutturali del BS B3-15 e la corrispondenza fra le lunghezze d'onda dei picchi e la loro attribuzione è riportata in Tabella 9.

Tabella 9: Valori delle lunghezze d'onda ATR-FTIR e la loro assegnazione ai diversi gruppi funzionali dei BS.

Lunghezza d'onda (cm ⁻¹)	Assegnazione	Referenza
3300–3200	Amide A	Naumann et ., 2009
3000–2800	CH ₂ e CH ₃ dei lipidi	Yoshida et al., 1997
1680–1618	Conformazione del peptide Amide I	Arrondo e Goni, 1998
~1548	Conformazione del peptide Amide II	Naumann et ., 2009
1456–1453	CH ₂ dei lipidi	Naumann et ., 2009
1400–1380	CH ₂ e CH ₃ dei lipidi, acido dipicolinico, Amide III	Naumann et ., 2009
~1250	CH-NH stretching	Ramani et al., 2012
~1066	(R-O-p-O-R) dalla vibrazione anulare dei carboidrati	Naumann et ., 2009
1055–1050	Gruppi fosfato, C-O stretching	Bezza e Chirwa, 2015
1035–1030	C-O stretching dei gruppi esteri	Rohman e Man, 2010

Lo spettro ATR-FTIR del BS B3-15 prodotto dal ceppo *B. licheniformis* B3-15 è riportato in Figura 14.

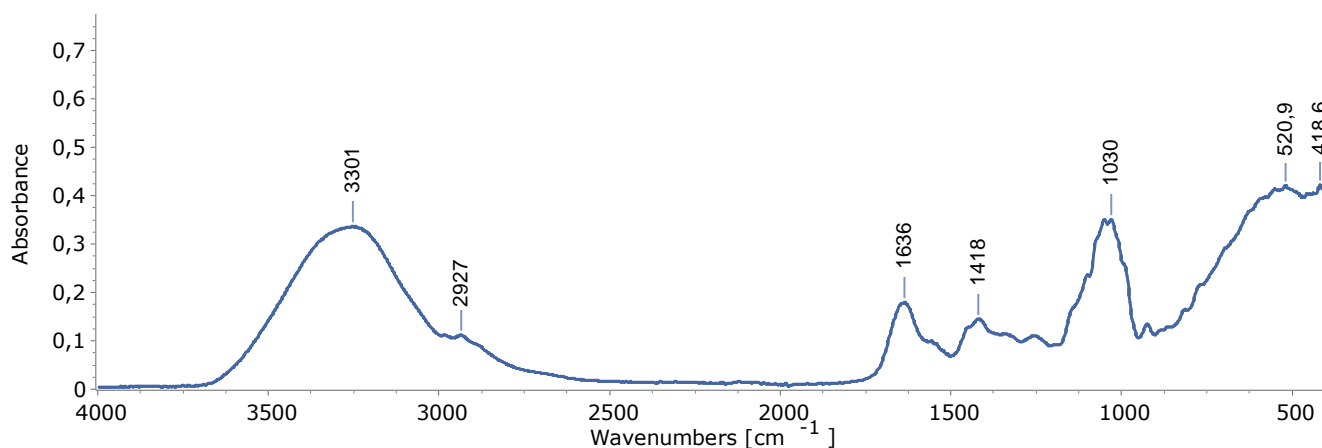


Figura 14: Spettro ATR-FTIR del BS del ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15.

Il picco osservato a 3301 cm⁻¹ è stato assegnato ai gruppi CH e OH dell'ammide A. I picchi osservati a 2944 e 2927 cm⁻¹ sono stati attribuiti alle vibrazioni di stretching di gruppi alifatici (-CH₃ e -CH₂)

dei lipidi, indicando la presenza di catene alchiliche (Figura 14). I picchi a 1641 e 1636 cm^{-1} sono stati attribuiti all'ammide I, indicando la presenza di una struttura peptidica nel BS. La regione caratteristica delle ammidi 3300–3250 cm^{-1} (Ammide A) e 1650–1500 cm^{-1} (Ammide I) è specifica per i lipopeptidi simili alla surfattina (Joy e Rahman, 2017; Lin et al., 1994; Ibrahim et al., 2013),

Attività e proprietà e del BS B3-15

La capacità dei BS di rimuovere differenti tipi di oli (minerale, grezzo e di ricino) da una matrice di tessuto di cotone è stata verificata mediante il test della rimozione dell'olio. La capacità di rimuovere tutti gli oli selezionati è stata trascurabile con l'acqua del rubinetto, utilizzata come controllo, viceversa sono stati osservati effetti positivi nella sezione del cotone in presenza del BS, in particolare del $70,0 \pm 2,20$ con olio di ricino, $53,0 \pm 0,04$ con ilio minerale e $45,0 \pm 0,04$ per l'olio grezzo.

Per determinare la capacità del BS B3-15 di modificare le proprietà di superfici idrofobiche, è stato eseguito il test dell'angolo di contatto (Figura 15).

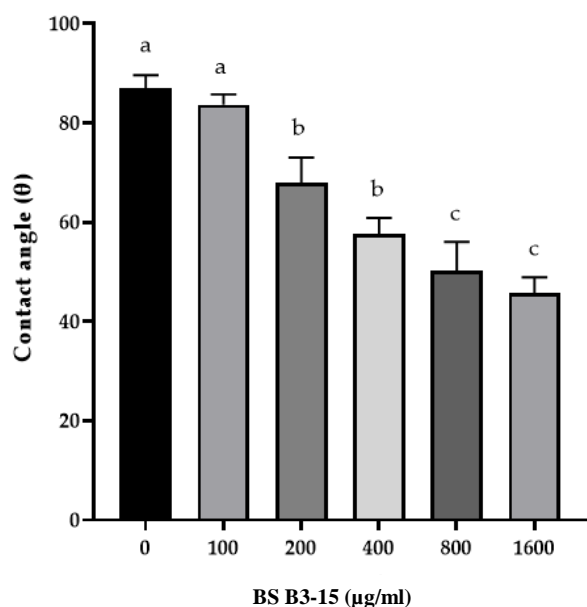


Figura 15: Proprietà della superficie, misurate come valori dell'angolo di contatto (θ), con o senza BS B3-15 a diverse concentrazioni (0, 100, 200, 400, 800 e 1600 $\mu\text{g/ml}$). Le barre rappresentano la media \pm DS per tre repliche ($n=3$). Diverse lettere minuscole sopra le barre indicano differenze statistiche significative ($p \leq 0,05$). Tra parentesi sono riportati i valori di inibizione del biofilm (%).

L'angolo di contatto dell'acqua sul polistirene è diminuito in presenza del BS B3-15 in modo dose-dipendente. Alla concentrazione più alta di BS (1600 $\mu\text{g/ml}$), l'angolo di contatto è stato ridotto da 89 a 47, indicando che il BS ha aumentato l'interazione tra l'acqua e la superficie idrofobica a causa della riduzione dell'idrofobicità superficiale (Figura 15).

Attività antibatterica dell'EPS B3-15 e del BS B3-15

L'EPS B3-15 e il BS B3-15 non hanno influenzato la crescita dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* fino alla massima concentrazione testata (2000 $\mu\text{g/ml}$ per l'EPS e 1000 $\mu\text{g/ml}$) indicando che i biopolimeri non hanno esercitato alcuna attività antibatterica. In aggiunta, le curve di crescita di *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *Str. pneumoniae* valutate in assenza o in presenza dell'EPS B3-15 (300 $\mu\text{g/ml}$) hanno ulteriormente confermato la mancanza di attività antibatterica dell'EPS B3-15 (Figura 16).

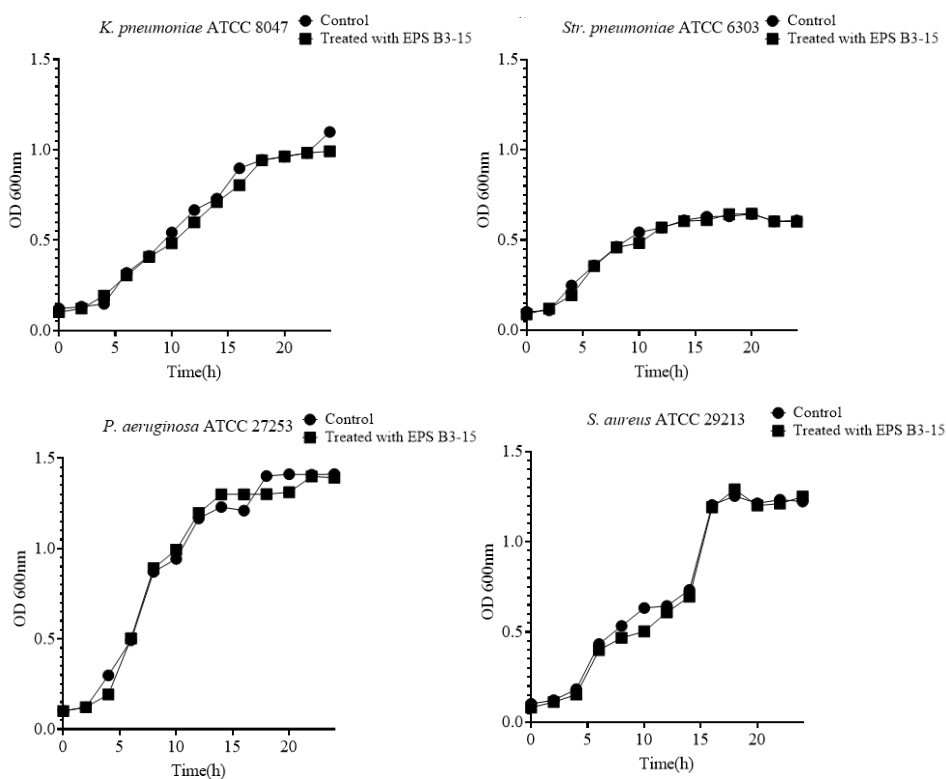


Figura 16: Curve di crescita di *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 in assenza (controllo) e in presenza di EPS B3-15 (300 $\mu\text{g/ml}$). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard (n= 3).

Attività antibiofilm e meccanismi d'azione dell'EPS e del BS B3-15 contro *P. aeruginosa* e *S. aureus*, selezionati organismi modello

Attività dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni

Gli effetti di inibizione dell'EPS e del BS B3-15 a dosi crescenti (da 50 a 300 µg/ml) sulla formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su micropiastre di polistirene sono riportati nella Figura 17 e 18.

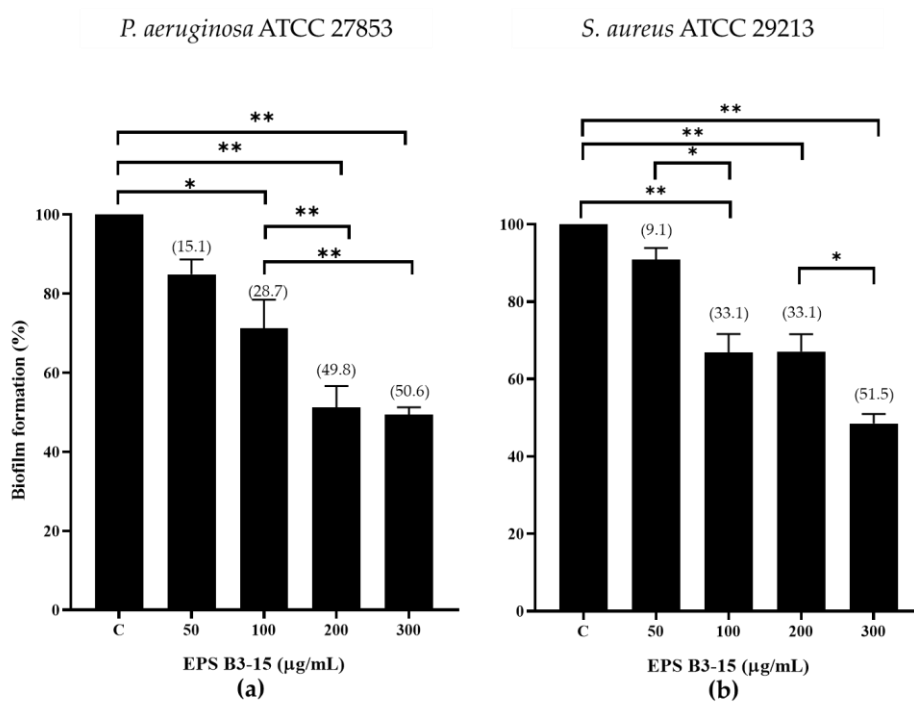


Figura 17: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo, C) o in presenza di EPS B3-15 a concentrazioni crescenti (da 50 a 300 µg/ml). I dati rappresentano la media ± deviazione standard (SD) di sei repliche (n=6). **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

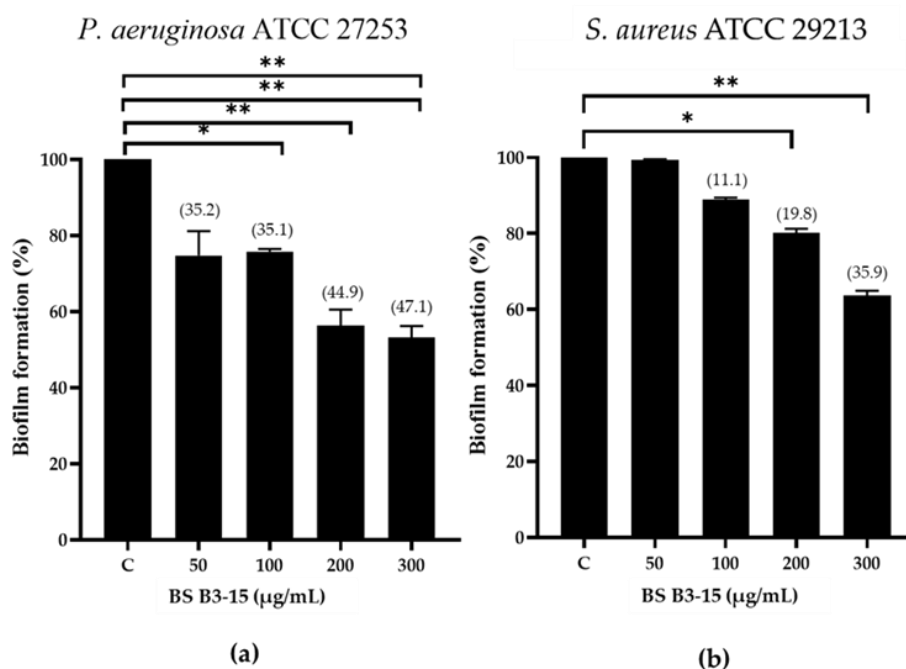


Figura 18: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo, C) o in presenza di BS B3-15 a concentrazioni crescenti (da 50 a 300 µg/ml). I dati rappresentano la media ± deviazione standard (SD) di sei repliche (n= 6). *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Sia l'EPS che il BS B3-15 hanno mostrato un effetto inibitorio dose-dipendente sulla formazione del biofilm di entrambi i ceppi (Figura 17 e 18). L'attività maggiore per l'EPS B3-15 è stata registrata alla concentrazione di 300 µg/ml, con una percentuale di inibizione del 50,6% per *P. aeruginosa* e del 51,5 per *S. aureus* (Figura 17) mentre il BS ha mostrato una maggiore capacità di inibire il biofilm di *P. aeruginosa* (47,1%) rispetto a *S. aureus* (35,9%) (Figura 18).

Attività dell'EPS e del BS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi

La capacità dell'EPS e del BS B3-15 (300 µg/ml) di interferire sulle diverse fasi di formazione del biofilm, valutata mediante aggiunta a tempi diversi dei biopolimeri (T0, T2, T4 e T8) e dopo 48 ore (T48) per *P. aeruginosa* o 24 ore (T24) per *S. aureus*, quando i loro biofilm erano completamente formati, è riportata in Figura 19 e 20.

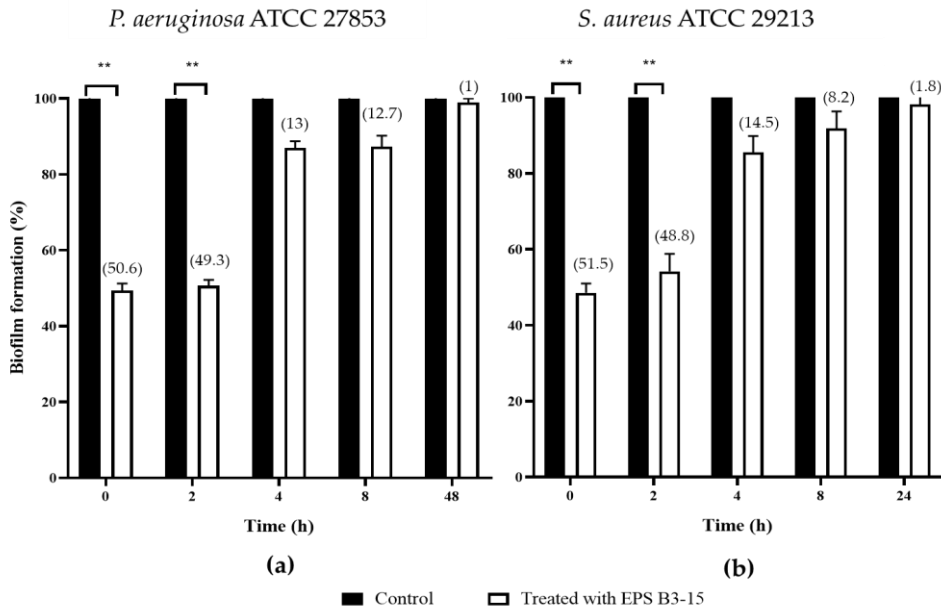


Figura 19: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o dopo l'aggiunta dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) in tempi diversi (T0, T2, T4, T8) e dopo 48 ore (T48) per *P. aeruginosa* o 24 ore (T24) per *S. aureus*, quando i biofilm erano completamente formati. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) ** Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

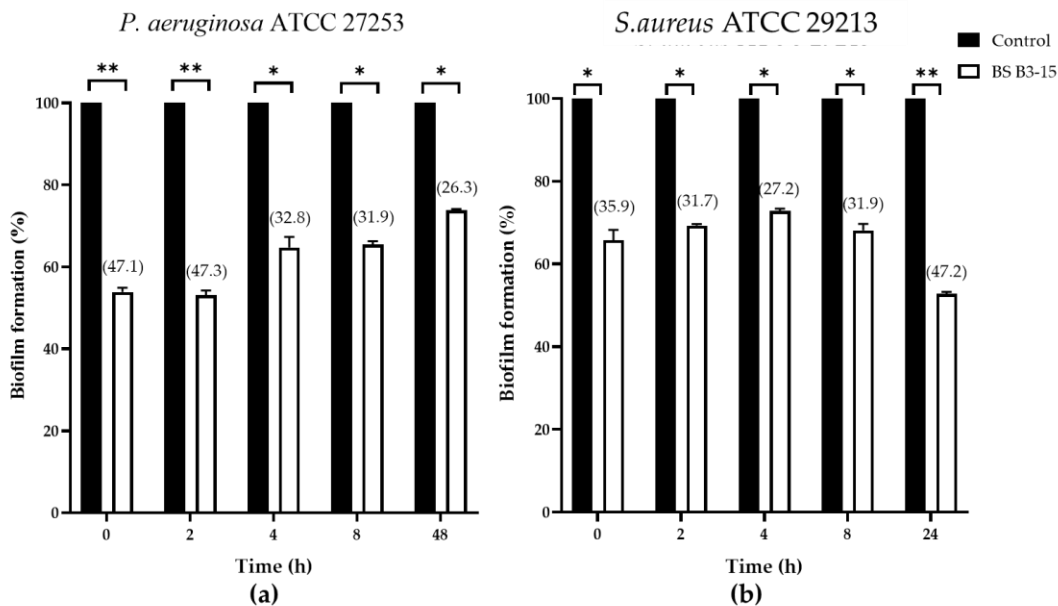


Figura 20: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o dopo l'aggiunta del BS B3-15 (300 µg/ml) in tempi diversi (T0, T2, T4, T8) e dopo 48 ore (T48) per *P. aeruginosa* o 24 ore (T24) per *S. aureus*, quando i biofilm erano completamente formati. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Quando aggiunto a T0 e T2, l'EPS B3-15 ha mostrato un'elevata capacità di influenzare l'adesione reversibile iniziale sia di *P. aeruginosa* (50,6 a T0 e 49,3% a T2 di inibizione) che di *S. aureus* (51,5 a T0 e 48,8% a T2 di inibizione). L'aggiunta dell'EPS B3-15 al T4 e T8 ha mostrato invece un'attività moderata sulla capacità di influenzare l'adesione irreversibile di *P. aeruginosa* (13,0 a T4 e 12,7% a T8 di inibizione) e *S. aureus* (14,5 a T0 e 8,2% a T8 di inibizione). L'EPS B3-15, infine, ha mostrato una capacità minima di agire sui biofilm maturi (1,0% al T48 per *P. aeruginosa* e 1,8% al T24 per *S. aureus*) (Figura 19).

Anche il BS B3-15 ha mostrato un'elevata capacità di influenzare l'adesione reversibile iniziale sia di *P. aeruginosa* (47,1 a T0 e 47,3% a T2 di inibizione) che di *S. aureus* (35,9 a T0 e 31,7,8% a T2 di inibizione). Inoltre, il BS B3-15 al T4 e T8 ha mostrato di essere attivo anche sull'adesione irreversibile di *P. aeruginosa* (32,8 a T4 e 31,9% a T8 di inibizione) e *S. aureus* (27,2 a T0 e 31,9% a T8 di inibizione). Il BS B3-15, infine, è stato in grado anche di distruggere il biofilm preformato, di *P. aeruginosa* (26,3%) e ancora più efficacemente per *S. aureus* (47,2).

Osservazione del biofilm e dell'attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 al microscopio confocale

Le micrografie effettuate al microscopio a scansione della formazione di biofilm su polistirene da parte di *P. aeruginosa* e *S. aureus* in assenza o in presenza dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) e del BS B3-15 sono riportate in Figura 21 e 22.

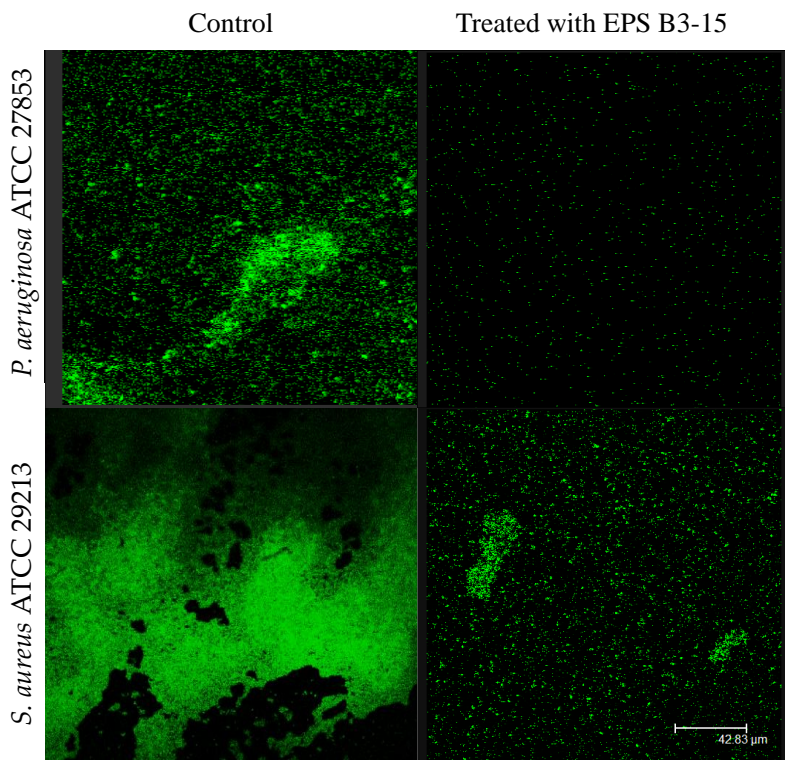


Figura 21: Formazione di biofilm su polistirene da parte di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o in presenza di EPS B3-15 (300 $\mu\text{g/ml}$). Micrografie ($\times 60$) dopo 48 ore di incubazione per *P. aeruginosa* o 24 ore per *S. aureus* a 37°C.

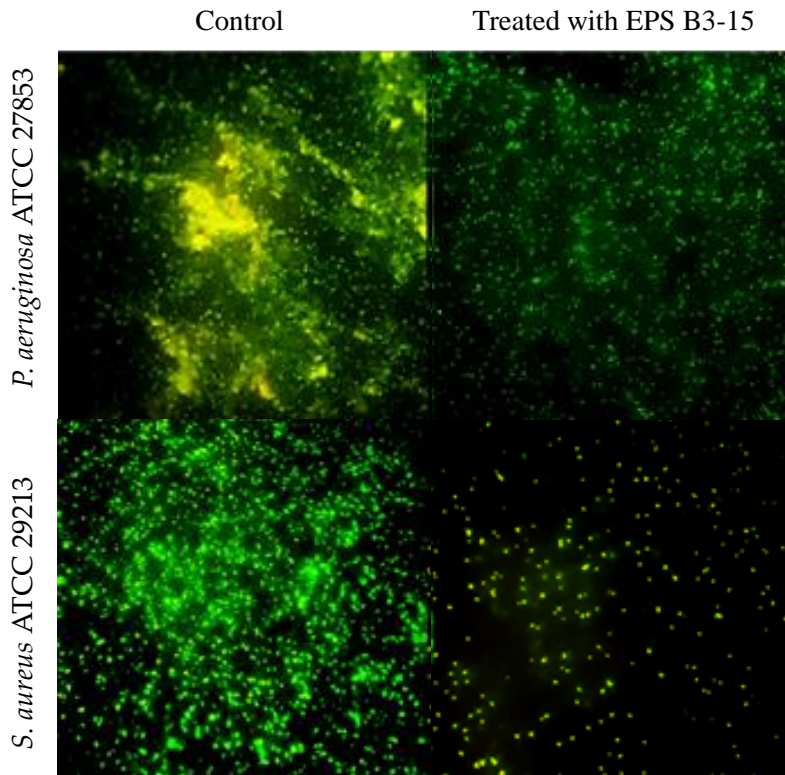


Figura 22: Formazione di biofilm su polistirene da parte di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o in presenza di BS B3-15 (300 $\mu\text{g/ml}$). Micrografie ($\times 60$) dopo 48 ore di incubazione per *P. aeruginosa* o 24 ore per *S. aureus* a 37°C.

Dopo il trattamento sia con l'EPS che con il BS B3-15, le micrografie hanno mostrato poche cellule aderenti al polistirene sia di *P. aeruginosa* che di *S. aureus* dopo rispettivamente 48 e 24 ore di incubazione (Figura 21 e 22), ad ulteriore conferma dell'attività antibiofilm ed antiadesiva di entrambi i biopolimeri prodotti dal *B. licheniformis* B3-15.

Attività antibiofilm dell'EPS e del BS B3-15 su un dispositivo medico in PVC

Gli effetti dell'aggiunta di differenti concentrazioni dell'EPS B3-15 e del BPS B3-15 (da 50 a 300 µg/ml) sulla formazione di biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su un segmento di dispositivo medico in PVC sono mostrati nelle Figure 23 e 24.

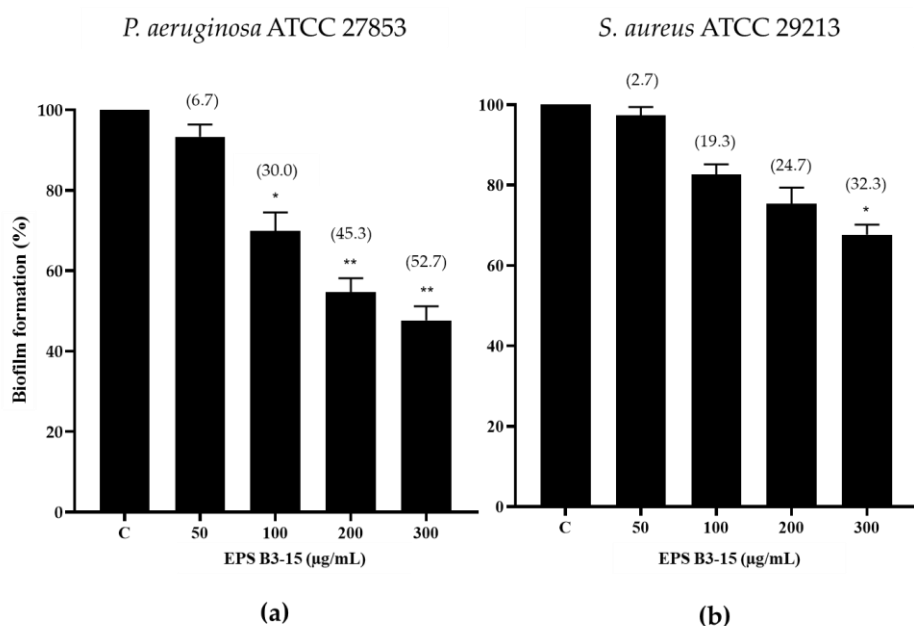


Figura 23: Formazione di biofilm (%) su un dispositivo medico in PVC da parte di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (Controllo, C) e dopo l'aggiunta di EPS B3-15 (da 50 a 300 µg/ml), rispettivamente dopo 48 o 24 ore di incubazione. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$) rispetto ai controlli non trattati. Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

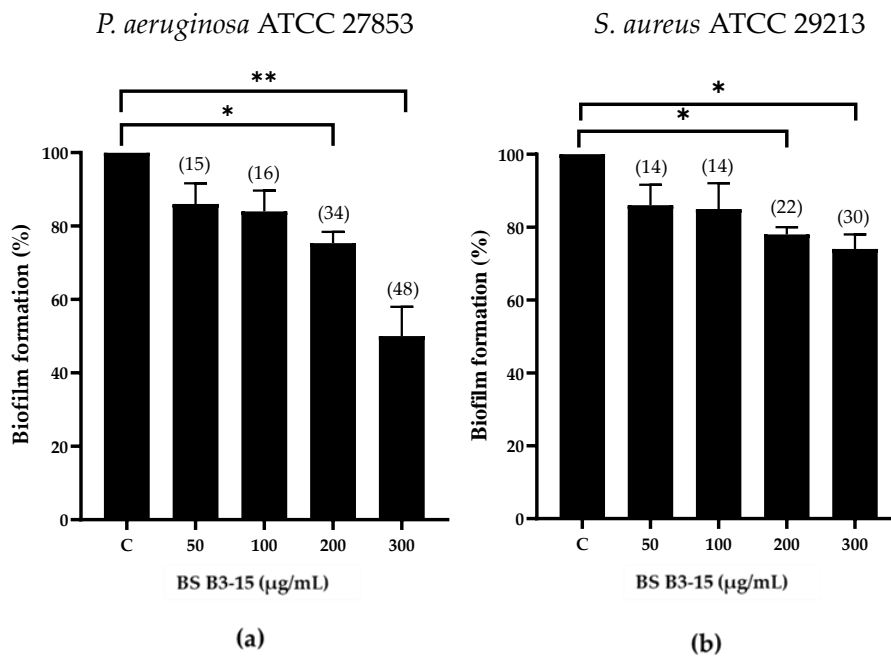


Figura 24: Formazione di biofilm (%) su un dispositivo medico in PVC da parte di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (Controllo, C) e dopo l'aggiunta di BS B3-15 (da 50 a 300 µg/ml), rispettivamente dopo 48 o 24 ore di incubazione. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) ** Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Sia l'EPS che il BS B3-15 alla massima concentrazione (300 µg/ml) hanno ridotto la formazione di biofilm di *P. aeruginosa* (rispettivamente 53 e 48%) in modo più efficiente rispetto a *S. aureus* (32 e 30%).

Effetti dell'EPS B3-15 sull'adesione superficiale

Saggio di rivestimento (Coating assay)

Gli effetti dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) sulle superfici abiotiche sono stati determinati mediante valutazione dell'adesione di *P. aeruginosa* o *S. aureus* a superfici pretrattate con l'EPS B3-15. L'EPS ha interferito con l'adesione su superfici di polistirene dei due ceppi, ed è stato più efficace nel prevenire l'adesione di *S. aureus* rispetto a *P. aeruginosa* (Figura 25).

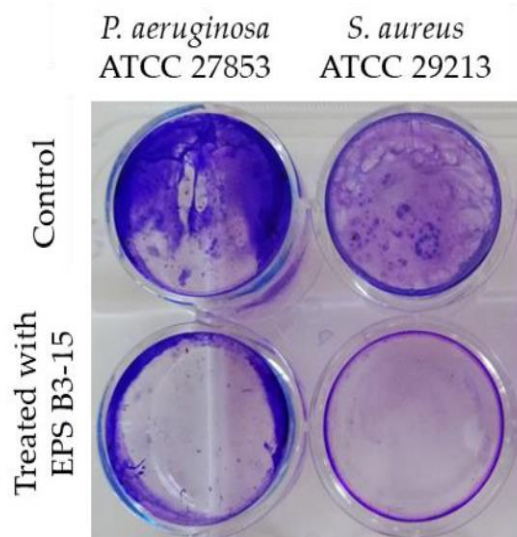


Figura 25: Adesione a superfici di polistirene di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o pretrattate (18 ore) con l'EPS B3-15 (300 µg/ml).

Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)

L'affinità a solventi polari (acetato di etile e cloroformio) e non polari (decano ed esadecano) di *P. aeruginosa* e *S. aureus* è illustrata nella Figura 26.

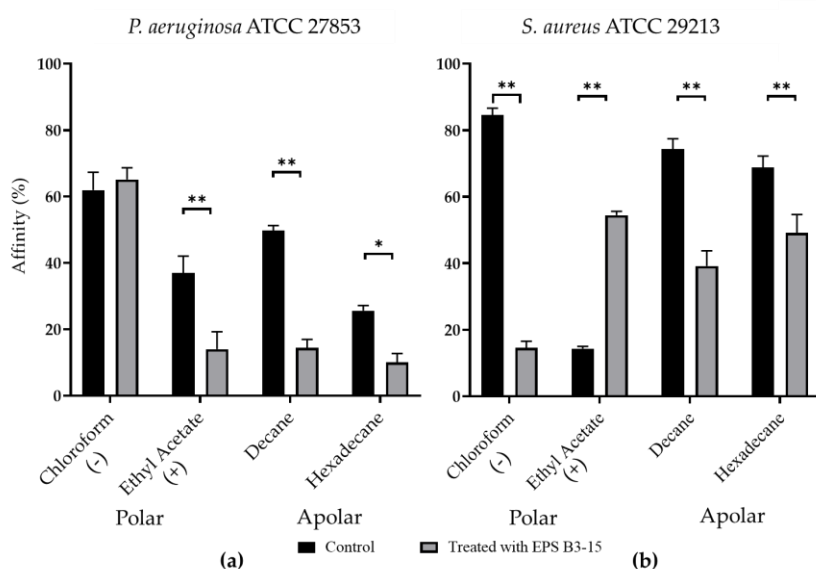


Figura 26: Affinità (espressa in percentuale) a solventi polari (cloroformio e acetato di etile) e non polari (decano ed esadecano) di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in cellule non trattate (controllo) o trattate con l'EPS B3-15 (300 µg/ml). L'affinità per il cloroformio indica la presenza di cariche cellulari negative (-); l'affinità per l'acetato

di etile indica la presenza di cariche cellulari positive (+). Tutti i saggi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Le cellule di *P. aeruginosa* non trattate possedevano un'elevata affinità per il cloroformio (61,9%), una bassa affinità (<50%) per l'acetato di etile, il decano e l'esadecano, indicando che le superfici cellulari erano cariche negativamente e moderatamente idrofobiche (Figura 26a). Le cellule di *S. aureus* non trattate hanno mostrato un'elevata affinità (84,5%) per il cloroformio e una bassa (14,2%) per l'acetato di etile, mentre l'affinità per il decano e l'esadecano era elevata (rispettivamente 74,4% e 68,3%), suggerendo che le superfici cellulari erano cariche negativamente e idrofobiche (Figura 26b). Con l'unica eccezione di *P. aeruginosa* nei confronti del cloroformio, l'EPS B3-15 ha modificato significativamente l'affinità delle cellule batteriche per tutti gli idrocarburi testati, indicando che esso è in grado di influenzare sia le cariche superficiali cellulari che l'idrofobicità della parete cellulare.

Aggregazione cellula-cellula

Le cellule di *P. aeruginosa* e *S. aureus*, trattate con l'EPS B3-15 (300 µg/ml), hanno mostrato una minore capacità di aggregazione, (rispettivamente 30 e 50%), dovuta alla capacità dell'EPS di inibire l'adesione fra le cellule (Figura 27). I dati ottenuti hanno indicato che l'EPS potrebbe agire come agente disaggregante.

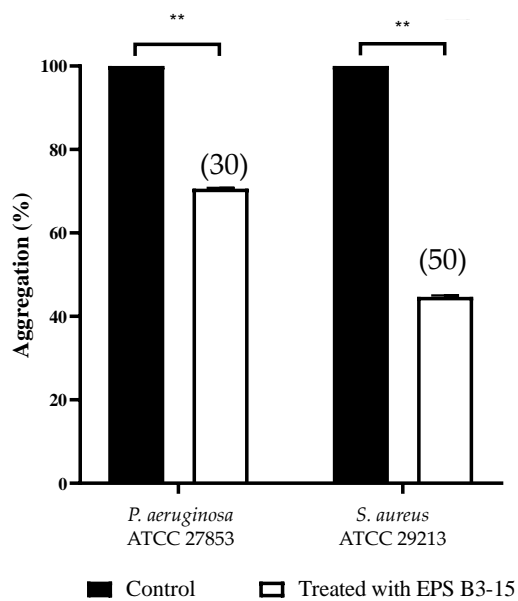


Figura 27: Effetti dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) sull'aggregazione cellulare (espressa in percentuale) di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 dopo 2 ore di incubazione. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 sulla regolazione dei fattori di adesione nella formazione del biofilm mediante qRT-PCR

Gli effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) sull'espressione di geni di *P. aeruginosa* e *S. aureus* che codificano per lectine o adesine coinvolte nell'aggregazione e nell'adesione cellula-cellula (rispettivamente *lecA* e *clfA*), e nella produzione di polisaccaridi (rispettivamente *psIA* e *icaD*) sono riportati in Figura 28.

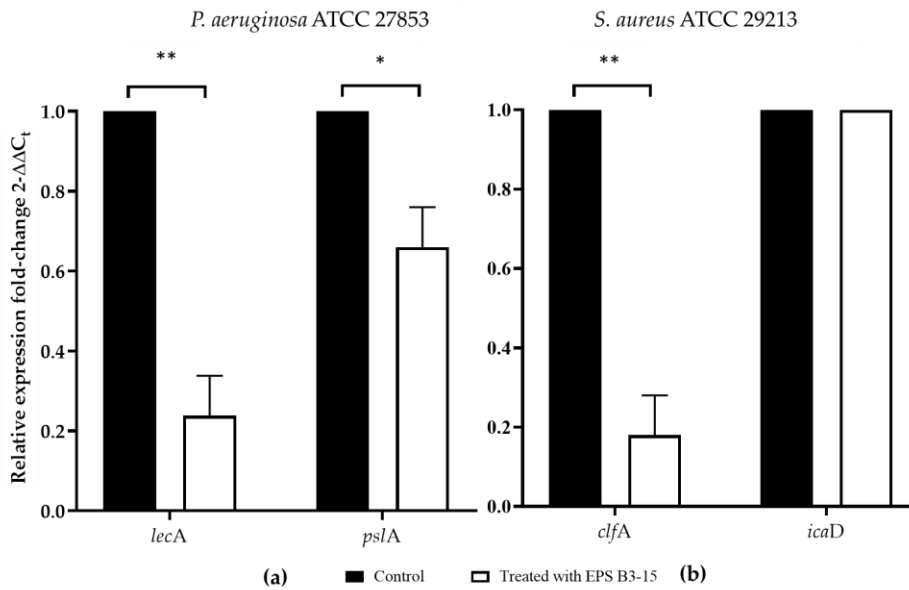


Figura 28: Espressione di geni coinvolti nell'adesione e nella formazione del biofilm in (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*lecA* e *pslA*) e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (*clfA* e *icaD*) non trattati (controllo) o trattati con l'EPS B3-15 (300 µg/ml). *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$).

Dopo l'aggiunta dell'EPS B3-15, i geni *lecA* e *pslA* di *P. aeruginosa* sono stati down-regulated (Figura 28a). Trattato con EPS, il gene *clfA* di *S. aureus*, coinvolto nell'adesione iniziale, è stato down-regulated a differenza del gene *icaD* (Figura 28b).

Effetti dell'aggiunta dell'EPS e del BS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di aderire a cellule epiteliali nasali umane (HNEpC)

Effetti dell'EPS e del BS B3-15 sull'adesione batterica di P. aeruginosa e S. aureus sulle HNEpC

Gli effetti dell'aggiunta dell'EPS e del BS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di aderire alle cellule HNEpC sono riportati rispettivamente in Figura 29 e 30.

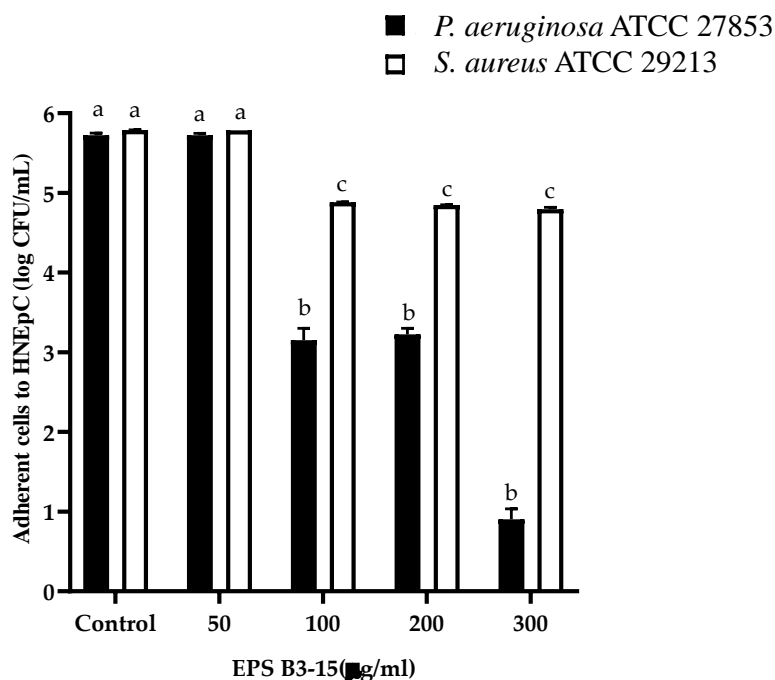


Figura 29: Effetti dell'aggiunta dell'EPS B3-15 a diverse concentrazioni (da 50 a 300 µg/ml) sull'adesione di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (espressa come scala logaritmica di CFU/ml) alle cellule epiteliali nasali umane HNEpC, dopo 2 ore di incubazione a 37 C. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$).

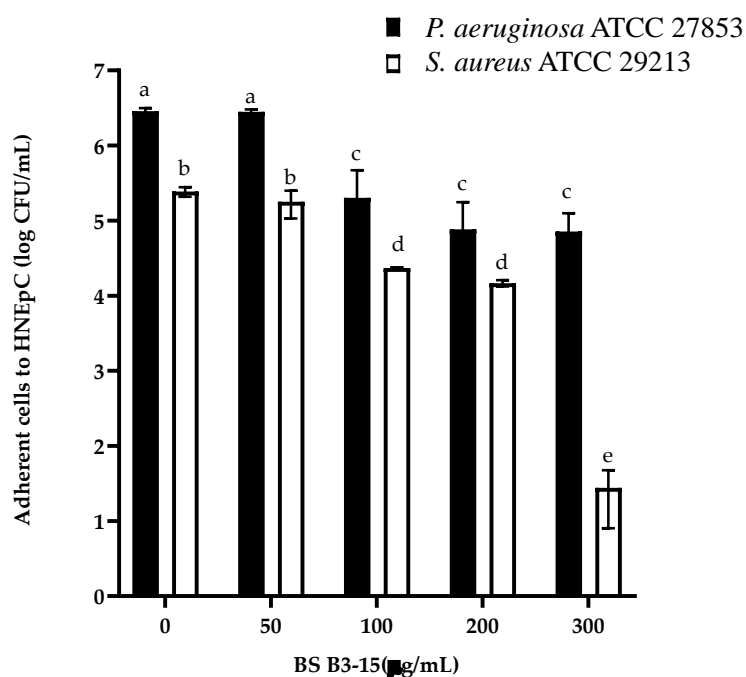


Figura 30: Effetti dell'aggiunta del BS B3-15 a diverse concentrazioni (da 50 a 300 µg/ml) sull'adesione (a) di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) di *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (espressa come scala logaritmica di CFU/ml) alle cellule epiteliali nasali umane HNEpC, dopo 2 ore di incubazione a 37 C. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$).

L'aggiunta dell'EPS B3-15 a differenti concentrazioni (da 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$) ha interferito con l'adesione di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sulle HNEpC (Figura 29) dopo 2 ore di incubazione a 37°C. Alla massima concentrazione testata di 300 $\mu\text{g/ml}$, l'EPS ha ridotto l'adesione di *P. aeruginosa* di cinque volte in scala logaritmiche mentre per *S. aureus* di una sola scala logaritmica.

L'aggiunta del BS B3-15 a differenti concentrazioni (da 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$) ha interferito con l'adesione di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sulle HNEpC (Figura 30) dopo 2 ore di incubazione a 37°C ma con effetti diversi. Alla massima concentrazione testata di 300 $\mu\text{g/ml}$, infatti, il BS ha ridotto l'adesione di *P. aeruginosa* di più di una volta in scala logaritmiche mentre per *S. aureus* di 5 volte la scala logaritmica.

Citotossicità dell'EPS e del BS B3-15 sulle HNEpC

La citotossicità dell'EPS e del BS B3-15 a concentrazioni crescenti (da 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$) sulle HNEpC dopo 24 ore di incubazione è riportata in Figura 31.

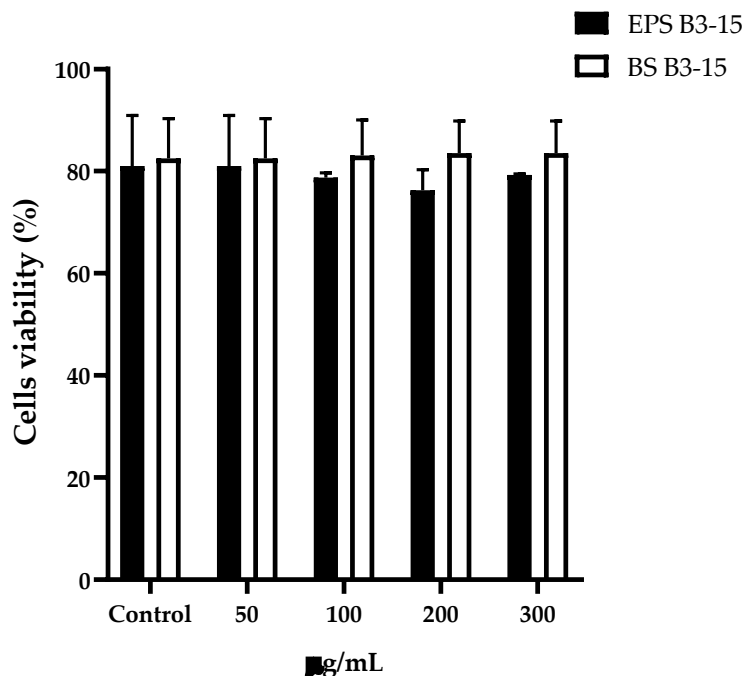


Figura 31. Vitalità delle cellule HNEpC dopo 24 ore in coltura cellulare non trattate (controllo) o trattate con l'EPS o il BS B3-15 (da 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$).

Dopo l'incubazione sia con l'EPS che con il BS B3-15, la vitalità cellulare non ha mostrato differenze significative con la coltura cellulare di controllo, indicando l'assenza di effetti citotossici.

Attività antibiofilm ed effetti sull'adesione superficiale contro patogeni umani delle vie respiratorie

Attività dell'EPS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni

L'EPS-B3-15 ha mostrato un'attività antibiofilm dose dipendente anche contro i patogeni umani delle vie respiratorie *K. pneumoniae* e *Str. pneumoniae* (Figure 32).

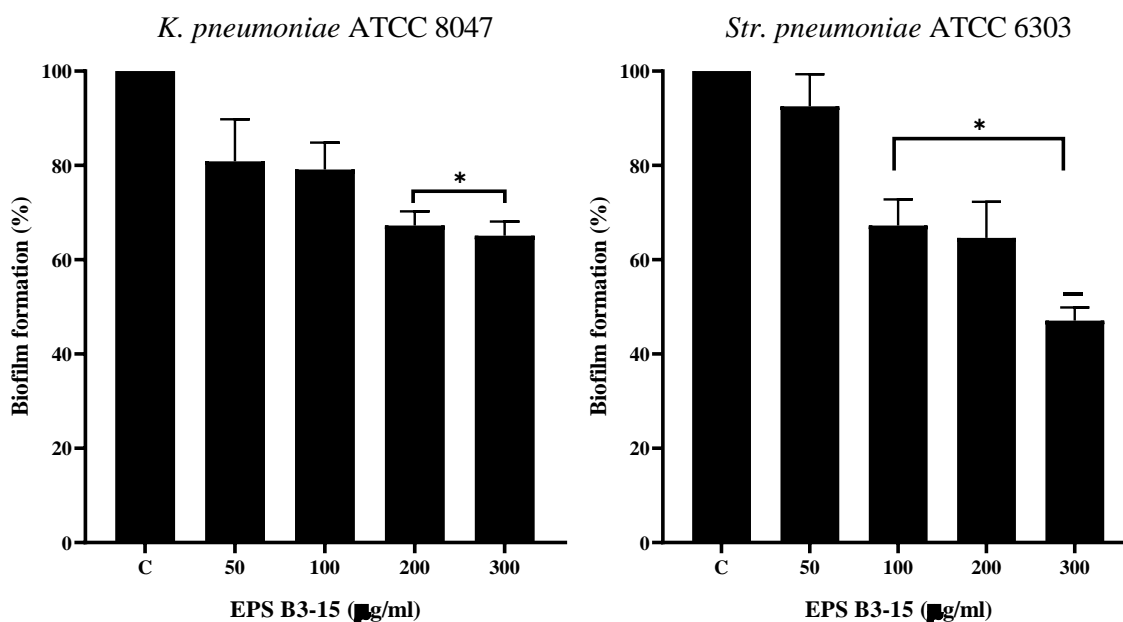


Figura 32: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 in assenza (controllo, C) o in presenza di EPS B3-15 a concentrazioni crescenti (da 50 a 300 µg/ml). I dati rappresentano la media ± deviazione standard (SD) di sei repliche (n= 6). **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

La maggiore attività antibiofilm dell'EPS-B3-15 è stata registrata alla dose massima testata di 300 µg/ml contro il batterio gram-positivo *Str. pneumoniae* (52,8%) ed era leggermente superiore rispetto a quella riscontrata per il batterio gram-positivo scelto come organismi modello *S. aureus* (51,5%). L'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 contro *K. pneumoniae* non ha mostrato differenze significative

sia alla concentrazione di 200 µg/ml che a quella di 300 µg/ml, con una percentuale di inibizione del biofilm del 44,4% (200 µg/ml) e del 44,2 (300 µg/ml), risultati comparabili con quelli ottenuti per l'organismi modello *P. aeruginosa*.

Saggio di rivestimento (Coating assay)

Gli effetti dell'EPS B3-15 (300 µg/ml) sulle superfici abiotiche sono stati determinati mediante valutazione dell'adesione di *K. pneumoniae* e *Str. pneumoniae* a superfici pretrattate con l'EPS B3-15 (Figura 33).

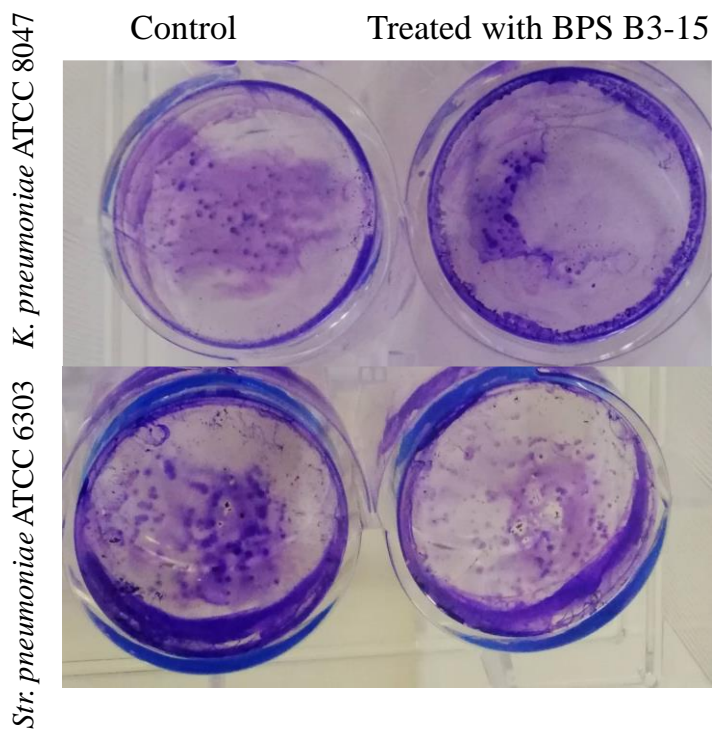


Figura 33: Adesione a superfici di polistirene di *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047 e *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 in assenza (controllo) o pretrattate (18 ore) con l'EPS B3-15 (300 µg/ml).

L'EPS ha interferito moderatamente con l'adesione su superfici di polistirene dei due ceppi, ed è stato più efficace nel prevenire l'adesione di *Str. pneumoniae* che di *K. pneumoniae*. Se confrontate con i risultati ottenuti con *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Figura 33) l'attività di inibizione dell'adesione dell'EPS è stata inferiore.

Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)

L'affinità a solventi polari (acetato di etile e cloroformio) e non polari (decano ed esadecano) di *K. pneumoniae* e *Str. pneumoniae* è mostrata in Figura 34.

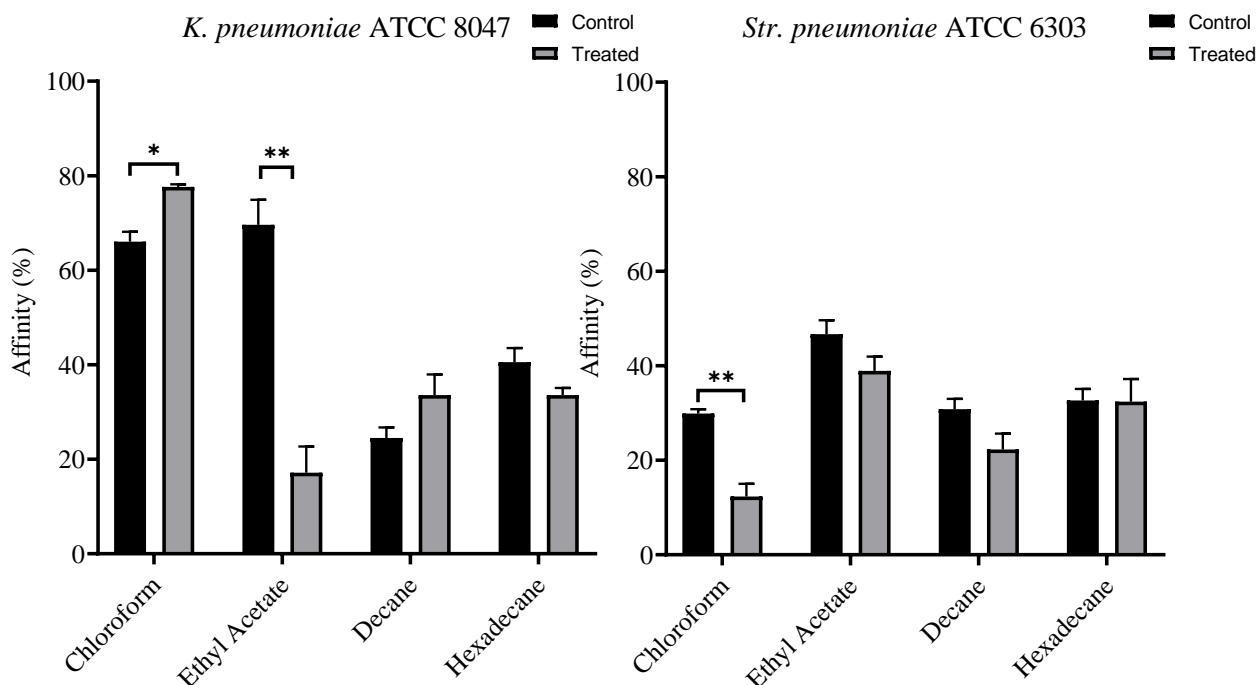


Figura 34: Affinità (espressa in percentuale) a solventi polari (cloroformio e acetato di etile) e non polari (decano ed esadecano) di (a) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 8047 (b) *Streptococcus pneumoniae* ATCC 6303 in cellule non trattate (controllo) o trattate con l'EPS B3-15 (300 µg/ml). L'affinità per il cloroformio indica la presenza di cariche cellulari negative (-); l'affinità per l'acetato di etile indica la presenza di cariche cellulari positive (+). Tutti i saggi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. *Differenze significative ($p \leq 0,05$), **Differenze significative ($p \leq 0,01$) rispetto ai controlli non trattati. Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Il batterio Gram-negativo *K. pneumoniae* e ha mostrato una significativa riduzione dell'affinità per l'acetato di etile e un aumento per il cloroformio, suggerendo una variazione delle cariche di superficie.

Al contrario, il ceppo Gram positivo *Str. pneumoniae* ha mostrato una minore affinità con il cloroformio dopo il trattamento con EPS-B3-15, suggerendo variazioni di carica differenti nella parete cellulare. Anche per i ceppi patogeni delle vie aeree testati l'interazione dell'EPS B3-15 con le strutture esterne dei batteri ha mostrato la capacità di modificare le cariche superficiali delle cellule e di conseguenza la capacità di aderire ai substrati abiotici o biotici (Figura 34).

Attività sinergica dell'EPS e del BS B3-15 (BPS B3-15) sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm

Attività antibatterica del BPS B3-15

Il BPS B3-15 non ha influenzato la crescita di *P. aeruginosa* o *S. aureus* fino alla massima concentrazione testata di 1000 $\mu\text{g/ml}$, indicando di non esercitare alcuna attività antibatterica. Le curve di crescita di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sono state valutate in assenza o in presenza di BPS B3-15 alla concentrazione di 300 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 35), poiché ciascun componente del BPS B3-15, quindi sia l'EPS che il BS B3-15 hanno mostrato di possedere una bassa tossicità nei confronti delle cellule umane fino a questa concentrazione (Zammuto et al., 2023a,b).

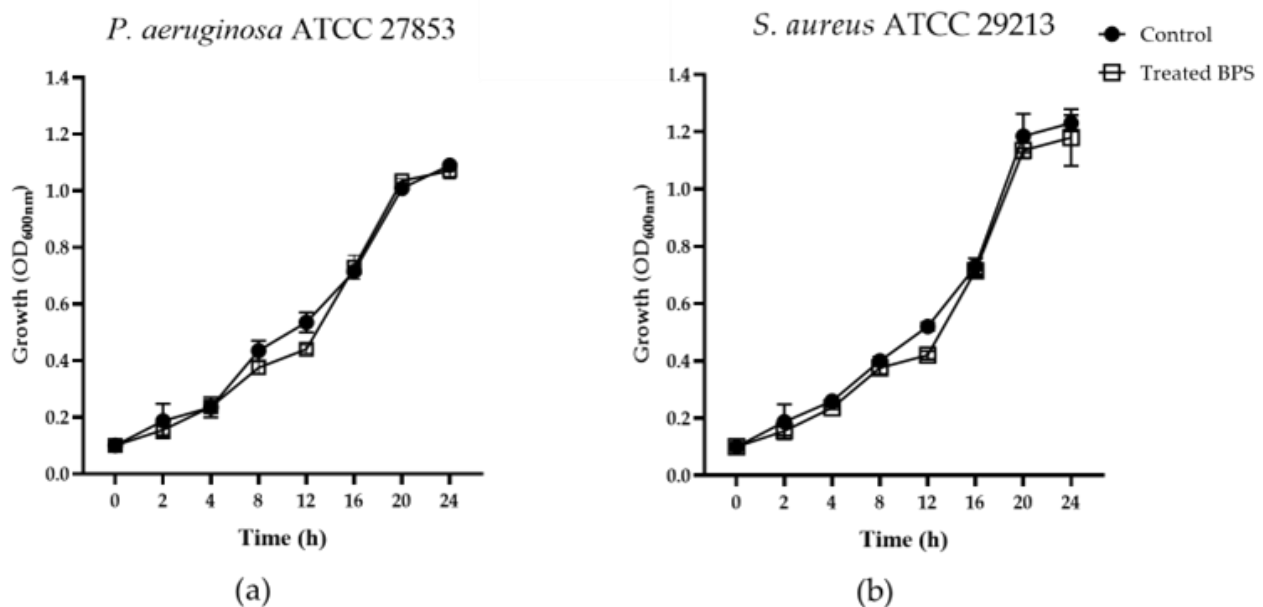


Figura 35: Curve di crescita di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e in assenza (controllo) e in presenza di BPS B3-15 (300 $\mu\text{g/ml}$). I dati sono espressi come medie e deviazioni standard (n= 3).

Attività antibiofilm del BPS B3-15 su micropiastre di polistirene a differenti concentrazioni

Gli effetti di inibizione del BPS B3-15 a dosi crescenti (da 50 a 300 $\mu\text{g/ml}$) sulla formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su micropiastre di polistirene sono riportati nella Figura 36.

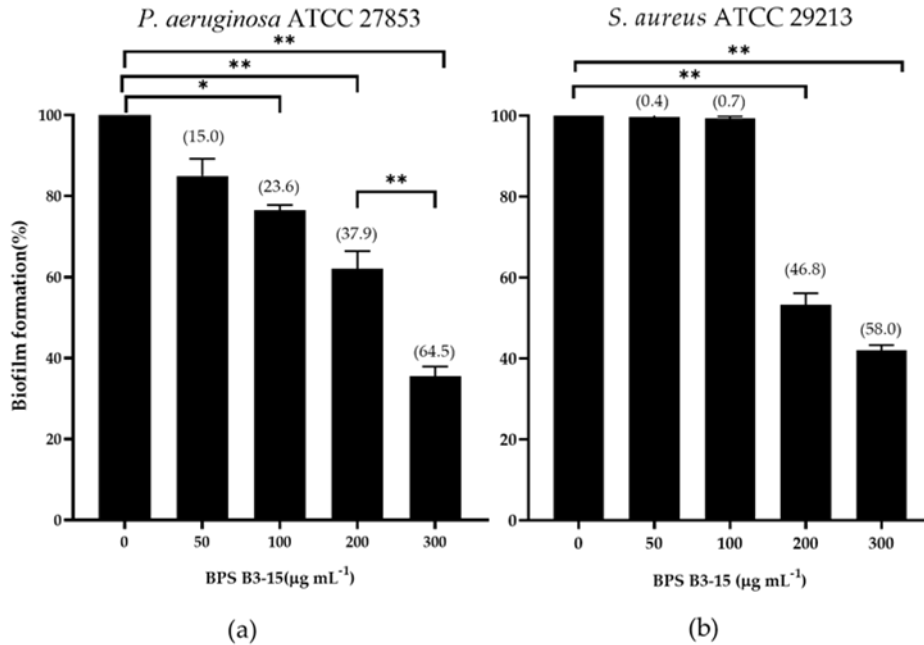


Figure 36: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo, C) o in presenza di BPS B3-15 a concentrazioni crescenti (da 50 a 300 µg/ml). I dati rappresentano la media ± deviazione standard (SD) di sei repliche (n= 6). *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Il BPS B3-15 ha mostrato effetti inibitori dose-dipendenti, con la concentrazione più alta testata di 300 µg/ml più attiva nel ridurre il biofilm di *P. aeruginosa* (65%) (Figura 36a) e *S. aureus* (58%) (Figura 36b), più alte rispetto a quelle registrate per i singoli biopolimeri.

Attività antibiofilm del BPS B3-15 su micropiastre di polistirene aggiunto in tempi diversi

Gli effetti di inibizione del BPS B3-15 aggiunto a tempi diversi, sulla formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su micropiastre di polistirene sono riportati in Figura 37.

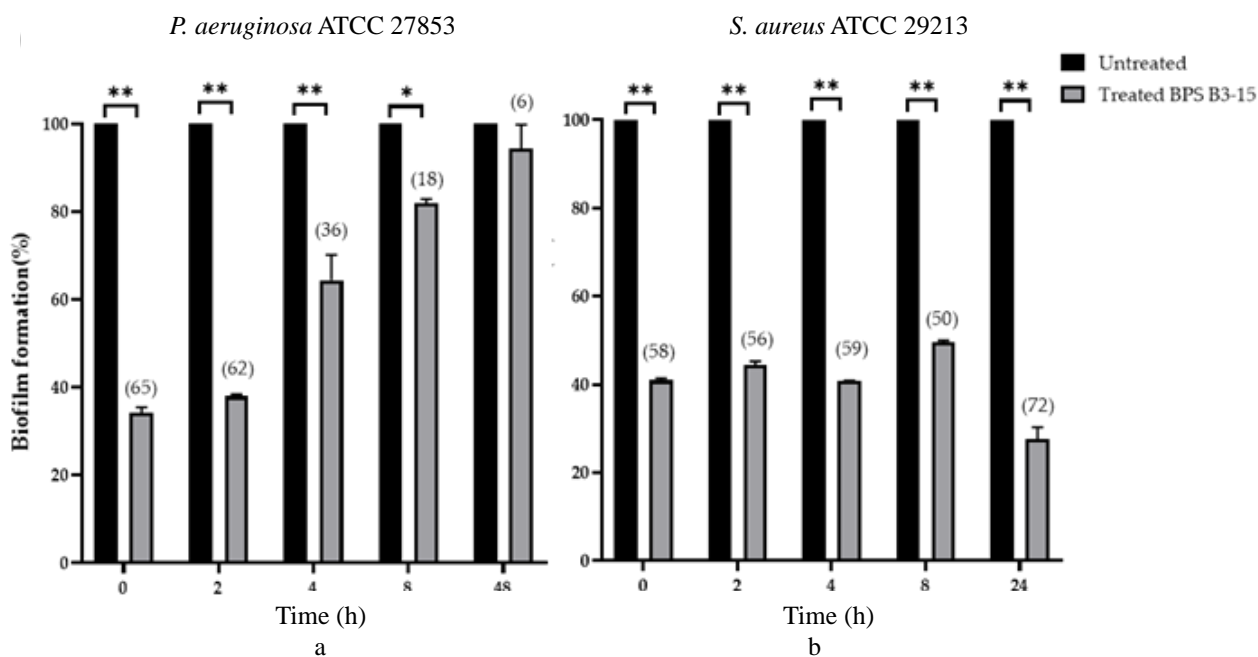


Figura 37: Formazione di biofilm (%) su micropiastre di polistirene da (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o dopo l'aggiunta dell'BPS B3-15 (300 µg/ml) in tempi diversi (T0, T2, T4, T8) e dopo 48 ore (T48) per *P. aeruginosa* o 24 ore (T24) per *S. aureus*, quando i biofilm erano completamente formati. *Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Per valutare la capacità di interferire con le diverse fasi di formazione del biofilm, il BPS B3-15 (300 µg/ml) è stato aggiunto in tempi diversi di crescita batterica (0, 2, 4 e 8 ore) e a 48 ore per *P. aeruginosa* o 24 ore per *S. aureus*, quando i loro biofilm erano completamente formati. Quando aggiunto a T0 e T2, il BPS B3-15 ha fortemente inibito l'adesione iniziale e reversibile di *P. aeruginosa* (rispettivamente 65% e 62% di inibizione) e *S. aureus* (rispettivamente 58% e 56% di inibizione). Quando aggiunto i tempi T4 e T8, la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* è stata moderatamente inibita dal BPS B3-15 (rispettivamente 36% e 18%), mentre quella di *S. aureus* è stata notevolmente inibita (59% e 50%). Il biofilm maturo di *P. aeruginosa* (T48) è stato moderatamente inibito (6%) mediante l'aggiunta di BPS B3-15, mentre quello di *S. aureus* (T24) è stato quasi completamente rimosso (72%).

Attività antibiofilm del BPS B3-15 su un dispositivo medico in PVC

L'effetto dell'aggiunta di BPS B3-15 (da 50 a 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sulla formazione di biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su una sezione di polivinilcloruro (PVC) di un dispositivo medico è mostrato nella Figura 38.

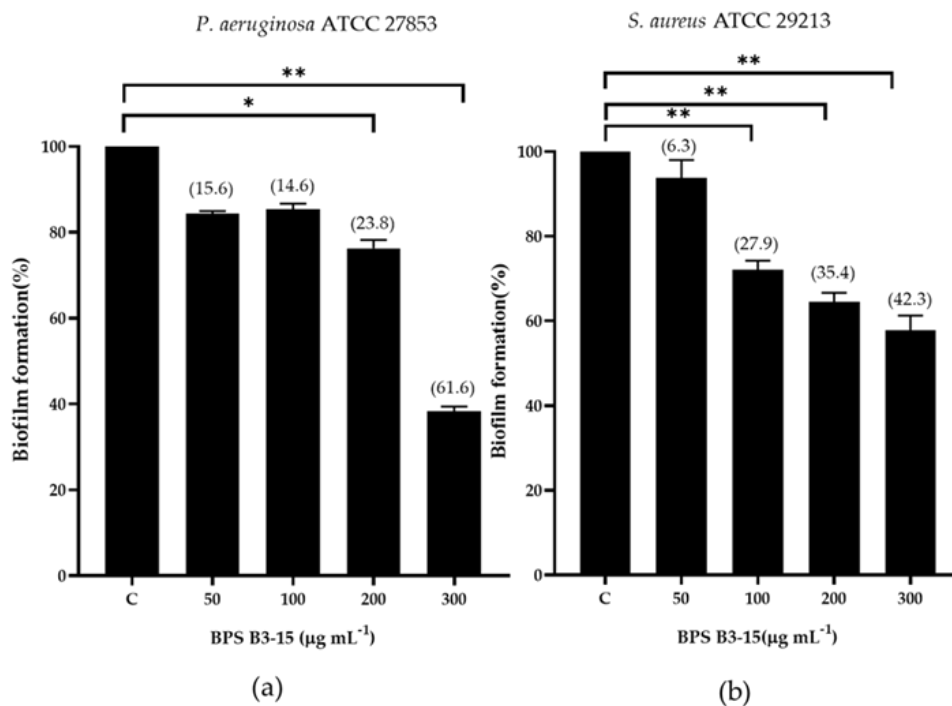


Figura 38: Formazione di biofilm (%) su un dispositivo medico in PVC da parte di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (Controllo, C) e dopo l'aggiunta di BPS B3-15 (da 50 a 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), rispettivamente dopo 48 o 24 ore di incubazione. *Differenze statisticamente significative ($p = 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p \leq 0,01$) rilevate mediante ANOVA rispetto ai controlli non trattati. Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Il BPS B3-15 ha mostrato la capacità di ridurre la formazione di biofilm su un dispositivo medico in PVC sia di *P. aeruginosa* che di *S. aureus* in maniera dose dipendente, con un'attività, alla più alta concentrazione testata (300 $\mu\text{g}/\text{ml}$), più efficace contro *P. aeruginosa* rispetto a *S. aureus* (rispettivamente 62 e 42%).

Proprietà tensioattive ed effetto sull'adesione superficiale del BPS B3-15

Proprietà tensioattive

Gli effetti del BPS B3-15 (300 µg/ml) sulle proprietà superficiali del polistirene mediante l'attività emulsionante e la misura dell'angolo di contatto sono riportati nella Figura 39.

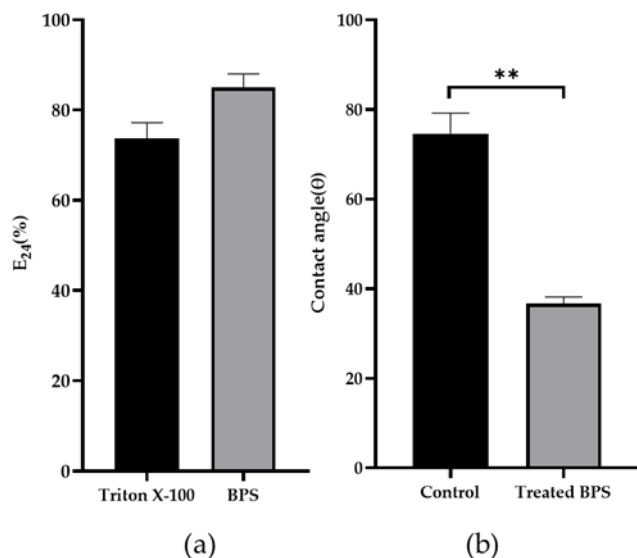


Figura 39: Proprietà tensioattive del BPS B3-15. (a) Capacità del BPS B3-15 di emulsionare (E₂₄) cherosene (1:1, v/v). (b) Angolo di contatto della soluzione acquosa del BPS B3-15 (300 µg/ml) su superfici di polistirene. I dati sono espressi come medie e deviazioni standard (n= 3). **Significativamente differente ($p \leq 0,01$) rispetto alla condizione non trattata.

Il BPS B3-15 ha mostrato un'elevata capacità di emulsionare il cherosene (1:1 v/v) con un valore E₂₄ dell'82% superiore rispetto a Triton X-100 (74%) (Figura 39a), utilizzato come controllo positivo. L'attività superficiale del BPS B3-15 è stata confermata anche dalla sua capacità di modificare la bagnabilità delle superfici di polistirene, come indicato dall'angolo di contatto che è stato notevolmente ridotto da 79 a 36 (Figura 39b).

Saggio di rivestimento (Coating assay)

Gli effetti del BPS B3-15 (300 µg/ml) sulle superfici abiotiche sono stati determinati mediante valutazione dell'adesione di *P. aeruginosa* o *S. aureus* a superfici pretrattate con il BPS B3-15 (Figura 40).

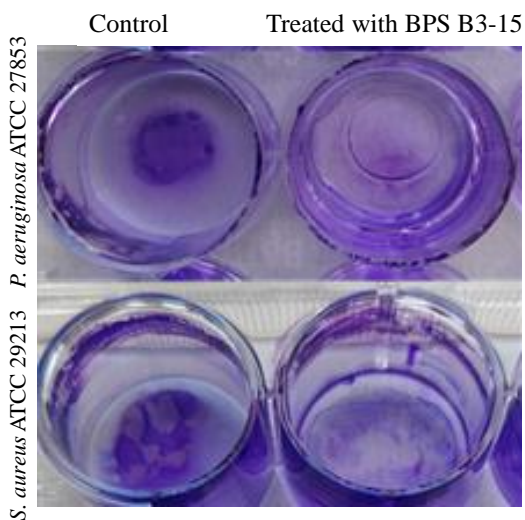


Figura 40: Adesione a superfici di polistirene di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza (controllo) o pretrattate (18 ore) con il BPS B3-15 (300 µg/ml).

Il BPS ha interferito con l'adesione su superfici di polistirene dei due ceppi, ed è stato più efficace nel prevenire l'adesione di *S. aureus* rispetto a *P. aeruginosa* (Figura 40).

Saggio dell'adesione batterica agli idrocarburi (MATH)

L'affinità a solventi polari (acetato di etile e cloroformio) e non polari (decano ed esadecano) di *P. aeruginosa* e *S. aureus* in cellule non trattate (controllo) o trattate con il BPS B3-15 (300 µg/ml) è illustrata nella Figura 41.

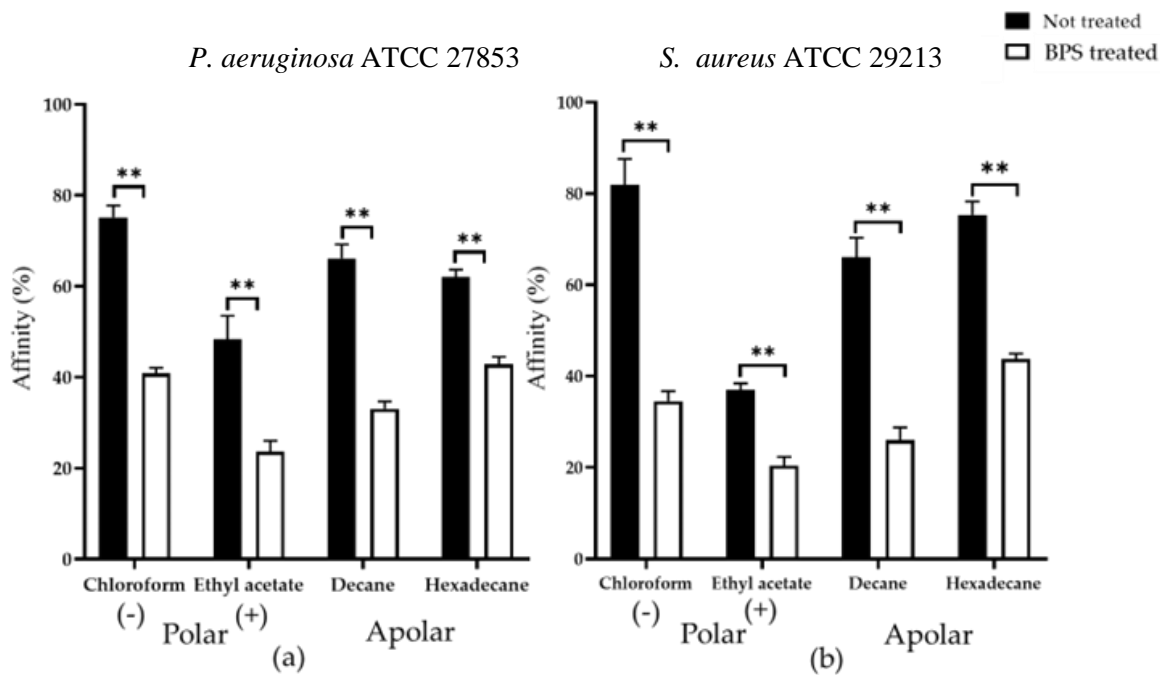


Figura 41: Affinità (espressa in percentuale) a solventi polari (cloroformio e acetato di etile) e non polari (decano ed esadecano) di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in cellule non trattate (controllo) o trattate con il BPS B3-15 (300 µg/ml). L'affinità per il cloroformio indica la presenza di cariche cellulari negative (-); l'affinità per l'acetato di etile indica la presenza di cariche cellulari positive (+). Tutti i saggi sono rappresentativi di tre esperimenti indipendenti. *Differenze statisticamente significative ($p = 0,05$) **Differenze statisticamente significative ($p = 0,01$). Tra parentesi sono riportati i dati sulla riduzione del biofilm in percentuale.

Il BPS B3-15 ha modificato significativamente l'affinità delle cellule dei batteri testati per tutti gli idrocarburi, con la più alta differenza registrata per le cellule di *S. aureus* nei confronti del cloroformio e del decano con una riduzione rispettivamente del 43% e del 37%.

Attività dell'EPS e del BS B3-15 e attività sinergica BPS B3-15 sulla capacità dei ceppi patogeni *P. aeruginosa* e *S. aureus* di formare biofilm su lenti a contatto

Attività antibatterica di una soluzione per risciacquo di lenti a contatto (CL-care)

Gli effetti della soluzione CL-care sulla biomassa batterica (OD_{600nm}) e sulla conta delle cellule vitali (CFU/ml), coltivate rispettivamente in MHB e MHA, dopo incubazione per 24 ore a 37°C, sono mostrati nella Tabella 11.

Tabella 11: Biomassa di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (OD_{600nm}) e cellule vitali (CFU/ml) in presenza di una soluzione per il risciacquo (CL-care) di lenti a contatto (CS) diluita (10, 20, 30 e 50%) in PBS o non diluita (100%).

Soluzione CL-care	Ceppo	Biomassa batterica OD _{600nm}	Cellule vitali (CFU/ml)
0	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1,23	$5,05 \times 10^8$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,27	$9,60 \times 10^8$
10	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,97	$4,13 \times 10^8$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	1,17	$8,79 \times 10^8$
20	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,77	$3,24 \times 10^8$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,54	$3,95 \times 10^8$
30	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,60	$2,50 \times 10^8$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,40	$3,00 \times 10^8$
50	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,07	$1,00 \times 10^4$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,06	$3,00 \times 10^3$
100	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	0,07	$3,50 \times 10^2$
	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	0,06	$3,00 \times 10^2$

L'attività antibatterica della CS-care è risultata dose-dipendente, con una significativa riduzione della crescita batterica a concentrazioni superiori al 30%. Senza influenzare la biomassa batterica (OD_{600nm} = 0,07), la CS-care a concentrazioni del 50 e 100% (v/v) ha ridotto fortemente le cellule vitali di *P. aeruginosa* (rispettivamente di 4 e 6 in scala logaritmica) e *S. aureus* (5 e 6 volte su scala logaritmica), indicando un'attività battericida della soluzione.

Attività antibiofilm della CL-care su lenti a contatto (CL)

Gli effetti della CS-care a diverse concentrazioni (30, 50 e 100%) sulla formazione di biofilm da parte di *P. aeruginosa* o *S. aureus* sulle CL normalizzata per ciascuna biomassa sono mostrati in Figura 42.

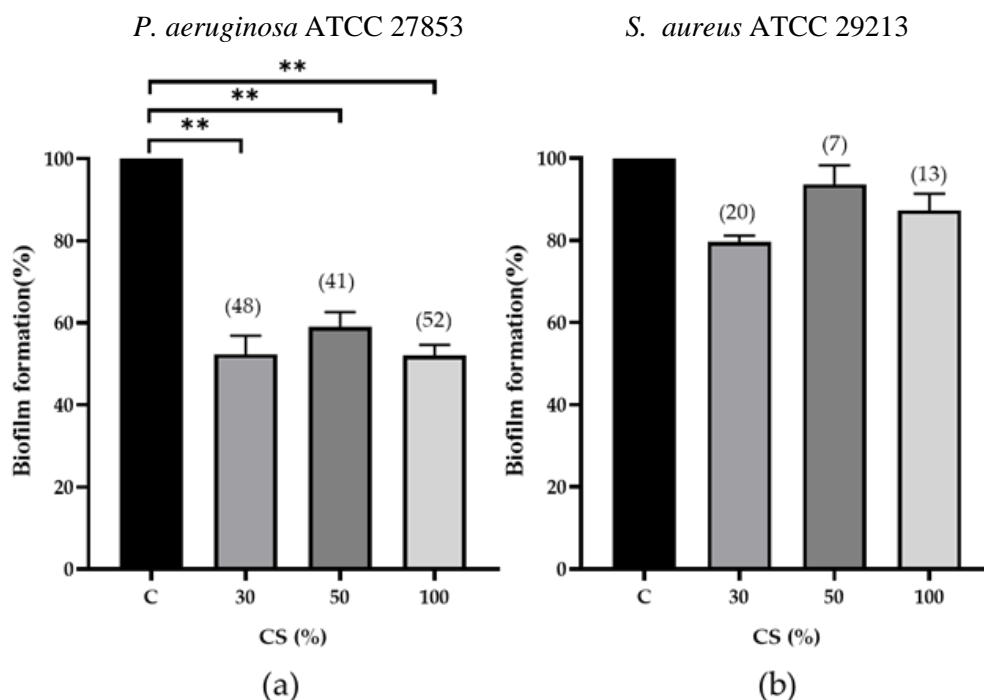


Figura 42: Formazione di biofilm (% , normalizzata per ciascuna biomassa) sulle lenti a contatto da parte di (a) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, in assenza (C, controllo) e dopo l'aggiunta della soluzione CS-care a diverse concentrazioni (30, 50 e 100% v/v). Diverse lettere minuscole sopra le barre indicano differenze statistiche significative ($p \leq 0,05$). Tra parentesi sono riportati i valori di inibizione del biofilm (%).

La CS-care alla concentrazione del 30% ha mostrato, dopo la normalizzazione per la biomassa batterica, la più alta attività antibiofilm contro *S. aureus* (20%) e un'attività paragonabile alla CS non diluita (100%) contro *P. aeruginosa* (48%), pertanto, questa concentrazione è stata utilizzata per ulteriori esperimenti.

Attività antibiofilm dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15, e dei biopolimeri in presenza della CL-care su CL

Gli effetti dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15 (300 µg/ml) da soli o in combinazione con la CS-care (30%) sulla formazione di biofilm di *P. aeruginosa* o *S. aureus* su CL sono mostrati in Figura 43.

P. aeruginosa ATCC 27853

S. aureus ATCC 29213

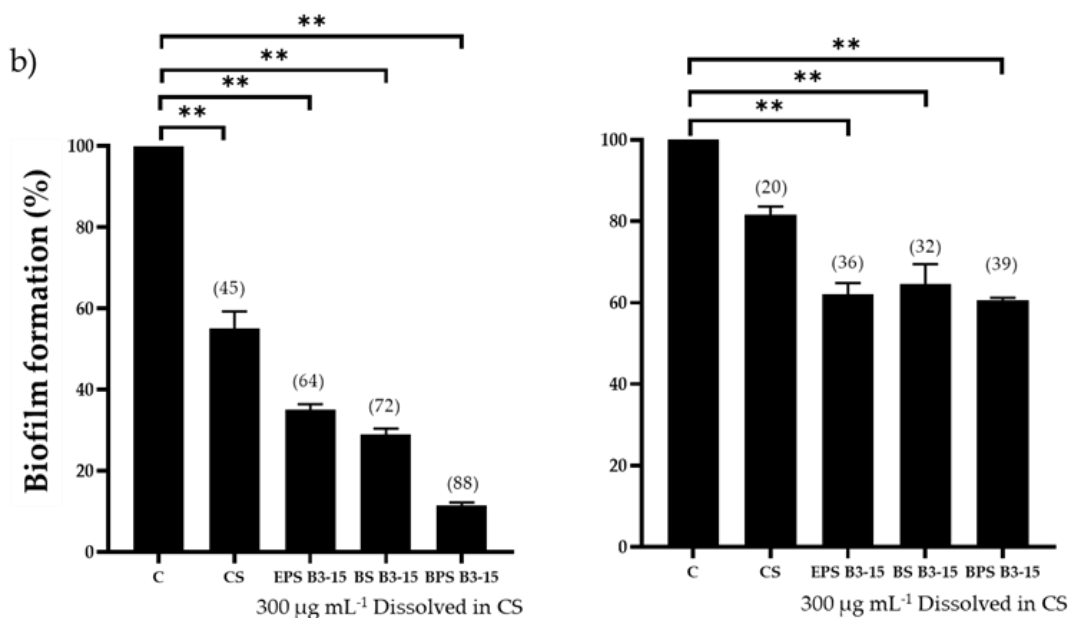
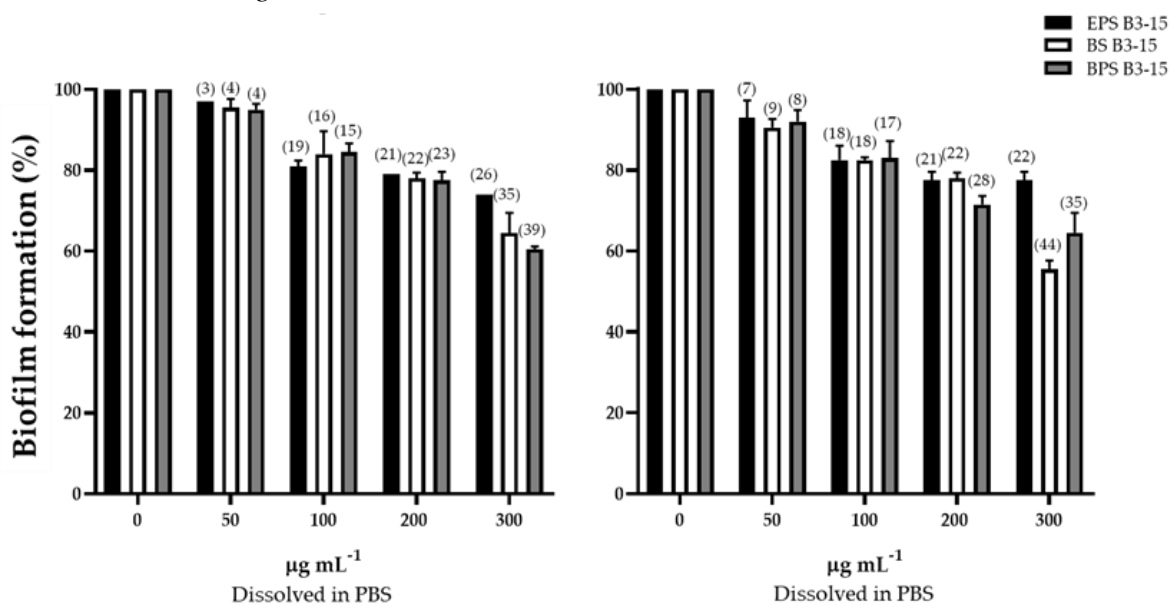


Figura 43: Effetti dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15 (a) da soli (a diverse concentrazioni da 50 a 300 µg/ml) o (b) in combinazione (a 300 µg/ml con CL-care al 30% v/v) sulla formazione di biofilm (normalizzata per ciascuna biomassa, %) di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sulle lenti a contatto. Diverse lettere minuscole sopra il grafico a barre indicano differenze statistiche significative ($p < 0,05$). Tra parentesi sono riportati i valori di inibizione del biofilm (%).

La presenza di EPS B3-15, BS B3-15 e BPS B3-15 sulle CL ha ridotto moderatamente, in modo dose-dipendente, il biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus*, con l'attività massima registrata alla concentrazione di 300 µg/ml (rispettivamente 26, 35 e 39% per *P. aeruginosa* e 22, 44 e 35%, per *S. aureus*) (Figura 42a). La combinazione di EPS B3-15, BS B3-15 e BPS B3-15 con la CS-care ha

ridotto il biofilm di *P. aeruginosa* sulle CL (rispettivamente 64, 72 e 88%) in modo più efficiente rispetto sia alla CS-care (55%) che a ciascun esopolimero da solo (Figura 42b). Inoltre, ciascun esopolimero in combinazione con la CS-care ha inibito moderatamente la formazione di biofilm di *S. aureus* (<40%), con il BPS B3-15 che ha mostrato la maggiore attività, (39%) seppur molto simile a quella del BS.

In Tabella 12 è riportato un confronto dell'attività antibiofilm dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15 (300 µg/ml) contro *P. aeruginosa* e *S. aureus* su differenti superfici.

Tabella 12: Confronto dell'attività antibiofilm dell'EPS B3-15, del BS B3-15 e del BPS B3-15 (300 µg/ml) contro *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 su differenti superfici.

		Antibiofilm activity (%)	
		<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Polistirene	EPS B3-15	51	52
	BS B3-15	47	36
	BPS B3-15	65	58
PVC	EPS B3-15	53	32
	BS B3-15	48	30
	BPS B3-15	62	42
Lenti a contatto	EPS B3-15	26	22
	BS B3-15	35	44
	BPS B3-15	39	35
	CS-care	48	20
	EPS B3-15 + CS-care	72	36
	BS B3-15 + CS-care	64	32
	BPS B3-15 + CS-care	88	39

Discussioni

Le sorgenti idrotermali delle isole Eolie rappresentano un ambiente naturale e facilmente accessibile ideale per esplorare la biodiversità procariotica marina, per studiare come i microorganismi rispondono alla presenza di condizioni inusuali e per la ricerca e lo sfruttamento di nuove biomolecole con potenziale biotecnologico. In questa tesi è stato approfondito lo studio del ceppo B3-15, precedentemente isolato da una sorgente idrotermale dell'isola di Vulcano nel sito Porto di Levante, identificato come appartenente alla specie *B. licheniformis*, e in grado di produrre differenti biopolimeri in base al terreno di coltura utilizzato per la crescita con varie applicazioni biotecnologiche in ambito ambientale e biomedico.

Il ceppo, per la sua termotolleranza e alofilia, è caratterizzato da una grande versatilità fisiologica che gli consente di adattarsi alle severe condizioni ambientali tipiche delle sorgenti idrotermali marine, ulteriormente confermata dal suo corredo enzimatico. Esso, infatti, ha mostrato di possedere una serie di enzimi lipasi oltre che alla capacità di crescere, se coltivato in un terreno di coltura minerale minimo, in presenza di kerosene come unica fonte di carbonio. Molti precedenti studi hanno riportato che batteri appartenenti alle specie *Bacillus*, *Geobacillus* e *Pseudomonas* che utilizzano idrocarburi sono in grado di produrre lipasi (Desai et al., 1997; Margesin et al., 1999; Meng et al., 2017; Mulani et al., 2017; Yusoff et al., 2020). Tali enzimi idrolitici sono tra i più interessanti in campo alimentare e farmaceutico e sono strumenti promettenti come potenziali biocatalizzatori nella produzione di biodiesel e in altre applicazioni biotecnologiche (Hamdan et al., 2021).

Le elevate concentrazioni nei fluidi idrotermali di metalli pesanti potenzialmente tossici, incluso l'arsenico, possono rendere il microbiota presente nelle sorgenti idrotermali resistente ad essi (Breuer e Pichler, 2013; Price et al., 2013;2015; Price e Pichler, 2005; Vetriani et al., 2005). Il ceppo *B. licheniformis* B3-15, infatti, è resistente all'As^{III} alla concentrazione di 500 µg/l e all'As^V fino a 2000 µg/l, che generalmente è meno tossico rispetto all'As^{III} (Spanò et al., 2023). La resistenza del ceppo alle forme di As testate potrebbe essere correlata alla sua capacità di produrre EPS. La produzione di

EPS rappresenta una strategia adattativa sviluppata dagli estremofili per far fronte agli stress ambientali. Tra le svariate funzioni, gli EPS potrebbero svolgere anche un ruolo importante nella rimozione dei metalli pesanti dall'ambiente (Gugliandolo et al., 2012; Nicolaus et al., 2010). Infatti, sebbene per la decontaminazione dell'arsenico, possono essere utilizzati diversi metodi chimici e fisici come adsorbimento, precipitazione chimica, coprecipitazione, scambio ionico, filtrazione e osmosi inversa (Hassan et al., 2009; Ungureanu et al., 2015), queste tecniche presentano una serie di limitazioni pratiche, quali ad esempio, la generazione di fanghi tossici, elevati costi e necessità di elaborate procedure di manutenzione (Srivastava e Anil Dwivedi, 2015). In questo contesto, il bioassorbimento di metalli pesanti tossici costituisce un'alternativa interessante ai processi di bonifica fisico-chimica comunemente utilizzati.

È noto che i bacilli sono in grado di produrre una varietà di esoprodotti, tra cui lipopeptidi ed EPS, a seconda delle condizioni di coltura e delle procedure di estrazione (Caccamo et al., 2022; Gugliandolo et al., 2012; Zammuto et al., 2022) e che la scelta delle fonti di azoto, come nutrienti inorganici o organici, e delle fonti di carbonio, può influenzare fortemente la resa delle biomolecole (Asgher et al., 2020; Larpin et al., 2002). *B. licheniformis* B3-15 è stato precedentemente riportato come produttore un EPS con varie applicazioni biotecnologiche (Arena et al., 2006; Maugeri et al., 2002a; Scala et al., 2019; Spanò and Arena 2016). In questo studio, è stato utilizzato un nuovo terreno di coltura (SG17) per la produzione di EPS contenente una dose maggiore di glucosio (5%) e diverse fonti di azoto (come estratti di carne e lievito allo 0,2%) rispetto al terreno precedentemente utilizzato (MD162), con un aumento dopo 48 ore di incubazione sia della crescita batterica che della resa in EPS (240 mg/l), superiore del 45% rispetto a quanto riportato in precedenza (Maugeri et al., 2002a; Spanò et al., 2023). Tuttavia, la produzione di EPS non è stata ulteriormente stimolata da concentrazioni più elevate di carbonio (fino al 10% w/v). Se confrontato con altri bacilli isolati dalle isole Eolie produttori EPS, la resa dell'EPS del ceppo B3-15 era paragonabile a quella ottenuta dal *B. licheniformis* T14 (256 mg/l con saccarosio) (Spanò et al., 2013) e superiore a quella ottenuta dai

ceppi 1A70 (185 mg/l con ribosio) e *B. horneckiae* SBP3 (70 mg/l) isolati dall'isola di Panarea (Gugliandolo et al., 2012). Inoltre, il ceppo B3-15 ha prodotto quantità maggiori di EPS rispetto a quelle di *Geobacillus* spp. precedentemente isolati da altre sorgenti termali marine come *G. thermodenitrificans* B3-72 (70 mg/l con glucosio) (Nicolaus et al., 2000), *G. tepidamans* V264 (111,4 mg/l con saccarosio) (Kambourova et al., 2009), *Geobacillus* 4004 (65 mg/l con saccarosio) e dal *Geobacillus* 4001 (55 mg/l con saccarosio) (Nicolaus et al., 2002).

L'EPS B3-15 è stato descritto come un esopolimero ad elevato contenuto di carboidrati (67%), basso contenuto di proteine (5%), attribuito principalmente alla componente di acido poli- γ -glutammico, e costituito da un'unità disaccaridica a configurazione manno-piranosidica (Spanò et al., 2023). Questa composizione è stata determinata dall'analisi NMR e ulteriormente confermata dallo spettro ATR-FTIR, che ha mostrato segnali attribuiti ai gruppi funzionali dei polisaccaridi (4000–3000 cm^{-1}) e dei γ -PGA (1550–1500 cm^{-1}).

L'EPS B3-15 è stato in grado di adsorbire l'As, con una maggiore efficienza per l'As^V (11.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, equivalenti a 36.000 μg per g di EPS) rispetto all'As^{III} (0,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ equivalenti a 3000 μg per g di EPS). Per la nostra conoscenza, non esiste lavoro in letteratura sull'adsorbimento di As da parte di EPS prodotti da bacilli. Tuttavia, rispetto alla capacità di assorbimento dell'As^{III} da parte della biomassa di bacilli, l'EPS B3-15 è risultato più efficiente rispetto a *B. pumilus* (5 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Vishnoi et al., 2016), *B. megaterium* (7 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Vishnoi et al., 2016), e *B. megaterium* UM-123 (127 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Miyatke e Hayashi, 2009), mentre era meno attivo di *Bacillus* sp. DJ1 (9800 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Joshi et al., 2009), *B. thuringiensis* WS3 (10.940 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Altowayti et al., 2019) e *Bacillus cereus* (32.240 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Giri et al., 2012a). Inoltre, l'EPS B3-15 ha assorbito l'As^V in modo più efficiente rispetto alla biomassa di *B. cereus* (30.040 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Giri et al., 2012b).

Il confronto degli spettri ATR-FTIR dell'EPS B3-15 non trattato e trattato con As^{III} o As^V ha messo in evidenza quali gruppi chimici del polisaccaride sono coinvolti nel processo di legame con l'As. L'EPS B3-15 ha mostrato cinque picchi elevati dopo trattamento con As^{III} (Figura 8d). In particolare,

la comparsa del picco attribuito all'As^{III} e la scomparsa del picco attribuito al gruppo N–O del γ -PGA suggeriscono un legame tra il γ -PGA e l'As^{III}. Al contrario, la perdita dei picchi attribuiti ai gruppi N–O e C–O solo nello spettro dell'EPS trattato con As^V (Figura 8e) indicava una maggiore interazione tra EPS e As^V rispetto a EPS e As^{III}.

Un test di inibizione della bioluminescenza, come strumento di rilevamento rapido (15 minuti) e affidabile, è stato utilizzato per determinare la tossicità dell'arsenico e la capacità dell'EPS B3-15 di prevenire i suoi effetti tossici. Uno dei vantaggi di questo test è che l'inibizione della luminescenza nei microrganismi può mostrare in modo efficiente gli effetti nocivi di una determinata sostanza sugli organismi superiori in diversi ambienti (Mohseni et al., 2018). Questo test ha confermato che l'EPS B3-15 non è risultato citotossico fino a 300 $\mu\text{g/ml}$ (Arena et al., 2006; Spanò et al., 2023). Inoltre, in presenza dell'EPS, la EC₅₀ dell'As è aumentata quasi del doppio, indicando un'attività protettiva contro la tossicità di entrambe le forme di arsenico (Spanò et al., 2023).

Oltre agli EPS, altre biomolecole con attività tensioattiva ed emulsionante stanno guadagnando crescente attenzione in diversi campi di applicazione, come il biorisanamento, l'industria farmaceutica e cosmetica, perché sono alternative ecocompatibili alle loro controparti prodotte industrialmente. Per queste ragioni il ceppo B3-15 è stato coltivato in differenti terreni di coltura con l'obiettivo di produrre biosurfattanti.

Per ottimizzare la produzione del BS B3-15 sono state utilizzate differenti condizioni nutrizionali. Come per gli EPS, è ampiamente riportato in letteratura che la scelta delle fonti di azoto, come nutriente inorganico o organico, e delle fonti di carbonio potrebbe avere una grande influenza sulla resa dei BS (Abouseouda et al., 2008; Fooladi et al., 2013). Di tutte le condizioni testate, il CFS di B3-15 ottenuto dalla crescita in un terreno contenente azoto organico (il peptone presente nel MB) e saccarosio come fonte di carbonio (MB + SAC), è quello che ha mostrato i valori di E₂₄ più alti, e quindi queste condizioni hanno consentito la produzione di una maggiore quantità di BS. Questi risultati sono stati ulteriormente confermati dalla positività del CFS ottenuto in MB + SAC ai test del

collasso della goccia d'olio e della riduzione della ST. Inoltre, il CFS del ceppo B3-15 ottenuto in queste condizioni nutrizionali ha mostrato un elevato potenziale nell'emulsionare differenti idrocarburi e oli vegetali, con i valori più alti di E_{24} ottenuti con il cherosene ed il decano (Figura 13), e con gli strati di emulsione che hanno mostrato elevata stabilità per oltre trenta giorni (Zammuto et al., 2022). Se confrontato con i valori di E_{24} di tensioattivi prodotti industrialmente, il valore dell' E_{24} del CFS di B3-15 con il cherosene (62%) era paragonabile rispetto a quelli del Triton X-100 (74%), del sodio dodecil solfato (74,4%) e del Tween 80 (73,2%) (Anburajan et al., 2014), e molto simile per l'esadecano (52%) rispetto all'alchilbenzene solfonato lineare (51,7%), al Findet® 1214N/23 (61,8%) e al Glucopone®650 (55,8%) (Vaz et al., 2012). Secondo diversi studi, la capacità dei CFS di emulsionare gli idrocarburi suggerisce un potenziale utilizzo nel biorisanamento e come detergenti industriali per la pulizia di superfici contaminate da benzina, come tubi petroliferi, cisterne di sentina o silos industriali (Banat et al., 2021; Satpute et al., 2010). Inoltre, il CFS del ceppo B3-15 è stato in grado di emulsionare oli vegetali, come oli di ricino e di oliva, suggerendo un'ulteriore possibile applicazione nell'industria alimentare come soluzione detergente più ecologica in alternativa ai tensioattivi sintetici (Campos et al., 2015).

Dopo ottimizzazione della produzione, dall'estrazione acida la resa di BS è stata di 910 mg/l dopo incubazione a 45°C per 48 ore (Zammuto et al., 2022). Un'ampia gamma di lipopeptidi da bacilli marini con attività tensioattiva è stata descritta, come la pumilacidina prodotta da *B. pumilus* e *B. stratosphericus* (Gandhimathi et al., 2009; Hentati et al., 2019), la surfattina e la lichenisina da *B. licheniformis* NIOT-06 (Anburajan, et al., 2015), la fengicina da *B. circulans* (Sivapathasekaran et al., 2009), le iturine da *B. megaterium* e *Bacillus* sp. KCB14S006 (Dey et al., 2015; Son et al., 2016) e la surfattina e la bacillomicina F da *B. siamensis* (Xu et al., 2018). Se confrontato con altri bacilli marini termofili e alofili, la resa del BS grezzo dal ceppo B3-15 era superiore a quella prodotta sia da *B. licheniformis* BAS50 (160 mg/l) che da *B. licheniformis* BNP29 (90 mg/l), ottenuto in condizioni di aerobiosi (Yakimov et al., 1997). Tuttavia, la resa di questi tensioattivi dipendeva fortemente dalle condizioni di coltivazione, poiché la produzione di tensioattivo in condizioni

anaerobiche era dalle tre alle cinque volte inferiore a quella delle colture aerobiche (Yakimov et al., 1997).

Gli spettri ATR-FTIR del BS hanno mostrato segnali attribuibili all'Ammide A, all'Ammide I e alle vibrazioni di stretching alifatico dei lipidi, specifiche per i lipopeptidi simili alla surfattina (Cho et al., 2003; Ibrahim et al., 2013; Joy et al., 2017; Lin et al., 1994; Nanjundan et al., 2019; Yakimov et al., 1995). Il test di rimozione dell'olio ha indicato che il BS B3-15 (1 g/l) ha rimosso efficacemente l'olio di ricino (70,0%), da una matrice di cotone (Zammuto et al., 2022). Come precedentemente riportato, la differenza nell'efficacia dei BS di diversi ceppi batterici nel rimuovere olio da una matrice di cotone può essere spiegata sulla base delle loro proprietà chimiche, in particolare della distribuzione dei gruppi polari, che portano alla classificazione dei tensioattivi in anionici, cationici e non ionici (Bouassida et al., 2018). In sostituzione dei metodi fisici e/o dei prodotti chimici attualmente in uso, il BS B3-15 potrebbe essere utilizzato per la rimozione di idrocarburi dal terreno o da tessuti di cotone contaminati, proprietà che fino ad ora non sono state adeguatamente esplorate (Mukherjee, 2007; Rosenberg e Ron., 1999).

I biofilm batterici rappresentano una problematica rilevante in una vasta gamma di aree, poiché la maggior parte dei farmaci biocidi è in grado di agire esclusivamente su cellule batteriche a vita libera, ma non contro batteri organizzati in biofilm. Nel presente studio sono stati valutati gli effetti dell'EPS e del BS B3-15 sull'adesione e sulla formazione di biofilm di *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, selezionati come organismi modello, su diverse superfici quali micropiastre di polistirene, un dispositivo medico in cloruro di polivinile e cellule nasali epiteliali umane, e dell'EPS B3-15 su *K. pneumoniae* ATCC 8047 e *Str. pneumoniae* ATCC 6303, patogeni umani delle vie respiratorie.

L'EPS e il BS B3-15 sono stati in grado di compromettere l'adesione e quindi la formazione di biofilm su superfici abiotiche e biotiche in modo dose-dipendente, senza esercitare alcuna attività

batteriostatica o battericida, analogamente ad altri polisaccaridi batterici con attività antibiofilm precedentemente isolati.

L'attività dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 era simile nel ridurre la formazione di biofilm di *P. aeruginosa* (rispettivamente 50,6% e 47,1%) e *S. aureus* (rispettivamente 51,5 e 35,9%) su superfici di polistirene. Pochi EPS prodotti da ceppi marini hanno mostrato di possedere attività antibiofilm sia contro batteri Gram-negativi che Gram-positivi (Spanò et al. 2016). L'EPS ricco di mannosio prodotto da *Oceanobacillus iheyensis* è risultato attivo solo contro la formazione di biofilm di *S. aureus* (62,3%) sul polistirene, ma non contro *P. aeruginosa* (Kavita et al., 2014). L'attività antibiofilm dell'EPS B3-15 era più efficace di quella dell'EPS del ceppo *Winogradskyella* sp. CAL396 associato ad una spugna antartica, costituito principalmente da mannosio, che ha mostrato una moderata riduzione della formazione di biofilm di *P. aeruginosa* (19%) e di *S. aureus* (16%) (Rizzo et al., 2021).

Per iniziare a comprendere i meccanismi di azione dell'attività antibiofilm, l'EPS e il BS B3-15 sono stati aggiunti in tempi diversi (0, 2, 4 e 8 ore), corrispondenti alla fase di adesione iniziale, reversibile e irreversibile, e dopo lo sviluppo del biofilm maturo. Oltre all'attività mostrata quando aggiunto contestualmente all'inizio della coltura batterica (T0), l'EPS (300 µg/ml) ha mostrato una buona attività antibiofilm anche se aggiunto dopo 2 ore, riducendo fortemente ($\geq 50\%$) la formazione di biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* sul polistirene, mentre non ha avuto effetti sui biofilm maturi. A differenza dell'EPS, il BS B3-15 ha mostrato anche capacità di agire sull'adesione irreversibile e di disgregare i biofilm maturi, risultando più efficace su *S. aureus* (47,2%) rispetto a *P. aeruginosa* (26,3%) (Zammuto et al., 2023a). Rispetto ad altri tensioattivi, come il BS grezzo prodotto da *B. subtilis* DS03 (Cruz Mendoza et al., 2022) e il lipopeptide prodotto da *B. licheniformis* AL 1.1 (Coronel-León et al., 2015), il BS B3-15 è stato in grado di distruggere in modo simile il biofilm preformato di *S. aureus* su la superficie del polistirene, ma al contrario di essi il BS B3-15 è riuscito anche a distruggere parzialmente il biofilm di *P. aeruginosa*. La capacità del BS B3-15 di agire anche sui biofilm maturi può essere spiegata dalla sua capacità di ridurre fortemente la tensione interfacciale

tra la superficie del polistirene e le cellule adese facilitando la rimozione del biofilm, come dimostrato dai risultati del test dell'angolo di contatto (Figura 15).

A differenza delle superfici in polistirene, l'EPS ha ridotto la formazione di biofilm di *P. aeruginosa* (52,7%) in modo più efficiente rispetto a *S. aureus* (32,3%) sulle superfici dei dispositivi medici in PVC (Zammuto et al., 2023a). Questo risultato potrebbe essere spiegato considerando le attrazioni elettrostatiche tra le superfici del PVC, che ha una carica più negativa rispetto al polistirene (Cai et al., 2020), e le cariche superficiali delle cellule batteriche. Infatti, le superfici cellulari di *S. aureus* possedevano una maggiore carica positiva dopo il trattamento con l'EPS che determina una maggiore adesione al PVC rispetto a *P. aeruginosa*. Oltre alle procedure preventive esistenti, il rivestimento di superfici abiotiche di dispositivi medici, quali dispositivi ortopedici ed endotracheali, cateteri vascolari e urinari, con l'EPS B3-15 potrebbe rappresentare un mezzo efficace per contrastare la contaminazione batterica.

L'aggiunta dell'EPS ha ridotto l'aggregazione cellula-cellula, mediata da adesine della superficie cellulare, necessaria per la prima fase dell'adesione batterica alle superfici (Sorroche et al., 2010). L'attività dell'EPS B3-15 sull'aggregazione cellula-cellula era simile a quella riportata per il polisaccaride A101 purificato, prodotto dal *Vibrio* sp. QY101, in grado di inibire l'adesione intercellulare sia da parte delle cellule di *P. aeruginosa* che di *S. aureus* (Jiang et al., 2011). Nelle cellule batteriche libere, l'aggiunta dell'EPS ha ridotto notevolmente l'espressione del gene *lecA* di *P. aeruginosa*, che codifica per lectine o adesine, e del gene *clfA* di *S. aureus*, che codifica per una proteina di superficie, confermando che l'EPS ha ostacolato le prime fasi di adesione cellulare. Inoltre, l'EPS ha parzialmente sottoregolato l'espressione di *pslA*, indicando che la biosintesi dei polisaccaridi, necessaria per l'attaccamento irreversibile di *P. aeruginosa* a una varietà di superfici (Ma et al., 2012), è stata ridotta. Al contrario, l'EPS non ha interferito con l'espressione del gene *icaD*, suggerendo l'assenza di una riduzione analoga sulla produzione di polisaccaridi coinvolti nello sviluppo della formazione del biofilm per *S. aureus*. In futuro, potrebbero essere condotte analisi

trascrittomiche approfondite per chiarire meglio le risposte genetiche di *P. aeruginosa* e *S. aureus* al trattamento con l'EPS. Questi risultati potrebbero spiegare i diversi meccanismi di azione dell'EPS sulla formazione del biofilm da parte di *P. aeruginosa* e *S. aureus* anche su superfici biotiche, dove l'adesione è anche mediata da recettori (es. adesine-matrice tissutale).

In aggiunta, l'EPS B3-15 ha un'attività antibiofilm dose dipendente anche contro *K. pneumoniae* e *Str. pneumoniae*, con un'attività alla massima concentrazione testata maggiore del 50% per entrambi i ceppi, due patogeni umani delle vie respiratorie resistenti ad un numero sempre maggiore di antibiotici per la loro capacità di formare biofilm.

Per indirizzare l'utilizzo dei biopolimeri prodotti dal ceppo B3-15 anche verso applicazioni biomediche, gli effetti dell'EPS e del BS B3-15 è stata valutata la capacità di interferire con l'adesione di *P. aeruginosa* e *S. aureus* alle cellule epiteliali nasali umane (HNEpC), che costituiscono la prima barriera di difesa del nostro organismo e uno dei principali bersagli delle infezioni batteriche trasmesse per via aerea. L'EPS B3-15 era già stato riportato come non citotossico rispetto a cellule WISH e PBMC umane (Arena et al., 2006) e ha confermato la sua non tossicità anche rispetto alle HNEpC (Zammuto et al., 2023a). Sebbene sia noto che le cellule umane sono sensibili ai tensioattivi batterici, anche il BS B3-15 non ha mostrato tossicità verso le HNEpC fino a 300 µg/ml, probabilmente a causa della sua struttura peptidica e lipidica. (Zammuto et al., 2023b). Al contrario, le lichenisine e le surfattine di *B. licheniformis* B4094 e B4123 sono state riportate come citotossici verso le cellule epiteliali intestinali umane Caco-2 tumorali a concentrazioni anche molto basse (rispettivamente IC₅₀ 16,6 e 23,5 µg/ml) (Yeak et al., 2022). Il BS B3-15 (a 300 µg/ml) ha inibito l'adesione di *S. aureus* (di cinque volte in scala logaritmica) alle cellule nasali umane in modo più efficiente rispetto a *P. aeruginosa* (di una volta in scala logaritmica) (Zammuto et al., 2023b). Al contrario, l'EPS B3-15 è risultato più efficace nel contrastare l'adesione di *P. aeruginosa* (di cinque volte in scala logaritmica) alle cellule nasali rispetto a *S. aureus* (di una volta in scala logaritmica)

(Zammuto et al., 2023a). Anche alla luce di questi risultati è stato deciso di valutare la possibile azione sinergica di questi due biopolimeri.

Come confermato dal coating assay su polistirene, il BPS B3-15 ha mostrato effetti antiadesivi legati alla capacità di modificare sia le proprietà idrofobiche che le cariche superficiali del substrato in modo più efficiente rispetto a quelli osservati singolarmente per l'EPS B3-15 e il BS B3-15. Inoltre, il test dell'angolo di contatto e dell'attività emulsionante hanno confermato che il BPS ha agito come tensioattivo. Le cariche negative esibite dalla componente di acido poli- γ -glutammico (γ -PGA) dell'EPS B3-15, così come quelle dei residui aminoacidici del lipopeptide BS B3-15, potrebbero contribuire ad alterare le cariche superficiali del polistirene. Queste proprietà potrebbero giustificare l'attività antiadesiva della miscela BPS B3-15 sia nei confronti di *P. aeruginosa* (64,5%) che di *S. aureus* (58,0%) sul polistirene, che è risultata più efficace di quella osservata per i singoli polimeri (Figura 35 e Tabella 12) (Zammuto et al., 2023a,b,c). Se confrontata con quella riportata per l'EPS B3-15 o il BS B3-15, anche l'attività sull'adesione irreversibile e la disgregazione dei biofilm maturi del BPS B3-15 è risultata maggiore. Ciò potrebbe essere correlato all'a maggiore attività emulsionante del BPS B3-15 ($E_{24} = 82\%$) rispetto all'EPS B3-15 (37%) e al BS B3-15 (67%) (Zammuto et al., 2023c).

Il BPS B3-15 ha ridotto l'adesione batterica al PVC, un polimero plastico idrofobo caricato negativamente, in modo più efficace (61,6% per *P. aeruginosa* e 42,3% per *S. aureus*) rispetto all'EPS e al BS B3-15 (rispettivamente 52,7% e 32,3%) (Zammuto et al., 2023a). Come rivelato dal test MATH, l'attività antiadesiva del BPS B3-15 sul PVC potrebbe essere spiegata dalla modificazione sia delle cariche sulla superficie cellulare che dei livelli di idrofobicità. Nello specifico, il BPS B3-15 ha diminuito l'affinità per il cloroformio e il decano di *P. aeruginosa* e per l'acetato di etile di *S. aureus*, suggerendo una riduzione delle cariche positive sulla superficie cellulare. Come i singoli biopolimeri, il BPS B3-15 potrebbe essere proposto come agente di rivestimento per prevenire o

eliminare i biofilm nei dispositivi medici in maniera ancora più efficace (Katsikogianni e Missirlis, 2004; Li et al., 2021; Zammuto et al., 2023c).

In aggiunta, gli esopolimeri EPS B3-15, BS B3-15 e la loro combinazione BPS B3-15 sono stati valutati rispetto alla formazione di biofilm di *P. aeruginosa* e *S. aureus* su lenti a contatto composte dal polimero Dayfilcon A. Tutti gli esopolimeri sono stati meno efficaci nel ridurre la formazione di biofilm sulle CL rispetto alle altre superfici (polistirene e PVC) (Figura 42 e Tabella 12). Queste differenze potrebbero essere correlate all'elevata idrofilia del polimero di cui sono composte le CL, che consiste per circa il 50% di acqua. Pochi studi hanno riportato l'attività antibiofilm su CL di biomolecole naturali. L'aglio nero ottenuto dalla fermentazione di *Allium sativum* ha inibito la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* (35%) (Di Onofrio et al., 2019), in modo simile al BS B3-15 (35%), ma meno del BPS B3-15 (39%), mentre l'estratto di olio di cannabino era più attivo (50%) (Kilvington et al., 2010) rispetto al BPS B3-15. Tuttavia, non è stata segnalata alcuna attività di questi prodotti naturali su *S. aureus*.

Le CS-care disponibili in commercio potrebbero non essere efficaci contro i biofilm anche se conformi agli standard internazionali ISO 14729 e FDA 510(k), che richiedono un'adeguata attività antimicrobica (Di Onofrio et al., 2019) ma solo contro un numero limitato di ceppi di riferimento di batteri e funghi planctonici (Kilvington et al., 2010). La CS-care ha inibito il biofilm di *P. aeruginosa* sulle CL (48%) più di *S. aureus* (20%); questi dati sono in accordo con quelli riportati da Di Onofrio et al. (2019). Quando gli esopolimeri sono stati aggiunti alla CS commerciale (30%), gli effetti antibiofilm sono aumentati, con il BPS B3-15 che è stato il più attivo nell'inibire la formazione del biofilm di *P. aeruginosa* (88% di riduzione del biofilm) e di *S. aureus* (39%). È interessante notare che la combinazione di BPS B3-15 con CS (30%) è risultata due volte più attiva rispetto alla sola CS. In una prospettiva futura, il BPS B3-15 potrebbe essere proposto in combinazione con disinfettanti per prevenire e rimuovere i biofilm e, quindi, ridurre i rischi legati alle infezioni oculari.

Conclusioni

Il ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15, caratterizzato da una grande versatilità fisiologica che gli consente di adattarsi alle severe condizioni ambientali tipiche delle sorgenti idrotermali marine, è in grado di produrre differenti biopolimeri quando coltivato in diverse condizioni colturali, nello specifico, un EPS (EPS-B3-15) e un biosurfattante (BS B3-15).

L'EPS B3-15 è costituito da una componente principale saccaridica, formata da unità ripetitive disaccaridiche con configurazione manno-piranosidica, e una proteica, attribuita alla presenza di acido poli- γ -glutammico ed è in grado di assorbire differenti forme di Arsenico e di ridurne la sua tossicità. Pertanto, potrebbe essere utilizzato, senza ulteriori trattamenti chimici, nel biorisanamento dell'arsenico come alternativa ecologica ai metodi fisici o chimici.

Quando coltivato in un differente terreno di coltura e alle idonee condizioni di crescita, il ceppo *Bacillus licheniformis* B3-15 è in grado di produrre un biosurfattante (BS B3-15) strutturalmente simile alla lichenisina con varie applicazioni biotecnologiche. Infatti, grazie alle sue capacità emulsionanti e di rimuovere oli da tessuti di cotone, esso potrebbe essere utilizzato nei trattamenti di terreni o di tessuti di cotone contaminati idrocarburi.

Senza mostrare attività antibatterica e citotossicità su cellule umane, sia l'EPS B3-15 che il BS B3-15 hanno mostrato, a basse concentrazioni (300 $\mu\text{g/ml}$), attività antibiofilm contro *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, batteri patogeni selezionati come organismi modello su differenti superfici abiotiche (polistirene e PVC) e biotiche (cellule epiteliali nasali umane).

I meccanismi coinvolti nella loro attività sono correlati alla modifica delle proprietà delle superficie dei substrati, alla diminuzione dell'idrofobicità della parete cellulare batterica, all'inibizione dell'autoaggregazione cellula-cellula e alla modifica dei *pathway* genici coinvolti nella formazione del biofilm. In aggiunta, l'EPS B3-15 ha mostrato attività antibiofilm contro i patogeni umani delle vie respiratorie *Klebsiella pneumoniae* e *Streptococcus pneumoniae*.

Infine, la combinazione dell'EPS B3-15 e del BS B3-15 possedeva un'attività antibiofilm e antiadesiva su differenti superfici sui batteri patogeni testati superiore rispetto a quelle delle biomolecole testate singolarmente. Per le loro proprietà biologiche, i biopolimeri prodotti dal ceppo B3-15 potrebbero avere numerose applicazioni nell'ambito industriale e medico, come spray nasale e per prevenire l'adesione di batteri patogeni su dispositivi medici quali protesi ortopediche, cateteri o dispositivi endotracheali.

Come composti solubili in acqua, non citotossici, biodegradabili e biocompatibili, l'EPS B3-15 e il BS B3-15 possiedono un'ampia gamma di possibili applicazioni biotecnologiche in ambito ambientale e biomedico.

Bibliografia

- Abouseouda, M., Maachi, R., Amranec, A., Boudergua, S., Nabia, A. (2008).** Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Desalination*, **223**, 143–151.
- Alluri, H.K., Ronda, S.R., Settalluri, V.S., Bondili, J.S., Suryanarayana, V., Venkateshwar, P. (2007).** Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *Afr. J. Biotechnol.*, **6**, 2924–2931.
- Altowayti, W.A.H., Algaifi, H.A., Bakar, S.A., Shahir, S. (2019).** The adsorptive removal of As (III) using biomass of arsenic resistant *Bacillus thuringiensis* strain WS3: Characteristics and modelling studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **172**, 176–185.
- Anburajan, L., Meena, B., Toms Cheriath, J., Dheenan Palaiya, S., Vinithkumar Nambali, V., Dharani, G., Kirubakaran, R. (2014).** Functional and molecular characterization of a lipopeptide surfactant from the marine sponge-associated eubacteria *Bacillus licheniformis* NIOT-AMKV06 of Andaman and Nicobar Islands, India. *Mar. Pollut. Bull.*, **82**, 76–85.
- Anburajan, L., Meena, B., Raghavan, R.V., Shridhar, D., Joseph, T.C., Vinithkumar, N.V., Dharani, G., Dheenan, P.S., Kirubakaran, R. (2015).** Heterologous expression, purification, and phylogenetic analysis of oil-degrading biosurfactant biosynthesis genes from the marine sponge-associated *Bacillus licheniformis* NIOT-06. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, **38**, 1009–1018.
- Arciola, C.R., Campoccia, D., Speziale, P., Montanaro, L., Costerton, J.W. (2012).** Biofilm formation in *Staphylococcus* implant infections. A review of molecular mechanisms and implications for biofilm-resistant materials. *Biomaterials*, **33**, 5967–5982.

- Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Jannello, D., Gugliandolo, C., Bisignano, G. (2006).** Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *Int. Immunopharmacol.*, **6**, 8–13.
- Arena, A., Gugliandolo, C., Stassi, G., Pavone, B., Iannello, D., Bisignano, G., Maugeri, T.L. (2009).** An exopolysaccharide produced by *Geobacillus thermodenitrificans* strain B3-72: Antiviral activity on immunocompetent cells. *Immunol. Lett.*, **123**, 132–137.
- Arrondo, J.L., Goñi, F.M. (1998).** Special Issue: Infrared spectroscopy of membrane lipids. *Chem. Phys. Lipids*, **96**, 1–164.
- Asgher, M., Qamar, S.A., Bilal, M., Iqbal, H.M.N. (2020).** Bio-based active food packaging materials: Sustainable alternative to conventional petrochemical-based packaging materials. *Food Res. Int.*, **137**, 109625.
- Banat, I.M., Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Martinotti, M.G., Fracchia, L., Smyth, T.J., Marchant, R. (2010).** Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **87**, 427–444.
- Banat, I.M.; Carboué, Q.; Saucedo-Castañeda, G.; de Jesús Cázares-Marinero, J. (2021).** Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using Solid-State fermentation (SSF) technology. *Bioresour. Technol.*, **320**, 124222.
- Bellon-Fontaine, M.N., Rault, J., Van Oss, C.J. (1996).** Microbial adhesion to solvents: A novel method to determine the electron-donor/ electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids Surf. B Biointerfaces.*, **7**, 47–53.
- Berne, C., Ducret, A., Hardy, G.G., Brun, Y.V. (2015).** Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbiol. Spectr.*, **3**, 163–199.

Bezza, F.A., Chirwa, E.M.N. (2015). Production and applications of lipopeptide biosurfactant for bioremediation and oil recovery by *Bacillus subtilis* CN2. *Biochem. Eng. J.*, **101**, 168–178.

Bouassida, M., Fourati, N., Ghazala, I., Ellouze-Chaabouni, S., Ghribi, D. (2018). Potential application of *Bacillus subtilis* SPB1 biosurfactants in laundry detergent formulations: Compatibility study with detergent ingredients and washing performance. *Eng. Life Sci.*, **18**, 70–77.

Breuer, C., Pichler, T. (2013). Arsenic in marine hydrothermal fluids. *Chem. Geol.*, **348**, 2–14.

Cai, H., Wang, Y., Wu, K., Guo, W. (2020). Enhanced hydrophilic and electrophilic properties of polyvinyl chloride (PVC) biofilm carrier. *Polymers*, **12**, 1240.

Caccamo, M.T., Zammuto, V., Gugliandolo, C., Madeleine-Perdrillat, C., Spanò, A., Magazù, S. (2018). Thermal restraint of a bacterial exopolysaccharide of shallow vent origin. *Int. J. Biol. Macromol.*, **114**, 649–655.

Caccamo, M.T., Gugliandolo, C., Zammuto, V., Magazù, S. (2020). Thermal properties of an exopolysaccharide produced by a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis* by ATR-FTIR spectroscopy. *Int. J. Biol. Macromol.*, **145**, 77–83.

Caccamo, M.T., Zammuto, V., Spanò, A., Gugliandolo, C., Magazù, S. (2022). Hydrating Capabilities of the Biopolymers Produced by the Marine Thermophilic *Bacillus horneckiae* SBP3 as Evaluated by ATR-FTIR Spectroscopy. *Materials*, **15**, 5988.

Campos, J.M.; Stamford, T.L.M.; Rufino, R.D.; Luna, J.M.; Stamford, T.C.M.; Sarubbo, L.A. (2015). Formulation of mayonnaise with the addition of a bioemulsifier isolated from *Candida utilis*. *Toxicol. Rep.*, **2**, 1164–1170.

Casentini, B., Gallo, M., Baldi, F. (2019). Arsenate and arsenite removal from contaminated water by iron oxides nanoparticles formed inside a bacterial exopolysaccharide. *J. Environ. Chem. Eng.*, **7**, 102908.

- Chen, C., Sun, N., Li, D., Long, S., Tang, X., Xiao, G., Wang, L. (2018).** Optimization and characterization of biosurfactant production from kitchen waste oil using *Pseudomonas aeruginosa*. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **25**, 14934–14943.
- Cho, S.J., Lee, S.K., Cha, B.J., Kim, Y.H., Shin, K.S. (2003).** Detection and characterization of the *Gloeosporium gloeosporioides* growth inhibitory compound iturin A from *Bacillus subtilis* strain KS03. *FEMS Microbiol. Lett.*, **223**, 47–51.
- Collic-Jouault, S., Zanchetta, P., Helley, D., Ratiskol, J., Siquin, C., Fischer, A.M., Guezennec, J. (2004).** Les polysaccharides microbiens d'origine marine et leur potentiel en thérapeutique humaine. *Pathologie Biologie*, **52**, 127–130.
- Cooley, B.J., Thatcher, T.W., Hashmi, S.M., L'Her, G., Le, H.H., Hurwitz, D.A., Provenzano, D., Touhami, A., Gordon, V.D. (2013).** The extracellular polysaccharide Pel makes the attachment of *P. aeruginosa* to surfaces symmetric and short-ranged. *Soft Matter.*, **9**, 3871–3876.
- Cooper, D.G., Goldenberg, B.G. (1987).** Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 224–229.
- Coronel-León, J., de Grau, G., Grau-Campistany, A., Farfan, M., Rabanal, F., Manresa, A., Marqués, A.M. (2015).** Biosurfactant production by AL 1.1, a *Bacillus licheniformis* strain isolated from Antarctica: Production, chemical characterization and properties. *Ann. Microbiol.*, **65**, 2065–2078.
- Cruz Mendoza, I., Villavicencio-Vasquez, M., Aguayo, P., Coello Montoya, D., Plaza, L., Romero-Peña, M., Marqués, A.M., Coronel-León, J. (2022).** Biosurfactant from *Bacillus subtilis* DS03: Properties and Application in Cleaning Out Place System in a Pilot Sausages Processing. *Microorganisms*, **10**, 1518.

- Cucarella, C., Tormo, M.A., Ubeda, C., Trotonda, M.P., Monzon, M., Peris, C., Amorena, B., Lasa, I., Penades, J.R. (2004).** Role of biofilm associated protein bap in the pathogenesis of bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.*, **72**, 2177–2185.
- De Almeida, D.G., Soares da Silva, R.D., Luna, J.M., Rufino, R.D., Santos, V.A., Banat, I.M., Sarubbo, L.A. (2016).** Biosurfactants: Promising molecules for petroleum biotechnology advances. *Front. Microbiol.*, **7**, 1718.
- Decho, A.W. (1990).** Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol.*, **28**, 73-153.
- De França, Í.W.L., Lima, A.P., Lemos, J.A.M., Lemos, C.G.F., Melo, V.M.M., de Sant’ana, H.B., Gonçalves, L.R.B. (2015).** Production of a biosurfactant by *Bacillus subtilis* ICA56 aiming bioremediation of impacted soils. *Catal. Today*, **255**, 10–15.
- Desai, J.D., Banat, I.M. (1997).** Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 47–64.
- Dey, G., Bharti, R., Dhanarajan, G., Das, S., Dey, K.K., Kumar, B.N., Sen, R., Mandal, M. (2015).** Marine lipopeptide Iturin A inhibits Akt mediated GSK3 β and FoxO3a signaling and triggers apoptosis in breast cancer. *Sci. Rep.*, **5**, 10316.
- Di Onofrio, V., Gesuele, R., Maione, A., Liguori, G., Liguori, R., Guida, M., Nigro, R., Galdiero, E. (2019).** Prevention of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on soft contact lenses by *Allium sativum* fermented extract (BGE) and Cannabinol oil extract (CBD). *Antibiotics*, **8**, 258.
- Elbourne, A., Chapman, J., Gelmi, A., Cozzolino, D., Crawford, R.J., Truong, V.K. (2019).** Bacterial-nanostructure interactions: The role of cell elasticity and adhesion forces. *J. Colloid Interface Sci.*, **546**, 192–210.

El Farissi, H., Talhaoui, A., EL Bachiri, A. (2022). Influence of pyrolysis process on the production of bio-oil used as alternative green energy from *Pistacia lentiscus* L. *J. Anal. Appl. Pyrolys.*, **168**, 105781.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) (2003). Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**, 509–515.

Fernandes de Oliveira, L.M., Steindorff, M., Darisipudi, M.N., Mrochen, D.M., Trübe, P., Bröker, B.M., Brönstrup, M., Tegge, W., Holtfreter, S. (2021). Discovery of *Staphylococcus aureus* adhesion inhibitors by automated imaging and their characterization in a mouse model of persistent nasal colonization. *Microorganisms*, **9**, 631.

Flemming, H.C., van Hullebusch, E.D., Neu, T.R., Nielsen, P.H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., Wuertz, S. (2023). The biofilm matrix: Multitasking in a shared space. *Nat. Rev. Microbiol.*, **21**, 70–86.

Fooladi, T., Hamid, A., Yusoff, W., Moazami, N., Shafiee, Z. (2013). Production of biosurfactant by indigenous isolated bacteria in fermentation system. *AIP Conf. Proc.*, **1571**, 197–201.

Franklin, M.J., Nivens, D.E., Weadge, J.T., Howell, P.L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.*, **2**, 167.

Franzetti, A., Gandolfi, I., Bestetti, G., Smyth, T.J., Banat, I.M. (2010). Production and applications of trehalose lipid biosurfactants. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, **112**, 617–627.

Gajdos, L., Blakeley, M.P., Haertlein, M., Forsyth, V.T., Devos, J.M., Imberty, A. (2022). Neutron crystallography reveals mechanisms used by *Pseudomonas aeruginosa* for host-cell binding. *Nat. Commun.*, **13**, 194.

- Gandhimathi, R., Seghal Kiran, G., Hema, T.A., Selvin, J., Rajeetha Raviji, T., Shanmughapriya, S. (2009).** Production and characterization of lipopeptide biosurfactant by a sponge-associated marine actinomycetes *Nocardiopsis alba* MSA10. *Bioprocess Biosyst. Eng.*, **32**, 825–835.
- Giri, A.K., Patel, R.K., Mahapatra, S.S., Mishra, P.C. (2012a).** Biosorption of arsenic (III) from aqueous solution by living cells of *Bacillus cereus*. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **20**, 1281–1291.
- Giri, A.K., Patel, R.K., Mishra, P.C. (2012b).** Biosorption of As(V) from aqueous solutions by living cells of *Bacillus cereus*. *Water Sci. Technol.*, **66**, 1699–1707.
- Gudiña, E.J., Rodrigues, A.I., Alves, E., Domingues, M.R., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2015).** Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. *Bioresour. Technol.*, **177**, 87–93.
- Guezennec, J. (2002).** Deep-sea hydrothermal vents: A new of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 204–208.
- Gugliandolo, C., Maugeri, T.L., Caccamo, D., Stackebrandt, E. (2003).** *Bacillus aelious* sp.nov. a novel thermophilic marine *Bacillus* species from Eolian Islands (Italy) *Syst. Appl. Microbiol.*, **26**, 450–455.
- Gugliandolo, C., Italiano, F., Maugeri, T.L. (2006).** The submarine hydrothermal system of Panarea (Southern Italy): biogeochemical processes at the thermal fluids-sea bottom interface. *Ann. Geophys.*, **49**, 783–792.
- Gugliandolo, C., Lentini, V., Spanò, A., Maugeri, T.L. (2012).** New bacilli from shallow hydrothermal vents of Panarea Island (Italy) and their biotechnological potentialities. *J. Appl. Microbiol.*, **112**, 1102–1112.

- Gugliandolo, C., Spanò, A., Lentini, V., Arena, A., Maugeri, T.L. (2014).** Antiviral and immunomodulatory effects of a novel bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin. *J. Appl. Microbiol.*, **116**, 1028–1034.
- Gugliandolo, C., Spanò, A., Maugeri, T.L., Poli, A., Arena, A., Nicolaus, B. (2015).** Role of bacterial exopolysaccharides as agents in counteracting immune disorders induced by herpes virus. *Microorganisms*, **3**, 464–483.
- Gupta, P., Diwan, B. (2017).** Bacterial exopolysaccharide mediated heavy metal removal: A Review on biosynthesis, mechanism and remediation strategies. *Biotechnology Reports* **13**, 58–71.
- Gurunathan, R., Rathinam, A.R., Hwang, J.-S., Dahms, H.-U. (2021).** Shallow Hydrothermal Vent Bacteria and Their Secondary Metabolites with a Particular Focus on *Bacillus*. *Mar. Drugs*, **19**, 681.
- Guttenplan, S.B., Kearns, D.B. (2013).** Regulation of flagellar motility during biofilm formation. *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, 849–871.
- Hamdan, S.H., Maiangwa, J., Ali, M.S.M., Normi, Y.M., Sabri, S., Leow, T.C. (2021).** Thermostable lipases and their dynamics of improved enzymatic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **105**, 7069–7094.
- Harapanahalli, A.K., Chen, Y., Li, J., Busscher, H.J., van der Mei, H.C. (2015).** Influence of adhesion force on *icaA* and *cidA* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **81**, 3369–3378.
- Hassan, K.M., Fukuhara, T., Hai, F.I., Bari, Q.H., Islam, K.M.S. (2009).** Development of a biophysicochemical technique for arsenic removal from groundwater. *Desalination*, **249**, 224–229.

- Hentati, D., Chebbi, A., Hadrich, F., Frikha, I., Rabanal, F., Sayadi, S., Manresa, A., Chamkha, M. (2019).** Production, characterization and biotechnological potential of lipopeptide biosurfactants from a novel marine *Bacillus stratosphericus* strain FLU5. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **167**, 441–449.
- Ibrahim, M.L., Ijah, U.J.J., Manga, S.B., Bilbis, L.S., Umar, S. (2013).** Production and partial characterization of biosurfactant produced by crude oil degrading bacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, **81**, 28–34.
- Janek, T., Łukaszewicz, M., Krasowska, A. (2013).** Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **110**, 379–386.
- Jiang, P., Li, J., Han, F., Duan, G., Lu, X., Gu, Y., Yu, W. (2011).** Antibiofilm activity of an exopolysaccharide from marine bacterium *Vibrio* sp. QY101. *PLoS ONE*, **6**, e18514.
- Joshi, D.N., Flora, S.J.S., Kalia, K. (2009).** *Bacillus* sp. strain DJ-1, potent arsenic hypertolerant bacterium isolated from the industrial effluent of India. *J. Hazard. Mater.*, **66**, 1500–1505.
- Joy, S., Rahman, K.S.M.P., Sharma, S. (2017).** Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. *Biochem. Eng. J.*, **317**, 232–241.
- Kaczorek, E., Pachholak, A., Zdarta, A., Smulek, W. (2018).** The impact of biosurfactant on microbial properties leading to hydrocarbon bioavailability. *Colloids Interfaces*, **2**, 35.
- Kambourova, M., Mandeva, R., Dimova, D., Poli, A., Nicolaus, B., Tommonaro, G. (2009).** Production and characterization of a microbial glucan, synthesized by *Geobacillus tepidamans* V264 isolated from Bulgarian hot spring. *Carbohydr. Polym.*, **77**, 338–343.

Karwacki, M.T., Kadouri, D.E., Bendaoud, M., Izano, E.A., Sampathkumar, V., Inzana, T.J., Kaplan, J. (2013). Antibiofilm activity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 5 capsular polysaccharide. *PLoS ONE*, **8**, e63844.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol.*, **28**, 668–681.

Katsikogianni, M., Missirlis, Y. (2004). Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur. Cell Mater.*, **8**, 37–57.

Kaur, N., Dey, P. (2023). Bacterial exopolysaccharides as emerging bioactive macromolecules: from fundamentals to applications. *Res. Microbiol.* **174**, 104024.

Kavita, K., Singh, V.K., Mishra, A., Jha, B. (2014). Characterization and anti-biofilm activity of extracellular polymeric substances from *Oceanobacillus iheyensis*. *Carbohydr. Polym.*, **101**, 29–35.

Kilvington, S., Huang, L., Kao, E., Powell, C.H. (2010). Development of a new contact lens multipurpose solution: Comparative analysis of microbiological, biological, and clinical performance. *J. Optom.*, **13**, 134–142.

Kreve, S., Dos Reis, A.C. (2022). Effect of surface properties of ceramic materials on bacterial adhesion: A systematic review. *J. Esthet. Restor. Dent.*, **34**, 461–472.

Lakherwal D. (2014). Adsorption of heavy metals: a review. *Int. J. Environ. Res. Dev.* **4**, 41–48.

Larpin, S., Sauvageot, N., Pichereau, V., Laplace, J.M., Auffray, Y. (2002). Biosynthesis of exopolysaccharide by a *Bacillus licheniformis* strain isolated from ropy cider. *Int. J. Food Microbiol.*, **77**, 1–9.

Lawrance, A., Balakrishnan, M., Joseph, T.C., Sukumaran, D.P., Valsalan, V.N., Gopal, D., Ramalingam, K. (2014). Functional and molecular characterization of a lipopeptide surfactant from

the marine sponge-associated eubacteria *Bacillus licheniformis* NIOT-AMIN06 of Andaman and Nicobar Islands, India. *Mar. Pollut. Bull.*, **82**, 76–85.

Lee, Z., Carder, K., Arnone, R., He, M. (2007). Determination of Primary Spectral Bands for Remote Sensing of Aquatic Environments. *Sensors*, **7**, 3428–3441.

Lentini, V., Gugliandolo, C., Maugeri, T.L. (2007). Identification of enzyme-producing thermophilic bacilli isolated from marine vents of Eolian Islands (Italy). *Ann. Microbiol.*, **57**, 355–361.

Lentini, V., Gugliandolo, C., Bunk, B. Overmann, J., Maugeri, T.L. (2014). Diversity of Prokaryotic Community at a Shallow Marine Hydrothermal Site Elucidated by Illumina Sequencing Technology. *Curr. Microbiol.*, **69**, 457–466.

Leon, C.G., Moraga, R., Valenzuela, C., Gugliandolo, C., Lo Giudice, A., Papale, M., Vilo, C., Dong, Q., Smith, C.T., Rossello-mora, R., et al. (2018). Effect of the natural arsenic gradient on the diversity and arsenic resistance of bacterial communities of the sediments of Camarones River (Atacama Desert, Chile). *PLoS ONE*, **13**, e0195080.

Li, X., Sun, L., Zhang, P., Wang, Y. (2021). Novel Approaches to combat medical device-associated biofilms. *Coatings*, **11**, 294.

Lin, S.C., Minton, M.A., Sharma, M.M., Georgiou, G. (1994). Structural and immunological characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus licheniformis* JF-2. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 31–38.

Lonsdale, P. (1977). Clustering of suspension-feeding macrobenthos near abyssal hydrothermal vents at oceanic spreading centres. *Deep-Sea Res.*, **24**, 857–863.

Lu, Y., Cai, W.J., Ren, Z., Han, P. (2022). The role of Staphylococcal biofilm on the surface of implants in orthopedic infection. *Microorganisms*, **10**, 1909.

- Ma, L., Wang, S., Wang, D., Parsek, M.R., Wozniak, D.J. (2012).** The roles of biofilm matrix polysaccharide Psl in mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, **65**, 377–380.
- Malik, A., Sakamoto, M., Hanazaki, S., Osawa, M., Susuki, T., Tochigi, M., Kakii, K. (2003).** Coaggregation among nonflocculating bacteria isolated from activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6056–6064.
- Mancuso Nichols, C., Garon Lardière, S., Bowman, J.P., Nichols, P.D., Gibson, J.A E., Guézennec, J. (2005).** Chemical characterization of exopolysaccharides from Antarctic marine bacteria. *Microb Ecol.*, **49**, 578–89.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. (1999).** Soil lipase activity—A useful indicator of oil biodegradation. *Biotechnol. Technol.*, **13**, 859–863.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Panico, A., Lama, L., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2002a).** A halophilic thermotolerant *Bacillus* isolated from a marine hot spring able to produce a new exopolysaccharide. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 515–519.
- Maugeri, T.L., Gugliandolo, C., Caccamo, D., Stackebrandt, E. (2002b).** Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**, 450–455.
- Maugeri, T.L., Lentini, V., Gugliandolo, C., Italiano, F., Cousin, S., Stackebrandt, E. (2009).** Bacterial and archaeal populations at two shallow hydrothermal vents off Panarea Island (Eolian Islands, Italy) *Extremophiles*, **13**, 199–212.
- Meng, L., Li, H., Bao, M., Sun, P. (2017).** Metabolic pathway for a new strain *Pseudomonas synxantha* LSH-70: From chemotaxis to uptake of n-hexadecane. *Sci. Rep.*, **7**, 39068.
- Miyatke, M., Hayashi, S. (2009).** Characteristics of arsenic removal from aqueous solution by *Bacillus megaterium* strain UM-123. *J. Environ. Biotechnol.*, **9**, 123–129.

- Mohseni, M., Abbaszadeh, J., Maghool, S.S., Chaichi, M.J. (2018).** Heavy metals detection using biosensor cells of a novel marine luminescent bacterium *Vibrio* sp. MM1 isolated from the Caspian Sea. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **148**, 555–560.
- Monds, R.D., O’Toole, G.A. (2009).** The developmental model of microbial biofilms: Ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol.*, **17**, 73–87.
- Mordmuang, A., Udomwech, L., Karnjana, K. (2021).** Influence of contact lens materials and cleaning procedures on bacterial adhesion and biofilm formation. *Clin. Ophthalmol.*, **15**, 2391.
- Mukherjee, A. (2007).** Potential application of cyclic lipopeptide biosurfactants produced by *Bacillus subtilis* strains in laundry detergent formulations. *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 330–335.
- Mulani, N., Fulke, A.B., D’souza, E., Ram, A., Maloo, A., Sayed, F., Gajbhiye, S.N. (2017).** Biodegradation of crude oil using marine *Bacillus* species from Vadinar coast, Gujarat, India. *Curr. Sci.*, **112**, 569–576.
- Nanjundan, J., Ramasamy, R., Uthandi, S., Ponnusamy, M. (2019).** Antimicrobial activity and spectroscopic characterization of surfactin class of lipopeptides from *Bacillus amyloliquefaciens* SR1. *Microb. Pathog.*, **128**, 374–380.
- Naumann, D., Fabian, H., Lasch, P. (2009).** FTIR spectroscopy of cells, tissues and body fluids. In *Advances in Biomedical Spectroscopy*, IOSPress BV: Amsterdam, The Netherlands, Volume 2, pp. 312–354.
- Naveed, S., Li, C., Zhang, J., Zhang, C., Ge, Y. (2020).** Sorption and transformation of arsenic by extracellular polymeric substances extracted from *Synechocystis* sp. PCC6803. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **206**, 111200.
- Navon-Venezia, S., Kondratyeva, K., Carattoli, A. (2017).** *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.*, **41**, 252–275.

- Nicolaus, B., Panico, A., Manca, M.C., Lama, L., Gambacorta, A., Maugeri, T.L. (2000).** A thermophilic *Bacillus* isolated from an Eolian shallow hydrothermal vent, able to produce exopolysaccharides. *Syst. Appl. Microbiol.*, **23**, 426–432.
- Nicolaus, B., Lama, L., Panico, A., Schiano Moriello, V., Romano, I., Gambacorta, A. (2002).** Production and characterization of exopolysaccharides excreted by thermophilic bacteria from shallow, marine hydrothermal vents of Flegrean areas (Italy). *Syst. Appl. Microbiol.*, **25**, 319–325.
- Nicolaus, B., Kambourova, M., Oner, E.T. (2010).** Exopolysaccharides from extremophiles: From fundamentals to biotechnology. *Environ. Technol.*, **31**, 1145–1158.
- O'Brien, K.L., Wolfson, L.J., Watt, J.P., Henkle, E., Deloria-Knoll, M., McCall, N., Lee, E., Mulholland, K., Levine, O.S., Cherian, T., (2009).** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, **374**, 893–902.
- O'Toole, G.A. (2011).** Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Vis. Exp.*, **47**, e2437.
- Paczosa, M.K., Meccas, J. (2016).** *Klebsiella pneumoniae*: Going on the Offense with a Strong Defense. *Microbiol Mol. Biol. Rev.*, **80**, 629-61.
- Passos da Silva, D., Matwichuk, M.L., Townsend, D.O., Reichhardt, C., Lamba, D., Wozniak, D.J., Parsek, M.R. (2019).** The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat. Commun.*, **10**, 2183.
- Perfumo, A., Rancich, I., Banat, I.M. (2010).** Possibilities and challenges for biosurfactants use in petroleum industry. In *Biosurfactants. Advances in Experimental Medicine and Biology*, Sen, R., Ed., Springer: New York, NY, USA, pp. 135–145.
- Pintor, A.M.A., Ferreira, C.I.A., Pereira, J.C., Correia, P., Silva, S.P., Vilar, V.J.P., Botelho, C.M.S., Boaventura, R.A.R. (2012).** Use of cork powder and granules for the adsorption of pollutants: A review. *Water Res.*, **46**, 3152–3166.

Poli, A., Anzelmo, G., Nicolaus, B. (2010). Bacterial exopolysaccharides from extreme habitat: Production, characterization and biological activities. *Mar. Drugs*, **8**, 1779–1802.

Price, R.E., Pichler, T. (2005). Distribution, speciation and bioavailability of arsenic in a shallow-water submarine hydrothermal system, Tutum Bay, Ambitle Island, PNG. *Chem. Geol.*, **224**, 122–135.

Price, R.E., London, J., Wallschläger, D., Ruiz-Chancho, M.J., Pichler, T. (2013). Enhanced bioaccumulation and biotransformation of As in coral reef organisms surrounding a marine shallow-water hydrothermal vent system. *Chem. Geol.*, **348**, 48–55.

Price, R.E., Larowe, D.E., Italiano, F., Savov, I., Pichler, T., Amend, J.P. (2015). Subsurface hydrothermal processes and the bioenergetics of chemolithoautotrophy at the shallow-sea vents off Panarea Island (Italy). *Chem. Geol.*, **408**, 21–45.

Prieto-Barajas, C.M., Alfaro-Cuevas, R., Valencia-Cantero, E., Santoyo, G. (2017). Effect of seasonality and physicochemical parameters on bacterial communities in two hot spring microbial mats from Araró, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.*, **88**, 616–624.

Qian, W., Sun, Z., Wang, T., Yang, M., Liu, M., Zhang, J., Li, Y. (2020). Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. *Microb. Pathog.*, **139**, 103924.

Ramani, K., Jain, S.C., Mandal, A.B., Sekaran, G. (2012). Microbial induced lipoprotein biosurfactant from slaughterhouse lipid waste and its application to the removal of metal ions from aqueous solution. *Colloids Surf. B.*, **97**, 254–263.

Rendueles, O., Kaplan, J.B., Ghigo, J.M. (2013). Antibiofilm polysaccharides. *Environ. Microbiol.*, **15**, 334–346.

- Rizzo, C., Zammuto, V., Lo Giudice, A., Rizzo, M.G., Spanò, A., Laganà, P., Martinez, M., Guglielmino, S., Gugliandolo, C. (2021).** Antibiofilm activity of Antarctic sponge-associated bacteria against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *J. Mar. Sci.Eng.*, **9**, 243.
- Rohman, A., Man, Y.C. (2010).** Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for analysis of extra virgin olive oil adulterated with palm oil. *Food Res. Int.*, **43**, 886–892.
- Romano, I., Poli, A., Lama, L., Gambacorta, A., Nicolaus, B. (2005).** *Geobacillus thermoleovorans* subsp. *stromboliensis* subsp. nov., isolated from the geothermal volcanic environment. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **51**, 183–189.
- Rosenberg, E., Ron, E.Z. (1999).** High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 154–162.
- Satpute, S.K., Banat, I.M., Dhakephalkar, P.K., Banpurkar, A.G., Chopade, B.A. (2010).** Biosurfactants, bioemulsifiers and exopolysaccharides from marine microorganisms. *Biotechnol. Adv.*, **28**, 436–450.
- Savli, H., Karadenizli, A., Kolayli, F., Gundes, S., Ozbek, U., Vahaboglu, H. (2003).** Expression stability of six housekeeping genes: A proposal for resistance gene quantification studies of *Pseudomonas aeruginosa* by Real-Time Quantitative RT-PCR. *J. Med. Microbiol.*, **52**, 403–408.
- Scala, A., Piperno, A., Hada, A., Astilean, S., Vulpoi, A., Ginestra, G., Marino, A., Nostro, A., Zammuto V., Gugliandolo, C., (2019).** Marine Bacterial Exopolymers-Mediated Green Synthesis of Noble Metal Nanoparticles with Antimicrobial Properties. *Polymers*, **11**, 1157.
- Senok, A., Nassar, R., Kaklamanos, E.G., Belhoul, K., Abu Fanas, S., Nassar, M., Azar, A.J., Müller, E., Reissig, A., Gawlik, D., et al. (2020).** Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolates associated with nasal colonization and environmental contamination in academic dental clinics. *Microb. Drug Resist.*, **26**, 661–669.

- Shaji, E., Santosh, M., Sarath, K.V., Prakash, P., Deepchand, V., Divya, B.V. (2021).** Arsenic contamination of groundwater: A global synopsis with focus on the Indian Peninsula. *Geosci. Front.*, **12**, 101079.
- Sharma, V.K., Sohn, M. (2009).** Aquatic arsenic: Toxicity, speciation, transformations, and remediation. *Environ. Int.*, **35**, 743–759.
- Sharma, N., Lavania, M., Kukreti, V., Rana, D.P., Lal, B. (2018).** Laboratory investigation of indigenous consortia TERIJ-188 for incremental oil recovery. *Front. Microbiol.*, **9**, 2357.
- Siegmund, I., Wagner, F. (1991).** New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnol. Technol.*, **5**, 265–268.
- Sierra, G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **23**, 15–22.
- Simell, B., Auranen, K., Käyhty, H., Goldblatt, D., Dagan, R., O'Brien, K.L. (2012).** The fundamental link between pneumococcal carriage and disease. *Expert Rev. Vaccines*, **11**, 841–855.
- Singh, R., Singh, S., Parihar, P., Singh, V.P., Prasad, S.M. (2015).** Arsenic contamination, consequences and remediation techniques: A review. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **112**, 247–270.
- Sivapathasekaran, C., Mukherjee, S., Samanta, R., Sen, R. (2009).** High-performance liquid chromatography purification of biosurfactant isoforms produced by a marine bacterium. *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**, 845–854.
- Smedley, P.L., Kinniburgh, D.G. (2013).** Arsenic in groundwater and the environment. In *Essentials of Medical Geology*, Selinus, O., Ed., Springer: Dordrecht, The Netherlands, pp. 279–310.

- Smyth, T.J.P., Perfumo, A., Marchant, R., Banat, I.M. (2010).** Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology, Timmis, K.N., Ed., Springer: Berlin, Germany, pp. 3705–3723.
- Son, S., Ko, S.K., Jang, M., Kim, J.W., Kim, G.S., Lee, J.K., Jeon, E.S., Futamura, Y., Ryoo, I.J., Lee, J.S., et al. (2016).** New cyclic lipopeptides of the iturin class produced by saltern-derived *Bacillus* sp. KCB14S006. *Mar. Drugs*, **14**, 72.
- Sorroche, F., Rinaudi, L., Zorreguieta, A., Giordano, W. (2010).** EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Curr. Microbiol.*, **61**, 465–470.
- Spagnuolo, D., Martino, A.D., Zammuto, V., Minicante, S.A., Spanò, A., Manghisi, A., Gugliandolo, C., Morabito, M., Genovese, G. (2022).** Conventional vs. Innovative Protocols for the Extraction of Polysaccharides from Macroalgae. *Sustainability*, **14**, 5750.
- Spanò, A., Gugliandolo, C., Lentini, V., Maugeri, T.L., Anzelmo, G., Poli, A., Nicolaus, B. (2013).** A novel EPS-producing strain of *Bacillus licheniformis* isolated from a shallow vent off Panarea Island (Italy). *Curr. Microbiol.*, **67**, 21–29.
- Spanò, A., Arena, A. (2016).** Bacterial exopolysaccharide of shallow marine vent origin as agent in counteracting immune disorders induced by Herpes Virus. *J. Immunoass. Immunochem.*, **37**, 251–260.
- Spanò, A., Laganà, P., Visalli, G., Maugeri, T.L., Gugliandolo, C. (2016).** *In vitro* antibiofilm activity of an exopolysaccharide from the marine thermophilic *Bacillus licheniformis* T14. *Curr. Microbiol.*, **72**, 518–528.
- Spanò, A., Zammuto, V., Macri, A., Agostino, E., Nicolò, M.S., Scala, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Ingegneri, M., Caccamo, M.T., Magazù, S., Martinez, M., Leon, G.C., Guglielmino, S.P.P., Gugliandolo, C. (2023).** Arsenic adsorption and toxicity reduction of an

exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* B3-15 of shallow hydrothermal vent origin. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11**, 325.

Speziale, P., Pietrocola, G., Rindi, S., Provenzano, M., Provenza, G., Di Poto, A., Visai, L., Arciola, C.R. (2009). Structural and functional role of *Staphylococcus aureus* surface components recognizing adhesive matrix molecules of the host. *Future Microbiol.*, **4**, 1337–1352.

Srivastava, S., Anil Dwivedi, K. (2015). Biological wastes the tool for biosorption of arsenic. *J. Bioremed. Biodegrad.*, **7**, 2.

Tchounwou, P.B. Yedjou, C.G. Patlolla, A.K. Sutton, D.J. (2012). Heavy metal toxicity and the environment. In *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology*, Springer, pp. 133–164.

Tarasov, V.G., Gebruk, A.V., Mironov, A.N., Moskalev, L.I. (2005). Deep-sea and shallow water hydrothermal vent communities: two different phenomena? *Chem. Geol.*, **224**, 5–39.

Theis, T., Skurray, R.A., Brown, M.H. (2007). Identification of suitable internal controls to study expression of a *Staphylococcus aureus* multidrug resistance system by quantitative real-time PCR. *J. Microbiol. Meth.*, **70**, 355–362.

Tripathi, V., Gaur, V.K., Dhiman, N., Gautam, K., Manickam, N. (2020). Characterization and properties of the biosurfactant produced by PAH-degrading bacteria isolated from contaminated oily sludge environment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.*, **27**, 27268–27278.

Tuleva, B., Christova, N., Jordanov, B., Nikolova-Damyanova, B., Petrov, P. (2005). Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. *Z. Naturforsch. C. J. Biosci.*, **60**, 577–582.

Uneputty, A., Dávila-Lezama, A., Garibo, D., Oknianska, A., Bogdanchikova, N., Hernández-Sánchez, J.F., Susarrey-Arce, A. (2022). Strategies applied to modify structured and smooth

surfaces: A step closer to reduce bacterial adhesion and biofilm formation. *Colloid Interface Sci. Commun.*, **46**, 100560.

Ungureanu, G., Santos, S., Boaventura, R., Botelho, C. (2015). Arsenic and antimony in water and wastewater: Overview of removal techniques with special reference to latest advances in adsorption. *J. Environ. Manag.*, **151**, 326–342.

Vandana, S.D. (2022). Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydr. Polym.*, **291**, 119536.

Varvaresou, A., Iakovou, K. (2015). Biosurfactants in cosmetics and biopharmaceuticals. *Lett. Appl. Microbiol.*, **61**, 214–223.

Vaz, D.A., Gudiña, E.J., Alameda, E.J., Teixeira, J.A., Rodrigues, L.R. (2012). Performance of a biosurfactant produced by a *Bacillus subtilis* strain isolated from crude oil samples as compared to commercial chemical surfactants. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **89**, 167–174.

Vetriani, C., Chew, Y.S., Miller, S.M., Yagi, J., Coombs, J., Lutz, R.A., Barkay, T. (2005). Mercury adaptation among bacteria from a deep-sea hydrothermal vent. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 220–226.

Vishnoi, N., Dixit, S., Singh, D.P. (2016). Differential pattern of arsenic binding by the cell wall in two arsenite tolerant *Bacillus* strains isolated from arsenic contaminated soil. *Cell. Mol. Biol.*, **62**, 1000138.

Wang, J., Chen, C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *Biotechnol. Adv.*, **24**, 427–451.

Wang, Y.-X., Xin, Y., Yin, J.-Y., Huang, X.-J., Wang, J.-Q., Hu, J.-L., Geng, F., Nie, S.-P. (2022). Revealing the architecture and solution properties of polysaccharide fractions from *Macrolepiota albuminosa* (Berk.). *Pegler. Food Chem.*, **368**, 130772.

- Wei, Y., Zhao, Y., Zhao, X., Gao, X., Zheng, Y., Zuo, H., Wei, Z. (2020).** Roles of different humin and heavy-metal resistant bacteria from composting on heavy metal removal. *Bioresour. Technol.*, **296**, 122375.
- Wiercigroch, E., Szafraniec, E., Czamara, K., Pacia, M.Z., Majzner, K., Kochan, K., Kaczor, A., Baranska, M., Malek, K. (2017).** Raman and infrared spectroscopy of carbohydrates: A review. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectr.*, **185**, 317–335.
- Wolfaardt, G.M., Lawrence, J.R., Korber, D.R. (1999).** Function of EPS in: Wingender J.R., Neu T.R. e Flemming, H.C. (Eds) *Microbial Extracellular Polymeric Substances: characterization, structure and function*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 171–216.
- Wotton, R.S. (2004).** The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic system. *Scientia Marina*, **68**, 13–11.
- Xu, B.H., Lu, Y.Q., Ye, Z.W., Zheng, Q.W., Wei, T., Lin, J.F., Guo, L.Q. (2018).** Genomics-guided discovery and structure identification of cyclic lipopeptides from the *Bacillus siamensis* JFL15. *PLoS ONE*, **13**, e0202893.
- Yadav, M.K., Go, Y.Y., Hye Kim, S., Chae, S.-W. Song, J.-J. (2017).** Antimicrobial and Antibiofilm Effects of Human Amniotic/Chorionic Membrane Extract on *Streptococcus pneumoniae*. *Front. Microbiol.*, **8**, 1948.
- Yakimov, M.M., Timmis, K.N., Wray, V., Fredrickson, H.L. (1995).** Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1706–1713.
- Yakimov, M., Amro, M., Bock, M., Boseker, K., Fredrickson, H.L., Kessel, D.G., Timmis, K.N. (1997).** The potential of *Bacillus licheniformis* strains for in situ enhanced oil recovery. *J. Petrol. Sci. Eng.*, **18**, 147–160.

Yeak, K.Y.C., Perko, M., Staring, G., Fernandez-Ciruelos, B.M., Wells, J.M., Abee, T., Wells-Bennik, M. (2022). Lichenysin Production by *Bacillus licheniformis* Food Isolates and Toxicity to Human Cells. *Front. Microbiol.*, **13**, 831033.

Yin, L.Q., Zhang, Y.Z., Azi, F., Zhou, J.Z., Liu, X.L., Dai, Y.Q., Wang, Z., Dong, M.S., Xia, X.D. (2022). Inhibition of biofilm formation and quorum sensing by soy isoflavones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Food Control.*, **133**, 108629–108639.

Yoshida, S., Miyazaki, M., Sakai, K., Takeshita, M., Yuasa, S., Sato, A., Kobayashi, T., Watanabe, S., Okuyama, H. (1997). Fourier Transform Infrared spectroscopic analysis of rat brain microsomal membranes modified by dietary fatty acids: Possible correlation with altered learning behavior. *Biospectroscopy*, **3**, 281–290.

Yusoff, D.F., Raja Abd Rahman, R.N.Z., Masomian, M., Ali, M.S.M., Leow, T.C. (2020). Newly isolated alkane hydroxylase and lipase producing *Geobacillus* and *Anoxybacillus* species involved in crude oil degradation. *Catalysts*, **10**, 851.

Zammuto, V., Fuchs, F.M., Fiebrandt, M., Stapelmann, K., Ulrich, N.J., Maugeri, T.L. Pukall, R., Gugliandolo, C., Moeller, R. (2018). Comparing Spore Resistance of *Bacillus* Strains Isolated from Hydrothermal Vents and Spacecraft Assembly Facilities to Environmental Stressors and Decontamination Treatments. *Astrobiology*, **18**, 11.

Zammuto, V., Spanò, A., Nicolò, M.S., Grillo, E., Caccamo, M.T., Magazù, S., Cappello, S., Gugliandolo, C. (2022). Thermophilic hydrocarbon-utilizing bacilli from marine shallow hydrothermal vents as producers of biosurfactants. *J. Mar. Sci. Eng.*, **10**, 1077.

Zammuto, V., Spanò, A., Agostino, E., Macrì, A., De Pasquale, C., Ferlazzo, G., Rizzo, M.G., Nicolò, M.S., Guglielmino, S., Gugliandolo, C. (2023a). Anti-Bacterial Adhesion on Abiotic and Biotic Surfaces of the Exopolysaccharide from the Marine *Bacillus licheniformis* B3-15. *Mar. Drugs*, **21**, 313.

Zammuto, V., Rizzo, M.G., De Pasquale, C., Ferlazzo, G., Caccamo, M.T., Magazù, S., Guglielmino, S.P.P., Gugliandolo, C. (2023b). Lichenysin-like Polypeptide Production by *Bacillus licheniformis* B3-15 and Its Antiadhesive and Antibiofilm Properties. *Microorganisms*, **11**, 1842.

Zammuto, V., Agostino, E., Macrì, A., Spanò, A., Nicolò, M.S., Gugliandolo, C. (2023c). Synergistic antibiofilm effects of exopolymers produced by the marine, thermotolerant *Bacillus licheniformis* B3-15 and their potential medical applications. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11**, 1660.

Appendice

Elenco delle pubblicazioni ottenute dai dati riportati in questo lavoro di tesi:

Spanò, A., Zammuto, V., Macrì, A., Agostino, E., Nicolò, M.S., Scala, A., Trombetta, D., Smeriglio, A., Ingegneri, M., Caccamo, M.T., Magazù, S., Martinez, M., Leon, G.C., Guglielmino, S.P.P., Gugliandolo, C. (2023). Arsenic adsorption and toxicity reduction of an exopolysaccharide produced by *Bacillus licheniformis* B3-15 of shallow hydrothermal vent origin. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11**, 325.

Zammuto, V., Spanò, A., Nicolò, M.S., Grillo, E., Caccamo, M.T., Magazù, S., Cappello, S., Gugliandolo, C. (2022). Thermophilic hydrocarbon-utilizing bacilli from marine shallow hydrothermal vents as producers of biosurfactants. *J. Mar. Sci. Eng.*, **10**, 1077.

Zammuto, V., Spanò, A., Agostino, E., Macrì, A., De Pasquale, C., Ferlazzo, G., Rizzo, M.G., Nicolò, M.S., Guglielmino, S., Gugliandolo, C. (2023a). Anti-Bacterial Adhesion on Abiotic and Biotic Surfaces of the Exopolysaccharide from the Marine *Bacillus licheniformis* B3-15. *Mar. Drugs*, **21**, 313.

Zammuto, V., Agostino, E., Macrì, A., Spanò, A., Nicolò, M.S., Gugliandolo, C. (2023c). Synergistic antibiofilm effects of exopolymers produced by the marine, thermotolerant *Bacillus licheniformis* B3-15 and their potential medical applications. *J. Mar. Sci. Eng.*, **11**, 1660.