

A. MACRÌ, E. AGOSTINO, M. G. RIZZO, A. SPANÒ, G. GENOVESE, D. SPAGNUOLO, F. CAPPARUCCI, C. GERVASI, A. SMERIGLIO, D. TROMBETTA, M. S. NICOLÒ, V. ZAMMUTO, C. GUGLIANDOLO

Dipartimento di Scienze Chimiche, Biologiche, Farmaceutiche ed Ambientali, Università degli Studi di Messina, Viale Ferdinando Stagno D'Alcontres 31, 98166 Messina, Italia  
angela.macri@studenti.unime.it

## **ATTIVITÀ ANTIBIOFILM E ANTIFOULING DI UN POLISACCARIDE PRODOTTO DA AGARDHIELLA SUBULATA (RHODOPHYTA)**

### **ANTI-BIOFILM AND ANTI-FOULING ACTIVITY OF THE POLYSACCHARIDE FROM AGARDHIELLA SUBULATA (RHODOPHYTA)**

**Abstract** - *In this study, in an ongoing screening for novel environment-friendly anti-biofouling molecules, the polysaccharide ( $\kappa$ -carrageenan), extracted from the invasive macroalga *Agardhiella subulata* (Rhodophyta), collected from Lake of Ganzirri (Messina, Italy), was evaluated for its effects on biofilm formation of pathogens relevant in aquaculture and human health. Without exerting any antibacterial activity, the polysaccharide reduced the biofilm formation by both Gram-positive and Gram-negative bacteria in a dose-dependent manner (100-400  $\mu\text{g/mL}$ ). As assessed by the surface-coating assay and the microbial affinity to hydrocarbons, the polysaccharide was able to inhibit the early bacterial adhesion to polystyrene surfaces, modifying their cell-surface properties in terms of charges and hydrophobicity. Furthermore, the polysaccharide showed high emulsifying activity ( $E_{24}$  up to 70%). As not toxic compound, the algal extract could be proposed as antiadhesive to prevent biofilms.*

**Key-words:** Antibiofilm activity, marine macroalgae, bacterial pathogens, polysaccharides, eco-compatibility.

**Introduzione** - Le malattie sostenute da batteri capaci di produrre biofilm rappresentano un grosso problema sia per la salute umana che per le attività industriali come l'acquacoltura. A causa della loro tolleranza ai disinfettanti e agli antimicrobici, i batteri patogeni inglobati nel biofilm sono notoriamente difficili da eradicare e possono pertanto causare infezioni croniche e malattie ricorrenti. La formazione del biofilm è un processo dinamico che inizia con l'adesione dei batteri al substrato biotico o abiotico, diviene irreversibile mediante la produzione di esopolimeri, che danno luogo allo sviluppo e alla stabilizzazione del biofilm, seguita dalla disgregazione e dispersione delle cellule (Monds & O' Tool, 2009). La fase dell'adesione iniziale è la più cruciale, perché le proprietà della superficie (cioè il tipo di substrato e la sua composizione chimica), i parametri ambientali (temperatura, pH, salinità, ecc.) e le proprietà della superficie cellulare batterica (cariche e idrofobicità), possono compromettere la formazione e lo sviluppo del biofilm. Le malattie batteriche indotte da microrganismi appartenenti alle Vibrionaceae rappresentano uno dei più severi problemi in acquacoltura.

Le macroalghe marine sono fonte di numerosi composti, quali flavonoidi, tannini, polifenoli e polisaccaridi, che possiedono un ampio spettro di bioattività (ad es.: antiossidante, antimicrobica, antinfiammatoria e anticancro) utili in diversi settori industriali (ad es: alimentare, mangimistico, cosmeceutico e farmaceutico (Kumar *et al.*, 2008). La biomassa delle macroalghe è in gran parte costituita da polisaccaridi, quali alginati, carragenani, agar, laminarani, fucoidani e ulvani, che svolgono importanti funzioni strutturali e di riserva. Tra i polisaccaridi, quelli solfatati sono conosciuti per le loro attività anticoagulanti, antiossidanti, antiproliferative, antitumorali, antinfiammatorie, antivirali, antimicrobiche ed antiadesive (Zammuto *et al.*, 2022a). Specie algali marine invasive presenti in diversi ambienti, come quello del lago salmastro di Ganzirri (Messina), producono grandi quantità di biomassa che necessita di essere periodicamente rimossa e trattata come rifiuto (Kumar *et al.*, 2008; Zammuto *et al.*, 2022a,b). Scopo del presente studio è stato quello di valutare l'attività antibiofilm

e *antifouling* di un estratto algale per trasformare un rifiuto in una valida risorsa biotecnologica per il settore dell'acquacoltura. A tale scopo, sono stati valutati gli effetti del polisaccaride estratto da *Agardhiella subulata* (C. Agardh) Kraft & M.J. Wynne (Rhodophyta), raccolta dal Lago di Ganzirri (Messina), sull'adesione iniziale e sulla formazione del biofilm di batteri patogeni rilevanti in acquacoltura (*Listonella anguillarum*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) e patogeni umani (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213). Inoltre è stata valutata la tossicità del polisaccaride su tre differenti modelli per prospettare un suo potenziale utilizzo per la salute dell'uomo e dell'ambiente.

**Materiali e metodi** - Campioni di *A. subulata* (C. Agardh) Kraft et M.J.Wynne (Rhodophyta) sono stati raccolti dal Lago salmastro di Ganzirri (Messina) ed il polisaccaride è stato estratto e caratterizzato chimicamente come precedentemente riportato (Zammuto *et al.*, 2022b). La capacità di produrre biofilm dei ceppi *Listonella anguillarum* (Van), *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Pdp) *Vibrio harveyi* G5, *V. parahaemolyticus* L12G, in confronto con *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, quali batteri modello, è stata valutata mediante la colorazione con il cristal violetto (0.1%) (O'Tool, 2011), in assenza o presenza del polisaccaride a concentrazioni crescenti (da 100 a 400 µg/mL). La biomassa dei biofilm è stata valutata spettrofotometricamente (OD = 585nm) (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA). Per analizzare gli effetti del polisaccaride (400 µg/mL in PBS) sia sulle proprietà di superficie che del substrato cellulare (cariche e idrofobicità), sono stati utilizzati il *surface-coating assay* ed il test di affinità agli idrocarburi (MATH), rispettivamente (Zammuto *et al.*, 2022a). Per il *surface-coating assay* un' aliquota (10 µL) di una soluzione di polisaccaride è stata distribuita in ciascun pozzetto di una piastra di polistirene a 24 pozzetti. Dopo incubazione a temperatura ambiente ciascuna sospensione batterica di 1 mL (contenente 10<sup>5</sup> CFU/mL) è stata aggiunta a ciascun pozzetto e la piastra è stata incubata per 18h a 37 °C. I pozzetti sono stati lavati e colorati con il cristal violetto (0.1%). Il MATH test è stato condotto aggiungendo una sospensione di ciascun batterio (3 mL) in PBS (OD<sub>400nm</sub> = 0.5-0.7)(A0) ad un' aliquota di ciascun idrocarburo (400 µL), etil acetato, cloroformio, decano e esadecano e agitati vigorosamente per 2 minuti. Dopo 10 min a 25 °C la soluzione acquosa è stata prelevata ed è stata misurata l'assorbanza ottica (OD = 400nm)(A1). L'affinità agli idrocarburi è stata calcolata secondo la seguente formula: % Affinità = (A0-A1)/A0 × 100.

La capacità di emulsionare il cherosene è stata valutata tramite il test dell' E<sub>24</sub> secondo quanto riportato da Zammuto *et al.*, 2022b. La tossicità del polisaccaride è stata testata a concentrazioni crescenti (da 100 a 400 µg/mL) mediante i seguenti saggi: il test della bioluminescenza *Vibrio harveyi* (G5) (Spanò *et al.*, 2023); test di vitalità di *Artemia salina* (Caputo *et al.*, 2020) e il test di tossicità acuta su embrioni di *Danio rerio* (Busquet *et al.*, 2014).

**Risultati** - Gli effetti del κ-carragenano (da 100 a 400 µg/mL) sulla formazione del biofilm batterico sono riportati in Fig. 1.

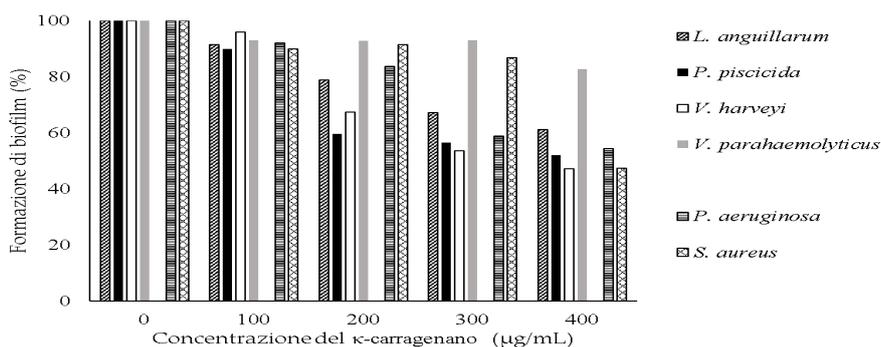


Fig. 1 - Formazione di biofilm (%) di *Listonella anguillarum*, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 in assenza o in presenza del κ-carragenano a concentrazioni crescenti (100 - 400 µg/mL).  
*Biofilm formation (%) by Listonella anguillarum, Photobacterium piscicida, Vibrio harveyi, V. parahaemolyticus, Pseudomonas aeruginosa and Staphylococcus aureus in the absence or in the presence of κ-carragenan (100, 200, 300, 400 µg/mL) extracted from Agardhiella subulata.*

Senza esercitare alcuna attività antibatterica, il polisaccaride ha ridotto la formazione del biofilm in modo dose-dipendente (100-400 µg/mL) ed alla più alta concentrazione (400 µg/mL) la riduzione del biofilm è risultata massima per *Vibrio harveyi* (52.8%), *Staphylococcus aureus* (51.6%), *Photobacterium damsela piscicida* (48%), *Pseudomonas aeruginosa* (44.5%), *Listonella anguillarum* (32.8%) e *Vibrio parahaemolyticus* (8.7%). La capacità di ridurre l'adesione batterica iniziale di *Listonella anguillarum*, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 sulla superficie di polistirene pretrattata con il polisaccaride (400 µg/mL) (*surface - coating assay*) è riportata in Tab. 1.

Il polisaccaride è stato in grado di ridurre efficacemente l'adesione iniziale sulla superficie di polistirene pretrattata (*surface-coating assay*) di *L. anguillarum*, *P. piscicida* e *P. aeruginosa* ed ha ridotto moderatamente l'adesione di *S.aureus*, *V. harveyi* e *V. parahaemolyticus*. L' affinità ai solventi polari, etil acetato e cloroformio, indica la modifica di cariche presenti sulla superficie cellulare, mentre l'affinità ai solventi apolari, decano ed esaecano, indica diversi livelli di idrofobicità. Le affinità ai solventi polari e non polari di *L. anguillarum*, *P. piscicida*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, sono riportate nella Tab. 2.

Tab. 1 - Capacità di aderire dei ceppi *Listonella anguillarum*, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 alla superficie di polistirene trattata o non trattata con il polisaccaride (400 µg/mL).  
*Ability to adhere of the strains Listonella anguillarum, Photobacterium piscicida, Vibrio harveyi, V. parahaemolyticus, Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853 and Staphylococcus aureus ATCC 29213 to the polystyrene surface treated or not treated with the polysaccharide (400 µg/mL).*

	Non trattato	Trattato
<i>L. anguillarum</i>	–	++
<i>P. piscicida</i>	–	++
<i>V. harveyi</i>	–	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	–	+
<i>P. aeruginosa</i>	–	++
<i>S. aureus</i>	–	+

(–) = nessuna capacità di inibire l'adesione al polistirene

(+) = moderata capacità di inibire l'adesione al polistirene

(++) = alta capacità di inibire l'adesione al polistirene

Tab. 2 - Affinità ai solventi polari (acetato di etile e cloroformio) e non polari (decano ed esadecano) (espressa in percentuale) di *Listonella anguillarum*, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, non trattati o trattati con il polisaccaride (400 µg/mL).

Affinity (expressed as a percentage) to polar (ethyl acetate and chloroform) and non-polar solvents (decane and hexadecane) of strains *Listonella anguillarum*, *Photobacterium piscicida*, *Vibrio harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, not-treated or treated with the polysaccharide (400 µg/mL).

	Affinità agli idrocarburi (%)							
	Acetato di etile		Cloroformio		Decano		Esadecano	
	Non trattato	Trattato	Non trattato	Trattato	Non trattato	Trattato	Non trattato	Trattato
<i>L. anguillarum</i>	50.38	28.14	56.06	7.39	73.48	27.04	8.71	1.04
<i>P. piscicida</i>	27.53	40.61	34.48	28.39	27.95	1.15	25.55	3.74
<i>P. aeruginosa</i>	26.01	22.50	61.85	67.11	38.00	21.11	22.00	12.33
<i>S. aureus</i>	20.00	67.98	88.00	51.27	45.00	31.00	52.00	32.00
<i>V. harveyi</i>	48.40	26.21	81.73	79.31	21.95	3.85	11.28	9.23
<i>V. parahaemolyticus</i>	17.05	19.93	77.88	61.53	19.30	14.42	3.24	2.99

L'aggiunta del polisaccaride ha modificato le proprietà della superficie (cariche ed idrofobicità) cellulare di tutti i ceppi batterici, con maggiori modifiche sia sulle cariche di superficie che sull'idrofobicità di *L. anguillarum*, sull'idrofobicità di *P. piscicida* e sulle cariche superficiali di *S. aureus*. Inoltre, il polisaccaride ha mostrato la capacità di emulsionare il cherosene ( $E_{24} = 70\%$ ). L'estratto di *A. subulata*, testato a diverse concentrazioni (da 100 a 400 µg/mL) su *V. harveyi* G5, *A. salina* e *D. rerio* è risultato non tossico fino alla concentrazione di 400 µg/mL.

**Conclusioni** - L'estratto algale ha ridotto la formazione del biofilm di tutti i ceppi testati con maggiore efficacia su *V. harveyi* modificando sia le proprietà superficiali del substrato che le proprietà della superficie cellulare batterica (cariche/idrofobicità). Quando il polisaccaride veniva confrontato con *Hypnea cornuta* (Kützinger) J. Agardh (Zammuto *et al.*, 2022a,b), esso riduceva più efficacemente la formazione del biofilm di *V. harveyi* e di *L. anguillarum* mentre aveva un'attività simile contro *S. aureus* e *P. piscicida*. Il polisaccaride, come polimero non tossico e biodegradabile, con proprietà tensioattive e antiadesive, potrebbe essere proposto come agente per prevenire la formazione di biofilm e conseguentemente lo sviluppo di biofouling in acquacoltura come alternativa ecosostenibile alle sostanze chimiche antivegetative.

#### Bibliografia

- BUSQUET F., STRECKER R., RAWLINGS J. M., BELANGER S. E., BRAUNBECK T., CARR G. J., HALDER M. (2014) - OECD validation study to assess intra-and inter-laboratory reproducibility of the zebrafish embryo toxicity test for acute aquatic toxicity testing. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **69** (3): 496-511.
- CAPUTO L., CORNARA L., BAZZICALUPO M., DE FRANCESCO C., DE FEO V., TROMBETTA D., SMERIGLIO A. (2020) - Chemical composition and biological activities of essential oils from peels of three citrus species. *Molecules*, **25** (8): 1890.
- KUMAR C. S., GANESAN P., SURESH P.V., BHASKAR N. (2008) - Seaweeds as a source of nutritionally beneficial compounds-a review. *J. Food Sci. Technol.*, **45** (1): 1.
- 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** (2): 73-87.
- O'TOOLE G.A. (2011) - Microtiter dish biofilm formation assay. *J. Visual. Exp.*, **47**: e2437.
- SPANÒ A., ZAMMUTO V., MACRÌ A., AGOSTINO E., NICOLÒ M.S., SCALA A., 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. Engin.*, **11** (2): 325.
- ZAMMUTO V., RIZZO M. G., SPANÒ A., GENOVESE G., MORABITO M., SPAGNUOLO D., GUGLIANDOLO C. (2022a) - *In vitro* evaluation of antibiofilm activity of crude extracts from macroalgae against pathogens relevant in aquaculture. *Aquaculture*, **549**: 737729.
- ZAMMUTO V., RIZZO M. G., SPANÒ A., SPAGNUOLO D., DI MARTINO A., MORABITO M., GUGLIANDOLO C. (2022b) - Effects of crude polysaccharides from marine macroalgae on the adhesion and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Algal Res.*, **63**: 102646.