



Maria Chiara Sportelli^a, Ruggiero Quarto^a, Rosaria A. Picca^a,
Giada Caniglia^b, Christine Kranz^b, Antonio Valentini^c, Holger Barth^d, Boris Mizaikoff^b, Nicola Cioffi^a
^aDipartimento di Chimica, Università di Bari "Aldo Moro"
^bInstitute of Analytical and Bioanalytical Chemistry, Ulm University (D)
^cDipartimento di Fisica, Physics Department, Università di Bari "Aldo Moro"
^dInstitute of Pharmacology and Toxicology, University of Ulm Medical Center (D)
*maria.sportelli@uniba.it

CANNIBALISMO NELL'INTERAZIONE BIOFILM-ANTIMICROBICI

I biofilm sono causa di gravi infezioni, per via della loro resistenza a condizioni estreme e trattamento farmacologico. In queste comunità talvolta si verificano episodi di cannibalismo, per nutrire gli organismi superstiti mediante lisi cellulare. Diverse tecniche analitiche sono state applicate con successo allo studio di biofilm. Tra queste, la spettroscopia IR-ATR che consente il monitoraggio in situ dei cicli vitali del biofilm.

I biofilm sono definiti come strutture tridimensionali costituite da cellule batteriche incorporate in una matrice di sostanze polimeriche extracellulari (EPS) [1]. Questo sistema complesso è dinamico e la sua struttura è fortemente influenzata da una moltitudine di parametri, come l'età del biofilm e le condizioni esterne, ad esempio la mancanza di nutrienti e/o l'attacco da parte di vari agenti [2]. La formazione del biofilm è un processo chimico multistadio, in cui i batteri passano dalla forma planctonica alla modalità sessile; l'interazione che si verifica tra i batteri in un biofilm e l'ambiente circostante può in gran parte determinare l'estensione e la composizione delle colonie batteriche [3]. Inoltre, è noto che le colonie batteriche attivano strategie di sopravvivenza quando sono sottoposte a condizioni di stress (ad esempio presenza di agenti antimicrobici) [4, 5]. Occasionalmente può verificarsi un comportamento cannibalistico [6], che implica la secrezione delle cosiddette tossine del cannibalismo, che possono uccidere i batteri sensibili della stessa colonia. Pertanto, le cellule lisate così generate possono fungere da nutrienti per i cannibali. Diverse nuove metodologie analitiche sono state recentemente sviluppate o adattate allo studio della formazione di biofilm, al fine di trovare strategie di eradicazione nuove e più efficaci [7-9]. Tra queste, la spettroscopia infrarossa in trasformata

di Fourier (FTIR), specialmente in modalità di riflessione totale attenuata (IR-ATR), può fornire il monitoraggio *in situ* e in tempo reale dei cicli vitali del biofilm, con dettaglio molecolare, specie sulle prime fasi di attacco [10]. Queste ultime sono particolarmente importanti per lo studio dei meccanismi di prevenzione della colonizzazione superficiale [11]. La crescita del biofilm può verificarsi durante periodi di tempo prolungati; pertanto, non solo sono necessari trattamenti antibatterici efficaci sul lungo periodo (1-5 giorni), ma anche metodi analitici appropriati per studiare il comportamento a lungo termine dei biofilm. A causa della ben nota resistenza dei biofilm agli antibiotici [12-14], è oggi di crescente interesse sviluppare metodologie innovative per il trattamento delle infezioni correlate ai biofilm. Queste nuove strategie sfruttano principalmente nanoparticelle (NPs) con proprietà antimicrobiche, come ZnONPs, AgNPs, CuNPs ecc. [15-17]. In questo lavoro, sono state incorporate AgNPs in una matrice di fluoropolimero (CF_x) utilizzando il ben noto metodo di deposizione mediante *sputtering* da fascio ionico (IBS) [18, 19], che ha consentito la preparazione di film sottili organici con un carico regolabile di NP inorganiche (antimicrobiche). A seguito di precedenti studi del nostro gruppo di ricerca sulle proprietà antimicrobiche dei film sottili di Ag-CF_x e sui meccanismi di azione di questi film

Maria Chiara Sportelli è risultata vincitrice della medaglia d'oro dell'edizione 2020 dell'European Young Chemist Award (EYCA), sezione Early Career Researcher.

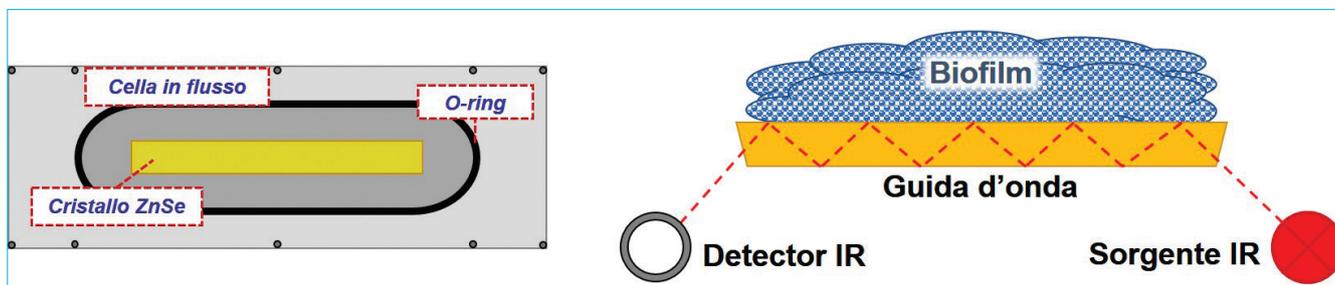


Fig. 1 - Apparato sperimentale per esperimenti IR-ATR in flusso su biofilm di *P. fluorescens*

compositi verso biofilm di *P. fluorescens* [15], abbiamo esplorato la progressione del biofilm su più lunghi tempi di contatto (48 h). Per la prima volta, sono stati studiati in dettaglio, su questa scala di tempi, sia le proprietà di rilascio di ioni antimicrobici dei film Ag-CF_x, sia il loro effetto sui biofilm di *P. fluorescens*. Si sono osservati cambiamenti dipendenti dal tempo nelle caratteristiche spettrali IR correlabili allo stress batterico. Inoltre si è registrata la ricolonizzazione sulla biomassa morta con possibili fenomeni di cannibalismo [20] all'interno della matrice del biofilm. La correlazione delle proprietà di rilascio ionico dei film sottili compositi con la determinazione spettrochimica dettagliata della risposta batterica a seguito dell'esposizione a lungo termine agli ioni d'argento antimicrobici risulta fondamentale per prevenire lo sviluppo di fenomeni di resistenza nei confronti dell'agente antimicrobico. Nel nostro caso, lo studio del cannibalismo in biofilm di *P. fluorescens* ha permesso di ipotizzare un regime di trattamento ottimizzato per l'eradicamento di biofilm resistenti ai nostri nanoantimicrobici. Lo studio è stato condotto su di una sospensione di batteri alla fine della fase di crescita esponenziale, in Luria-Bertani, la quale è stata utilizzata per avviare la formazione del biofilm sulla superficie del cristallo ATR. Durante questa fase, l'accumulo di biomassa sulla superficie dello stesso ed il graduale aumento della ricopertura sono stati seguiti attraverso l'aumento delle bande di assorbimento IR caratteristiche.

La configurazione sperimentale ha compreso una cella in flusso per il monitoraggio della crescita del biofilm di *P. fluorescens*, garantendo l'approvvigionamento continuo di nutrimento fresco al biofilm. Una pompa peristaltica è stata utilizzata per far fluire il terreno di coltura nel sistema. Il blocco

strumentale della cella a flusso è stato posto nella *sample chamber* di uno spettrometro FTIR Bruker Tensor II (Bruker Optics GmbH, Ettlingen, DE) come illustrato in Fig. 1.

I cristalli ATR in ZnSe sono stati modificati con nanocompositi Ag-CF_x in vari modi. In primo luogo, sono state coperte con il film sottile solo le aree IR inattive lungo la superficie del cristallo; successivamente, l'intera superficie del cristallo è stata modificata con un film sottile di 150 nm di spessore. Quindi, sono stati condotti tre diversi esperimenti: i) utilizzando un cristallo completamente modificato in superficie; ii) utilizzando un cristallo parzialmente ricoperto; iii) un esperimento di controllo utilizzando un cristallo senza film sottile antimicrobico.

Tutti gli esperimenti sono stati eseguiti in un periodo di 48 h alle stesse condizioni sperimentali e sfruttando colture batteriche identiche.

Un confronto dettagliato tra i dati IR ottenuti su tali superfici di ZnSe ha consentito un disaccoppiamento dell'effetto del rilascio ionico (esercitato dal film sottile), dall'effetto connesso al contatto diretto tra batteri e Ag-CF_x. Nel caso del cristallo interamente ricoperto, non era visibile alcuna colonizzazione superficiale, evidenziando che il film composito ha un forte effetto *antifouling* anche per esposizioni prolungate. Analogamente, i risultati sul cristallo parzialmente ricoperto hanno dimostrato che gli ioni Ag⁺, rilasciati in soluzione, esercitano un'azione biostatica e biocida. Tali dati sono stati confrontati con quanto osservato nell'esperimento di controllo, in cui il biofilm cresce e prolifera per tutta la durata dell'esperimento (Fig. 2).

In conclusione, come dimostrato dai risultati IR-ATR, il rilascio di ioni Ag⁺ può rallentare la colonizzazione superficiale e permette di eliminare il biofilm

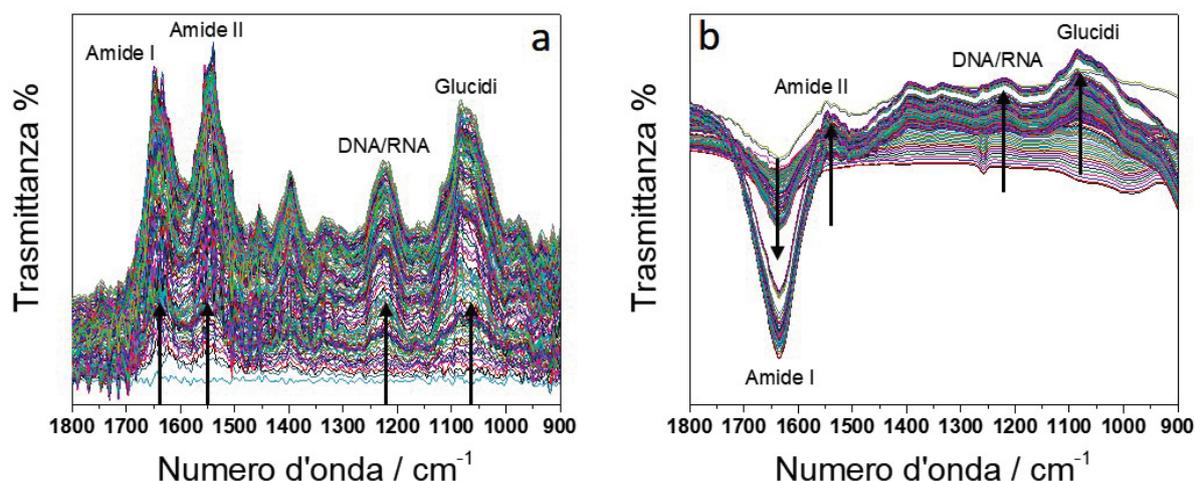


Fig. 2 - Evoluzione degli spettri ATR-IR, in 48 h, di un biofilm di *P. fluorescens* in assenza di agenti antimicrobici (a) e in presenza del cristallo parzialmente modificato (b). Le frecce indicano l'evoluzione temporale delle bande IR di interesse

batterico in poche ore. Si è anche dimostrato spettroscopicamente che le cellule batteriche possono ricolonizzare la biomassa morta, quando quest'ultima è abbastanza spessa da impedire un'interazione diretta con la superficie antimicrobica. Sono in corso nuovi esperimenti che combinano tecniche spettroscopiche e di microscopia a scansione di sonda, finalizzati ad ampliare le conoscenze sui fenomeni che intercorrono a livello microscopico in tutte le fasi cruciali della interazione nanoantimicrobico/biofilm.

Bibliografia

- [1] J.W. Costerton *et al.*, *J. Bacteriol.*, 1994, **176**, 2137.
- [2] D.O. Serra *et al.*, *mBio*, 2013, **4**, e00103-13.
- [3] V. Sihorkar *et al.*, *Pharm. Res.*, 2001, **18**, 1247.
- [4] S. Yu *et al.*, *Appl. Env. Microbiol.*, 2016, **82**, 6403.
- [5] D.B. Roszak *et al.*, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1987, **51**, 365.
- [6] C. Höfler *et al.*, *Microbiology*, 2016, **162**, 164.
- [7] E. Denkhaus *et al.*, *Microchim. Acta*, 2007, **158**, 1.
- [8] J. Azeredo *et al.*, *Crit. Rev. Microbiol.*, 2017, **43**, 313.
- [9] R.V. Linares *et al.*, *Desalination Water Treat.*, 2016, **57**, 22894.
- [10] P. Stenclova *et al.*, *Appl. Spectrosc.*, 2019, 0003702819829081.
- [11] F. Humbert *et al.*, In situ assessment of antibacterial activity of dermaseptine S4 derivatives against *Pseudomonas fluorescens* nascent biofilms by using ATR-

FTIR spectroscopy, in *Microbes in Applied Research*, World Scientific, 2012, pp. 547-550, ISBN 978-981-4405-03-4.

- [12] N. Høiby *et al.*, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2010, **35**, 322.
- [13] R. Patel, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2005, **437**, 41.
- [14] T.-F.C. Mah *et al.*, *Trends Microbiol.*, 2001, **9**, 34.
- [15] M.C. Sportelli *et al.*, *Sci. Rep.*, 2017, **7**, 11870.
- [16] M.C. Sportelli *et al.*, Recent trends in the electrochemical synthesis of zinc oxide nanocolloids, in *CRC Concise Encyclopedia of Nanotechnology*; 2015, pp. 1158-1172, ISBN 978-1-4665-8034-3.
- [17] M.C. Sportelli *et al.*, *Appl. Sci.*, 2018, **8**, 77.
- [18] I. Farella *et al.*, *Appl. Phys. A*, 2005, **80**, 791.
- [19] N. Cioffi *et al.*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2005, **381**, 607.
- [20] N. Allocati *et al.*, *Cell Death Dis.*, 2015, **6**, e1609, DOI: [10.1038/cddis.2014.570](https://doi.org/10.1038/cddis.2014.570).

Cannibalism in the Biofilm-Antimicrobial Interaction

Biofilms cause severe infections due to their resistance to extreme conditions and drug treatment. Sometimes, episodes of cannibalism occur within them, feeding cannibals by induced cell lysis. Biofilms have been studied by several analytical techniques, including IR-ATR spectroscopy, which affords for the *in-situ* monitoring of biofilm life cycle.