

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI CATANIA

**Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche
Sezione di Microbiologia**

**DOTTORATO INTERNAZIONALE DI RICERCA
IN SCIENZE MICROBIOLOGICHE E BIOCHIMICHE**

Ciclo XXVIII

Dott.ssa Oleana Olga Prato

**STUDIO DI METABOLITI BIOATTIVI DA BATTERI ASSOCIATI A
PORIFERI ANTARTICI E DA ALGHE MARINE**

TESI DI DOTTORATO

Coordinatore:

Prof.ssa Adriana Garozzo

Tutor:

Prof.ssa Gianna Tempera

TRIENNIO 2012-2015

a Francesco...

Abstract

The improper and uncontrolled use of antibiotics is the major responsible for the emergence of Multi-Drug Resistant strains, hence the urgent need to find alternative antibiotics. Recently the interest of many researchers is more and more addressed to the search for new sources of bioactive molecules and the ocean is still unexplored source of biologically active molecules. Most marine substances with biological activity are produced by invertebrates such as sponges, cnidarians, bryozoans and sea slugs, vertebrates such as sea squirts, from plants such as algae and some marine microorganisms, extremophiles, symbionts, whose metabolites are produced to counteract the unfavorable environmental conditions in which they live. The competition in bacteria living in extreme environments, such as Antarctic areas, could be a new and promising field of research. The study was carried out on 833 bacterial strains isolated from 52 samples of Antarctic sponges and coming on the Italian Collection of Antarctic bacteria (CIBAN). After a preliminary inhibitory activity screening, we extracted and tested for antimicrobial activity both pigments and polysaccharides(molecules known for their inhibitory activity).The percentage of Antarctic strains active against at least one target bacteria (19.4%) appeared comparable with those reported in the literature concerning bacteria associated with sponges of temperate and tropical seas, and higher than that reported by many AA.*Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.* and *Arthrobacter sp.* are the species that showed higher antibacterial activity. No antiviral activity was observed by polysaccharide extracts. The lack of knowledge and the preliminary results have led us to expand the research to other bacteria.

In line with the research for antimicrobial substances by marine organisms, the focus during the course of study has shifted to other marine organisms producing sulfated polysaccharides: algae. The cultivation of algae for many uses is increasingly a subject of interest and has already been demonstrated antiviral activity. Seven representative samples of the three divisions macroalgal were chosen in the following study: *Agardhiella sp.*, *Gracilaria sp.* and *Hypnea musciformis*, *Chaetomorpha sp.* and *Ulva lactuca*, *Padina pavonica* and *Halopteris flicina*. Thallus alga, collected between May and July in the

North-Eastern coast of Sicily, were dried or freeze-dried and subjected to extraction with ethanol. The products were tested for antimicrobial activity. It has not been demonstrated antiviral activity, but antibacterial towards Gram-positive bacteria and antifungal to *C. albicans*. The few species examined in this study and the possibility to modify the polysaccharides sulfation (increasing its bio-activity) should stimulate research in this area.

L'improprio ed incontrollato uso degli antibiotici verso i batteri patogeni ha favorito l'insorgenza dei ceppi Multi-Drug Resistant, da cui deriva l'urgenza di trovare antibiotici alternativi a quelli già in uso. Recentemente l'interesse di molti studiosi è sempre più rivolto alla ricerca di nuove fonti di molecole bioattive e l'oceano rimane una fonte ancora poco esplorata di molecole biologicamente attive; la maggior parte delle sostanze marine con attività biologica sono prodotte da invertebrati come poriferi, cnidari, briozoi e nudibranchi, vertebrati come le ascidie, da vegetali quali le alghe e da alcuni sistemi di microrganismi, quali quelli marini, gli estremofili, i simbionti, produttori di metaboliti secondari prodotti per la difesa verso condizioni ambientali non ottimali. La competizione tra microrganismi colonizzatori degli ambienti estremi, come quelli antartici, si prospetta essere un nuovo e promettente orizzonte di ricerca. Lo studio è stato condotto su 833 ceppi batterici isolati da 52 esemplari di Poriferi antartici della Collezione Italiana di Batteri Antartici (CIBAN) da cui dopo un preliminare screening dell'attività inibitoria, sono stati estratti da alcuni ceppi molecole ad attività inibitoria, polisaccaridi e pigmenti di cui è stata testata l'attività antimicrobica. La percentuale di ceppi antartici attivi nei confronti di almeno un microrganismo bersaglio (19,4 %) è apparsa comparabile con quelle riportate in letteratura riguardanti batteri associati a spugne dei mari temperati o tropicali, per quanto riguarda le conoscenze pregresse sull'attività antibiotica di ceppi antartici, la percentuale di batteri attivi determinata nel presente studio è apparsa superiore a quella riportata. *Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.* e *Arthrobacter sp.* sono le specie che hanno mostrato maggiore attività antibatterica. Nessuna attività antivirale è stata osservata dagli

estratti polisaccaridici. La poca conoscenza e nuovi promettenti dati in letteratura suggeriscono di ampliare le ricerche verso tali microrganismi.

In linea con la ricerca di sostanze di natura antimicrobica da organismi marini, l'attenzione durante il corso di studi si è spostata anche ad altri organismi produttori di polisaccaridi solfati : le alghe, di cui si sta valorizzando la coltivazione per diversi usi, e di cui recenti studi hanno dimostrato il potenziale antivirale. Sette campioni rappresentativi le tre divisioni macroalgali sono state scelte nel seguente studio: *Agardhiella sp.*, *Gracilaria sp.* e *Hypnea musciformis*, *Chaetomorpha sp.* e *Ulva lactuca*, *Padina pavonica* e *Halopteris filicina*. Talli freschi sono stati raccolti tra i mesi di maggio e di luglio nelle coste della Sicilia Nord- Orientale, essiccati o liofilizzati e sottoposti ad estrazione con etanolo. I prodotti sono stati testati per il potenziale antimicrobico. Non è stata osservata alcuna attività antivirale, bensì antibatterica verso batteri Gram-positivi ed antifungina verso *C. albicans*. Le poche specie prese in esame in questo studio e la possibilità di modificare la solfatazione dei polisaccaridi aumentandone la bio-attività dovrebbe stimolare la ricerca in questo settore.

INDICE

Capitolo I – Introduzione	1
I.1.1. Le resistenze batteriche	1
I.1.2. Blue biotechnology	8
I.2. Scopo della tesi	12
I.3. Bibliografia	14
Capitolo II	18
II.1. Introduzione ai batteri associati alle spugne antartiche	18
II.1.1. I Poriferi e le associazioni batteriche	18
II.1.2. Sostanze bioattive prodotte da batteri	22
II.1.2.a. Sostanze di natura peptidica	22
II.1.2.b. Polisaccaridi extracellulari	24
II.1.2.c. I pigmenti	26
II.1.3. Il continente Antartico	28
II.1.3.a. Il trattato sull'Antartide	30
II.1.3.b. Il Programma Nazionale di Ricerche in Antartide	30
II.1.3.c. il Museo Nazionale dell'Antartide	31
II.2. Materiali e Metodi	33
II.2.1. Raccolta dei campioni	33
II.2.2. Screening dell'attività inibitoria.	37
II.2.2.1. Estrazione batteriocine e antibiogramma	37
II.2.2.1.a. Caratterizzazione preliminare dell'estratto	38
II.2.2.2. Estrazione del pigmento	39
II.2.2.3. Screening della produzione di polisaccaridi	39
II.2.2.3.a. Estrazione polisaccaridi	40
II.2.3. Valutazione dell'attività antibiotica	41
II.2.3.1. Valutazione dell'attività antibatterica	41
II.2.3.2. Valutazione della citotossicità	42
II.2.3.3. Valutazione dell'attività antivirale	43
II.2.4. Amplificazione PCR e analisi del rDNA 16S	44
II. 3. Risultati	45
II.3.1. Screening mediante la tecnica dello striscio perpendicolare	45
II.3.2. Estrazione di molecole bioattive.	51
II.3.2.a. Caratterizzazione dell'estratto	54
II.3.3. Valutazione bioattività esopolisaccaridi	56
II.3.4. Valutazione bioattività pigmenti	57
II.3.5. Identificazione dei ceppi con attività inibitoria.	57
II.4. Discussione	65
II.5. Bibliografia	68

Capitolo III	80
III.1. Introduzione-Le macroalghe	80
III.1.1. I polisaccaridi solforati	84
III.2. Materiali e metodi	87
III.2.1. Raccolta dei campioni	87
III.2.2. Estrazione delle molecole	87
III.2.3. Valutazione dell'attività antibiotica.	88
III.2.3.1. Valutazione dell'attività antibatterica	88
III.2.3.2. Valutazione della citotossicità	89
III.2.3.3. Valutazione dell'attività antivirale	90
III.2.3.4. Valutazione dell'attività antimicotica	91
III 3. Risultati	93
III.3.1. Attività antibatterica	93
III.3.2. Citotossicità	95
III.3.3. Attività antivirale	95
III.3.4. Attività antimicotica.	96
III.4. Discussione	97
III.5. Bibliografia	100
Capitolo IV	108
IV.1. Discussioni finali	108
IV.2. Bibliografia	110

Capitolo I - Introduzione

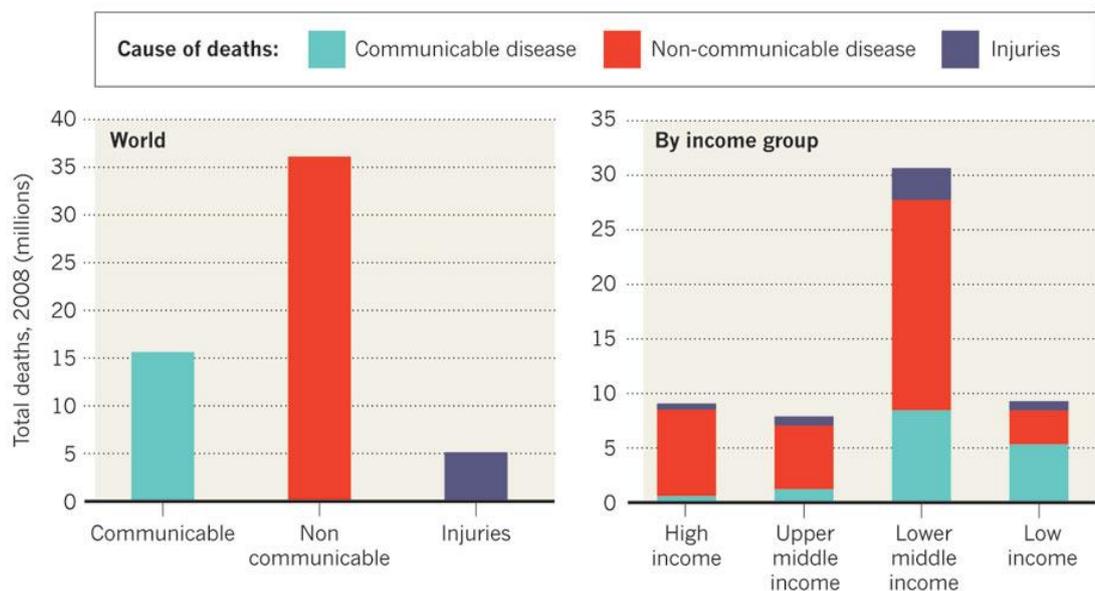
I.1.1. Le resistenze batteriche

Le malattie infettive rivestono il 25% delle cause di decessi annuali (non includendo le morti aggiuntive che avvengono come conseguenza di infezioni passate o per complicazioni associate a malattie croniche) (Figura 1), e rimangono ancora la causa principale di morte per i paesi meno sviluppati.

Figura 1. Stima delle morti nel 2008: 16 milioni di morti sono attribuibili alle malattie trasmissibili.

TOTAL DEATHS

Non-communicable disease (NCD) surpassed communicable disease as the greatest cause of all deaths in 2008, in all income groups except low-income countries. Middle-income countries have made progress against communicable disease in recent years, but a population bulge of young people, as well as increasing longevity, mean that more people have been exposed to NCD.



Le concause che contribuiscono allo sviluppo delle malattie infettive sono molteplici: l'aumentata crescita della popolazione mondiale, il sovraffollamento di città caratterizzate da una cattiva sanità, la maggiore possibilità di movimento, la produzione massiva di cibo in assenza, talvolta, di norme sanitarie adeguate [1,2,3].

Il controllo della crescita microbica nella clinica medica avviene mediante l'uso di agenti chimici, definiti “agenti antimicrobici”; essa può prevedere due possibili modalità d'azione: batteriostatica (in cui si ha un arresto della moltiplicazione batterica dopo contatto con l'antibiotico), battericida (in cui si il numero di batteri sopravvissuti dopo 24h. di contatto con l'antibiotico è $\leq 0,01\%$)

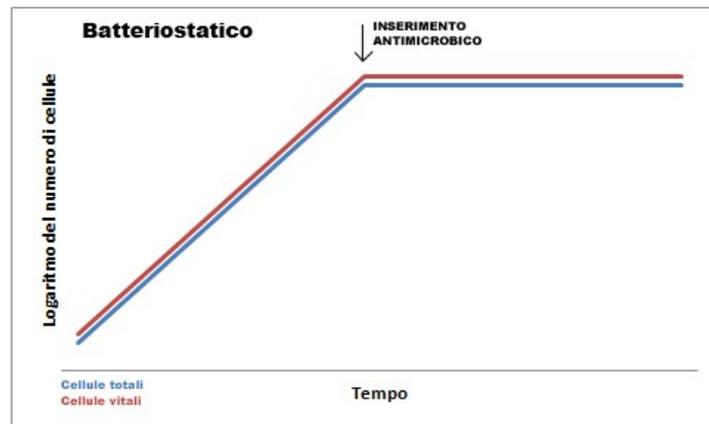


Figura 2. Azione batteriostatica

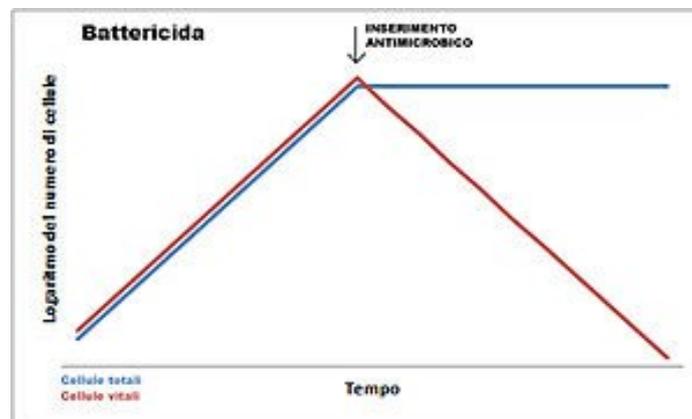


Figura 3. Azione batteriocida

I principali meccanismi d'azione dei chemioterapici prevedono l'interferenza con le attività cellulari del microrganismo come la sintesi della parete cellulare con il metabolismo dell'acido folico (caratteristici dei soli procarioti), interferenze sulla produzione dell' mRNA, sulla struttura della membrana plasmatica, sulla sintesi proteica (interferendo con la DNA girasi, Rna polimerasi DNA dipendente, tRNA, e subunità ribosomali 50 S e 30 S) [4]. La resistenza ai farmaci antimicrobici è definita quindi

come la capacità acquisita di un organismo di resistere agli effetti di un agente chemioterapico al quale è normalmente suscettibile. La maggior parte delle resistenze coinvolgono geni di resistenza che sono trasferiti attraverso scambi genetici.

La capacità dei batteri di sopravvivere a farmaci anti-microbici è da includere nella loro natura di ereditare caratteristiche derivanti da mutazioni spontanee, espressione di nuovi geni o da scambi di materiale genetico, tramite trasduzione (ad opera di fagi, come rappresentato in Figura 2), trasformazione (DNA libero proveniente da lisi di altre cellule batteriche, come rappresentato in Figura 3), trasposizione (trasloco di elementi genetici nello stesso genoma batterico con attivazione di geni silenti o nuovi ricombinanti) o più frequentemente tramite coniugazione (attraverso lo scambio di elementi genetici extracromosomici denominati plasmidi, come rappresentato in Figura 4), quando la carica di una popolazione microbica supera il milione di individui come adattamento evolutivistico diviene altamente probabile che in più di una cellula batterica si verifichino eventi spontanei che ne modificano il patrimonio genetico, tali cambiamenti favoriscono l'adattamento di microrganismi capaci all'adattamento di nuove condizioni ambientali [5,6].

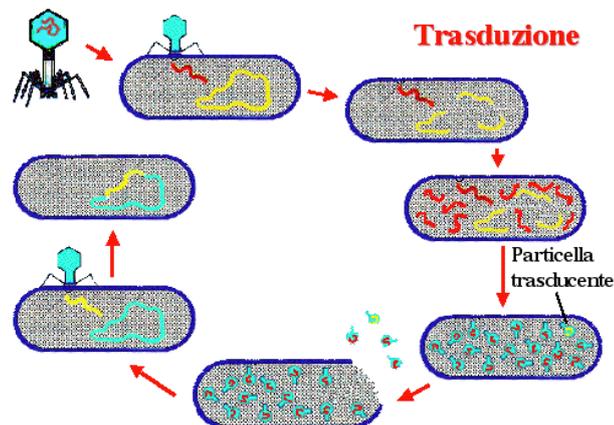


Figura 4. *Trasduzione: trasposto di materiale genetico mediante fagi.*



Figura 5. *Trasformazione nei batteri: i frammenti di materiale genetico incorporati dal batterio dall'ambiente circostante provengono dalla lisi cellulare di altre cellule batteriche.*

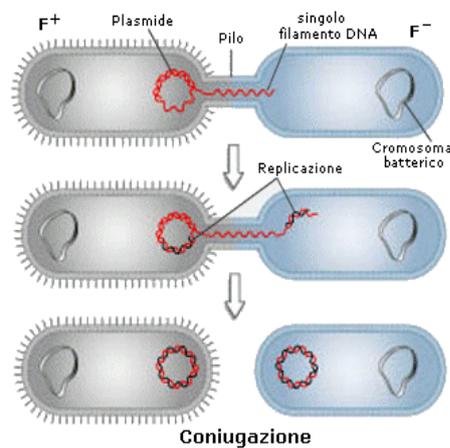


Figura 6. *Coniugazione batterica: trasferimento di una copia del plasmide attraverso il pilum.*

La presenza di un farmaco antimicrobico agisce come meccanismo selettivo sopprimendo i microrganismi sensibili e permettendo la crescita dei mutanti resistenti. L'incidenza di resistenza di ciascun patogeno è dipendente dalla pressione selettiva

esercitata dalla quantità di farmaco impiegato in un determinato ambiente, quindi il consumo di farmaci è il “motore” stesso dell’incidenza di resistenza. Numerose indagini suggeriscono che gli antibiotici sono usati nella pratica clinica molto più spesso di quanto sia necessario: il trattamento degli antibiotici spesso non è giustificato e le dosi e la durata del trattamento spesso non sono corrette, inoltre tutto ciò è aggravato dall’uso di diversi pazienti di non portare a termine la terapia appena i sintomi migliorano. Forte peso nella selezione di ceppi resistenti hanno anche gli impieghi indiscriminati e non essenziali degli xenobiotici, ad esempio, gli antibiotici sono usati in zootecnia sia come additivi nell'alimentazione degli animali per stimolarne la crescita e accorciare il tempo necessario per immetterli sul mercato (ad esempio l'aggiunta di 25 mg di penicillina ogni 500 gr di mangime per polli porta ad un risparmio di 900 milioni di Kg di alimenti ogni anno, perché favorisce un incremento della crescita dell’animale più rapido: si ritiene che gli antibiotici agiscano inibendo i microrganismi responsabili delle infezioni di bassa entità e riducendo le conseguenti infiammazioni dell'epitelio intestinale, permettendo un assorbimento più efficace dei nutrienti), sia come misura profilattica, per prevenire la comparsa di malattie piuttosto che per curare quelle in corso.

La resistenza da parte dei batteri agli antibiotici maggiormente utilizzati è diventato un allarme al livello mondiale e le soluzioni più probabili sono lo sviluppo di nuovi principi attivi, unitamente ad un impiego più appropriato dei farmaci disponibili[7].

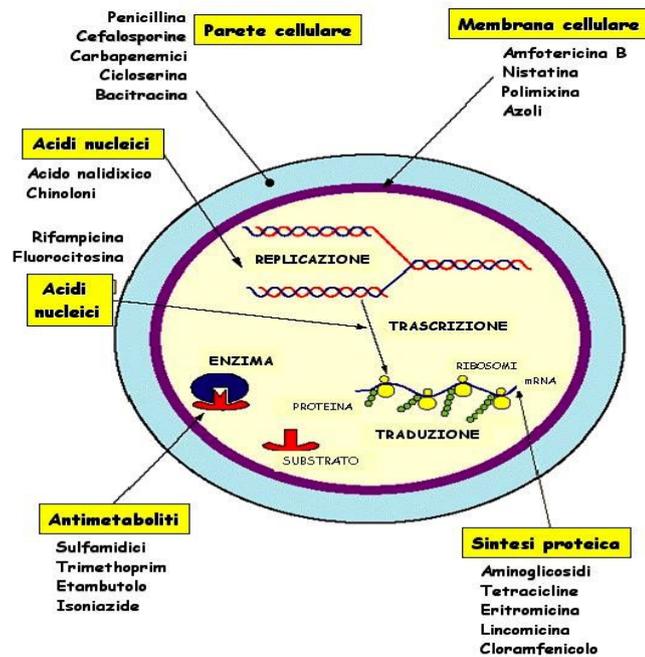


Figura 7. Bersagli dei principali agenti chemioterapici antimicrobici.

L'inefficacia di un antibiotico può essere dovuta a diversi meccanismi di resistenza tra cui ricordiamo:

- 1) la mancanza nell'organismo del bersaglio su cui agisce l'antibiotico, ad esempio i micoplasmi non sono dotati di parete batterica e sono quindi resistenti alle penicilline;
- 2) la produzione di enzimi inattivanti gli antibiotici mediante fosforilazione, adenilazione o acetilazione dei gruppi amminici e idrossilici degli antibiotici;
- 3) l'alterazione della permeabilità dell'involucro e quindi del trasporto del farmaco;
- 4) l'alterazione del bersaglio ad esempio con la produzione di proteine simili ai fattori di allungamento che proteggono il ribosoma 30S ai quali l'antibiotico si lega senza che la sintesi proteica venga alterata.
- 5) presenza di sistemi di trasporto attivo, un esempio sono le "multidrug resistance pumps", pompe di efflusso non specifiche, ma in grado di espellere antibiotici di varie strutture chimiche, le quali sono presenti in importanti patogeni multiresistenti (*N. gonorrhoeae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ecc.);
- 6) presenza di vie metaboliche alternative, per esempio la resistenza degli enterococchi ai sulfamidici (inibitori della produzione dell'acido folico) è superata dall'abilità di assorbire l'acido folico dall'ambiente[4,8].

Nell'ambito delle patologie infettive ad eziologia batterica, le problematiche emergenti sono legate soprattutto allo sviluppo di antibiotico-resistenza a più agenti antimicrobici nello stesso microrganismo in importanti patogeni, definiti batteri Multi-Drug Resistant (MDR); tra gli agenti eziologici di infezioni acute tale fenomeno ha coinvolto principalmente *Streptococcus pneumoniae*, Enterococchi, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa*: La multi-resistenza, comparsa in ambiente nosocomiale, è ormai largamente diffusa nei principali batteri patogeni comunitari e rappresenta oggi uno dei maggiori problemi di sanità mondiale.

I.1.2. Blue biotechnology

L'improprio e incontrollato uso degli antibiotici verso i batteri patogeni ha favorito l'insorgenza dei ceppi Multi-Drug Resistant (MDR), da cui deriva l'urgenza di trovare antibiotici alternativi per combatterli. Recentemente, poiché la tradizionale ricerca di nuove molecole ad attività antibiotica non sembra riuscire a contrastare il fenomeno, l'interesse di molti studiosi è sempre più rivolto alla ricerca di nuove fonti di molecole bioattive. In questo contesto si inserisce la "Blue biotechnology"

La parola "biotecnologia" si riferisce all'integrazione delle scienze naturali e dell'uso di organismi, loro parti o analoghi molecolari, nei processi industriali per la produzione di beni e servizi (definizione della European Federation of Biotechnology, EFB). Nella ricerca di biomolecole nuove ed utili riveste un ruolo importante la fruibilità di un ambiente poco esplorato e caratterizzato da una notevole biodiversità [9,10].; l'ambiente marino risulta essere ancora non completamente conosciuto ed estremamente ricco in specie a causa della straordinaria variabilità delle condizioni chimico-fisiche riscontrabili in questo ecosistema (temperatura tra -1,5°C nelle acque antartiche a +350°C nei sistemi idrotermali; pressione tra 1 e più di 1000 atmosfere; diverse nicchie ecologie e della disponibilità dei nutrienti). La blue-biotechnology si riferisce quindi all'applicazione delle metodiche di biologia molecolare agli organismi acquatici e marini.

Tabella 1. *Associazione di colori alle branche tecnologiche*

Color Type	Area of Biotech Activities
Red	Health, Medical, Diagnostics
Yellow	Food Biotechnology, Nutrition Science
Blue	Aquaculture, Coastal and Marine Biotech
Green	Agricultural, Environmental Biotechnology – Biofuels, Biofertilizers, Bioremediation, Geomicrobiology
Brown	Arid Zone and Desert Biotechnology

Dark	Bioterrorism, Biowarfare, Biocrimes, Anticrop warfare
Purple	Patents, Publications, Inventions, IPRs
White	Gene-based Bioindustries
Gold	Bioinformatics, Nanobiotechnology
Grey	Classical Fermentation and Bioprocess Technology

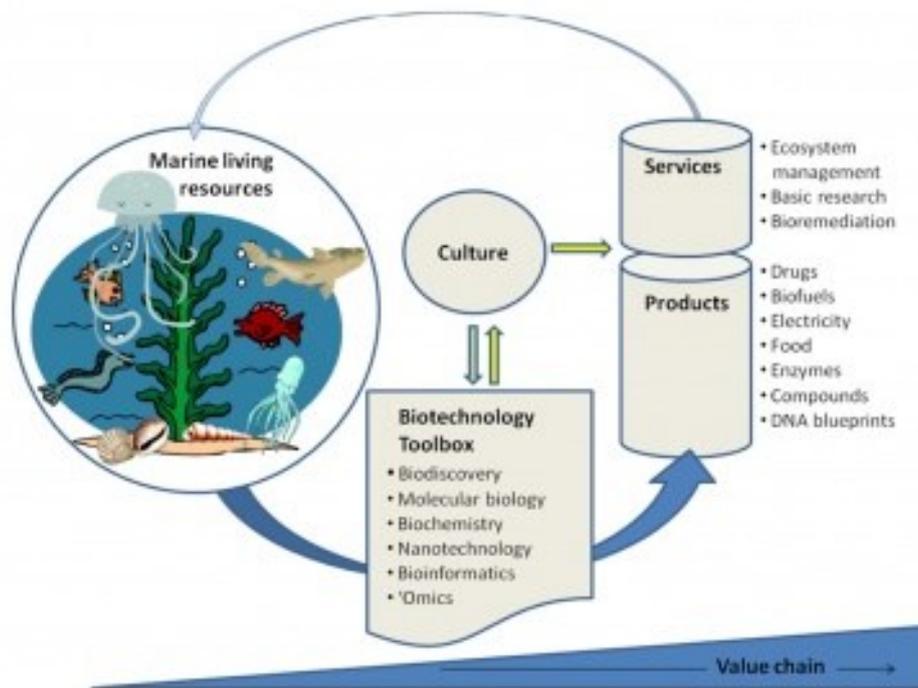


Figura 8. Rappresentazione schematica della Blue-biotechnology

Allo stato attuale, 118 derivati da sostanze naturali marine sono in corso di studi preclinici e 3 sono già presenti sul mercato [11]. I primi prodotti di derivazione marina approvato dall'FDA sono una molecola antitumorale, il cytarabine (arabinosyl cytosine; Ara-C), ed un antivirale, il vidarabine (arabinofuranosyladenine; Ara-A), entrambi sintetizzati da due molecole provenienti dalla spugna marina *Tethya crypta*. [12]. Inoltre Eribulin mesylate (E7389; Halichondrin B; della Halaven) è stato recentemente approvato dall'FDA per il trattamento delle metastasi del cancro al seno [13].

La maggior parte delle sostanze marine con attività biologica sono prodotte da invertebrati come poriferi, cnidari, briozoi e nudibranchi, vertebrati come le ascidie [14] e da vegetali quali le alghe. I Poriferi rappresentano il Phylum di invertebrati da cui sono stati isolati ed estratti il maggior numero di sostanze con potenti attività biologiche

e con architetture molecolari peculiari [15], la cui provenienza è stata ipotizzata e, nella maggior parte dei casi, confermata essere prodotta dai microorganismi ad essi associati [16,17]. Alcuni sistemi di microorganismi, quali quelli marini, gli estremofili, i simbionti, sono noti produttori di metaboliti secondari prodotti per la difesa verso condizioni ambientali non ottimali [18]. La competizione tra microorganismi colonizzatori degli ambienti estremi potrebbe fornire nuovi orizzonti di ricerca.

I batteri associati alle spugne antartiche ecologicamente presentano tutte le qualità per essere dei buoni produttori in tal senso, inoltre, l'utilizzo dei microorganismi come fonte di antibiotici presenta diversi vantaggi come la possibilità di controllare le condizioni colturali per ottimizzare la produzione dei metaboliti [19] e l'eventuale manipolazione genetica. Le informazioni riguardanti la biodiversità e l'evoluzione dei procarioti antartici rimangono tuttavia ancora piuttosto scarse e, viste le peculiarità dell'ambiente in esame, vanno senza alcun dubbio ampliate. L'adattamento dei microorganismi antartici alle temperature costantemente basse risiede nell'ottimizzazione dei processi cellulari di base, necessari per consentirne la crescita e la sopravvivenza in condizioni estreme: le modificazioni di natura fisiologico-strutturale che li caratterizzano innalzano il loro potenziale applicativo.

Tra le molecole ad attività antimicrobica prodotte dai batteri, le più note sono le batteriocine [20], ma altre categorie come le sostanze di natura volatile (VOC) [21,22] e gli esopolisaccaridi stanno attirando l'attenzione dei ricercatori [23,24,25]. Gli esopolisaccaridi batterici hanno trovato uso come gli analoghi vegetali, come ad esempio il Gelrite® nella ricerca agronomica.

In linea con la ricerca di sostanze di natura antimicrobica da organismi marini, l'attenzione durante il corso di studi si è spostata anche ad altri organismi produttori di polisaccaridi, il cui uso è noto da secoli ma la cui bioattività è ancora poco nota: le alghe. Organismi vegetali che colonizzano zone di stress quali le zone costiere, a causa delle variazioni saline e di nutrienti colonizzano zone in cui la competizione tra specie è alta e si traduce con un'alta variabilità genetica e adattativa, anche in popolazioni della stessa specie ma che colonizzano zone diverse. Inoltre l'aumento del consumo alimentare oltre che di quello industriale, sta favorendo la nascita di coltivazioni di tali vegetali che si prestano a diversi usi. Recenti studi hanno dimostrato [26-34] l'attività antivirale di alcune popolazioni algali asiatiche e del Mediterraneo, sarebbe quindi opportuno studiare la potenzialità di quelle locali al fine di poterne promuovere la

coltivazione in scala regionale senza il rischio ambientale di portare organismi alloctoni durante la coltivazione.

I.2. Scopo della tesi

La presente tesi ha lo scopo di ampliare le conoscenze, a tutt'oggi frammentarie, sulle comunità microbiche associate a Poriferi antartici, sulle alghe e sulla loro potenziale attività antibiotica;

Da questo lavoro ci si aspetta:

- Di trovare nuove specie batteriche promettenti;
- Di trovare nuovi composti bioattivi, grazie ai diversi adattamenti biochimici;
- Che i composti trovati siano poco tossici ed ecocompatibili, grazie alla loro biodegradabilità, e quindi più competitive con le molecole già note.

L'attività di ricerca sui microrganismi antartici è stata suddivisa in 2 obiettivi principali, di seguito descritti:

1. Screening preliminari atti ad individuare l'inibizione da parte di ceppi isolati da spugne antartiche nei confronti di ceppi patogeni.
 - a. I ceppi in esame provengono dalla Collezione Italiana di Batteri ANtartici (CIBAN). I ceppi provengono da diverse specie di spugne antartiche. E' stato effettuato uno screening sui batteri e sul loro potenziale antibiotico.
 - b. E' stata anche effettuata una amplificazione PCR-amplification, il sequenziamento e l'analisi filogenetica dell'RNA 16S dei batteri che mostrano attività inibitoria verso ceppi target
 - c. Estrazione e caratterizzazione preliminare di molecole bioattive
2. Estrazione e Test *in vitro* per saggiare l'attività degli estratti
 - a. Diverse tecniche di estrazione sono state scelte dalla letteratura per estrarre le diverse produzioni batteriche;
 - b. Test *in vitro* sono stati condotti per dimostrarne la bassa citossicità, in vista di studi preclinici future;
 - c. Gli estratti sono stati testati *in vitro* per saggiarne l'attività antimicrobica verso batteri e virus.

Allo stesso modo l'attività di ricerca sulle alghe mira a :

- Trovare specie algali promettenti;
- Trovare nuovi composti bioattivi, grazie alle diverse condizioni ambientali locali;
- Trovare composti poco tossici ed ecocompatibili, grazie alla loro biodegradabilità, e quindi più competitive con le molecole già note.

L'attività di ricerca sulle alghe siciliane verte ad un obiettivo principale:

- Estrazione e Test *in vitro* per saggiare l'attività degli estratti
 - d. Diverse tecniche di estrazione sono state scelte dalla letteratura per estrarre le diverse produzioni algali
 - e. Test *in vitro* sono stati condotti per dimostrarne la bassa citossicità, in vista di studi preclinici future;
 - f. Gli estratti sono stati testati *in vitro* per saggiarne l'attività antimicrobica verso batteri, funghi e virus.

I.3.Bibliografia

1. Cockerill F.R. e Smith T.F., (2004). Response of the Clinical Microbiology laboratory to emerging (new) and reemerging infectious diseases. *J Clin. Microbiol.* 42:2359-2365.
2. Morens D. M., Folkers G. K., Fauci A. S. , (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious disease. *Nature* vol. 430.
3. Racaniello V. R., (2004). Emerging infectious disease. *J Clin Investig.* 113.
4. Madigan M.T., J.M. Martinko, J. Parker, (2003). *Microbiologia dei microrganismi*. Vol.1. Brock. Pp 401-422
5. Davies J.,(1994). Inactivation of antibiotics and dissemination of resistance genes. *Science* 264: 375-382.
6. Rice L.B. , (1998). Tn916 family conjugative transposons and dissemination of antimicrobial resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemoter.* 42: 1871-1877.
7. Livermore D.M. , (2003). Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* 36 (Suppl 1): S11-23.
8. Walsh C., (2003). Antibiotics: actions, origins, resistance. p.89-156. American Society for Microbiology. Press, Washington.
- 9 Cowan, James A. *Inorganic biochemistry: an introduction*. John Wiley & Sons, 1997.
- 10 Sponga, Federica, et al. "Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms." *Journal of Biotechnology* 70.1 (1999): 65-69.
- 11 Nastrucci, Candida, Alfredo Cesario, and Patrizia Russo. "Anticancer drug discovery from the marine environment." *Recent patents on anti-cancer drug discovery* 7.2 (2012): 218-232.

- 12 Newman, David J., Gordon M. Cragg, and Christopher N. Battershill. "Therapeutic agents from the sea: biodiversity, chemo-evolutionary insight and advances to the end of Darwin's 200th year." (2009).
13. (<http://marinepharmacology.midwestern.edu/clinPipeline.htm>)
- 13 Anthoni, U., Nielsen, P.H., Perieira, M., and Christophersen, C. (1990). Bryozoan secondary metabolites: a chemotaxonomical challenge. *Comp.Biochem. Physiol.* 96B: 431-437
- 15 Tadesse, Margey, et al. "Screening for antibacterial and antifungal activities in marine benthic invertebrates from northern Norway." *Journal of invertebrate pathology* 99.3 (2008): 286-293.
- 16 Thiel V., Imhoff J.F.(2003). Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges.*Biomolecular Engineering*, 20: 421- 423
- 17 Radjasa O. K., Martens T., Grossart H.P., Brinkoff T., Sabdono A., Simon M.(2007). Antagonistic Activity of a Marine Bacterium 152 . *J. Biol. Sci.*, 7:2, 239-246.
18. Chang, Chia-Che, et al. "Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms." *Journal of bioscience and bioengineering* 111.5 (2011): 501-511.
- 19.Okami, Y. & Hotta, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. In *Actinomycetes in biotechnology*, pp. 33-67. Edited by M. Goodfellow, S. T. Williams & M. Mordarski. San Diego: Academic Press Inc.
20. Riley, Margaret A., and John E. Wertz. "Bacteriocins: evolution, ecology, and application." *Annual Reviews in Microbiology* 56.1 (2002): 117-137.
- 21.Romoli, Riccardo, et al. "Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 46.10 (2011): 1051-1059.
- 22.Papaleo, Maria Cristiana, et al. "Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against Burkholderia cepacia complex bacteria." *Biotechnology advances* 30.1 (2012): 272-293.

23. Arena, Adriana, et al. "Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*." *International immunopharmacology* 6.1 (2006): 8-13.
- 24 Holmström, Carola, and Staffan Kjelleberg. "Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents." *FEMS microbiology ecology* 30.4 (1999): 285-293.
- 25 Senni, Karim, et al. "Marine polysaccharides: a source of bioactive molecules for cell therapy and tissue engineering." *Marine drugs* 9.9 (2011): 1664-1681.
- 26.Zandi, Keivan, et al. "Evaluation of in vitro antiviral activity of a brown alga (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against herpes simplex virus type 1." *African Journal of Biotechnology* 6.22 (2007).
- 27.Godoi, Ananda Marques de, et al. "Antiviral Activity of Sulfated Polysaccharide of *Adenantha pavonina* against Poliovirus in HEp-2 Cells." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014 (2014).
- 28.Wang, Wei, Shi-Xin Wang, and Hua-Shi Guan. "The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview." *Marine drugs* 10.12 (2012): 2795-2816.
- 29.Gonzalez, M. E., B. Alarcon, and L. Carrasco. "Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31.9 (1987): 1388-1393.
30. Buck, C. et al. 2006 "Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Papillomavirus Infection". *PloSPathogens* 2: Pp 671-680.
- 31.Talarico, Laura B., et al. "Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*." *International journal of biological macromolecules* 34.1 (2004): 63-71.
- 32.Schaeffer, David J., and Victor S. Krylov. "Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria." *Ecotoxicology and environmental safety* 45.3 (2000): 208-227.

33. Talarico, L. B., et al. "The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell." *Antiviral research* 66.2 (2005): 103-110.

34. Witvrouw, Myriam, and Etienne De Clercq. "Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs." *General Pharmacology: The Vascular System* 29.4 (1997): 497-511.

Capitolo II

II.1. Introduzione ai batteri associati alle spugne antartiche

II.1.1. I Poriferi e le associazioni batteriche

Originatosi nel Precambriano, il phylum dei Poriferi, denominato comunemente “spugne”, rappresenta un gruppo di invertebrati pluricellulari meno evoluti che occupa una posizione intermedia tra i protozoi ed i veri metazoi, venendo inclusi quindi nei Parazoi, poiché possiedono solo pochi tipi cellulari non organizzati in veri tessuti [1].

Essi colonizzano ogni tipo di ambiente acquatico, dalle zone polari [2] alle temperate e alle tropicali [3,4] da ambienti sciafili come le grotte, ai luminosi coralli tropicali [5]. Sono organismi bentonici sessili che vivono ancorati a substrati quali rocce, alghe, conchiglie e granchi, possono essere incrostanti o eretti, assumendo morfologie diverse secondo le caratteristiche ambientali (substrato, correnti, moto ondoso). Organismi sospensivori, le spugne filtrano, con una grandissima efficienza (75-99%) i batteri dall'acqua circostante come fonte di cibo [6]. Il Phylum comprende 4 classi: *Demospongiae*, *Hexactinellida*, *Homoscleromorpha* e *Calcarea*. Quasi esclusivamente marine, delle 15.000 specie di spugne, solo 1% abita le acque dolci [7]. Esse producono metaboliti secondari per allontanare e difendersi dai predatori [8] competere per lo spazio con altri organismi sessili [9,10], per la comunicazione e la protezione da organismi infestanti e patogeni. Le spugne marine rappresentano la fonte dominante di metaboliti bioattivi, poiché organismi privi di corazze e quindi senza difesa meccanica contro parassiti, patogeni, pascolatori e predatori, ed hanno elaborato, nel corso dell'evoluzione, una serie di meccanismi biochimici atti alla salvaguardia delle proprie specie mediante un'elevata presenza di metaboliti secondari, la cui produzione è da attribuire anche alla coesistenza degli stessi invertebrati marini con microrganismi di origine batterica; è verosimile credere che la maggior parte dei metaboliti isolati da una spugna siano prodotti da microrganismi simbiotici poiché è stato dimostrato che i batteri possono occupare fino al 60% del volume tissutale della spugna. Questa idea sembra essere confermata dal fatto che molto spesso composti strutturalmente simili siano stati

isolati da spugne appartenenti a specie molto diverse, come pure metaboliti con notevoli differenze strutturali sono isolati da spugne della stessa specie [11,12]. Negli organismi Eucarioti pluricellulari, le capacità biochimiche sono limitate, al contrario degli organismi unicellulari, appartenenti ai domini degli Archea, dei Batteri e degli stessi Eucarioti, i quali manifestano un'alta diversità metabolica, in correlazione anche ai diversi ambienti colonizzati. Non meraviglia quindi la scelta simbiote degli organismi superiori come adattamento ecologico, come negli invertebrati marini, in special modo quelli sessili, ricca fonte di metaboliti, di provenienza autogena, ma in altri casi appunto, di produzione della flora batterica simbiote. I microrganismi associati alle spugne rappresentano quindi una importante e promettente fonte di prodotti naturali, producendo polichetidi e peptidi non ribosomiali che mostrano diverse attività biologiche.

Le spugne hanno sviluppato un'associazione complessa con microrganismi (batteri, cianobatteri, dinoflagelati, diatomee ed archea). Le associazioni con i batteri variano da spugna a spugna, come scritto precedentemente, la massa batterica può occupare fino al 60% del volume della spugna, sia occupando la matrice extracellulare, che il volume intracellulare[13] ed il numero delle cellule batteriche può essere superiore di tre ordini di grandezza rispetto alla colonna d'acqua [14]. I batteri associati alle spugne possono essere suddivisi in tre categorie: esosimbionti (outer layer), endosimbionti (nel mesoilo) e simbionti intracellulari (nel citoplasma e talvolta nel nucleo) [15,16,17]. I batteri associati alle spugne e quelli usati come particelle di cibo si possono distinguere dalla presenza di quest'ultimi presenti esclusivamente nelle camere coanocitiche; sono state proposte due teorie sul modo in cui le spugne acquisiscano i batteri simbionti: la prima ipotizza la resistenza di alcuni ceppi batterici alla digestione e alla migrazione del batterio nel mesoilo, dimostrato da[18], mentre la seconda teoria prevede una trasmissione verticale dei simbionti attraverso le larve o le uova, ed è stata dimostrata da Webster e Hill [14].

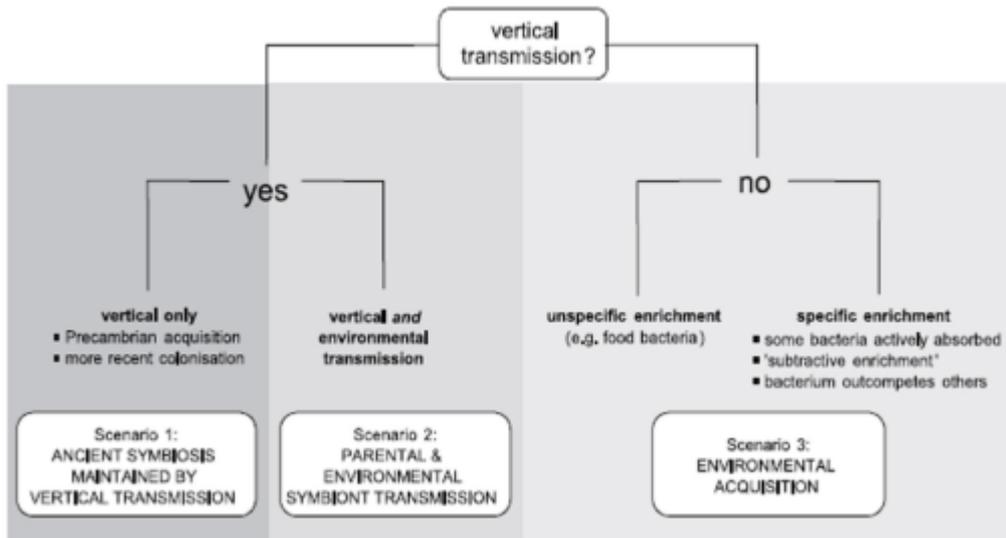


Figura 9 . Schema generale dei vari scenari evolutivi delle associazioni spugne-microrganismi simbiotici (Taylor et al.,2007).

Organismi vicino al gruppo dell'alfaproteobatterio NW001 furono trovati in sette generi di spugne, distanti geograficamente. E' evidente che i simbionti batterici forniscano all'ospite dei benefici: acquisizione di nutrienti [19], stabilizzazione dello scheletro della spugna [20], processamento dei cataboliti dell'invertebrato [21], protezione dai raggi UV [22] e difese chimiche [23]. In cambio, la spugne offrono ai batteri l'accesso fisso alla zona fotica, un substrato da colonizzare, un rifugio dai predatori e fonti sicure di cibo [24].

Le colonie coltivabili però presentano “the great plate count anomaly” [25],rappresentano cioè meno dell'1% dell'effettiva popolazione batterica presente nel campione di spugna [14]. Tecniche di biologia molecolare e analisi della comunità batterica mediante il sequenziamento del gene 16S rRNA hanno dimostrato l'esistenza di specie mai ipotizzate, diverse persino da quelle presenti nella colonna d'acqua circostante. I batteri associati alle spugne appartengono a 25 phyla, tra cui i più diffusi sono *Acidobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Chloroflexi*, *Cyanobacteria*, *Deinococcus-Thermus*, *Firmicutes*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Nitrospirae*, *Planctomycetes*, “*Poribacteria*”, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Thaumarchaeota* , *TM6* e *Verrucomicrobia*), sono inoltre presenti 2 phyla di Archea (*Crenarchaeota* e *Euryarchaeota*) e diversi Eucarioti unicellulari [26].

Di recente la ricerca ha volto l'attenzione ai microrganismi marini come fonte di molecole biologicamente attive. I batteri marini hanno trovato impiego nella ricerca di biosurfattanti

e nella *bioremediation* [27], nella produzione di enzimi[28] come la lipasi [29], chitinasi [30], proteasi [31] , esterasi [32,33,34], agarasi [35] , antimicrobici e antivirali [36]. La causa della ricchezza nella produzione di molecole biologicamente attive va ricercata nel fatto che i microrganismi abitano ambienti unici ed estremi (temperature comprese tra i -15° C e i 110° C, forza ionica tra 2 e 5 M NaCl, range di pH inferiore a 4 e superiore a 9) [37]. Si possono quindi distinguere organismi estremofili definiti termofili, psicrofili, acidofili, alcalofili, alofili e barofili [38].

In questa tesi l'attenzione è stata focalizzata su microrganismi capaci di crescere alle basse temperature; tali microrganismi possono essere divisi in due gruppi: psicrofili (optimum di temperatura a 15°C, con un massimo di 20°C ed un minimo di 0°C) e psicotolleranti (incapaci di vivere a 0°C, ma possono avere un optimum di temperatura a 3-5°C, con un massimo di 20-30°C) [39]. La condizione di bassa temperatura ha costretto gli organismi ad adottare diverse strategie per la sopravvivenza come l'aumento della fluidità della membrana cellulare in particolare mediante elevate concentrazioni di acidi grassi insaturi e poli-insatutti (PUFA), presenza catene lipidiche corte, introduzione di catene laterali e nella produzione di pigmenti [40,41] mediante l'espressione di proteine resistenti al freddo coinvolte nella traduzione e nella traduzione [42], produzione di proteine CAP (Cold-Acclimation Proteins) e AFP (Antifreeze Proteins) [43] ed esopolisaccaridi [44], enzimi capaci di reazioni chimiche a basse temperature, ma termolabili [45,46], diverso avvolgimento della struttura secondaria degli acidi nucleici e degli enzimi intra ed extracellulari [47].



Figura 10. *Porifero antartico.*

Per quanto riguarda le regioni polari, i lavori riguardanti l'associazione tra Poriferi e microrganismi sono piuttosto rari. [48,49,50], tutti afferenti al medesimo gruppo di ricerca, si sono occupati dell'associazione tra diatomee e spugne antartiche, mentre Webster *et al.* [51] sono stati gli unici a riportare risultati sui batteri associati a poriferi in Antartide. Questi ultimi autori, sulla base di analisi biomolecolari indipendenti dalla coltivazione (DGGE e librerie di cloni), hanno studiato la diversità dei batteri associati a cinque spugne antartiche (*Kirkpatrickia varialosa*, *Latrunculia apicalis*, *Homaxinella balfourensis*, *Mycale acerata* e *Sphaerotylus antarcticus*), osservando come questa fosse sostanzialmente più bassa rispetto a quella riscontrata nell'acqua di mare circostante. In particolare, l'analisi filogenetica ha rivelato la predominanza di Gamma- e Alfaproteobatteri e membri del gruppo dei *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroidetes* (CFB). La carenza di informazioni sulle comunità microbiche associate a Poriferi antartici rende, dunque, questo campo di ricerca innovativo, e senza alcun dubbio da approfondire.

II. 1.2. Sostanze bioattive prodotte da batteri

I batteri producono diverse molecole che presentano attività antimicrobica, tra cui:

- Sostanze di natura peptica quali batteriocine, peptidi non ribosomiali (NRPs) e polichetidi (PKs);
- Pigmenti che mostrano attività antiossidante ed antimicrobica;
- Composti di natura volatile (VOCs), molecole a basso peso molecolare che hanno mostrato attività antimicrobica [52]
- Esopolisaccaridi [53]

Le conoscenze dell'attività antimicrobica dei batteri associate a spugne antartiche sono ancora poco ampliate e riguardano soprattutto i VOC[53].

II.1.2. a. Sostanze di natura peptidica

Tra le sostanze di natura peptica che hanno mostrato possedere attività antimicrobica hanno trovato il loro impiego le batteriocine, i peptidi di sintesi non ribosomiale (NRPs) e i polichetidi (PKs).

Le batteriocine sono una classe di molecole di natura peptidica prodotte da i batteri, capaci di inibire ceppi batterici diversi dal ceppo produttore, ma strettamente associati ad esso. Le batteriocine prodotte dai batteri Gram-positivi sono generalmente piccoli peptidi cationici, termostabili, i cui geni per la codificazione sono localizzati sia a livello plasmidico che cromosomico in strutture simil-operone, sintetizzati inattivi, mediante scissione si trasformano in molecole attive che agiscono direttamente sulle membrane di altri ceppi batterici Gram-positivi e occasionalmente verso batteri della stessa specie. Le batteriocine prodotte dai batteri Gram-negativi sono invece proteine, i cui geni sono localizzati solo a livello plasmidico, ad alto peso molecolare strutturate in domini distinti per l'adesione, la traslocazione e l'attività batteriocida, formano dei canali ionici della membrana di altri Gram-negativi e mostrano attività nucleasica. I meccanismi di regolazione della produzione delle batteriocine è influenzato dalla densità della popolazione batterica, denominato *quorum sensing* [54,55]. In campo alimentare le batteriocine possono essere usate come conservanti in quanto controllano e contengono popolazioni batteriche dannose, cause di deterioramento dei cibi e di intossicazioni, ad esempio, la nisina, batteriocina prodotta dai batteri lattici, è stata approvata dalla FDA (Food and Drug Administration) come bio-conservante alimentare. Per quanto riguarda le applicazioni in campo clinico le batteriocine possono essere considerate dei "farmaci d'elezione", poiché agiscono specificamente su determinati ceppi batterici, senza interferire sulla popolazione commensale dell'ospite, riducendo la pressione selettiva su altri ceppi patogeni e quindi riducendo anche il fenomeno della multiresistenza, rappresentando una valida alternativa agli antibiotici.

Altre sostanze prodotte da organismi marini che hanno mostrato possedere attività antimicrobica presentano una struttura appartenente a due importanti classi chimiche: i polichetidi ed i ciclopeptidi (di sintesi non ribosomiale, NRPs), sintetizzati in assenza di uno stampo di RNA_m [56]; i polichetidi e i peptidi non ribosomiali vengono assemblati da molecole di acil-coenzimaA o monomeri di aminoacidi. In queste categorie di molecole sono noti diversi antibiotici, immunosoppressori, anticolesterolizzanti, antitumorali, antifungini e antiparassitari [57].

I peptidi non ribosomiali (NRPs) presentano strutture molto varie e particolari, piccoli peptidi costituiti da 2-50 amminoacidi anche non proteinici, presentano modificazioni o residui come quelli metilici, a cui possono essere incorporate molecole lipidiche o

carboidrati; la struttura primaria spesso non è lineare, bensì ciclica, policiclica o ramificata, sintetizzati dalle e dalle non-ribosomalpeptide sintetasi (NRPSs) [58,59]. Gli NRPs sono complessi enzimatici non-ribosomali chiamati NRPs Sintetasi (NRPSs), composti da 4 domini principali: il primo dominio di adenilazione (A), ed un elongatore della catena, (Peptidyl Carrier Protein, PCP)il dominio di condensazione (C) , il dominio tioesterasi finale di rilascio della molecola [60,]; tra le molecole sintetizzate da questi complessi multienzimatici si può citare ad esempio l'ACV-tripeptide, il precursore delle penicilline e delle cefalosporine è sintetizzato dalle NRPSs e presenta attività immunosoppressive (ciclosporina), antitumorali (bleomicina) e antibiotiche (vancomicina); anche surfattanti (surfattina) e siderofori (pyoverdina) sono sintetizzati mediante questa via[56,60]. I polichetidi sono sintetizzati dalle PKS sintetasi, complessi multienzimatici costituiti in moduli funzionali responsabili della maturazione del peptide, i domini minimi necessari sono una Chetosintetasi (KS), un Acyltransferasi (AT) ed un elongatore della catena, (Acyl Carrier Protein, ACP) , quindi il peptide passa ad altri domini per ulteriori modificazioni (Chetoriduttasi, KR), Deidratasi (DH) ed enol-riduttasi (ER)[61].

L'approccio genomico per l'individuazione del cluster genico delle NRPSs e delle PKSs, consente di individuare velocemente microrganismi potenzialmente produttori di sostanze di natura antibiotica.

II.1.2.b. Polisaccaridi extracellulari

Gli esopolisaccaridi microbici sono composti da uno scheletro di lunghe catene di zuccheri ad alto peso molecolare (da 10 a 30 kDa) ed ha composizione variabile: sono costituiti in massima parte da zuccheri esosi (D-glucosio, D-galattosio, D- e L-mannosio) e pentosi (D-ribosio, D-arabinosio, D-xilosio), in pochi casi da eptosi e zuccheri con catene laterali. Essi variano da polimeri lineari del glucosio, come i destrani, in cui i monomeri sono uniti mediante legami α -1-4, ad eteropolisaccaridi ramificati derivanti dalla ripetizione di subunità oligosaccaridiche, come nel caso dello xantano o dell'acido colanico [62]. L'eterogeneità degli EPS supera notevolmente quella delle proteine. Ad esempio, due molecole dello stesso zucchero possono legarsi formando undici diversi disaccaridi, mentre due aminoacidi identici costituiscono un solo dipeptide [63]. Nell'ambito della stessa specie la lunghezza degli EPS può apparire uniforme o essere eterogenea, mentre il peso molecolare oscilla tra 50.000 e diversi

milioni di kDa. Altamente idratate (più del 99% di acqua), grazie alla presenza di gruppi idrossilici e carbossilici [64]. Altri costituenti presenti possono essere gli acidi uronici, ed altri elementi come proteine, amminozuccheri, lipidi, piruvati, esteri solfati e acidi nucleici che influenzano la struttura terziaria della molecola e le caratteristiche chimico-fisiche, e cationi bivalenti che ne favoriscono i legami [65]. La produzione degli EPS è influenzata da diversi fattori tra cui la salinità, il pH, la disponibilità dei nutrienti quali azoto, fosforo, zolfo, potassio [66] e di carboidrati [64], e la fase vitale del microorganismo, la maggior produzione sembra coincidere con la fine della fase logaritmica e la fase stazionaria [65]. La biosintesi degli EPS nei batteri può essere extracellulare, utilizzando precursori esterni, o intracellulare, più comune, assemblando i componenti vicino alla membrana e poi rilasciandoli all'esterno, e può essere liberato all'esterno della cellula (slime-EPS) o può rimanerne legato sulla superficie del batterio (capsular-EPS) [67]. In generale, la proporzione di EPS nei biofilm può variare dal 50 al 90% della materia organica totale, sono quindi i principali responsabili dell'integrità strutturale e funzionale dei biofilm e sono considerati come i componenti chiave che ne determinano le proprietà chimico-fisiche e biologiche [68].

Diversi sono i vantaggi determinati dalla presenza di un biofilm, tra i quali la formazione di consorzi microbici, la ritenzione di acqua e la protezione dall'essiccamento, la formazione di una barriera protettiva verso biocidi e particelle virali e dalla predazione in genere, per l'accumulo e la stabilizzazione di esoenzimi, come riserva di composti organici ed inorganici esogeni e per il sequestro di macromolecole da sottoporre a degradazione esoenzimatica, permettendo un miglior accesso dei microrganismi ai nutrienti [65,69]. Per quanto riguarda il continente Antartico, si ritiene che gli EPS svolgano un importante ruolo nella resistenza alle basse temperature abbassando il punto di congelamento dell'acqua [70] e permettendo la formazione di canicoli salmastri nel ghiaccio [71].

Tra gli EPS ricavati da microrganismi terrestri e attualmente utilizzati in biotecnologia vanno ricordati lo xantano (estratto dal fitopatogeno *Xanthomonas campestris*), il gellano (estratto da *Sphingomonas paucimobilis*) e gli alginati (prodotti da diverse specie di *Pseudomonas*) [72-75]. Gli esopolisaccaridi hanno trovato uso nei settori farmaceutico, alimentare e petrolchimico: xantani, alginati, destrani, glucani vengono utilizzati come additivi nel cibo per le loro proprietà emulsionanti (salse), gelificanti (confetture) e stabilizzanti (gelati, condimenti); gli alginati evitano la formazione di

cristalli di ghiaccio o di zucchero nei cibi; l'acido ialuronico, viene usato come agente idratante in cosmesi. In campo medico, la natura bioattiva e spesso non immunogenica degli EPS induce alla ricerca del loro uso come bioadesivi e antitumorali; infine diversi EPS hanno presentato attività antibatterica [76], antifungina [77] ed antivirale [78,79]. Per quanto riguarda i batteri antartici è stata riportata l'attività antifouling [53] da ceppi appartenenti al genere *Pseudoalteromonas*.

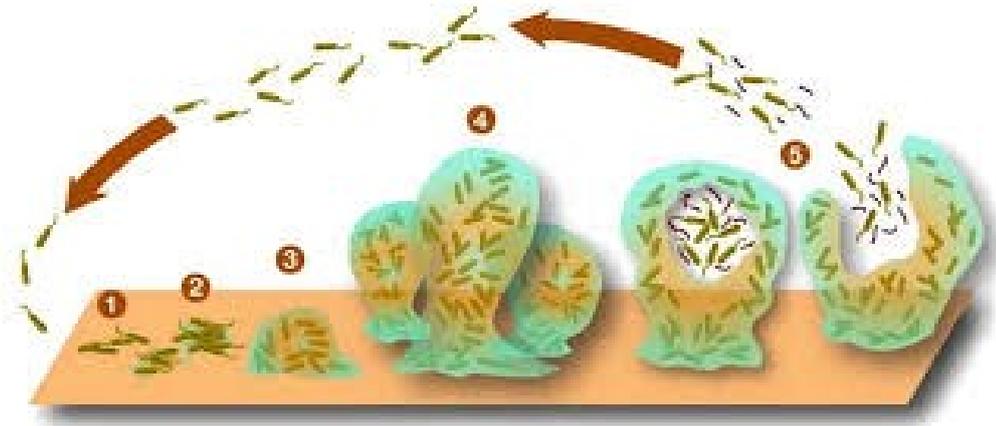


Figura 11. Rappresentazione di un biofilm.

II.1.2.c. I pigmenti

I pigmenti sono molecole capaci di assorbire la luce e conferiscono colore al fenotipo dei microrganismi. Le principali funzioni biologiche dei pigmenti nei batteri è favorire l'adattamento a diverse condizioni ambientali: protezione dalla fotossidazione dei raggi UV e da altri agenti ossidanti, protezione in ambienti a temperature estreme, acquisizioni di nutrienti, inibizione di microrganismi che potrebbero competere per lo spazio e per i nutrienti, acquisizione di energia mediante fotosintesi (come ad esempio nei Cyanobatteri) [80]. Per quanto riguarda i batteri antartici, si è osservato che le specie polari rispetto a quelle colonizzatrici delle acque temperate, presentano un aumento della quantità dei pigmenti con la conseguente modificazione ed aumento della fluidità della membrana, adattamento necessario per la colonizzazione di ambienti freddi [81]. L'espressione genica di alcuni pigmenti (come per le NRPSs) è regolata anche da meccanismi legati al *quorum sensing* [82].

I pigmenti batterici hanno trovato uso nelle applicazioni umane, dall'industria alimentare a quella tessile [83], come sostituiti dei coloranti artificiali, poiché meno tossici ed ecocompatibili grazie alla loro biodegradabilità [84]. Diversi pigmenti batterici vengono usati come indicatori fluorescenti nella ricerca medica [85-87] ed altri sembrano possedere i requisiti per l'uso nell'industria farmaceutica: alcuni pigmenti hanno mostrato attività antiossidanti, immunosoppressive ed antimicrobiche, persino verso ceppi batterici MDR [88,89]. In diversi studi è stato dimostrato che i batteri pigmentati hanno mostrato maggiore attività inibitoria verso batteri e protozoi[90]. Tra i pigmenti che possiedono attività biologiche si possono elencare la Prodigiosina, molecola aromatica isolata da *Serratia marcescens*, *Pseudomonas sp.* e *Pseudoalteromona sp.*; tra i membri di quest'ultimo genere batterico, diverse specie producono altri pigmenti biotivi come la Cycloprodigiosina, che ha dimostrato proprietà anticancerogene, antimalariche ed immunosoppressive, come l'Astaxantina, un idrocarburo polinsaturo appartenente ai carotenoidi con attività antiossidante, la Violaceina derivato indolico prodotto anche da *Chromobacterium sp.* con attività antitumorale, antibiotica ed antiprotozoari, le Tambjamine che presentano capacità antifouling, antibatterica e citotossica[90]. Tra i batteri antartici produttori di pigmenti bioattivi sono stati segnalati *Janthinobacterium sp.* e *Flavobacterium sp.*, colonizzatori delle acque dolci [88,91] che presenta attività antibatterica verso ceppi batterici MDR, e *Pedobacter sp.* [89] con attività antiossidante. La conoscenza attuale sulle potenzialità dei pigmenti prodotte da batteri antartici marini sono scarse, e maggiore attenzione si sta rivolgendo a tale settore.

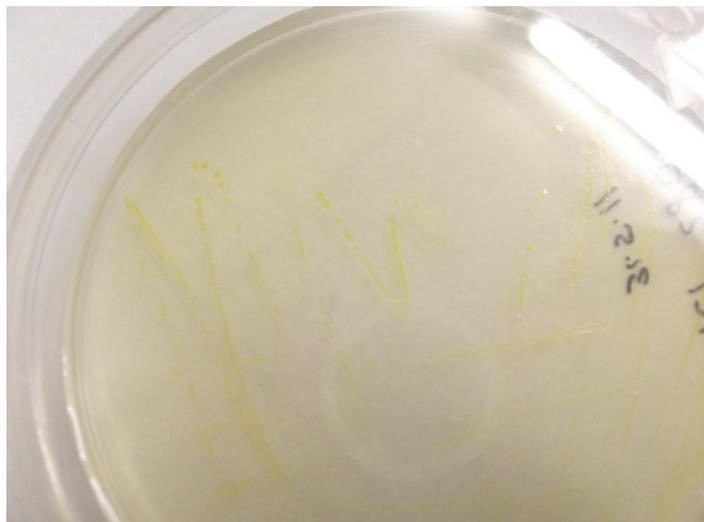


Figura 12. Un ceppo di batterio pigmentato (*Arthrobacter sp.*)

II. 1.3. Il continente Antartico

Secondo Aristotele l'esistenza di una zona fredda a nord del pianeta implicava l'esistenza di una zona altrettanto fredda posta a sud. Il Polo Nord (*αρκτικός, Arktikos*) era posto sotto la costellazione dell' Orsa Maggiore (dal termine greco *αρκτός, orsa*) e quindi la terra opposta fu chiamata *Antarktikos (ανταρκτικός)*, Antartide. Quindi fin dall'antichità si ipotizzava l'esistenza di una Terra Australis; il primo avvistamento confermato del continente risale al 1820 durante la spedizione russa di Lazarev e Bellingshausen ed il primo uso formale del nome Antartide in riferimento a un continente è attribuito al cartografo scozzese John George Bartholomew nel 1890.

L'Antartide è situato nell'emisfero australe a sud del Circolo polare antartico, circondato dai mari antartici, a sud dei tre oceani, Atlantico, Indiano e Pacifico. Per convenzione il confine geografico è delimitato dalla cosiddetta convergenza antartica, la latitudine (circa 50° S) dove si inabissano le acque di superficie subtropicali, larga dai 40 agli 80 km, ed è situata a circa 1600 km dalla costa e in essa la temperatura cala bruscamente. La convergenza antartica costituisce una barriera biologica insormontabile per gli organismi marini di piccole dimensioni e all'interno della quale si trova un ecosistema del tutto particolare.

Ha una superficie di circa 14 milioni di km². Il 98% del suo territorio è completamente coperto da ghiacci che, con uno spessore medio di 1.600 m ed un volume medio totale di 26,6 milioni di km³, che costituiscono il 92% delle riserve di acqua dolce del globo. Le acque congelano in superficie per una parte dell'anno, corrispondente all'inverno australe, estendendo la calotta polare antartica fra i 70 ed i 55° S. Questo ghiaccio marino è annuale, raggiunge uno spessore intorno ai 2 m per poi sciogliersi in estate; si distinguono quindi una Zona di ghiaccio persistente (PIZ) anche nella stagione estiva, che occupa una parte del Mare di Weddel e del Mare di Ross; una Zona costiera a bassi fondali (CCSZ) riesce a liberarsi periodicamente dal ghiaccio; una Zona del ghiaccio stagionale (SIZ) occupa circa 16 milioni di chilometri quadrati, cioè quasi la metà di quello che viene considerato l'Oceano Meridionale ed è quella che subisce i cambiamenti più drastici ed imponenti nel corso dell'anno, a causa dello scioglimento annuale e nella quale si sviluppa uno dei più interessanti ecosistemi del pianeta alimentata dal plancton e che rappresenta la fonte di cibo per cetacei, pinguini (il

pinguino imperatore e il pinguino di Adelia), pesci, foche (le foche di Weddell e la foca leopardo) e molti uccelli (appartenenti alle famiglie dei procellariformi e caradriformi); una Zona di oceano permanentemente libero dai ghiacci (POOZ) .

Si distinguono due sole stagioni, spesso denominate Sole di mezzanotte e notte polare, oppure semplicemente estate e inverno, determinate dalla presenza o meno del sole sopra l'orizzonte. L'Antartide può essere classificato come deserto: all'interno le precipitazioni medie annue sono soltanto di circa 50 mm con una temperatura media annuale inferiore a -50°C e spesso si verificano violente bufere di neve causate dai forti venti. Le precipitazioni sono molto più frequenti lungo la costa (media annua di 380 mm), che presentano temperature più elevate: da -0°C a -15°C durante l'estate e da -15°C a -30°C durante l'inverno, mentre all'interno da -40°C a -90°C con poche precipitazioni in particolare sull'altopiano centrale (10 mm annui).

L'interno del continente è caratterizzato oltre che da condizioni climatiche estreme, anche dalla povertà del suolo, che diventano fattori determinanti e limitanti per lo sviluppo una vegetazione superiore che risulta costituita quasi esclusivamente da muschi, epatiche e licheni. Le uniche piante angiosperme che crescono in Antartide sono la *Deschampsia antarctica* e il *Colobanthus quietensis*; queste piante presentano un habitus erbaceo e vivono tra le rocce presso il litorale sulla costa occidentale della penisola Antartica. La ricchezza della fauna nelle poche aree deglacciate, paragonata a quella nell'oceano circostante e sulla banchisa, appare molto povera e le uniche forme di vita sono rappresentate da microrganismi ed alcuni invertebrati.

Il continente non è abitato permanentemente da alcuna popolazione umana; le sole presenze sono comprese tra le 1.000 e 5.000 unità nelle stazioni di ricerca.

L'Antartide ha un compito importante nell'equilibrio ambientale del pianeta, partecipando in maniera decisiva alla circolazione oceanica e quindi atmosferica del pianeta.

Dal 1959 lo status politico dell'Antartide è regolato dal Trattato Antartico, firmato a oggi da 46 Paesi. Il trattato vieta le attività militari e minerarie, sostiene la ricerca scientifica e protegge gli ecosistemi del continente.

II.1.3.a. Il Trattato sull'Antartide

Applicato alla regione situata a Sud del 60° grado di latitudine Sud, compresi tutti i tavolati glaciali, è stato firmato a Washington il 1° dicembre 1959 dai Governi dell'Argentina, dell'Australia, del Belgio, del Cile, della Repubblica Francese, del Giappone, della Nuova Zelanda, della Norvegia, dell'Unione Sud-Africana, dell'Unione delle Repubbliche Socialiste Sovietiche, del Regno Unito di Gran Bretagna e d'Irlanda del Nord e degli Stati Uniti d'America, è entrato in vigore nel 1961; il Trattato riconosce nell'Antartide l'interesse di tutta l'umanità e che quindi debba essere riservato soltanto ad attività pacifiche e non divenga teatro né motivo di vertenze internazionali; col Trattato viene sospesa qualsiasi rivendicazione territoriale e lo sfruttamento delle risorse esistenti, sono autorizzate soltanto attività pacifiche e vietate contaminazioni di alcun tipo.

II.1.3.b. Programma Nazionale di Ricerche in Antartide

Il Governo italiano ha sottoscritto il Trattato Antartico il 18 marzo 1981 e il 10 giugno 1985 è stata approvata la Legge n.284 istitutiva del Programma Nazionale di Ricerche in Antartide (PNRA). Il programma, svolto sotto l'egida del Ministero dell'Università e della Ricerca Scientifica e Tecnologica (MURST), prevedeva attività di ricerca per il periodo 1985-1991 con l'obiettivo di assicurare la partecipazione dell'Italia al Trattato Antartico. Nel 1988 in occasione della XX riunione SCAR tenutasi a Hobart (Australia), l'Italia è diventata inoltre membro dello SCAR (Scientific Committee on Antarctic Research). Nel 1991 è stata approvata la Legge n.380 che organizza le attività di ricerca sulla base di programmi quinquennali. Il programma di ricerca include: Scienze della Terra, Fisica dell'Atmosfera, Cosmologia, Biologia e Medicina, Oceanografia, Scienze Ambientali, Tecnologia. I progetti di ricerca sono sviluppati dai ricercatori afferenti alle Università, al Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR) ed a numerosi altri Istituti (Osservatorio Geofisico Sperimentale, Istituto Nazionale di Geofisica, Istituto Centrale di Ricerca Scientifica e Tecnologica Applicata al Mare, Stazione Zoologica di Napoli, ecc.). Questi, a seguito della valutazione e dell'approvazione da parte della Commissione Scientifica Nazionale per l'Antartide (CSNA), vengono attuati nelle campagne di ricerca antartiche. In seguito all'approvazione della legge istitutiva del PNRA è stata realizzata una base permanente in Antartide. Le spedizioni prevalentemente dedicate alle ricerche nel settore della biologia marina sono state la terza spedizione, la quinta e la decima condotte nel Mare

di Ross e di Weddell nell'ambito di progetti finalizzati come, per il settore dell'ecologia, il Ross Sea Marginal Ice Zone Experiment (ROSSMIZE).

II.1.3.c. Museo Nazionale dell'Antartide

Il Museo Nazionale dell'Antartide "Felice Ippolito" (MNA) è un museo scientifico italiano. Istituito il 2 Maggio 1996, è dedicato alla memoria del geologo e ingegnere Felice Ippolito (1915-1997), che ne fu il primo presidente. È stato strutturato come Centro Interuniversitario tra gli Atenei di Genova, Siena e Trieste; esso ha il compito della conservazione, dello studio e della valorizzazione dei reperti acquisiti nel corso delle spedizioni scientifiche in Antartide e di promuovere la diffusione dei risultati dell'attività scientifica svolta in Antartide al fine di rendere più efficace l'insegnamento delle scienze ed in particolare delle scienze polari, nell'interesse degli alunni, della scuola e della società. Il Museo è articolato in tre sezioni con competenze scientifiche differenziate: biologico-ecologiche (sezione di Genova), geologico terrestre e glaciologiche (sezione di Siena) e geologico marine (sezione di Trieste).

II. 2. Materiali e metodi

II.2.1. Raccolta dei campioni

Allo scopo di trovare nuove e promettenti molecole bioattive da batteri, alcuni campioni di spugna antartiche sono stati raccolti per isolare nuove specie batteriche per la ricerca di batteriocine, esopolisaccaridi e pigmenti. La ricerca è stata condotta su 833 ceppi batterici precedentemente isolati su Marine Agar (MA, Difco) da 52 esemplari di Poriferi antartici, appartenenti a specie distinte e prelevati con ogni cura di asepsi da sei siti a Baia Terra Nova (Mare di Ross, Antartide) nel corso della XX Spedizione Italiana in Antartide (Estate Australe 2004-2005) (Figura 15). Le spugne campionate sono rappresentative di 20 generi, appartenenti principalmente alla classe delle Demosponge (Tabella 1). I ceppi utilizzati fanno parte della Collezione Italiana di Batteri Antartici (CIBAN) del Museo Nazionale dell'Antartide (MNA) "Felice Ippolito", allocata presso il Dipartimento di Biologia Animale ed Ecologia Marina dell'Università di Messina.

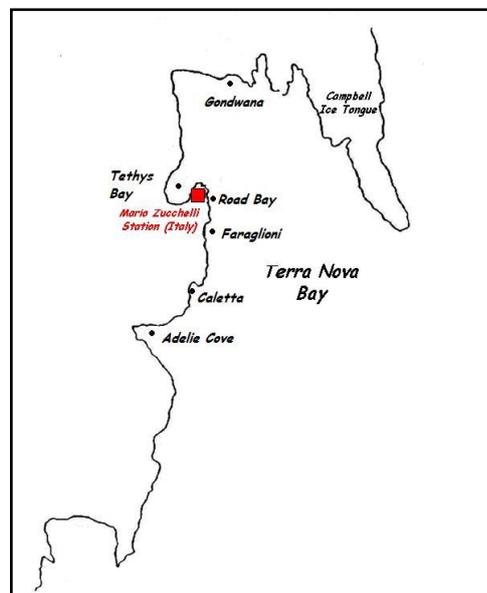


Figura 14. Siti di campionamento.

Tabella 2. Affiliazione filogenetica e provenienza delle spugne oggetto di studio (**TB**: Thetys Bay; **CAL**: Caletta; **AC**: Adelie Cove; **GW**: Gondwana; **FAR**: Faraglioni; **RB**: Road Bay).

Specie	Codice esemplare	Sito di campionamento	Prof. (m)
<i>Anoxycalyx joubini</i> (Topsent, 1910)	TB-i-3	Thetys Bay	50
<i>Artemisina tubulosa</i> (Koltun, 1964)	TB-i-5	Thetys Bay	50
<i>Calyx arcuaria</i> (Topsent, 1913)	CAL-a-5	Caletta	60-110
<i>C. arcuaria</i> (Topsent, 1913)	CAL-a-2	Caletta	60-110
<i>C. arcuaria</i> (Topsent, 1913)	AC-1	Adelie Cove	80-120
<i>Clathria nidificata</i> (Kirkpatrick, 1907)	TB-a-5	Thetys Bay	30-50
<i>C. nidificata</i> (Kirkpatrick, 1907)	AC-6	Adelie Cove	80-120
<i>C. toxipraedita</i> (Topsent, 1913)	TB-e-4	Thetys Bay	100-200
<i>Crella</i> (<i>Crella</i>) sp.	AC-c-5	Adelie Cove	70-120
<i>Gelliodes kerguelensis</i> (Hentschel, 1914)	CAL-b-1	Caletta	50-120
<i>H. pilosa</i> (Kirkpatrick, 1907)	TB-i-1	Thetys Bay	50
<i>H. pilosa</i> (Kirkpatrick, 1907)	CAL-a-3	Caletta	60-110
<i>H. pilosa</i> (Kirkpatrick, 1907)	GW-a-5	Gondwana	50-60
<i>Haliclonissa verrucosa</i> (Burton, 1932)	CAL-a-4	Caletta	60-110
<i>H. verrucosa</i> (Burton, 1932)	FAR-a-2	Faraglioni	80-90
<i>H. verrucosa</i> (Burton, 1932)	AC-f-2	Adelie Cove	25-27
<i>Halicondria</i> sp.	TB-b-5	Thetys Bay	50-90
<i>Halicondria</i> sp.	TB-g-1	Thetys Bay	100-200
<i>Isodictya</i> sp.	TB-e-2	Thetys Bay	100-200

<i>Isodictya</i> sp.	TB-e-5	Thetys Bay	100-200
<i>I. conulosa</i> (Ridley e Dendy, 1886)	TB-f-2	Thetys Bay	100-200
<i>I. kerguelensis</i> (Ridley e Dendy, 1886)	TB-g-2	Thetys Bay	100-200
<i>I. ericacea</i> (Topsent, 1916)	TB-h-2	Thetys Bay	100-200
<i>Lissodendoryx nobilis</i> (Ridley e Dendy, 1886)	TB-i-4	Thetys Bay	50
<i>L. nobilis</i> (Ridley e Dendy, 1886)	AC-e-2	Adelie Cove	49-110
<i>L. antartica</i> (Hentschel, 1914)	AC-d-2	Adelie Cove	86-197
<i>Mycale</i> sp.	TB-a-1	Thetys Bay	30-50
<i>Microxina sarai</i> (Calcinai e Pansini, 2000)	AC-8	Adelie Cove	80-120
<i>Myxodoryx hanitschi</i> (Kirkpatrick, 1907)	CAL-a-9	Caletta	60-110
<i>M. hanitschi</i> (Kirkpatrick, 1907)	RB-2	Road Bay	80-100
<i>M. hanitsch</i> (Kirkpatrick, 1907)	AC-3	Adelie Cove	80-120
<i>M. hanitsch</i> (Kirkpatrick, 1907)	AC-15	Adelie Cove	80-120
<i>M. hanitsch</i> (Kirkpatrick, 1907)	AC-f-1	Adelie Cove	25-27
<i>Phorbis glaberrima</i> (Topsent, 1917)	GW-a-4	Gondwana	50-60
<i>P. glaberrima</i> (Topsent, 1917)	TB-e-3	Thetys Bay	100-200
<i>P. glaberrima</i> (Topsent, 1917)	AC-5	Adelie Cove	80-120
<i>P. glaberrima</i> (Topsent, 1917)	AC-14	Adelie Cove	80-120
<i>P. glaberrima</i> (Topsent, 1917)	AC-f-3	Adelie Cove	25-27
<i>Plicatellopsis antarcticus</i> (Carter, 1882)	TB-f-1	Thetys Bay	100-200

<i>Pseudosuberites nudus</i> (Koltun, 1964)	TB-b-2	Thetys Bay	50-90
<i>P. nudus</i> (Koltun, 1964)	FAR-a-1	Faraglioni	80-90
<i>Rossella antartica</i> (Carter, 1872)	TB-e-1	Thetys Bay	100-200
<i>Suberites montiniger</i>	GW-a-2	Gondwana	50-60
<i>S. caminatus</i> (Ridley & Dendy, 1886)	AC-e-4	Adelie Cove	49-110
<i>Tedania charcoti</i> (Topsent, 1907)	TB-a-2	Thetys Bay	30-50
<i>T. charcoti</i> (Topsent, 1907)	TB-a-6	Thetys Bay	30-50
<i>T. charcoti</i> (Topsent, 1907)	TB-e-6	Thetys Bay	100-200
<i>T. charcoti</i> (Topsent, 1907)	TB-e-7	Thetys Bay	100-200
<i>T. charcoti</i> (Topsent, 1907)	CAL-a-6	Caletta	60-110
<i>T. charcoti</i> (Topsent, 1907)	GW-a-7	Gondwana	50-60
<i>T. spinata</i> (Ridley, 1881)	AC-e-1	Adelie Cove	49-110
<i>Tedania</i> sp.	TB-h-1	Thetys Bay	100-200

Immediatamente dopo il prelievo, ciascun esemplare è stato sciacquato con acqua marina sterile e conservato a 4° C in apposite buste sterili fino all'arrivo nel laboratorio di microbiologia della base di ricerca. Entro quattro ore dal prelievo, il tessuto interno di ciascuna spugna è stato estratto mediante l'ausilio di un *cork borer*. Il frammento di tessuto è stato pesato ed omogeneizzato in acqua di mare (sterilizzata per filtrazione attraverso membrane in policarbonato di porosità 0,22 µm). Sono state preparate delle diluizioni seriali dei campioni ed aliquote di 100 µl di ciascuna diluizione sono state utilizzate per seminare in duplicato piastre di terreno Marine Agar 2216 (MA, Difco). La semina è stata condotta per disseminazione superficiale ("*spread plating*") e le piastre poste a 4°C fino al loro arrivo in Italia. Le colonie cresciute sono state prelevate *random* e strisciate tre volte prima di essere considerate pure.

II.2.2. Screening dell'attività inibitoria.

Sui batteri isolati dalle spugne sono stati effettuati degli screening sull'attività antagonista nei confronti di batteri patogeni per l'uomo (Lo Giudice et al., 2007): *Escherichia coli* ATCC 25922 (E), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (S), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (P), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (B), *Salmonella enterica* ATCC 14028 (Sal), *Micrococcus luteus* ATCC 4698 (M) e *Proteus mirabilis* ATCC 12453 (Pr). Il metodo utilizzato per i test è stato quello dello striscio perpendicolare ("cross-streak method"): nella prima fase, i ceppi da testare sono stati seminati sul MA e incubati alla temperatura di 15 °C fino a crescita cospicua (circa 7-14 giorni). I ceppi bersaglio sono stati poi strisciati perpendicolarmente allo striscio iniziale e le piastre sono state incubate a 28 e a 37 °C per 24-48h [92]. Nel caso di risposte positive (zona di inibizione pari ad almeno 5 mm tra il ceppo produttore e il ceppo-bersaglio) i ceppi sono stati nuovamente testati contro i bersagli sensibili per confermare l'osservazione iniziale. Come controllo negativo, i ceppi target sono stati seminati individualmente su MA per accertarne la crescita in assenza dei ceppi antartici.

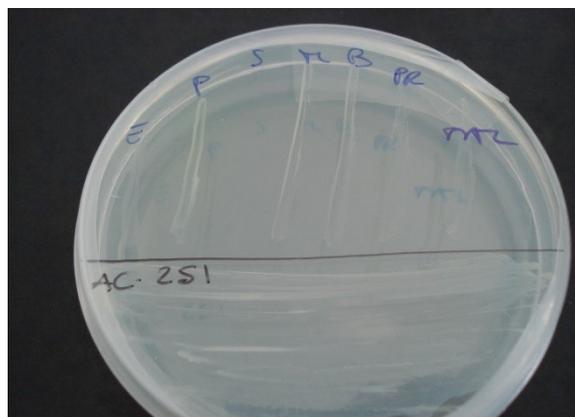


Figura 14. Tecnica dello striscio perpendicolare: nella parte inferiore della figura si osserva la crescita di un ceppo batterico testato, nella parte superiore gli strisci dei ceppi bersaglio. La mancanza dello striscio del ceppo bersaglio S indica l'inibizione della crescita da parte del ceppo testato (E: *E. coli*; P: *P. aeruginosa*; S: *S. aureus*; M: *M. luteus*; B: *B. subtilis*; Pr: *P. mirabilis*; Sal: *S. enterica*)

II.2.2.1. Estrazione batteriocine e antibiogramma

Un ceppo per ciascuna specie di *Pseudoalteromonas* sp. (ceppo Ted381), *Arthobacter* sp. (ceppo Pli280) and *Psychrobacter* sp. (ceppo A265), che mostrava una significativa attività inibitoria è stato selezionato per procedere con l'estrazione delle molecole

bioattive da essi eventualmente prodotte. L'estrazione è stata eseguita secondo il protocollo di seguito descritto [93]: i ceppi attivi sono stati inoculati in aliquote di 50, 100 e 300 ml di terreno Marine Broth (MB; Difco) ai due diversi valori di pH 7 e 7.5, ed incubati sia alla temperatura di 10 °C che a 15 °C fino a crescita cospicua ($OD_{600} > 1.000$ nm; circa 15 giorni). Trascorso il periodo di incubazione, le colture sono state centrifugate (7000 rpm per 20 minuti) ed al surnatante è stato acidificato con acido acetico ed addizionato un uguale volume (1:1, v/v) di etilacetato. Dopo una vigorosa agitazione, la fase idrofobica è stata prelevata ed il solvente fatto evaporato sotto cappa chimica. I residui sono stati risospesi con etilacetato e portati ad un volume finale di 100 μ l. L'estratto è stato quindi testato mediante il metodo della diffusione da disco (Kirby-Bauer): il ceppo target è stato fatto crescere a 37°C in Nutrient Broth (NB, Oxoid) fino al raggiungimento della fase logaritmica di crescita, ed un inoculo pari a 0.5 McFarland è stato incluso in 20 ml di soft NA (0.9 % agar). Aliquote dell'estratto (20, 50 e 100 μ l) sono state utilizzate per imbibire dischetti sterili di carta da filtro (\varnothing 6 mm) che sono stati quindi posti sulla superficie del terreno in precedenza inoculato con il ceppo target sensibile all'azione inibitoria. Dischetti imbibiti con etilacetato e con estratti del terreno di MA privo di inoculi sono stati utilizzati come controlli negativi. Le piastre sono state incubate a 28 °C e 37 °C. L'eventuale attività inibitoria dell'estratto è stata individuata mediante alla formazione di un alone d'inibizione attorno ai dischetti, come schematizzato in Figura 15.

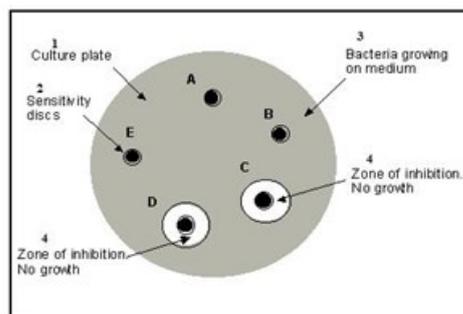


Figura 15. Schematizzazione dell'antibiogramma. In caso di positività del test i batteri presentano una sensibilità all'estratto e si osserva un alone di inibizione attorno al dischetto (C, D), che non si osserva in caso di mancata sensibilità all'estratto (A, B, E), (1.piastra di coltura; 2. dischetto 3.crescita del batterio target; 4.alone di inibizione,nessuna crescita)

II.2.2.1.a Caratterizzazione preliminare dell'estratto

La caratterizzazione preliminare degli estratti che hanno mostrato di possedere attività

inibitoria è stata effettuata mediante cromatografia su strato sottile (*Thin Layer Chromatography*, TLC). In particolare, la separazione è stata effettuata utilizzando piastre di silica gel come fase stazionaria, e opportuna miscela di solventi come fase mobile (metanolo/cloroformio 1.5:98.5). La separazione delle frazioni molecolari è stata osservata mediante U.V.; soluzioni coloranti a base di anisaldeide e ninidrina sono state utilizzate per evidenziare rispettivamente l'eventuale presenza di sostanze glucidiche sotto forma di spot di colore giallo, e quelle peptidiche sotto forma di spot rosso [94].

II.2.2.2. Estrazione del pigmento

Tra i batteri con un'attività inibitoria ed evidente fenotipo colorato, *Arthobacter* sp. Pli280 è stato scelto per l'estrazione dei pigmenti. Una subcultura di brodo Zo Bell da 50 ml è stata trasferita in 250 ml di Luria broth modificato con 6% di olio di girasole [95] ed incubato per 72 ore a 25 °C. Il surnatante è stato allontanato mediante centrifugazione a 8000 x g per 5 minuti; il pellet è stato lavato risospeso con acqua deionizzata e centrifugato nuovamente per rimuovere residui di brodo; le cellule sono state miscelate a 2 ml di Etanolo (99% v/v) ed ultrasuonificate con 5 cicli da 30 secondi a 60 MHz . L'etanolo è stato allontanato mediante centrifugazione a 10000 x g per 5 minuti ed il pellet è stato lasciato asciugare, pesato e sospeso in DMSO [96].

II.2.2.3. Screening della produzione di polisaccaridi

I ceppi risultati attivi sono stati incubati in MA e sottoposti ad uno screening visivo: in base alla presenza di un fenotipo mucoide, i ceppi sono stati incubati alla temperatura di 15° C per due settimane, utilizzando il terreno MA addizionato con saccarosio allo 0,6% (w/v) allo scopo di evidenziarne l'aspetto compatto e viscoso delle colonie mediante osservazione allo stereomicroscopio . Dopo una prima selezione, si è anche proceduto al test di produzione dello *slime* legato alla produzione di EPS, secondo il metodo descritto da Christensen G.D. *et al.* [97] modificato da Maugeri *et al.* (2002) [98]: i ceppi sono stati fatti crescere a 15° C in Marine Broth più saccarosio (concentrazione finale 0,6%, w/v), all'interno di provette da centrifuga in poliestere (Falcon) da 15 ml; dopo 14 giorni le provette sono state svuotate del contenuto, lavate con acqua distillata e colorate con safranina per evidenziare l'eventuale presenza dello *slime*.

II.2.2.3.a. Estrazione polisaccaridi

I tre ceppi selezionati (Cal 430, CAL 366, TB41) sono stati messi ad incubare a 10 °C in 350 ml di in un terreno di coltura minimo contenente per litro di Nine Salt Solution a pH 7, composta da 17,6 g NaCl, 1,47 g Na₂SO₄, 0,08 g NaHCO₃, 0,25 g KCl, 0,04 g KBr, 1,87 g MgCl₂ 6 H₂O, 0,41 g CaCl₂ 2H₂O, 0,008 g SrCl 6 H₂O, 0,008 g H₃BO₃, 5 g di peptone, 1 g di estratto di lievito e, come substrato carbonioso, il Saccarosio alla concentrazione del 2% (w/v). Il terreno liquido così composto è stato inoculato con il 10% delle precolture con O.D. >200 nm incubate a 15° C nello stesso terreno di coltura. L'estrazione dell'esoprodotto dal brodo colturale è stata effettuata mediante il protocollo riportato da Maugeri *et al.*: i 385 ml di coltura cellulare a termine è stata centrifugata a 8000 g per 10' a + 4° C e il surnatante, da cui è stato allontanato il pellet, è stato trattato con lo stesso volume di etanolo freddo. La soluzione alcolica è stata conservata *overnight* a -20° C, centrifugata a 10000 g per 30' a + 4° C ed il pellet precipitato è stato raccolto, risospeso in acqua distillata, trattato con etanolo freddo e conservato -20° C. Previa centrifugazione a 10000 g per 30' a + 4° C, allontanamento del surnatante e risospensione del pellet in acqua distillata, la soluzione acquosa è stata sottoposta a dialisi per 72 ore, utilizzando delle membrane Spectra/Por 1 di taglio molecolare pari a 7000 Da. Infine, il campione è stato liofilizzato, pesato, risospeso in acqua distillata e conservato a -20° C prima di essere utilizzato nei saggi antimicrobici.



Figura 16. *Polisaccaridi liofilizzati*

II. 2.3. Valutazione dell'attività antibiotica

Gli estratti sono stati sottoposti a test per valutarne l'eventuale potenziale inibitorio verso batteri e virus secondo le opportune metodiche.

II.2.3.1. Valutazione dell'attività antibatterica

L'attività antibatterica è stata valutata mediante la tecnica della diffusione su disco per valutare l'efficacia dell'estrazione delle batteriocine. Il pigmento ed i polisaccaridi sono stati valutati mediante la Concentrazione Minima Inibitoria, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) e la Concentrazione Minima Batteriocida, Minimum Bactericidal Concentration (MBC) [99], verso i seguenti batteri patogeni: *S. aureus* clinical isolate 052/149 (c.i.), *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* c.i.032/130/2bis, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* c.i. 052/170, *S. epidermidis* 052/150, *S. epidermidis* 052/122, *S. haemolyticus* 052/138, *E. coli* c.i. 032/129, *E. coli* ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* c.i. 050/074, *K. pneumoniae* c.i. 019/104, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. aerogenes* c.i. 050/012-medivis. I ceppi batterici standard provengono dall'American Type Culture Collection (Rockville, USA), mentre gli isolate clinici provengono dalla collezione batterica del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Catania.

Diverse colonie dei ceppi target sono state inoculate in acqua fisiologica sterile (NaCl 0.9% (w/v)) fino al raggiungimento dello standard pari a 0.5 McFarland, pari approssimativamente a 10^6 Unità Formanti Colonia (Colony Forming Unit, CFU) per mL. Il test è stato effettuato in micropiastre con fondo a U usando come brodo di coltura il Muller Hinton broth (OXOID). La piastra è così stata disposta: la prima colonna conteneva la concentrazione più alta dell'estratto, le altre colonne contenevano diluizioni del 50% dell'estratto, la colonna 10 conteneva la concentrazione più bassa. la metà della concentrazione dell'estratto della colonna. Per ogni concentrazione la replicabilità è stata condotta in duplicato. La colonna 11 conteneva il controllo della crescita dei ceppi target (100 μ L di brodo senza estratto con 5 μ L of *inoculum*). La colonna 12 conteneva 100 μ L di brodo senza estratto, usato quindi come controllo di sterilità. Le sostanze idrosolubili sono state diluite 1:10, mentre le sostanze disciolte in DMSO sono state diluite 1:100. I valori di MIC sono determinati dalla più bassa concentrazione dell'estratto che inibisce la crescita del microrganismo bersaglio. Sono

state effettuate diluizione al raddoppio della sostanza in esame con i seguenti range di concentrazioni:

- Cal403 range compreso tra 680 µg/ml e 1,33 µg/ml
- Cal366 range compreso tra 650 µg/ml e 1,27 µg/ml
- TB41 range compreso tra 500 µg/ml e 0,98 µg/ml

La MBC è stata determinata prelevando 100 µl da ciascun pozzetto delle piastre usate per la MIC che non presentassero alcuna crescita visibile ad occhio nudo ed inocolandoli su piastre di Muller Hinton agar, messe ad incubare per 24 ore a 37 °C. I valori di MBC sono determinati dalla più bassa concentrazione dell'estratto che uccide il microrganismo bersaglio, bloccandone la crescita anche dopo la semina in piastra.

II.2.3.2. Valutazione della citotossicità

La vitalità delle cellule è stata misurata con il metodo della colorazione con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich [100].

Le colture cellulari sono le seguenti: Vero (African green monkey kidney), Hep2 and HFF-1 cresciute nel terreno D-MEM, Dulbecco Minimum Essential Medium (Vero e Hep2 cresciute in D-MEM 1gr/L; HFF in D-MEM , 4,5gr/L), addizionate con siero fetale bovino (2% (v/v) Vero e Hep2, mentre 10%(v/v) HFF-1); MDCK (Madin-Darby Canine Kidney Epithelial) cresciute in RPMI addizionato col 2% di siero fetale bovino. Tutte le cellule provengono dalla collezione American Type Culture Collection (Rockville, USA); le cellule sono state mantenute a -80 °C prima dell'uso. Le cellule sono state inoculate in micropiastre da 96 pozzetti con una densità iniziale di $1,5 \times 10^5$ per pozzetto dalla Colonna 4 alla 12, la Colonna 3 è stata inoculate con una concentrazione di cellule pari alla metà della Colonna 4, la Colonna 2 con densità pari alla metà della 3, la Colonna 1 è stata lasciata vuota per la misura del bianco allo spettrofotometro. Dalla colonna 5 alla 12 erano presenti concentrazioni decrescenti degli estratti: nella 5 la concentrazione più alta, nella 12 quella più bassa; le diluizioni sono state effettuate al raddoppio. Le colonne 2,3 e 4 sono state usate come controlli. Le colture sono state esposte alle differenti concentrazioni dell'estratto per 48 ore di incubazione a 37 °C con 5% CO₂. Le piastre sono state osservate al microscopio ottico dopo 24 e 48 ore per analizzare qualunque anomalia di crescita. Dopo 48 ore il surnatante è stato rimosso e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100µl di D-MEM senza

rosso fenolo contenente MTT (concentrazione finale 0.5 mg/ml). Dopo 2 ore di incubazione è stato allontanato l'MTT e sono stati aggiunti 100 µl di Etanolo per solubilizzare i cristalli. Dopo una vigorosa miscelazione, è stata misurata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. La CD50 è stata calcolata come la concentrazione alla quale l'estratto ha ridotto la vitalità delle cellule del 50%

La citotossicità è stata valutata sulle sostanze di cui era interesse studiarne l'attività antivirale, l'attenzione si è rivolta quindi agli estratti di natura polisaccaridica prelevati dai tre ceppi Cal 403, Cal 366 e Tb 41:

II.2.3.3. Valutazione dell'attività antivirale

L'attività antivirale è stata valutata mediante il test della riduzione delle pacche. Per i virus HSV-1 ed Echo9 sono state utilizzate colture cellulari VERO, per il virus H1n1 le MDCK, per l'adenovirus %, Coxackievirus e Poliovirus le Hep-2, per il Citomegalovirus CMV le HFF-1. Tutti i virus provengono dalla collezione ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, USA) e sono stati conservati a -80 °C prima dell'uso.

L'attività antivirale è stata valutata mediante la riduzione delle placche virali come descritto: inoculate in micropiastre le cellule con una densità iniziale di $1,5 \times 10^5$ e lasciate incubare per 24 ore a 37 °C al 5% di CO₂. La prima colonna è stata usata come controllo della crescita delle cellule, la seconda colonna come controllo della formazione delle placche da parte dei virus. Dalla colonna 3 alla 12 sono state messe le concentrazioni della sostanza con diluizioni al raddoppio in modo tale da avere nella colonna 3 la concentrazione più alta (pari alla CD50 calcolata mediante il test di citotossicità) e nella 12 la più bassa. Il virus è stato inoculato dalla colonna 2 alla 12 ad una concentrazione pari a $2,5 \times 10^3$ lasciando due pozzetti per diluizione privi di inoculo del virus come controllo del comportamento delle cellule con la sostanza. Osservate al microscopio elettronico dopo 24 e 48 ore per segnalare l'eventuale presenze o assenza di placche virali. Sulle sostanze che presentavano attività antivirale veniva effettuata la colorazione con Crystal violetto secondo la seguente modalità: svuotate del loro contenuto, le micropiastre venivano riempite con 50 µl di soluzione contenente Crystal violetto e lasciate incubare per 15 minuti, previo scarico e successivi lavaggi, la piastra veniva lasciata asciugare ed osservata al microscopio ottico. La concentrazione inibente 50% (IC50) veniva calcolata alla concentrazione del composto che riduceva del 50% il

numero delle placche virali. L'attività antivirale è stata testata sugli estratti di natura polisaccaridi prelevati dai ceppi Cal 403, Cal 366 e Tb41.

II.2.4. Amplificazione PCR e analisi del rDNA 16S

L'amplificazione del 16S rDNA è stata effettuata seguendo la metodica descritta da Michaud *et al.* [101]. Singole colonie cresciute su MA sono state sospese in 20 µl di acqua milliQ sterile e lisate mediante riscaldamento in un bagnomaria a +95°C per 10'. I lisati cellulari sono stati immediatamente raffreddati in ghiaccio e sottoposti ad una breve centrifugazione prima di essere utilizzati per l'amplificazione via PCR impiegando i primer universali 27f (5'-GAG AGT TTG ATC CTG G CT CAG-3') e 1492r (5'- CTA CGG CTA CCT TGT TAC GA-3'). È stato utilizzato il seguente programma di PCR: 1) 95°C per 1'30''; 2) 5 cicli a 95°C per 30'', 60°C per 30'' e 72°C per 4'; 3) 5 cicli a 95°C per 30'', 55°C per 30'' e 72°C per 4'; 4) 25 cicli a 95°C per 30'', 50°C per 30'' e 72°C per 4'; 5) 72°C per 10'; 6) 60°C per 10'. L'amplificato è stato purificato utilizzando il QIAquick PCR purification kit (Qiagen). Il campione è stato preparato seguendo le indicazioni del laboratorio Macrogen (Korea) cui sono stati inviati per il sequenziamento. Le sequenze ottenute sono state allineate con quelle presenti in database, corrette manualmente e, infine, utilizzate per la costruzione degli alberi filogenetici (mediante il metodo neighbor-joining) utilizzando il software MEGA3 [102].

II. 3. Risultati

III.3.1. Screening mediante la tecnica dello striscio perpendicolare

Il 19,7% (164) dei ceppi antartici testati ha mostrato di possedere attività antibiotica (Tabella 3). Particolarmente interessanti sono apparse le spugne appartenenti ai generi *Artemisia*, *Haliclona*, *Haliclonissa*, *Isodictya*, *Phorbas*, *Plicatellopsis* e *Tedania* poiché la loro comunità coltivabile su terreno MA è stata costituita per più del 20% da ceppi con attività antibiotica.

Tabella 3. Attività antibiotica di batteri antartici nei confronti di microrganismi di origine terrestre.

Spugna	Ceppi testati (n°)	Ceppi attivi (n°, %)
<i>Artemisina</i>	23	7 (30,4)
<i>Anoxycalyx</i>	39	3 (7,7)
<i>Crella</i>	3	0
<i>Calyx</i>	97	5 (5,2)
<i>Chlatria</i>	14	1 (7,1)
<i>Gellioides</i>	18	0
<i>Haliclona</i>	69	37 (53,6)
<i>Haliclonissa</i>	96	31 (32,3)
<i>Halicondria</i>	10	1 (10,0)
<i>Isodictya</i>	35	15 (42,9)
<i>Lissodendoryx</i>	97	4 (4,1)
<i>Microxina</i>	1	0
<i>Mycale</i>	2	0
<i>Myxodoryx</i>	49	1 (2,0)

<i>Phorbas</i>	46	14 (30,4)
<i>Plicatellopsis</i>	5	1 (20,0)
<i>Pseudosuberites</i>	7	0
<i>Rossella</i>	1	0
<i>Suberites</i>	28	0
<i>Tedania</i>	193	44 (22,8)
Totale	833	164 (19,7)

L'elenco dei 164 ceppi con attività antibiotica, inclusa l'indicazione dei ceppi target ad essi sensibili, è riportato in Tabella 4.

Tabella 4. Lista dei ceppi attivi [*E*: *E. coli*; *P*: *P. aeruginosa*; *S*: *S. aureus*; *M*: *M. luteus*; *B*: *B. subtilis*; *Pr*: *P. mirabilis*; *Sal*: *S. enterica*; +: risposta positiva; -: risposta negativa; (+) debole risposta positiva].

Spugna	Ceppo	E	P	S	M	B	Pr	Sal
<i>Artemisina</i>	230, 264	+	-	-	(+)	-	-	-
	A265	+	-	-	+	-	-	-
	233, 236, 250	+	-	-	-	-	-	-
	266	-	-	-	(+)	-	-	-
<i>Anoxycalyx</i>	TB41	+	-	-	+	-	+	-
	TB42	-	-	-	-	-	(+)	-
	TB76	-	+	-	-	-	-	-
<i>Calyx</i>	CAL36	(+)	-	-	-	-	-	(+)
	CAL293	+	+	-	-	-	-	-

	CAL291	-	-	(+)	-	-	-	-
	CAL296	-	-	-	-	-	(+)	-
	CAL300	-	-	+	-	-	-	-
<i>Chlatria</i>	408	+	-	-	-	-	-	-
<i>Haliclona</i>	CAL89, CAL90	(+)	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)
	CAL110	+	(+)	-	-	-	(+)	(+)
	CAL103	+	+	-	-	-	(+)	-
	CAL102, CAL106, GW168, 143, 174	+	(+)	-	-	-	-	-
	CAL107, GW163	+	+	-	-	-	-	-
	151	(+)	(+)	-	-	-	-	-
	CAL109, GW170	(+)	-	-	-	-	(+)	-
	GW172, GW191, GW193, GW196, GW201, GW202, GW205, 146, 148, 149, 152, 153, 168, 169, 171, 172, 173, CAL104, CAL108, GW167, CAL97	+	-	-	-	-	-	-
	GW166	(+)	-	-	-	-	-	-
	CAL100	-	-	(+)	-	-	-	-
<i>Haliclonissa</i>	CAL618	+	+	(+)	+	(+)	(+)	-
	CAL637	(+)	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	CAL622	+	-	+	-	(+)	-	(+)
	CAL652	-	-	-	(+)	-	(+)	(+)
	CAL594, CAL602, CAL634	-	(+)	(+)	-	-	-	-

	CAL617	+	-	-	-	-	(+)	-
	CAL629, CAL639, CAL645	+	(+)	-	-	-	-	-
	CAL640, CAL641, CAL644, CAL632, CAL576	+	-	-	-	-	-	-
	CAL567, CAL569, CAL577, CAL613, CAL615, CAL625, CAL626, CAL646, CAL656	(+)	-	-	-	-	-	-
	CAL600, CAL604, CAL633	-	(+)	-	-	-	-	-
	AC104, AC116, CAL580	-	-	(+)	-	-	-	-
<i>Halicondria</i>	441	(+)	-	-	-	(+)	-	-
<i>Isodictya</i>	343	+	+	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	482	+	(+)	-	(+)	(+)	(+)	(+)
	327, 334, 346, 396, 469b	+	-	-	-	-	-	-
	350a, 328, 385, 345, 457, 464, 469a, 482	(+)	-	-	-	-	-	-
<i>Lyssodendoryx</i>	TB18	(+)	(+)	-	-	-	(+)	-
	TB13	(+)	-	-	-	-	(+)	-
	TB17	(+)	-	-	-	-	-	-
	TB35	-	-	+	-	-	-	-
<i>Myxodoryx</i>	AC207a	-	-	-	-	-	-	(+)
<i>Phorbas</i>	GW95	(+)	(+)	-	-	-	-	-
	AC182, GW84, GW107	+	-	-	-	-	-	-
	AC232, GW83	-	-	(+)	-	-	-	-
	AC191	-	(+)	-	-	-	-	-

AC248, GW92, GW97, GW109,
447, 448, 449

(+) - - - - -

<i>Plicatellopsis</i>	Pli280	+	-	-	+	+	-	-
<i>Tedania</i>	CAL351	+	+	+	-	+	-	-
	CAL366	+	-	+	+	-	-	+
	CAL403	+	-	(+)	-	-	+	+
	CAL330, CAL362	+	-	+	+	-	-	-
	CAL364	+	-	+	-	+	-	-
	CAL363	+	-	-	+	-	+	-
	CAL335, CAL336, CAL391, CAL404	+	-	-	+	-	-	-
	CAL399	+	-	-	-	-	+	-
	CAL373	+	(+)	-	-	-	-	-
	CAL374	+	-	-	+	-	-	-
	CAL381	+	-	-	-	-	(+)	-
	CAL352	-	-	-	+	-	-	-
	CAL359b	-	-	+	-	-	-	-
	CAL367	-	(+)	-	-	-	-	-
	CAL326, CAL410	(+)	-	-	-	-	-	-
	CAL337, CAL341, CAL380, CAL386, CAL390, CAL392, CAL406, CAL407, CAL416, CAL427, CAL442, 5, GW128, GW130, GW131, GW132, GW143, CAL384, CAL380,	+	-	-	-	-	-	-

CAL368, CAL371, CAL357,
CAL359a

Come mostrato in Figura 17, la maggior parte dei ceppi attivi ha inibito la crescita di un unico microrganismo target (107 su 164), mentre 37 ceppi hanno mostrato attività nei confronti di due ceppi. I restanti 20 ceppi attivi hanno inibito la crescita di un maggior numero di microrganismi (da 3 a 7).

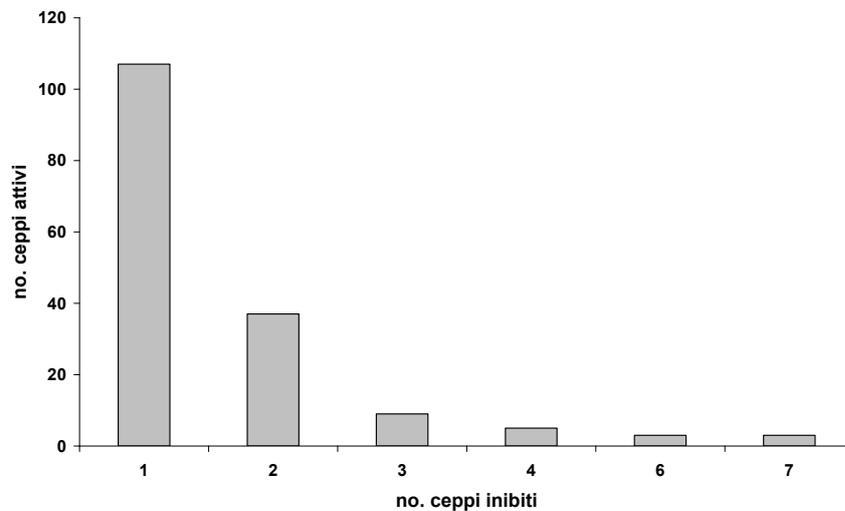


Figura 17. Numero di ceppi inibiti.

Nel complesso, la crescita di *E. coli* è stata inibita dalla grande maggioranza dei ceppi (139). Al contrario, *B. subtilis* e *S. enterica* non sono apparsi particolarmente inibiti dall'azione dei ceppi antartici testati, tranne in pochi casi (rispettivamente da 11 e 12 ceppi batterici antartici) (Figura 18).

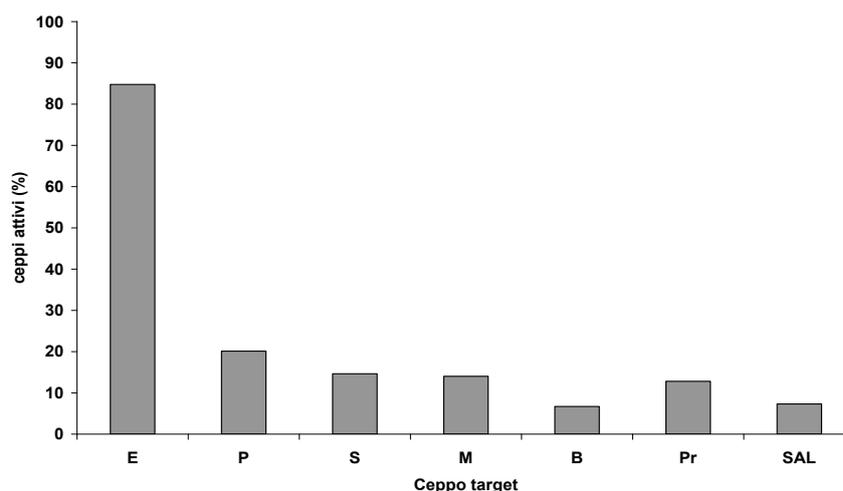


Figura 18. Inibizione dei ceppi target ad opera di batteri antartici (**E**: *E. coli*; **P**: *P. aeruginosa*; **S**: *S. aureus*; **M**: *M. luteus*; **B**: *B. subtilis*; **Pr**: *P. mirabilis*; **Sal**: *S. enterica*)

III.3.2. Estrazione di molecole bioattive.

Tre ceppi appartenenti a generi e spugne distinte sono stati selezionati tra quelli che si sono mostrati più efficaci nell'inibire la crescita dei ceppi target per procedere con l'estrazione di molecole bioattive. Le loro caratteristiche generali sono riassunte in Tabella 5.

Tabella 5. Ceppi selezionati per l'estrazione di molecole bioattive.

Ceppo	Spugna	E	M	B	Pr
<i>Arthrobacter</i> sp. Pli280	<i>Plicatellopsis</i>	+	+	+	-
<i>Psychrobacter</i> sp. A265	<i>Artemisina</i>	+	+	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CAL381	<i>Tedania</i>	+	-	-	(+)

Come descritto nei Materiali e Metodi, per l'estrazione sono state effettuate diverse prove di crescita facendo variare il pH e il volume di terreno, nonché la temperatura di incubazione (sia del ceppo antartico che del microrganismo target). In generale, i risultati migliori sono stati ottenuti incubando il ceppo antartico a 15 °C nel terreno a pH neutro. Il variare del volume iniziale della coltura e della temperatura di incubazione

delle piastre inoculate col ceppo bersaglio sono apparsi determinanti per ottimizzare l'attività degli estratti. Inizialmente, l'attività è stata testata per gli estratti ottenuti da colture da 50 e 100 ml dei ceppi *Psychrobacter* sp. A265 e *Arthrobacter* sp. Pli280, entrambi nei confronti di *M. luteus* e *E. coli*, ed incubando a 28 °C le piastre già inoculate con il microorganismo target. Come mostrato in Tabella 6, in queste condizioni l'estratto di *Psychrobacter* sp. A265 ha dato risposta positiva solo nei confronti di *E. coli*, producendo un alone di inibizione avente un diametro di 1 o 4 mm. Al contrario, *Arthrobacter* sp. Pli280 ha mostrato di inibire solo debolmente la crescita di *M. luteus*.

Tabella 6. Misure del diametro (in mm) dell'alone di inibizione prodotto dall'estratto ottenuto da colture da 50 e 100 ml e incubazione del target a 28°C. (**E**: *E. coli*; **M**: *M. luteus*).

Ceppo vs Target	Volume coltura(µl)	
	20	50
<i>Psychrobacter</i> sp. A265 vs E		4
<i>Psychrobacter</i> sp. A265 vs M	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp. Pli280 vs E	-	-
<i>Arthrobacter</i> sp. Pli280 vs M	<1	<1

Sulla base di tali risultati preliminari, si è deciso di estrarre le eventuali molecole ad attività antibiotica da un volume maggiore (300 ml) di coltura iniziale, mantenendo le condizioni di crescita ottimali (pH 7, 15 °C). Gli estratti ricavati dalle colture sono stati testati nei confronti dei target *E. coli*, *M. luteus* e *B. subtilis* tenendo conto dei risultati ottenuti dallo screening iniziale e incubando le piastre inoculate con il target a 28 °C. L'estratto del ceppo *Psychrobacter* sp. A265 ha prodotto gli aloni di inibizione più ampi utilizzando aliquote da 20 e 50 µl (Tabella 7) e *E. coli* come target. Per tale ceppo, pertanto, l'aliquota da 100 µl non è stata presa in considerazione. In particolare, è stato osservato un doppio alone di inibizione probabilmente dovuto alla presenza di varianti più resistenti nella stessa coltura di *E.coli* o alla produzione di due diverse molecole bioattive. Al contrario, l'estratto dalla coltura del ceppo *Arthrobacter* sp. Pli280 ha dato risultati migliori testando l'aliquota da 100 µl sia nei confronti di *M. luteus* che *B. subtilis* (rispettivamente 3 e 2,5 mm). Infine, l'estratto di *Pseudoalteromonas* sp.

CAL381 ha dato risultati insoddisfacenti poiché ha sempre prodotto aloni deboli e non facilmente misurabili (< 1 mm). Un'ulteriore prova è stata condotta testando 100 µl di estratto a 37°C (temperatura ottimale di crescita dei microrganismi target). Come è possibile notare in Tabella 7, gli estratti dei tre ceppi (per tutti 100 µl) hanno dato risposte differenti. Nel caso dei ceppi *Psychrobacter* sp. A265 e *Arthrobacter* sp. Pli280 la temperatura più elevata sembra aver ridotto l'efficienza di inibizione, facendo pensare alla produzione di molecole bioattive termolabili. Al contrario, per il ceppo *Pseudoalteromonas* sp. CAL381 la differente temperatura di inibizione non ha avuto influenza sull'attività inibitoria dell'estratto.

Tabella 7. Misure del diametro (in mm) dell'alone di inibizione. Per il ceppo *Psychrobacter* sp. A265 erano presenti due aloni, distinti dall'apice ^l (alone minore) e ^p (alone maggiore). (**E**: *E. coli*; **M**: *M. luteus*; **Pr**: *P. mirabilis*; **B**: *B. subtilis*; nd: non determinato).

Ceppo vs Target	28°C			37°C
	20 µl	50 µl	100 µl	100 µl
<i>Psychrobacter</i> sp. A265 vs E	3 ^l	9 ^l	nd	3
	7 ^p	12 ^p	nd	
<i>Psychrobacter</i> sp. A265 vs M	nd	nd	nd	3
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CAL381 vs E	<1	<1	nd	<1
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. CAL381 vs Pr	<1	<1	nd	2
<i>Arthrobacter</i> sp. Pli280 vs M	<1	1	3	<1
<i>Arthrobacter</i> sp. Pli280 vs B	<1	1,5	2,5	<1



Figura 19. Antibiogramma dell'estratto ricavato dalla coltura di *Psychrobacter* sp. A265 in cui è stato inoculato *E.coli*. Sono presenti 4 dischetti, di cui uno imbibito di solo etilacetato (**B**) e gli altri con due aliquote diverse di estratto (20 e 50 μ l). È visibile un doppio alone di inibizione.

.III.3.2.a. Caratterizzazione dell'estratto

L'applicazione della TLC ha permesso di separare e individuare, mediante opportuni coloranti (Figura 20) e visione ai raggi UV 547 (Figura 21), le componenti glucidiche e proteiche dell'estratto, visibili sotto forma di spot di colore giallo e rosa rispettivamente. Tra gli estratti dei diversi ceppi, quello ottenuto da *Pseudoalteomonas* sp. CAL381 ha mostrato maggiore intensità facendo presupporre quindi una maggiore quantità.

La tecnica ha permesso la separazione delle frazioni glucidiche e proteiche degli estratti in relazione fra loro e con il "bianco" ottenuto dal processo di estrazione sul brodo di coltura sterile; ciascun estratto era caratterizzato da un pattern specifico alle diverse prove, con bande specifiche a diversa migrazione, determinando l'eterogeneità molecolare tra i tre estratti.



Figura 20. Separazione e colorazione delle frazioni proteiche (a sinistra) e glucidiche (a destra) evidenziate mediante ninidrina ed anisaldeide degli estratti di *Psychrobacter* sp. A265(A), di *Pseudoalteromonas* sp. CAL381 (T) e di *Arthrobacter* sp. Pli280(P).

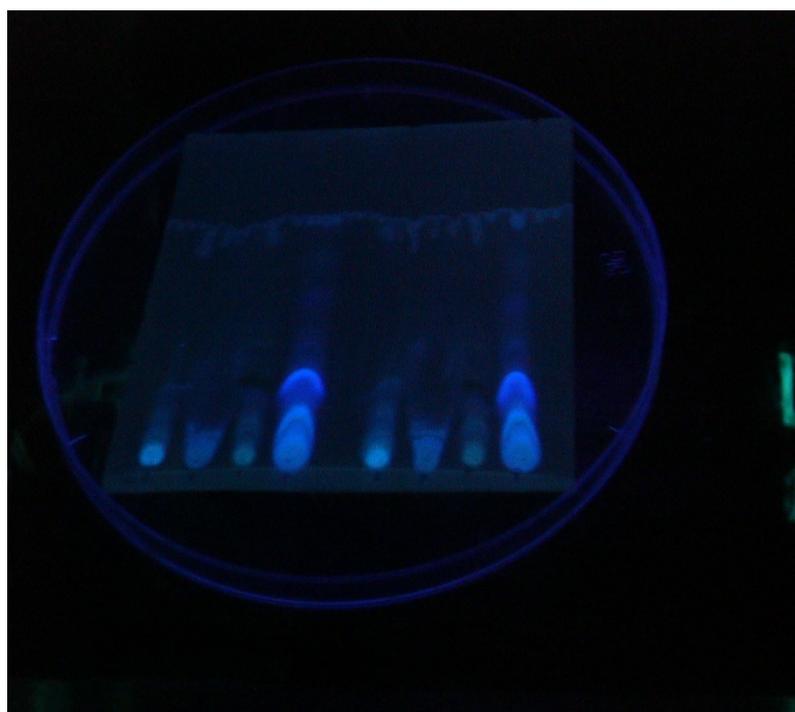


Figura 21. Separazione delle frazioni degli estratti visibili ai raggi UV.547

III.3.3. Valutazione bioattività esopoliccaridi

I saggi effettuati alla ricerca della Minima Concentrazione Inibente (M.I.C.) degli esoprodotti non hanno dato alcun risultato di attività dell'estratto, evidenziato dall'assenza di inibizione della crescita batterica dei ceppi patogeni alle diverse concentrazioni degli estratti.

Tabella 8. Risultati delle M.I.C. degli esoprodotti verso i ceppi patogeni Gram positivi (n.a.: non attivo).

	<i>S. aureus</i> ATCC 29213	<i>S. aureus</i> isolato clinico 052/146	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. faecalis</i> isolato clinico 032/130/2
Cal366	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cal403	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TB 41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Tabella 9. Risultati delle M.I.C. degli esoprodotti verso i ceppi patogeni Gram negativi (n.a.: non attivo).

	<i>E. coli</i> ATCC 35218	<i>E.coli</i> isolato clinico 032/129	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>P. aeruginosa</i> isolato clinico 019/087	<i>P. mirabilis</i> isolato clinico 050/074	<i>K.pneumoniae</i> isolato clinico 019/104	<i>S. enterica</i> isolato clinico 047/068
Cal366	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Cal403	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
TB 41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

I valori della CD50 sono riportati in tabella:

Tabella10. Valori di citossicità espressi in µg/ml

	HFF-1	VERO
Cal 366	20,3	163
Cal 403	85	175
Tb41	1000	500

I risultati dei saggi di attività antivirale sono riportati in tabella:

Tabella11. Valutazione attività antivirale degli esopolisaccaridi. (*n.a.* non attivo, *n.t.* non testato)

	HSV1	ECHO9	CMV	POLIO1	COX-B1	H1N1
Cal 366	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.t.
Cal 403	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Tb41	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

III.3.4. Valutazione bioattività pigmenti

La valutazione dell'attività antibatterica del pigmento estratto dal ceppo Pli 280 è riportato nella tabella:

Tabella 12. Valutazione attività antibatterica del pigmento Pli 280 (*n.a.* non attivo)

	Pli 280
<i>S. aureus ATCC</i>	n.a.
<i>E.coli ATCC</i>	n.a.
<i>E.aerogenes I.C.</i>	n.a.
<i>P.aeruginosa ATCC</i>	n.a.

III.3.5. Identificazione dei ceppi con attività inibitoria.

Il protocollo di PCR ha dato esito positivo per l'amplificazione del 16S rDNA di 126 ceppi tra i 164 che hanno mostrato di possedere attività antibiotica (Tabella 3). Essi sono in predominanza Gammaproteobatteri (65,9%), seguiti da Attinobatteri (28,6%) e in minor misura da Firmicutes (2,4%), Bacteroidetes (2,4%) e Alfacaproteobatteri (0,7%) (Figura 20).

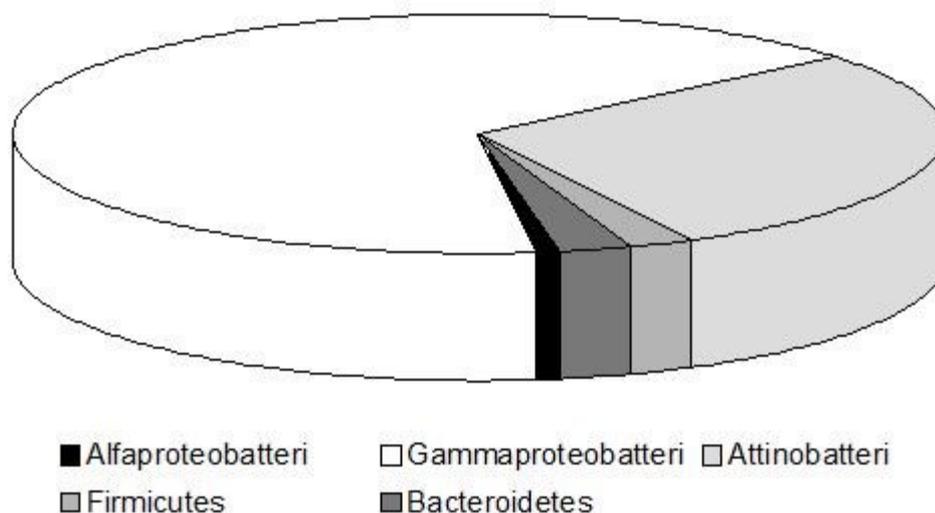


Figura 22. Inibizione dei ceppi target ad opera di batteri antartici (**E:** *E. coli*; **P:** *P. aeruginosa*; **S:** *S. aureus*; **M:** *M. luteus*; **B:** *B. subtilis*; **Pr:** *P. mirabilis*; **Sal:** *S. enterica*).

In particolare, i Gammaproteobatteri sono in massima parte affiliati al genere *Pseudoalteromonas* (52 isolati), *Psychrobacter* (13 isolati) e *Shewanella* (8 isolati). Il genere *Arthrobacter* (29 ceppi attivi) è apparso predominante tra gli Attinobatteri. In generale, i rimanenti generi riscontrati sono stati rappresentati da 1 a 3 isolati.

Tabella 13. Affiliazione filogenetica dei ceppi con attività inibitoria (**ALF:** Alfaproteobatteri; **GAM:** Gammaproteobatteri; **BAC:** Bacteroidetes; **ACT:** Attinobatteri; **FIR:** Firmicutes).

Origine	Ceppo	Ceppo più vicino dopo allineamento in GenBank (AN, microrganismo)	Phylum o classe	Sim (%)
<i>Artemisina</i>	236	JF711015, <i>Stenotrophomonas rhizophila</i> PCA_13	GAM	99
	A265 , 266	NR043079, <i>Psychrobacter cryohalolentis</i> K5	GAM	99
	250	JF505957, <i>Arthrobacter sulfonivorans</i> KNUC9023	ACT	99
	264	AB680853, <i>Sporosarcina psychrophila</i> NBRC 15381	FIR	99
<i>Anoxycalyx</i>	TB41	HQ848047, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. CE6	GAM	99

	TB42		DQ642813, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 10	GAM	99
	TB76		EU681019, <i>Pseudomonas</i> sp. W15Feb36	GAM	99
<i>Calyx</i>	CAL291, CAL300		FR691390, <i>Arthrobacter flavus</i> R- 43110	ACT	98
	CAL296		AB166906, <i>Halomonas</i> sp. SYO J52	GAM	99
<i>Chlatria</i>	408		AB680359, <i>Pseudoalteromonas</i> NBRC 12985	GAM	99
<i>Haliclona</i>	CAL89, CAL90, 151, 152		EF093124, <i>Arthrobacter</i> sp. VTT E- 052916	ACT	100
	CAL108, CAL110		FJ196024, <i>Leifsonia</i> sp. ZS3-10-1	ACT	98
	153		FJ999947, <i>Micrococcus luteus</i> EQH18	ACT	98
	172		EU305672, <i>Citricoccus</i> sp. FS24	ACT	98
	173		EU239169, <i>Microbacterium oxydans</i> KNUC334	ACT	99
	174		FJ169470, <i>Microbacterium oxydans</i>	ACT	99
	CAL100		EU237132, <i>Psychrobacter</i> sp. TB 40	GAM	99
	169		FN377742, <i>Psychrobacter</i> sp. KB3-14	GAM	99
	GW166, GW167, GW205, 146, 149		FJ161365, <i>Psychrobacter nivimaris</i> D7084	GAM	99
	GW202		EU090718, <i>Psychrobacter</i> <i>cryohalolentis</i> KOPRI22219	GAM	100

CAL102	DQ652554, <i>Shewanella</i> sp. D64	GAM	99
CAL109	DQ533968, <i>Shewanella</i> sp. ice-oil-417	GAM	99
171	FJ626841, <i>Shewanella</i> sp. 33B	GAM	99
GW168	FJ594949, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. Mn13	GAM	99
GW170, GW193, GW196,	FJ161250, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. D4011	GAM	99
CAL107			
GW191, GW201, 143	GQ149233, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ArcN81.11	GAM	99
148, 168	EF613488, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. NJ70	GAM	99
GW163, GW172	GU166126, <i>Colwellia</i> sp. BSw20736	GAM	99
CAL567, <i>Haliclonissa</i> CAL569, CAL652	GQ454842, <i>Arthrobacter</i> sp. VUG-A15	ACT	99
CAL576, CAL580, CAL594,			
CAL602, CAL625, CAL626,	FR682669, <i>Arthrobacter flavus</i> R-36538	ACT	99
CAL632, CAL634, CAL640,			

CAL641, CAL644				
CAL618, CAL622, CAL637, CAL639		FR691390, <i>Arthrobacter flavus</i>	ACT	99
CAL645		FR682669, <i>Arthrobacter flavus</i>	ACT	99
CAL613		FJ435350, <i>Rhodococcus</i> sp. H2	ACT	100
CAL604, CAL615		EU000237, <i>Shewanella donghaensis</i> KOPRI_22224	GAM	99
CAL617		AB003190, <i>Shewanella</i> sp. SC2A	GAM	99
CAL629, CAL656		DQ060402, <i>Marinobacter</i> <i>psychrophilus</i> BSi20041	GAM	99
CAL633		AY167267, <i>Marinobacter</i> sp. ANT8277	GAM	99
CAL646, CAL577		NR025822, <i>Gillisia mitskevichiae</i> strain KMM 6034	BAC	99
<i>Lyssodendoryx</i>	TB18	FM955861, <i>Arthrobacter oxydans</i> strain Asd M3-4	ACT	99
	TB13	AY657017, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 41	GAM	99
	TB17	HM584485, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. Z18-3	GAM	99
<i>Phorbas</i>	449	EU135677, <i>Planococcus</i> sp. YIM C738	FIR	98
	GW83	EU237146, <i>Sphingopyxis</i> sp. TB 82	ALF	98
	AC248	FJ161250, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. D4011	GAM	98

	447, 448	GQ149232, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. ArcB84A	GAM	98
	GW92, GW97	FJ161365, <i>Psychrobacter nivimaris</i> D7084	GAM	98
	GW95, GW107	FJ196010, <i>Shewanella</i> sp., NF1-13	GAM	96
	GW109	AY536572, <i>Alteromonas</i> sp. WED7C	GAM	99
<i>Plicatellopsis</i>	Pli280	NR026448, <i>Arthrobacter rhombi</i> strain F98.3H69	ACT	98
<i>Tedania</i>	CAL427	AF041789, <i>Arthrobacter</i> sp. S23H2	ACT	99
	GW128	Y08540, <i>Janibacter thuringensis</i>	FIR	99
	CAL326, CAL335, CAL336, CAL362, CAL363, CAL410, GW130, GW131, GW132, CAL366	EF382701, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. BSi20430	GAM	99
	CAL330, CAL390, CAL392, CAL407, CAL364, CAL371	AY664266, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. JL- BS-J24	GAM	100
	CAL337, CAL341,	NR043959, <i>Pseudoalteromonas artica</i>	GAM	99

CAL351,	strain A37-1-2		
CAL381,			
CAL386,			
CAL352,			
CAL368,			
CAL373,			
CAL381			
<hr/>			
CAL380,			
CAL391,			
CAL404,	AY657017, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. 41	GAM	99
CAL416,			
CAL374,			
CAL380			
<hr/>			
CAL399,			
CAL403,	EF156750, <i>Pseudoalteromonas</i> sp. J22	GAM	99
CAL442			
<hr/>			
5	AB094794, <i>Psychrobacter okhotskensis</i>	GAM	99
<hr/>			
GW143	AY771721, <i>Vibrio logei</i> isolate S3-6	GAM	99
<hr/>			
CAL384	DQ073103, <i>Psychroserpens</i> sp. TW- JL-49	BAC	98

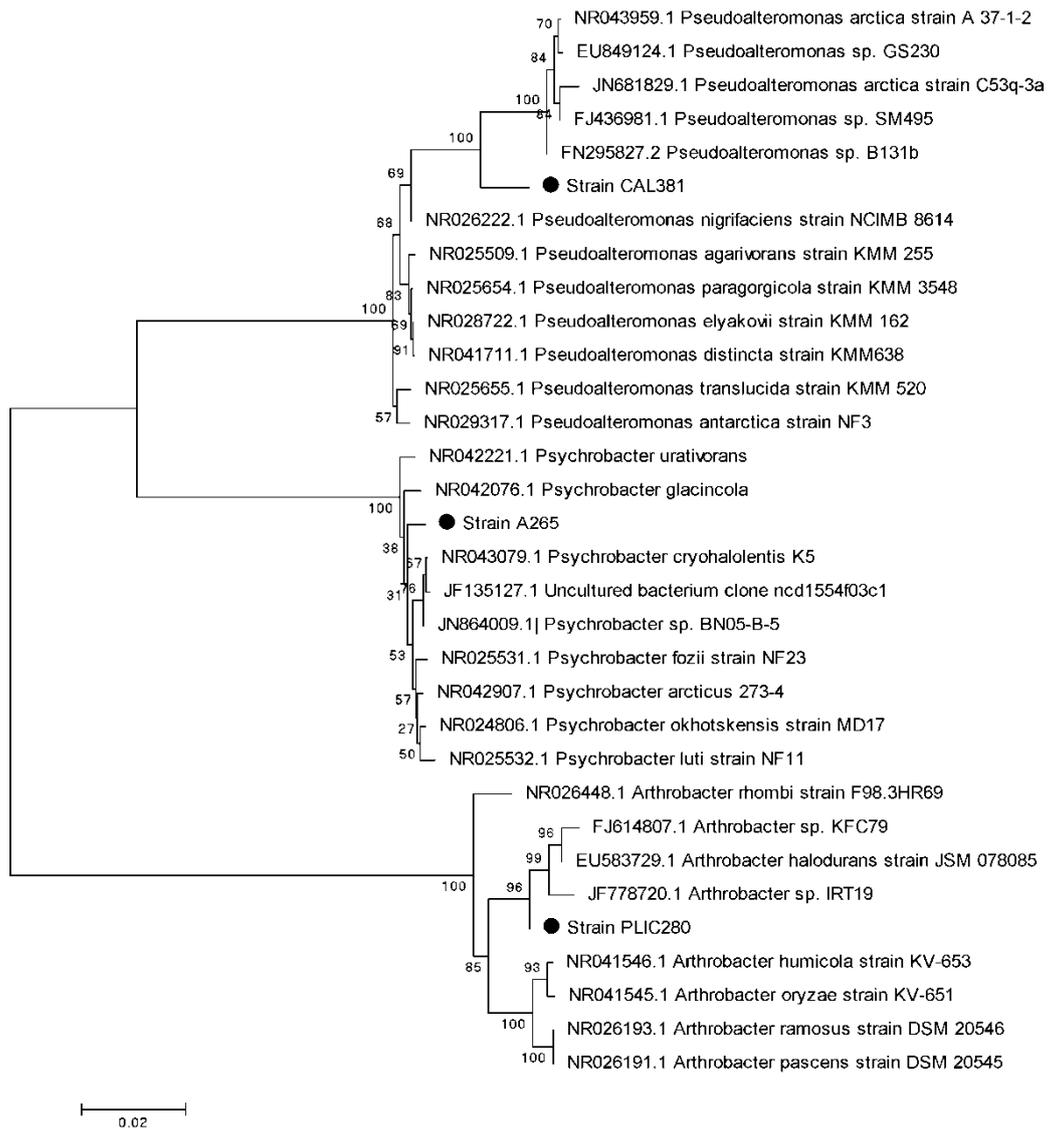


Figura 23. Albero filogenetico per i ceppi *Pseudoalteromonas* sp. CAL381, *Psychrobacter* sp. A265 e *Arthrobacter* sp. Pli280.

II.4. Discussione

Ciascuno degli 833 ceppi antartici analizzati è stato esaminato per la sua capacità di inibire la crescita di *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *P. mirabilis* e *S. enterica*. I 164 ceppi attivi inibivano in massima parte microrganismi Gram-negativi, piuttosto che Gram-positivi. Questo risultato potrebbe essere una conseguenza della predominanza di batteri Gram-negativi nell'ambiente marino, incluso quello antartico, tanto da determinare una più efficace attività antagonista nei loro confronti. La percentuale di ceppi antartici attivi nei confronti di almeno un microrganismo bersaglio (19,4 %) è apparsa comparabile, o addirittura superiore, con quelle riportate in letteratura. Ad esempio, in uno studio effettuato su 238 batteri associati a due spugne del Mediterraneo, Hentschel *et al.* [103] hanno determinato una percentuale di ceppi con attività pari all'11,3%, mentre Nair e Simidu [104] hanno riportato che il 13,3% dei ceppi batterici *free-living* testati inibivano la crescita di *S. aureus*. Percentuali superiori sono state ottenute da Ivanova *et al.* [92] e da Zheng *et al.* [105], rispettivamente il 26 ed il 28% di isolati attivi da varie fonti marine. Per quanto riguarda le conoscenze pregresse sull'attività antibiotica di ceppi antartici, la percentuale di batteri attivi determinata nel presente studio è apparsa superiore a quella riportata da O'Brien *et al.* (0,29%)[106] e Lo Giudice *et al.* 3,8%[107] per ceppi batterici isolati rispettivamente da suolo e acqua di mare; questo ultimo risultato indica che microambienti, quali le spugne, all'interno dei quali l'antagonismo microbico (per lo spazio e il cibo) è più accentuato possano costituire una valida fonte di microrganismi con attività antibiotica. In effetti, l'attività antimicrobica è generalmente più comune per batteri associati a superfici o particelle, piuttosto che per quelli a vita libera. Studi recenti condotti da Romoli *et al.* [108] e Papaleo *et al.* [52] sugli isolati dalle spugne *L. nobilis*, *A. joubini* e *H. verrucosa* (ceppi utilizzati anche nell'ambito di questa tesi) hanno messo in evidenza la capacità di tali ceppi di inibire la crescita anche di patogeni opportunisti della fibrosi cistica facenti parte del complesso della *Burkholderia cepacia* (Bcc). Inoltre, gli stessi autori hanno dimostrato che le molecole ad attività antibiotica sono in alcuni casi di natura volatile. Tali risultati dovrebbero generare un maggiore stimolo allo sviluppo della ricerca in questo settore.

I ceppi attivi sono stati identificati mediante sequenziamento ed analisi del 16S rDNA. Si è trattato in massima parte di Gammaproteobatteri e Attinobatteri, entrambi gruppi filogenetici ben noti come produttori di composti biologicamente attivi. Tra i Gammaproteobatteri, membri del genere *Pseudoalteromonas* sono riconosciuti come produttori di antibiotici. Sobolevskaya *et al.* [109] e Zheng *et al.* [105] hanno riportato di composti antimicrobici estratti da ceppi di *Pseudoalteromonas* isolati da spugne marine, mentre Isnansetyo e Kamei [110] hanno caratterizzato il batterio *P. phenolica* in grado di produrre sostanze antibiotiche contro *S. aureus* meticillina-resistente. L'attività antimicrobica è stata spesso associata a specie di *Pseudomonas*, tuttavia, soltanto un ceppo (TB76) tra quelli testati, isolato dalla spugna *A. joubini*, appartiene a questo genere. Così come riportato nei risultati, tra gli Attinobatteri con attività antibiotica prevalgono membri del genere *Arthrobacter*. Tale dato è in accordo con quanto riportato da altri autori. Henschel *et al.* [103] hanno osservato l'effetto inibitorio di membri di tale genere contro *S. aureus*. Altri due membri di *Arthrobacter* con attività antimicrobica sono stati isolati dal suolo da Kamigiri *et al.* [111] e O'Brien *et al.* [106].

Come già osservato da Grossart *et al.* [112] per i batteri isolati da aggregati organici, e da Lo Giudice *et al.* [107,113] per i batteri marini antartici, isolati strettamente correlati hanno mostrato alcune differenze nell'attività inibitoria. Questi risultati suggeriscono che l'attività inibitoria possa essere più probabilmente ceppo-specifica piuttosto che specie-specifica e che la singola specie sia in grado di produrre composti diversi che agiscono su bersagli differenti.

Tenendo conto delle diverse prove di crescita effettuate, i risultati migliori sono stati ottenuti facendo crescere i ceppi antartici nel terreno di coltura a pH 7 e incubando le colture a 15°C. Pertanto, le prove successive sono state condotte mantenendo tali condizioni ottimali.

Per quanto riguarda l'attività antibatterica valutata sul pigmento estratto da Pli280, non è risultata attiva verso nessun ceppo testato. L'estratto in etilacetato ha dimostrato invece di conservare l'attività antibatterica rilevata mediante il metodo dello striscio perpendicolare. La natura quindi della molecola ad attività inibitoria è da escludere sia lipidica o comunque di natura pigmentata.

Per quanto riguarda l'attività antimicrobica degli EPS durante lo svolgimento di questa tesi non è stata riscontrata alcuna attività antibatterica né antivirale. I prodotti da ceppi

di *Pseudolateromonas spp.*, in letteratura è riportata l'attività antibatterica nei confronti di *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus faecalis* e *Proteus vulgaris* e solo *E. aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *M. luteus* hanno mostrato sensibilità nei confronti degli EPS e l'inibizione della crescita sembra essere nettamente maggiore nei confronti dei batteri Gram-negativi rispetto a quelli Gram-positivi. Il ceppo il ceppo TB 41 appartenente a tale genere e presente in questo lavoro di tesi, ha mostrato una grande potenzialità nel produrre sostanze di natura volati (VOC) capaci di inibire ceppi patogeni appartenenti al gruppo della *Burkholderia Cepacia*. [52]. Nonostante la potenzialità dei ceppi, gli esoprodotti estratti da tali ceppi non hanno dimostrato avere alcuna attività antimicrobica, che dovrà pertanto essere ricercata in prodotti microbici di altra natura.

Di particolare interesse è apparso, come accennato in precedenza, il ceppo *Psychrobacter* sp. A265. Ciò per diversi motivi tra cui il diametro degli aloni di inibizione prodotti e la presenza di un doppio alone probabilmente dovuto alla presenza di varianti più resistenti nella stessa coltura di *E. coli* o alla produzione di due diverse molecole bioattive. Inoltre, ad oggi la capacità di *Psychrobacter spp.* di inibire microrganismi di origine terrestre è stata riportata solo in rari casi (Lo Giudice *et al.*, 2007; Papaleo *et al.*, 2012), tanto da far supporre che si tratti di molecole bioattive ancora sconosciute. Tuttavia, i diametri degli aloni di inibizione prodotti dagli estratti di *Psychrobacter* sp. A265 (come anche quello di *Arthrobacter* sp. Pli280) sono risultati meno ampi dopo un'incubazione a 37°C, facendo pensare alla produzione di molecole bioattive termolabili. Al contrario, per il ceppo *Pseudoalteromonas* sp. CAL381 la differente temperatura di incubazione non ha avuto influenza sull'attività inibitoria dell'estratto.

Infine, l'applicazione della TLC per la preliminare caratterizzazione delle molecole estratte fa supporre che esse siano di natura glicoproteica.

In conclusione, l'isolamento e la caratterizzazione di ceppi antartici in grado di inibire la crescita di microrganismi terrestri, alcuni dei quali potenzialmente patogeni per l'uomo, evidenzia il potenziale utilizzo di batteri adattati alle basse temperature come nuova fonte di antibiotici di interesse farmaceutico. L'Antartide potrebbe rappresentare un ambiente non ancora sfruttato per la scoperta di microrganismi di interesse biotecnologico.

II.5. Bibliografia

1. Bergquist, P. R. (1978). Sponges. Hutchinson and Co. Ltd., London, United Kingdom.
2. Dayton, P. K. (1974). Biological accommodation in the benthic community at McMurdo Sound, Antarctica. *Ecol. Monogr.* 44:105–128.
3. Reiswig H.M. (1973). Population dynamics of three Jamaican Demospongiae. *Bull Mar Sci* 23: 191-226
4. Wenner E.L., Knott D.M., Van Dolah R.F., Burrell V.G. (1983). Invertebrate communities associated with hard bottom habitats in South Atlantic Bight. *Estuar Coast Shelf Sci* 17: 143-158
5. Targett N.M., Schahl G.P. (1984). Chemical ecology and distribution of sponges in the Salt River Canyon, St. Croix, U.S.V.I. NOAA Technical Memorandum OAR NURP-1, Rockville, MD; p 361-369
6. Turon, X., J. Galera, and M. J. Uriz. 1997. Clearance rates and aquiferous systems in two sponges with contrasting life-history strategies. *J. Exp. Zool.* 278:22–36.
7. Belarbi E., Gomez H.A.C., Chisti Y., Camacho F.G., Grima E.M., (2003). Producing Drugs from Marine Sponges, *Biotechnol. Adv.*, 21: 585-598.
8. Pawlik J. R, McFall G., Zea S.(2002), Does the Odor from Sponges of the Genus *Ircinia* Protect them from Fish Predators? *J. Chem. Ecol.*, 28:1103-1115.
9. Davis A. R., Butler A.J., van Altna I.(1991) . Settlement Behaviour of Ascidian Larvae: Preliminary Evidence for Inhibition by Sponge Allelochemicals, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 72: 117-123.
10. Becerro, M. A., Turon X., Uriz M.J.,(1997) . Multiple Functions for Secondary Metabolites in Encrusting Marine Invertebrates, *J. Chem. Ecol.*, 23: 1527-1547.

11. Thiel V., Imhoff J.F. (2003). Phylogenetic identification of bacteria with antimicrobial activities isolated from Mediterranean sponges. *Biomolecular Engineering*, 20: 421- 423
12. Radjasa O. K., Martens T., Grossart H.P., Brinkoff T., Sabdono A., Simon M. (2007). Antagonistic Activity of a Marine Bacterium 152 . *J. Biol. Sci.*, 7:2, 239-246.
13. Wilkinson, C. R. (1978). Microbial associations in sponges. II. Numerical analysis of sponge and water bacterial populations. *Mar Biol* 49, 169-176.
14. Webster N.S., Hill R.T. (2001). The culturable microbial community of the Great Barrier Reef sponge *Rhopaloeides odorabile* is dominated by an alpha-Proteobacterium. *Marine Biology*, 138: 843-851.
15. Fuerst, J. A., Webb, R. I., Garson, M. J., Hardy, L., Reisdig, H. M. (1999). Membrane-bounded nuclear bodies in a diverse range of microbial symbionts of Great Barrier Reef sponges. *Mem Queensl Mus* 44, 193-203.
16. Lee, Y. K., Lee, J.-H. , Lee, H. K. (2001). Microbial symbiosis in marine sponges. *J Microbiol* 39, 254-264.
17. Vacelet, J. (1970). Description de cellules à bactéries intranucléaires chez des éponges *Verongia*. *J Microsc (Paris)* 9, 333-346.
18. Friedrich A.B., Merkert H., Fendert T., Hacker J., Proksch P., Hentschel U. (1999). Microbial diversity in the marine sponge *Aplysina cavernicola* (formerly *Verongia cavernicola*) analyzed by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Marine Biology*, 134: 461-470.
19. Borowitzka, M. A., Hinde, R., Pironet, F. (1988). Carbon fixation by the sponge *Dysidea herbacea* and its endosymbiont *Oscillatoria spongelliae*. In *Proceedings of the 6th International Coral Reef Symposium*, pp. 151-155. Edited by J. H. Choat, D. J. Barnes, M. A. Borowitzka & other authors. Townsville, Australia: Symposium Executive Committee.
20. Wilkinson, C. R., Nowak, M., Austin, B., Colwell, R. R. (1981). Specificity of bacterial symbionts in Mediterranean and Great Barrier Reef sponges. *Microb Ecol* 7, 13- 21.

21. Wilkinson, C. R. (1978c). Microbial associations in sponges. I. Ecology, physiology and microbial populations of coral reef sponges. *Mar Biol* 49, 161-167.
22. Shick, J. M., Dunlap, W. C. (2002). Mycosporine-like amino acids and related gadusols: biosynthesis, accumulation, and UV-protective functions in aquatic organisms. *Annu Rev Physiol* 64, 223-262.
23. Schmidt, E. W., Obraztsova, A. Y., Davidson, S. K., Faulkner, D. J., Haygood, M. G. (2000). Identification of the antifungal peptide-containing symbiont of the marine sponge *Theonella swinhoei* as a novel delta-proteobacterium, "*Candidatus Entotheonella palauensis*". *Mar Biol* 136, 969-977.
24. Kennedy, J., P. Baker, C. Piper, P. D. Cotter, M. Walsh, M. J. Mooij, M. B. Bourke, M. C. Rea, P. M. O'Connor, R. P. Ross, C. Hill, F. O'Gara, J. R. Marchesi, A. D. W. Dobson, (2009). Isolation and Analysis of Bacteria with Antimicrobial Activities from the Marine Sponge *Haliclona simulans* Collected from Irish Waters. *Mar Biotechnol* 11:384-396
25. Staley, J. T., Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 39, 321-346.
26. Hentschel, U., Hopke, J., Horn, M., Friedrich, A.B., Wagner, M., Hacker, J., Moore, B.S., 2002. Molecular Evidence for a Uniform Microbial Community in Sponges from Different Oceans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 4431-4440.
27. Maneerat, S., (2005). Biosurfactants from marine microorganisms. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 27: 1263-1272.
28. Debashish, G., S. Malay, S. Barindra and M. Joydeep, (2005). Marine enzymes. *Mar. Biotechnol.*, 96: 189-218.
29. Baharum, S.N., M.R. Sulung, R.N.Z.R.A. Rahman, A.B. Salleh and M. Basri, (2006.) Organic Solvent Tolerant Lipases. In: *New Lipases and Proteases*, Salleh, A.B., R.N.Z.R.A. Rahman and M. Basri (Eds.). Nova Science Publishers Inc., New York.
30. Zhao, Y., R.D. Park and R.A.A. Muzzarelli, (2010). Chitin deacetylases: Properties and applications. *Mar. Drugs*, 8: 24-46.

31. Yu, Y., H. Li, Y. Zeng and B. Chen, (2009). Extracellular enzymes of cold-adapted bacteria from Arctic sea ice, Canada Basin. *Polar Biol.*, 32: 1539-1547.
32. Al-Khudary, R., R. Venkatachalam, M. Katzer, S. Elleuche and G. Antranikian, (2010). A cold-adapted esterase of a novel marine isolate, *Pseudoalteromonas arctica*: Gene cloning, enzyme purification and characterization. *Extremophiles*, 14: 273-285.
33. Suzuki, T., T. Nakayama, D.W. Choo, Y. Hirano, T. Kurihara and T. Nishino, (2003). Esaki N: Cloning, heterologous expression, renaturation and characterization of a cold-adapted esterase with unique primary structure from a psychrotroph *Pseudomonas* sp. strain B11-1. *Protein Expression Purification*, 30: 171-178.
34. Suzuki, T., T. Nakayama, T. Kurihara, T. Nishino and N. Esaki, (2001). Cold-active lipolytic activity of psychrotrophic *Acinetobacter* sp. strain no. 6. *J. Biosci. Bioeng.*, 92: 144-148.
35. Li, J., F. Han, X. Lu, X. Fu, C. Ma, Y. Chu and W. Yu, (2007). A simple method of preparing diverse neoagaro-oligosaccharides with beta-agarase. *Carbohydr. Res.*, 342: 1030-1033.
36. Gallardo, G.L., M. Butler, M.L. Gallo, M.A. Rodriguez, M.N. Eberlin and G.M. Cabrera, (2006.) Antimicrobial metabolites produced by an intertidal *Acremonium furcatum*. *Phytochemistry*, 67: 2403-2410.
37. Podar, M. and A.L. Reysenbach, (2006). New opportunities revealed by biotechnological explorations of extremophiles. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 17: 250-255.
38. Stetter, K.O., (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Lett.*, 452: 22-25.
39. Margesin, R., G. Neuner and K.B. Storey, (2007). Cold-loving microbes, plants, and animals fundamental and applied aspects. *Naturwissenschaften*, 94: 77-99.
40. D'Amico S., T. Collins, J.C. Marx, G. Feller, C. Gerday (2006). Psychrophilic microorganisms: challenger for life. *EMBO reports* 7: 385-389.
41. Nichols D., P.D. Nichols, T.A. McMeekin (1993). Polyunsaturated fatty acids in Antarctic bacteria. *Antarctic Science*, 5 (2): 149-160.

42. Michel, V., I. Lehoux, G. Depret, P. Anglade, J. Labadie and M. Hebraud, (1997). The cold shock response of the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas fragi* involves four low-molecular-mass nucleic acid binding proteins. *J. Bacteriol.*, 23: 7331-7342.
43. Gilbert J.A., P.J. Hill, C.E. Dodd, J. Laybourn-Parry (2004). Demonstration of antifreeze protein activity in Antarctic lake bacteria. *Microbiology*, 150: 171-180.
44. Mancuso Nichols C.A., J.P. Bowman, J. Guézennec (2005b). Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3519-352.
45. Nichols D., J. Bowman, K. Sanderson, C. Mancuso Nichols, T. Lewis, T. McMeekin, P. Nichols (1999). Development with Antarctic microorganisms: culture collections, bioactivity screening, taxonomy, PUFA production and cold-adapted enzymes. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 240-246.
46. Gerday C., M. Aittaleb, M. Bentahir, J.P. Chessa, P. Claverie, T. Collins, S. D'Amico, J. Dumont, G. Garsoux, D. Georgette, A. Hoyoux, T. Lonhienne, M.A. Meuwis, G. Feller (2000). Cold-adapted enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 18: 103-107.
47. Marx J.G., S.D. Carpenter, J.W. Deming (2009). Production of cryoprotectant extracellular polysaccharide substance (EPS) by the marine psychrophilic bacterium *Colwellia psychrerythraea* strain 34H under extreme conditions. *Canadian Journal of Microbiology*, 55: 63-72.
48. Bavestrello G., Arillo A., Calcinai B., Cattaneo-Vietti R., Cerrano C., Gaino E., Penna A., Sarà M. (2000). Parasitic diatoms inside Antarctic sponges. *Biological Bulletin*, 198: 29-33.
49. Cerrano C., Calcinai B., Cucchiari E., Di Camillo C., Nigro M., Regoli F., Sarà A., Schiapparelli S., Totti C., Bavestrello G. (2004). Are diatoms a food source for Antarctic sponges. *Chemistry and Ecology*, 20: 57-64.
50. Regoli F., Nigro M., Chierici E., Cerrano C., Schiapparelli S., Totti C., Bavestrello G. (2004). Variations of antioxidant efficiency and presence of endosymbiotic diatoms

in the Antarctic sponge *Haliclona dancoi*. *Marine Environmental Research*, 58: 637-640.

51. Webster N.S., Negri A.P., Munro M.M.H.G., Battershill C.N. (2004). Diverse microbial communities inhabit Antarctic sponges. *Environmental Microbiology*, 6: 288-300.

52. Papaleo, Maria Cristiana, et al. "Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against Burkholderia cepacia complex bacteria." *Biotechnology advances* 30.1 (2012): 272-293.

53. Papa, Rosanna, et al. "Anti-biofilm activity of the Antarctic marine bacterium *Pseudoalteromonas haloplanktis* TAC125." *Research in microbiology* 164.5 (2013): 450-456.

54. Raffi, Valeria, and Maria Cristina Ossiprandi. "Bacteriocine: evoluzione, ecologia ed applicazioni pratiche Bacteriocins: evolution, ecology and practice application."

55. Riley, Margaret A., and John E. Wertz. "Bacteriocins: evolution, ecology, and application." *Annual Reviews in Microbiology* 56.1 (2002): 117-137.

56. Di Lorenzo, Manuela, et al. "A nonribosomal peptide synthetase with a novel domain organization is essential for siderophore biosynthesis in *Vibrio anguillarum*." *Journal of bacteriology* 186.21 (2004): 7327-7336.

57. Walsh C., (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. p.89-156. American Society for Microbiology. Press, Washington.

58. Zhu, Peng, et al. "Molecular phylogeny and modular structure of hybrid NRPS/PKS gene fragment of *Pseudoalteromonas* sp. NJ6-3-2 isolated from marine sponge *Hymeniacidon perleve*." *J. Microbiol. Biotechnol* 19.3 (2009): 229-237.

59. Masschelein, Joleen, et al. "A PKS/NRPS/FAS hybrid gene cluster from *Serratia plymuthica* RVH1 encoding the biosynthesis of three broad spectrum, zeamine-related antibiotics." *PLoS One* 8.1 (2013): e54143.

60. Caboche, Ségolene, et al. "NORINE: a database of nonribosomal peptides." *Nucleic acids research* 36.suppl 1 (2008): D326-D331.

61. Schirmer, Andreas, et al. "Metagenomic analysis reveals diverse polyketide synthase gene clusters in microorganisms associated with the marine sponge *Discodermia dissoluta*." *Applied and Environmental Microbiology* 71.8 (2005): 4840-4849.
62. Christensen B.E., J. Kjosbakken, O. Smidsrød (1985). Partial chemical and physical characterization of two extracellular polysaccharides produced by marine, periphytic *Pseudomonas* sp. strain NCMB 2021. *Applied and Environmental Microbiology*, 50: 837-845.
63. Weiner M.R. (1997). Biopolymers from marine prokaryotes. *Marine Biotechnology*, 15: 390-394.
64. Mancuso Nichols C.A., J. Guézennec, J.P. Bowman (2005a). Bacterial exopolysaccharides from extreme environments with special consideration of the Southern Ocean, sea ice, and deep-sea hydrothermal vents: a review. *Marine Biotechnology*, 7: 253-271.
65. Decho A.W. (1990). Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes. In: Barnes H. (Ed), *Oceanography and Marine Biology*, Aberdeen University Press, pp. 73-153.
66. Sutherland J.W. (1982). Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. *Advances in Microbial Physiology*, 23: 79-150.
67. Kumar A.K., K. Mody, B. Jha (2007). Bacterial exopolysaccharides-a perception. *Journal of Basic Microbiology*, 47: 103-117.
68. Flemming H.C., J. Wingender (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) – Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43 (6):1-8.
69. Wotton R.S. (2004). The ubiquity and many roles of exopolymers (EPS) in aquatic systems. *Scientia Marina*, 68: 13-21.
70. Mancuso Nichols C.A., J.P. Bowman, J. Guézennec (2005b). Effects of incubation temperature on growth and production of exopolysaccharides by an Antarctic sea ice bacterium grown in batch culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 3519-352.

- 71.Krembs C., H. Eicken, K. Junge, J.W. Deming (2002). High concentrations of exopolymeric substance in Arctic winter sea ice: implications for the polar ocean carbon cycle and cryoprotection of diatoms. *Deep Sea Research*, 49: 2163-2181.
- 72.Sutherland J.W. (2002). A sticky business. Microbial polysaccharides: current product and future trends. *Microbiology Today*, 29: 70-71.
- 73.Van Kranenburg R., I.C. Boels, M. Kleerebezem, W.M. de Vos (1999). Genetics and engineering of microbial exopolysaccharides for foods: approaches for the production of existing and novel polysaccharides. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 498-504.
- 74.Banik R.M., B. Kanari, S.N. Upadhyay (2000). Exopolysaccharide of the gellan family: prospects and potential. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16: 407-414.
- 75.Guezenec J. (2002). Deep-sea hydrothermal vents: A new source of innovative bacterial exopolysaccharides of biotechnological interest? *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 29: 204-208.
- 76.Holmström, Carola, and Staffan Kjelleberg. "Marine Pseudoalteromonas species are associated with higher organisms and produce biologically active extracellular agents." *FEMS microbiology ecology* 30.4 (1999): 285-293.
- 77., C. H. E. N., et al. "Inhibitory Effect of Extracellular Polysaccharide EPS-II from Pseudoalteromonas on Candida adhesion to Cornea in vitro." *Biomedical and Environmental Sciences* 25.2 (2012): 210-215.
- 78.Arena, Adriana, et al. "Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant Bacillus licheniformis." *International immunopharmacology* 6.1 (2006): 8-13.
79. Ipper, Nagesh S., et al. "Antiviral activity of the exopolysaccharide produced by Serratia sp. strain Gsm01 against cucumber mosaic virus." *J. Microbiol. Biotechnol* 18.1 (2008): 67-73.
- 80.Liu, George Y., and Victor Nizet. "Color me bad: microbial pigments as virulence factors." *Trends in microbiology* 17.9 (2009): 406-413.

81. Bej, Asim K., Jackie Aislabie, and Ronald M. Atlas, eds. *Polar microbiology: the ecology, biodiversity and bioremediation potential of microorganisms in extremely cold environments*. CRC Press, 2009.
82. Thomson, N. R., et al. "Biosynthesis of carbapenem antibiotic and prodigiosin pigment in *Serratia* is under quorum sensing control." *Molecular microbiology* 36.3 (2000): 539-556.
83. Ahmad, Wan Azlina, et al. *Application of bacterial pigments as colorant*. Springer Berlin Heidelberg, 2012.
84. Zhang, Hechun, et al. "A kind of potential food additive produced by *Streptomyces coelicolor*: characteristics of blue pigment and identification of a novel compound, λ -actinorhodin." *Food Chemistry* 95.2 (2006): 186-192.
85. DeLange, Robert J., and Alexander N. Glazer. "Phycoerythrin fluorescence-based assay for peroxy radicals: a screen for biologically relevant protective agents." *Analytical Biochemistry* 177.2 (1989): 300-306.
86. Mahmoudian, Jafar, et al. "Conjugation of R-Phycoerythrin to a Polyclonal Antibody and F (ab')₂ Fragment of a Polyclonal Antibody by Two Different Methods." *Avicenna journal of medical biotechnology* 2.2 (2010): 87.
87. Thammapalerd, N., et al. "Application of local products R-phycoerythrin and monoclonal antibody as a fluorescent antibody probe to detect *Entamoeba histolytica* trophozoites." *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health* 27.2 (1996): 297-303.
88. Mojib, Nazia, et al. "Antimycobacterial activity in vitro of pigments isolated from Antarctic bacteria." *Antonie van Leeuwenhoek* 98.4 (2010): 531-540.
89. Correa-Llantén, Daniela N., Maximiliano J. Amenábar, and Jenny M. Blamey. "Antioxidant capacity of novel pigments from an Antarctic bacterium." *Journal of Microbiology* 50.3 (2012): 374-379.
90. Soliev, Azamjon B., Kakushi Hosokawa, and Keiichi Enomoto. "Bioactive pigments from marine bacteria: applications and physiological roles." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011 (2011).

91. Asencio, Geraldine, et al. "Antibacterial activity of the Antarctic bacterium *Janthinobacterium* sp: SMN 33.6 against multi-resistant Gram-negative bacteria." *Electronic Journal of Biotechnology* 17.1 (2014): 1-1.
92. Ivanova E.P., Nicolau D.V., Yumoto N., Taguchi T. (1998). Impact of conditions of cultivation and adsorption on antimicrobial activity of marine bacteria. *Marine Biology*, 130: 545-551.
- 93., Li, et al. "Marine bacteria associated with marine macroorganisms: the potential antimicrobial resources." *Ann Microbiol* 55.2 (2005): 119-24.
94. Hu K., J.X. Li, J.M. Webster , (1997). Quantitative analysis of a bacteria-derived antibiotic in nematode-infected insects using HPLC-UV and TLC-UV methods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, Vol. 703, Issues 1–2: 177-183)
95. Wei, Yu-Hong, and Wei-Chuan Chen. "Enhanced production of prodigiosin-like pigment from *Serratia marcescens* SMΔR by medium improvement and oil-supplementation strategies." *Journal of bioscience and bioengineering* 99.6 (2005): 616-622.
96. Lu, Yuan, et al. "Production of violet pigment by a newly isolated psychrotrophic bacterium from a glacier in Xinjiang, China." *Biochemical Engineering Journal* 43.2 (2009): 135-141.
97. Christensen G.D., W.A. Simpson, J.J. Younger, L.M. Baddour, F.F. Barret, D.M. Melton, E.H. Beachey (1985). Adherence of coagulase-negative *Staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of *Staphylococci* to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22: 996-1006.
98. Maugeri T.L., C. Gugliandolo, D. Caccamo, E. Stackebrandt (2002). Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 450-455.
99. Hayhoe, E. J., and E. A. Palombo. "Extracts of *Eremophila longifolia* inhibit the cariogenic activities of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*." *Planta Medica* 5.12 (2011): 2476-2482.

100. Ishiyama, Munetaka, et al. "A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19.11 (1996): 1518-1520.
101. Michaud L., Di Cello F., Brilli M., Fani R., Lo Giudice A., Bruni V. (2004). Biodiversity of cultivable Antarctic psychrotrophic marine bacteria isolated from Terra Nova Bay (Ross Sea). *FEMS Microbiology Letters*, 230: 63-71.
102. Altschul S.F., Maden T.L., Shäffer A.A., Zhang J., Miller W. e Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25: 3389-3402.
103. Hentschel, U., Schmid, M., Wagner, M., Fieseler, L., Gernert, C., Hacker, J., (2001). Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 35, 305-312.
104. Nair, S., Simidu, U., (1987). Distribution and significance of heterotrophic marine bacteria with antibacterial activity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53, 2957-2962.
105. Zheng L., Chen H., Han X., Lin W., Yan X. (2005). Antimicrobial screening and active compound isolation from marine bacterium NJ6-3-1 associated with the sponge *Hymeniacidon perleve*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21: 201-206.
106. O'Brien, A., Sharp, R., Russell, N., Roller, S., (2004). Antarctic bacteria inhibit growth of food-borne microorganisms at low temperatures. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 48, 157-167.
107. Lo Giudice A., Brilli M., Bruni V., De Domenico M., Fani R., Michaud L. (2007). Bacterium-bacterium inhibitory interactions among psychrotrophic bacteria isolated from Antarctic seawaters (Terra Nova Bay, Ross Sea). *FEMS Microbiology Ecology*.
108. Romoli R., Papaleo M.C., De Pascale D., Tutino M.L., Michaud L., Lo Giudice A., Fani R., Bartolucci G. (2011). Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction - gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 46: 1051-1059.

- 109.Sobolevskaya M.P., Smetanina O.F., Speitling M., Shevchenko L.S., Dmitrenok P.S., Laatsch H., Kutznesova T.A., Ivanova E.P., Elyakov G.B. (2005). Controlling production of brominated cyclic depsipeptides by *Pseudoalteromonas maricaloris* KMM 636^T. *Letters in Applied Microbiology*, 40: 243-248.
- 110.Isnansetyo, A. & Kamei, Y. (2003). MC21-A, a bactericidal antibiotic produced by a new marine bacterium, *Pseudoalteromonas phenolica* sp. nov. O-BC30T, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 480-488.
- 111.Kamigiri, K., Tokunaga, T., Shibazaki, M., Setiavan, B., Rantiatmodjo, R.M., Morioka, M., Suzuki, K-I., (1996.) YM-3009, a novel quinolone antibiotic produced by *Arthrobacter* sp. *J. Antibiot.*, 49, 823-825.
- 112.Grossart, Hans-Peter, et al. "Antagonistic activity of bacteria isolated from organic aggregates of the German Wadden Sea." *FEMS microbiology ecology*47.3 (2004): 387-396.
- 113.Lo Giudice A., Bruni V., Michaud L. (2007a). Characterization and antibacterial potential of marine psychrotrophic bacteria from the Ross Sea (Antarctica). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*.

Capitolo III

III.1. Le macroalghe

Organismi eucarioti autototrofi acquatici, le alghe vengono principalmente distinte in microalghe e macroalghe; le prime comprendono le alghe unicellulari mentre le seconde comprendono alghe pluricellulari la cui struttura del corpo è tallofitica, non distinta quindi in tessuti diversi. Le alghe vengono suddivise ulteriormente secondo la presenza di determinati pigmenti : in tutte è presente la clorofilla A, il pigmento costituito da un anello tetrapirrolico con un atomo di magnesio legato al centro, in grado di convertire l'energia luminosa in energia chimica. Nelle alghe verdi (Chlorophyta) sono presenti anche la clorofilla B ed i carotenoidi, mentre nelle alghe brune (Heterokontophyta o Pheophyta) è presente la clorofilla C; infine nelle alghe rosse sono presenti la clorofilla D e le ficobiline. La presenza di pigmenti diversi è un adattamento che consente alle alghe di colonizzare tutte le zone costiere in cui arrivano le radiazioni solari.

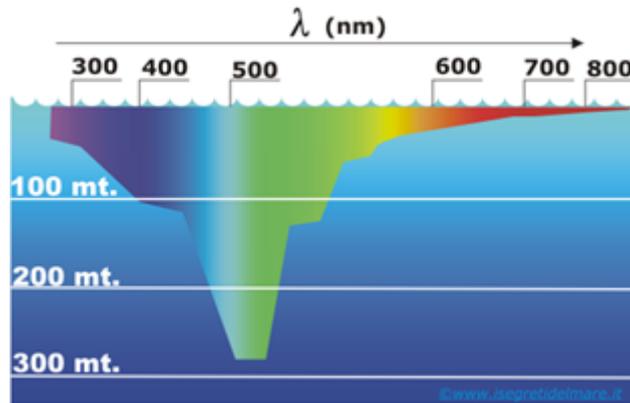


Figura 24. Propagazione delle radiazioni luminose in mare

La zona costiera viene quindi suddivisa in rapporto alla penetrazione della luce in zona fotica, zona illuminata, e zona afotica, priva di luce; la zona fotica è ulteriormente divisa in eufotica, direttamente irradiata dal sole, e zona disfotica, zona poco illuminata. La zona limite tra la fotica e quella afotica è tra i 100 e i 200 metri, ma la profondità del limite dipende da diversi fattori fra cui la torbidità delle acque, ad esempio nel Mar Baltico il limite si trova verso i 50 m di profondità mentre nel mar Rosso verso i 200 m. Quando la radiazione luminosa si propaga in mare la sua intensità decresce in funzione

della profondità in modo quasi esponenziale in funzione della lunghezza d'onda: dopo i primi 50 cm dalla superficie la radiazione incidente si riduce del 50%; l'1% penetra al massimo fino 200 m (considerato il limite della zona fotica). Le prime radiazioni che si estinguono sono quelle a minore energia come il rosso (620 nm), l'arancio (620 nm), il giallo (580 nm), il verde (530), ed infine il blu (470 nm) ed il viola (420 nm).

Le caratteristiche di illuminazione influenzano la ripartizione verticale degli organismi vegetali: assenti nella zona afotica, gli organismi vegetali si localizzano nella zona fotica secondo la zonazione del fitobenthos [1]: le fanerogame (le piante vascolarizzate) si localizzano nella zona immediatamente fotica, le alghe verdi che assorbono la luce nelle radiazioni comprese tra il giallo ed il rosso, si localizzano entro i primi 40 m, le alghe brune, che assorbono nella banda blu-verde si possono trovare a profondità maggiori, le alghe rosse assorbono nella banda del blu occupando zone costiere molto profonde, fino ai 200m.

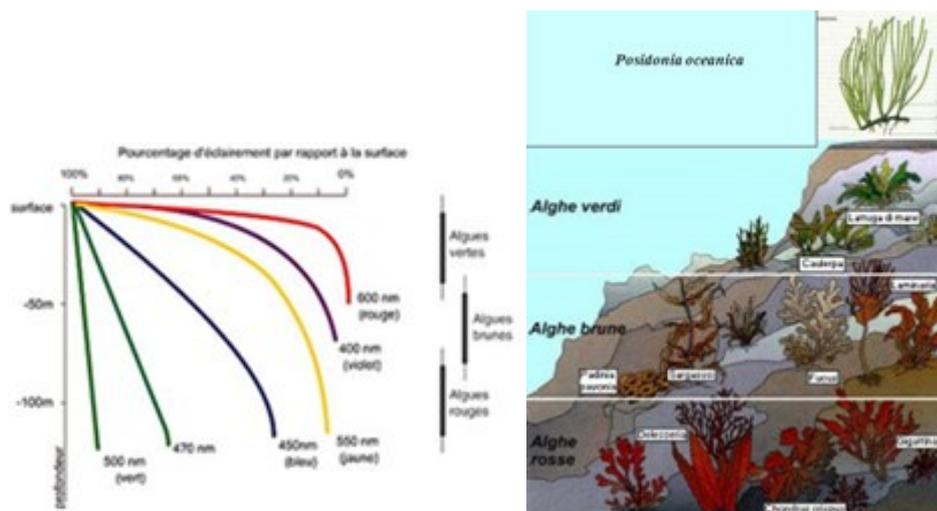


Figura 25. Zonazione del fitobenthos influenzata dalla penetrazione della luce.

Le popolazioni umane che abitavano lungo le coste, si nutrivano di alghe: è possibile risalire al consumo alimentare di alghe in Giappone già dal XIV secolo ed in Cina nel XVI secolo; la nazione attualmente col maggior consumo alimentare delle macroalghe risulta essere la Corea. La Cina è il maggior produttore di alghe a consumo alimentare (circa 5 tonnellate l'anno), la maggior parte delle coltivazioni sono riferite all'alga bruna *Laminaria japonica*, comunemente chiamata *Kombu*, coltivata in corde in sospensione al largo nell'oceano; la Corea invece produce maggiormente la bruna

Undaria pinnatifida (chiamata *wakame*); infine il Giappone produce il *nori* (usata nel sushi), che sarebbe l'alga rossa del genere *Porphyra*. Altre alghe rosse, raccolte e consumate localmente sono la *dulse* (*Rhodomenia palmata*) raccolta in Irlanda e nelle coste orientali del Canada, ed il “*mauro*”, un' insalata di alghe rosse raccolte nella costa orientale della Sicilia (tra cui si distinguono le specie *Grateloupia filicina* e *Hypnea mushiformis*), e l'hana nori (*Chondrus crispus*), commercializzato in Giappone, ma prodotto in Canada. Tra le alghe verdi vengono consumati l'*aonori* o green laver (appartenente ai generi *Monostroma spp.* ed *Enteromorpha spp.*) ed il sea grapes o caviale verde (*Caulerpa lentillifera*)[2].



Figura 26. L'alga rossa *Porphyra sp.* usata per il consumo di sushi.

Le coltivazioni sono generalmente in corde, inseminate con spore o a cui sono stati piantati talli, fisse o mobili, immerse o galleggianti in mare aperto.



Figura 27. Coltivazione di alghe su corde

La recente dichiarazione dell'Organizzazione Mondiale della Sanità sul rischio per la salute dovuto al consumo alimentare di carne rossa (dichiarata cancerogena) e ad una maggiore sensibilità ecologica (spreco di risorse idriche e terreni agricoli per

l'alimentazione del bestiame), indirizzano la cultura alimentare verso alimenti poco conosciuti ma ricchi in nutrienti . Le alghe rispondono a tali requisiti contenendo numerosi nutrienti essenziali (proteine, acidi grassi polinsaturi, PUFA, pari dall'1 al 3% della massa totale, vitamine A, B12, C, D, E e K, minerali tra cui Potassio, Magnesio, Selenio, Calcio, Iodio e Zinco) [3], mostrando importanti attività cancerogene, come quella di prevenzione al tumore mammario mediante alimentazione con il Wakame [4], e depurative, è stato dimostrato che l'alimentazione con Wakame e Kombu accelera la detossificazione del corpo dalle diossine e dai policloro bifenili (PCB)[5], e rispondendo a requisiti di ecosostenibilità poiché non richiede acque potabili, terreni da sfruttare e fertilizzanti; le alghe inoltre fissano la CO₂. Il contenuto di composti bioattivi però sembra può variare in base alle stagioni, alle diverse porzioni del tallo alle fasi del ciclo riproduttive e delle aree geografiche [36,47].

Le aziende alimentari stanno iniziando a produrre e commercializzare nuovi prodotti come cracker di riso a base d'alga, polpette d'alga o affettati di natura vegetale. Le alghe si prestano inoltre ad altri usi: disidratate e macinate vengono utilizzate come concime per animali, in agraria grazie all' alto contenuto di fibre delle alghe che agisce come ammendante e assiste ritenzione di umidità e per il contenuto minerale che le rende ottimi fertilizzanti e fonte di oligoelementi . Promettenti e versatili le alghe si prestano a diverse prospettive future:

- come fonte di Energie rinnovabili mediante la trasformazione mediante fermentazione della biomassa delle alghe in bioetanolo, butanolo, biogas o in combustibili solidi come il pelle)[6,7];
- Capaci di assorbire ioni metalli come gli ioni Rame, Nickel, Zinco e Cadmio, le alghe sono potenzialmente utilizzabili nella bio-remediation per i trattamenti delle acque di scarico e l'allontanamento dei metalli pesanti[8];
- Come abbattitore del carico di nutrienti che porterebbero all'eutotrofia, all'anossia, e alla variazione delle popolazioni batteriche, animali e vegetali delle coste, causate dall'allevamento intensivo dell'acquacoltura in mare aperto, in un concetto di policoltura, acquacoltura integrata di alghe e risorse ittiche eviterebbe i danni ambientali associati a quest'ultima [9].

III.1.1. I polisaccaridi solforati

Tra i derivati delle alghe, i polisaccaridi hanno trovato impiego in molteplici settori industriali. Nelle alghe si distinguono i polisaccaridi di riserva, localizzati nei cloroplasti (amido nelle alghe verdi, amido delle floridee nelle alghe rosse e laminarina nelle brune) ed i polisaccaridi solforati (SPs) strutturali che costituiscono la parete cellulare. La parete cellulare delle alghe presenta una porzione fibrillare che comprende cellulosa, mannani e xilani, una porzione amorfa che comprende polisaccaridi solforati come la fucoidina e gli alginati (nelle alghe brune), l'agar e i carraghenani (nelle alghe rosse), gli omopolisaccaridi e gli eteropolisaccaridi polidispersi (nelle alghe verdi) ed eventuali mineralizzazioni calcaree (nelle alghe coralline). I polisaccaridi solforati sono una generalmente prodotti nei mammiferi e negli invertebrati, le alghe costituiscono la fonte vegetale più importante alternativa a quella animale [10]. Tra le funzioni degli SPs, oltre quella di garantire la giusta flessibilità delle fronde in risposta alla forza del movimento ondoso, è stata dimostrata la prevenzione alla disidratazione, la protezione all'ossidazione dovuta ai raggi UV ed è stata ipotizzato il mantenimento dell'equilibrio ionico della cellula, garantito dai cationi metallici associati agli SPs[11]. Ogni SPs estratto da un'alga è un composto con una struttura unica che gli conferisce peculiari attività biologiche: attività anticoagulante, utilizzabili come alternativa all'eparina[3] commerciale che presenta effetti collaterali anche gravi; attività antivirale verso i virus HSV-1 e HSV-2, dengue virus, il virus dell'HIV[12-19], è stato osservato che il grado di solfatazione del polisaccaride modula l'attività, un maggiore grado aumenta l'attività antivirale del SP [3]; attività antiossidante, oltre che nell'uso terapeutico potrebbero essere una valida alternativa agli antiossidanti commerciali di sintesi somministrati attualmente nei cibi, è stato dimostrato ad esempio che gli SPs estratti da *Sargassum fulvellum* ha un attività antiossidante maggiore dei commerciali BHA (butylated hydroxyanisole) e α -tocoferolo [3]; attività antineoplastiche ed inibitrici dell'angiogenesi[10]. Tra gli SPs più usati distinguiamo i carraghenani e l'agar, estratti dalle alghe rosse, e gli alginati e i fucoidani, estratti dalle alghe brune.

L'agar e i carraghenani sono galattani formati da unità di galattosio e galattosio modificato; l'agar contiene D- e L- galattosio, mentre i carraghenani D-zuccheri. L'agar è costituito da agarosio (l'agente gelificante) e agaropeptina; forma gel ad una temperatura compresa tra i 32 °C e i 43 °C, è termoresistente, non scioglie se non oltre gli 85 °C. Viene estratto principalmente dalle alghe *Gracilaria sp.* e *Gelidium sp.* (

l'unica sorgente dell'agar usato in batteriologia, BACTO, che non contiene alcuna attività inibente verso i batteri), e dalle alghe *Gracilariopsis sp.* e *Gelidiella sp.* in minor numero *Pterocladia sp.* L'agar è stato definito sicuro, GRAS (Generally Recognized As Safe), dalla FDA americana (Food and Drug Administration); insapore, si presta ad essere un ottimo additivo alimentare, è infatti usato come gelificante ed addensante; ha trovato largo uso anche come stabilizzante per diversi prodotti come i gelati, inibendo la formazione di cristalli, creme e lozioni cosmetiche.

I carraghenani sono costituiti da una catena di esteri solfati 1,3-linked α -galattose – 4-sulfate e 1,3-linked 3,6- β - anidrogalattosio; secondo il grado di solfatazione possiamo distinguere tre tipi di carraghenani definiti con le lettere greche λ κ e ι , il tipo κ presenta le migliori proprietà di gelificazione. La fonte principale dei carraghenani è l'alga rossa *Chondrus crispus* (Irish Moss), oltre *Euचेuma cottoni* (adesso nota come *Kappaphycus alvarezii*) e *Euचेuma spinosum* (adesso nota come *Euचेuma denticulatum*). I carraghenani trovano uso come substrati per biocatalisi, come mangime, come addensante per gelatine, dessert e carni in scatola, come emulsionante in dentrifici; gel vaginali a base di carraghenani hanno dimostrato di inibire il virus dell'HPV, anche in concentrazioni molto diluite, e quindi di prevenirne la trasmissione verticale e prevenire la condizione JORRP (Juvenile Onset Recurrent Respiratory Papillomatosis) nei neonati; gel estratti da alghe sono vengono usati come lubrificanti da almeno 5000 anni, quelli contenenti agar o alginati sono meno efficaci come inibitori del virus HPV rispetto ai carraghenani, mentre i condom privi di gel sono poco efficaci nella prevenzione della trasmissione del virus; i carraghenani sono commestibili e stimolano i tessuti, suggerendo un'ottima alternative alla crema topica vaginale all'estradiolo [20].

Gli alginati sono costituiti da catene lineari di β -1,4-linked D-acido mannuronico (M) e α -1,4 linked L-acido guluronico (G), e differiscono secondo le proporzioni tra M e G [21]. Secondo la nazione produttrice, gli alginati possono essere estratti da *Laminaria sp.*, *Undaria sp.*, *Ascophyllum sp.*, *Durvillaea sp.*, *Ecklonia sp.*, *Lessonia sp.*, *Macrocystis sp.* e *Sargassum sp.*. La proprietà addensante degli alginati è usata nell'industria tessile nella preparazione delle tinte, nell'industria alimentare per sugh, topping, gelati, bibite, carni in scatola, e sciroppi e crioprotettore del pesce surgelato (alginato di calcio), come substrato per la biocatalisi, grazie alla capacità di formare fibre stabili come emostatico (alginato di calcio), in cibi dietetici dona senso di sazietà e protezione gastrica. Le applicazioni farmaceutiche sono dovute alla capacità degli alginati di formare gel

mediante “gelificazione ionotropica”, con l’ausilio di ioni divalenti come Ca^{2+} e Zn^{2+} , ma non con il Mg^{2+} [21,22]: la somministrazione orale di farmaci o proteine è agevola dalla facile denaturazione e degradazione degli alginati al livello dello stomaco. La resistenza del gel di alginati a resistere alle alte temperature lo rende un utile supporto in biocatalisi. Una delle possibili applicazioni future degli alginati è la costruzione di matrici utilizzabili per la rigenerazione dei tessuti.

I fucooidani sono polimeri del L-fucosio, presentano altri zuccheri come xylosio, galattosio mannosio e acido galatturonico. Principalmente estratti da *Sargassum sp.* e *Undaria sp.* . Hanno mostrato interessanti attività biologiche: antiulcera, anticoagulante, antivirale (verso i virus HSV1, 2, CMV), riduce i livelli di colesterolo, induce la differenziazione osteoblastica (può essere usato come integratore nella prevenzione di diverse patologie ossee), inibisce l’induzione dei raggi UV alle metalloproteasi della matrice, enzimi prodotti dai linfoblasti della pelle, che degradano il connettivo., suggerendone l’uso in cosmesi come prevenzione dell’invecchiamento della pelle[3].

I polisaccaridi potrebbero essere usati come materiale alternativo, economico, commestibile e biodegradabile alla plastica da imbottigliamento mediante la tecnica chiamata Spherification, già usata come tecnica culinaria di Ferran Adrià, inoltre la tenacia delle alghe nell’aderenza alle rocce ed alle navi suggerisce la loro capacità adesiva resistente all’acqua, suggerendo un uso farmaceutico come bioadesivi e un uso medico come chiusure chirurgiche e collanti per ossa[21].

III.2. Materiali e metodi

III.2.1. Raccolta dei campioni

Sono stati utilizzati campioni di specie facilmente reperibili a livello locale e che abbiano mostrato in letteratura attività antimicrobiche. In particolare sono state scelte: *Agardhiella sp.*, *Gracilaria sp.* e *Hypnea musciformis*, appartenente alla divisione delle Rhodophyta (alghe rosse); *Chaetomorpha sp.* e *Ulva lactuca*, appartenente alla divisione delle Chlorophyta (alghe verdi); *Padina pavonica* e *Halopteris filicina*, appartenenti alla divisione delle Heterokontophyta.

I talli freschi sono stati raccolti tra i mesi di maggio e di luglio nelle coste della Sicilia Nord- Orientale. Le alghe sono state lavate in acqua di fonte per togliere le incrostazioni, quindi in acqua distillata ed essiccate al sole o in stufa a temperatura ambiente, o liofilizzate. Gli essiccati sono stati polverizzati.



Figura 28. Siti di campionamenti

III.2.2. Estrazione delle molecole

Per ottenere i polisaccaridi, 20 grammi delle polveri di ciascun campione di alga è stato lasciato a macerare in agitazione per 24 ore in 200 ml di etanolo (99% v/v), quindi filtrato con carta bibula. Il pellet è stato lasciato macerare in 300 ml di acqua distillata alla temperatura di 70 °C per 24 ore (le alghe brune sono state fatte anche macerare con acetone 99% (v/v) in agitazione per 24 ore e filtrate con carta bibula prima di questo trattamento). Previa filtrazione con un telo di lino mantenendo la temperatura sopra i 60 °C , sono stati aggiunti 200 ml di etanolo 99% v/v al surnatante; il precipitato è stato

raccolto, essiccato all'aria a temperatura ambiente e liofilizzato[23-25]. I polisaccaridi estratti sono stati pesati e risospesi in acqua distillata. Gli estratti etanolic ed acetonic sono stati concentrati mediante Rotavapor per studi successivi, pesati e risospesi in DMSO.

III.2.3. Valutazione dell'attività antibiotica.

A ciascun estratto è stato assegnato un codice come riportato in tabella 14:

Tabella 14. Codici attribuiti ai campioni raccolti; sono riportati i metodi di disidratazione dei campioni.

code	kind of extract	algal species	drying mode
R1P	polisaccharide	<i>Agardhiella sp.</i>	sun dried
R2P	polisaccharide	<i>Gracilaria sp.</i>	sun dried
R3P	polisaccharide	<i>Hypnea sp.</i>	sun dried
R4P	polisaccharide	<i>Hypnea musciformis</i>	lyophilized
V1P	polisaccharide	<i>Chaetomorpha sp.</i>	sun dried
V2P	polisaccharide	<i>Chaetomorpha sp.</i>	sun dried
B1P	polisaccharide	<i>Padina pavonica</i>	air dried
B2P	polisaccharide	<i>Halopteris filicina</i>	air dried
R1E	ethanolic extract	<i>Agardhiella sp.</i>	sun dried
R2E	ethanolic extract	<i>Gracilaria sp.</i>	sun dried
R3E	ethanolic extract	<i>Hypnea sp.</i>	sun dried
R4E	ethanolic extract	<i>Hypnea musciformis</i>	lyophilized
V1E	ethanolic extract	<i>Chaetomorpha sp.</i>	sun dried
V3E	ethanolic extract	<i>Ulva lactuca</i>	sun dried
B1E	ethanolic extract	<i>Padina pavonica</i>	air dried
B2E	ethanolic extract	<i>Halopteris filicina</i>	air dried
B1A	acetone extract	<i>Padina pavonica</i>	air dried
B2A	acetone extract	<i>Halopteris filicina</i>	air dried

Gli estratti sono stati sottoposti a test per valutarne l'eventuale potenziale inibitorio verso batteri, funghi e virus secondo le opportune metodiche.

II.2.3.1. Valutazione dell'attività antibatterica

L'attività antibatterica è stata valutata il metodo della Concentrazione Minima Inibitoria, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) e la Concentrazione Minima Batteriocida, Minimum Bactericidal Concentration (MBC)[26] verso i seguenti batteri patogeni: *S. aureus* clinical isolate 052/149 (c.i.), *S. aureus* ATCC 29213, *E. faecalis* c.i.032/130/2bis, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. epidermidis* c.i. 052/170, *S. epidermidis* 052/150, *S. epidermidis* 052/122, *S. haemolyticus* 052/138, *E.coli* c.i. 032/129, *E. coli*

ATCC 35218, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *P. mirabilis* c.i. 050/074, *K. pneumoniae* c.i. 019/104, *K. pneumoniae* ATCC 700603, *E. aerogenes* c.i. 050/012-medivis. I ceppi batterici standard provengono dall'American Type Culture Collection (Rockville, USA), mentre gli isolati clinici provengono dalla collezione batterica del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Catania.

Diverse colonie dei ceppi target sono state inoculate in acqua fisiologica sterile (NaCl 0.9% (w/v) fino al raggiungimento dello standard pari a 0.5 McFarland, pari approssimativamente a 10^6 Unità Formanti Colonia (Colony Forming Unit, CFU) per mL. Il test è stato effettuato in micropiastre con fondo a U usando come brodo di coltura il Muller Hinton broth (OXOID). La piastra è così stata disposta: la prima colonna conteneva la concentrazione più alta dell'estratto, le altre colonne contenevano diluizioni del 50% dell'estratto, la colonna 10 conteneva la concentrazione più bassa. la metà della concentrazione dell'estratto della colonna. Per ogni concentrazione la replicabilità è stata condotta in duplicato. La colonna 11 conteneva il controllo della crescita dei ceppi target (100 μ L di brodo senza estratto con 5 μ L of *inoculum*). La colonna 12 conteneva 100 μ L di brodo senza estratto, usato quindi come controllo di sterilità. Le sostanze idrosolubili sono state diluite 1:10, mentre le sostanze disciolte in DMSO sono state diluite 1:100. I valori di MIC sono determinati dalla più bassa concentrazione dell'estratto che inibisce la crescita del microrganismo bersaglio.

La MBC è stata determinata prelevando 100 μ L da ciascun pozzetto delle piastre usate per la MIC che non presentassero alcuna crescita visibile ad occhio nudo ed inocolandoli su piastre di Muller Hinton agar, messe ad incubare per 24 ore a 37 °C. I valori di MBC sono determinati dalla più bassa concentrazione dell'estratto che uccide il microrganismo bersaglio, bloccandone la crescita anche dopo la semina in piastra.

II.2.3.2. Valutazione della citotossicità

La vitalità delle cellule è stata misurata con il metodo della colorazione con MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich [27]).

Le colture cellulari sono le seguenti: Vero (African green monkey kidney), Hep2 and HFF-1 cresciute nel terreno D-MEM, Dulbecco Minimum Essential Medium (Vero e Hep2 cresciute in D-MEM 1gr/L; HFF in D-MEM , 4,5gr/L), addizionate con siero fetale bovino (2% (v/v) Vero e Hep2, mentre 10%(v/v) HFF-1); MDCK (Madin-Darby

Canine Kidney Epithelial) cresciute in RPMI addizionato col 2% di siero fetale bovino. Tutte le cellule provengono dalla collezione American Type Culture Collection (Rockville, USA); le cellule sono state mantenute a -80 °C prima dell'uso. Le cellule sono state inoculate in micropiastre da 96 pozzetti con una densità iniziale di $1,5 \times 10^5$ per pozzetto dalla Colonna 4 alla 12, la Colonna 3 è stata inoculate con una concentrazione di cellule pari alla metà della Colonna 4, la Colonna 2 con densità pari alla metà della 3, la Colonna 1 è stata lasciata vuota per la misura del bianco allo spettrofotometro. Dalla colonna 5 alla 12 erano presenti concentrazioni decrescenti degli estratti: nella 5 la concentrazione più alta, nella 12 quella più bassa; le diluizioni sono state effettuate al raddoppio. Le colonne 2,3 e 4 sono state usate come controlli. Le colture sono state esposte alle differenti concentrazioni dell'estratto per 48 ore di incubazione a 37 °C con 5% CO₂. Le piastre sono state osservate al microscopio ottico dopo 24 e 48 ore per analizzare qualunque anomalia di crescita. Dopo 48 ore il surnatante è stato rimosso e sono stati aggiunti ad ogni pozzetto 100µl di D-MEM senza rosso fenolo contenente MTT (concentrazione finale 0.5 mg/ml). Dopo 2 ore di incubazione è stato allontanato l'MTT e sono stati aggiunti 100 µl di Etanolo per solubilizzare i cristalli. Dopo una vigorosa miscelazione, è stata misurata la lettura allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm. La CD50 è stata calcolata come la concentrazione alla quale l'estratto ha ridotto la vitalità delle cellule del 50%. La citotossicità è stata valutata sulle sostanze di cui era interesse studiarne l'attività antivirale.

II.2.3.3. Valutazione dell'attività antivirale

L'attività antivirale è stata valutata mediante il test della riduzione delle pacche. Per i virus HSV-1 ed Echo9 sono state utilizzate colture cellulari VERO, per il virus H1n1 le MDCK, per l'adenovirus %, Coxsackievirus e Poliovirus le Hep-2, per il Citomegalovirus CMV le HFF-1. Tutti i virus provengono dalla collezione ATCC, American Type Culture Collection (Rockville, USA) e sono stati conservati a -80 °C prima dell'uso.

L'attività antivirale è stata valutata mediante la riduzione delle placche virali come descritto: inoculate in micropiastre le cellule con una densità iniziale di $1,5 \times 10^5$ e lasciate incubare per 24 ore a 37 °C al 5% i CO₂. La prima colonna è stata usata come controllo della crescita delle cellule, la seconda colonna come controllo della

formazione delle placche da parte dei virus. Dalla colonna 3 alla 12 sono state messe le concentrazioni della sostanza con diluizioni al raddoppio in modo tale da avere nella colonna 3 la concentrazione più alta (pari alla CD50 calcolata mediante il test di citotossicità) e nella 12 la più bassa. Il virus è stato inoculato dalla colonna 2 alla 12 ad una concentrazione pari a $2,5 \times 10^3$ lasciando due pozzetti per diluizione privi di inoculo del virus come controllo del comportamento delle cellule con la sostanza. Osservate al microscopio elettronico dopo 24 e 48 ore per segnalare l'eventuale presenza o assenza di placche virali. Sulle sostanze che presentavano attività antivirale veniva effettuata la colorazione con Crystal violetto secondo la seguente modalità: svuotate del loro contenuto, le micropiastre venivano riempite con 50 μ l di soluzione contenete Crystal violetto e lasciate incubare per 15 minuti, previo scarico e successivi lavaggi, la piastra veniva lasciata asciugare ed osservata al microscopio ottico. La concentrazione inibente 50% (IC50) veniva calcolata alla concentrazione del composto che riduceva del 50% il numero delle placche virali.

III.2.3.4. Valutazione dell'attività antimicotica

Per la valutazione dell'attività antimicotica sono state eseguite le indicazioni per il Broth Microdilution Test, seguendo le referenze date dal NCCLS reference method [28].

L'inoculo del micete target è stato preparato prelevando un paio di colonie da una coltura in piastra di *Candida albicans* (isolato clinico dalla collezione del Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologiche dell'Università degli Studi di Catania). Le colonie sono state sospese in soluzione fisiologica (Na Cl al 9%) al raggiungimento di 0.5 McFarland a 570 nm. L'inoculo è stato quindi diluito in soluzione fisiologica (1:50) e in RPMI 1640 (1:20), infine diluito 1:1 come inoculo finale nelle micropiastre per raggiungere una densità cellulare pari a $0.5 \times 10^3 - 2.5 \times 10^3$ CFU/mL. Il test è stato eseguito riempiendo le micropiastre da 96 pozzetti a fondo concavo, con RPMI1640 addizionato di glutammina, senza bicarbonato, con rosso fenolo come indicatore e tamponato con 0.165 mol/MOPS, aggiustato a pH7.0, sterilizzato mediante filtrazione e conservato a 4°C. La prima colonna conteneva la più alta concentrazione dell'estratto, si è proceduto con diluizioni al raddoppio fino alla 10 colonna che conteneva la concentrazione più bassa. La colonna 11 conteneva il controllo di crescita (100 μ L di RPMI 1640 e 100 μ L di inoculo). La colonna 12 conteneva solo 200 μ L di RPMI 1640

come controllo di sterilità. Le sostanze idrosolubili sono state diluite 1:10, mentre le sostanze disciolte in DMSO sono state diluite 1:100.

III. 3. Risultati

III.3.1. Attività antibatterica

Tutti gli estratti algali non hanno mostrato possedere alcuna attività verso i batteri Gram-negativi. Allo stesso modo, i polisaccaridi estratti non hanno mostrato possedere alcuna attività inibitoria verso i batteri Gram positivi. Gli altri estratti hanno mostrato avere un attività inibitoria, in particolare batteriostatica ai valori presenti in tabella 15. In particolare gli estratti delle Chlorophyta e delle Heterokontophyta sembrano più efficaci di quelle delle Rhodophyta.

Tabella 15. Valutazione dell'attività antibatterica (nt.: non testato)

	R1P	R2P	R3P	V2P	V3P	B1P	B2P	R1E	R2E	R3E	R4E	V1E	V3E	B1E	B2E	B1A	B2A
1st dose µg/ml	16250	3125	8333	6250	6250			16700	16700	11700	10000	25000	15000	445	500	167	100
<i>E.coli</i> i.c.032/129	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive
<i>P.aeruginosa</i> i.c.medivis	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	n.t.	inactive	inactive	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>E.aerogenes</i> i.c.medivis	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	n.t.	inactive	inactive	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>P.mirabilis</i> i.c.050/104	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	n.t.	inactive	inactive	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S.aureus</i> i.c.052/149	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	1250	391	156 n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S.aureus</i> ATCC 29213	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	522	522	inactive	1250	391	156	111,25	500	167	100
<i>E.faecalis</i> i.c.032/130/2	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	3750 n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>E.faecalis</i> ATCC 29212	inactive	inactive	inactive	inactive	inactive	n.t.	n.t.	4175	inactive	inactive	inactive	inactive	59	222,5	500	167	100
<i>S.epidermidis</i> 052/150	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	156	49	59 n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>S.epidermidis</i> 052/122	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	4175	2087,5 n.t.	10000	6250	3750	3750	222,5	500	167	100
<i>S.haemoliticus</i> 052/138	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	156	25000	59 n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.

III.3.2. Citotossicità

I risultati dei test di citotossicità sono mostrati in tabella 16. Tutti gli estratti hanno mostrato una bassa tossicità verso le colture cellulari Hep-2 ma un'elevata tossicità verso la linea cellulare VERO.

Tabella 16. *Valutazione dell'attività citotossica (nt.: non testato)*

Extracts	first dose µg/ml	MDCK CD50 µg/ml	Hep-2 CD50 µg/ml	VERO CD50 µg/ml
R1P	1250	625	1250	78
R4P	1250	312,5	1250	78
V2P	2500	625	2500	19,5
V3P	2500	625	2500	19,5
V1E	2500	n.t.	n.t.	312,5
V2E	1670	n.t.	n.t.	209
R1E	1670	104,4	n.t.	417,5
R4E	1000	125	n.t.	62,5

III.3.3. Attività antivirale

Tutti gli estratti testate non hanno dimostrato possedere alcuna attività antivirale.

Tabella 17. *Valutazione dell'attività antivirale (nt.: non testato)*

Extracts	H1N1	HSV1
R1P	Inactive	Inactive
R4P	Inactive	Inactive
V2P	Inactive	Inactive
V3P	Inactive	Inactive
V1E	n.t.	Inactive
V2E	n.t.	Inactive
R1E	Inactive	Inactive
R4E	Inactive	inactive

III.3.4. Attività antimicotica.

Gli estratti delle alghe brune non hanno mostrato possedere alcuna attività antimicotica. Al contrario le alghe rosse e quelle verdi hanno mostrato possedere un'azione inibitoria verso *C.albicans* alle concentrazioni mostrate in tabella:

Tabella 18. Valutazione dell'attività antivirale (*nt.:* non testato)

Extracts	First dose µg/ml	CD50 µg/ml
R1P	1250	Inactive
R2P	n.t.	-
R4P	1250	156,25
B1P	n.t.	-
B2P	5000	inactive
V2P	1250	250
V3P	1250	39
V1E	1250	312,5
V3E	750	Inactive
R1E	835	417,5
R2E	835	209
R4E	500	250
B1E	22,25	Inactive
B2E	250	Inactive
B1A	28	Inactive
B2A	50	Inactive

III.4. Discussione

Tra le Chlorophyta, per quanto riguarda il genere *Chaetomorpha sp.* sono state riportate in letteratura asiatica attività antiossidanti dell'estratto etanolic [29], e antiprotozoarie di un estratto metanolico [30], per quanto riguarda l'attività antivirale è stata riportata l'attività verso il virus HSV-1 del polisaccaride estratto da *C. crassa* [31]. Sia l'estratto etanolic che il polisaccaride del campione analizzato durante questo lavoro hanno mostrato una bassa tossicità ed di possedere attività antimicotica. Il polisaccaride, al contrario di quanto atteso, non ha mostrato alcuna attività antivirale ed antibatterica, mentre l'estratto etanolic ha mostrato possedere attività antibatterica verso tutti i ceppi analizzati appartenenti al genere *Staphylococcus sp.*, ma non verso gli enterococchi ed i ceppi batterici gram-negativi. I pochi dati presenti in letteratura e le attività mostrate rendono questa specie promettente per ulteriori studi.

Per quanto riguarda il genere *Ulva sp.* , sono state riportate attività antiossidanti [32], antiprotozoarie [33], antivirali da parte di un polisaccaride estratto dal un campione mediterraneo della specie *U.lactuca* [34, 35] ed antibatterica di un estratto metanolico della stessa specie, attivo solo verso *S. aureus* (e non verso i ceppi batterici Gram-negativi) e verso diversi miceti [36-38]. Sono state riportate anche attività anticancerogene [39] e anti-iperglicemizzanti e anti-genotossiche [40]. Gli estratti etanolici del campione di *U.lactuca* analizzati in questo lavoro hanno mostrato possedere attività antibatterica verso tutti i ceppi Gram-positivi testati, ma non verso i Gram-negativi e verso i miceti al contrario degli estratti polisaccaridici che hanno mostrato una buona attività antifungina, ma alcuna attività antibatterica ed antivirale. Raccolta nelle spiagge dopo spiaggiamenti e facile da coltivare, per le poche richieste di crescita e l'uso in bioremediation di zone eutrofiche, oltre che per usi alimentari ed industriali, tra cui la produzione di biocarburanti, *Ulva sp.* è un'altra specie promettente per la coltivazione e ulteriori studi.

Tra le Heterokontophyta, per quanto riguarda il genere *Halopteris sp.*, sono state riportate nella letteratura riguardante specie del Mediterraneo attività antiprotozoaria dell'estratto etanolic di campioni della specie *H.scoparia* [41], mentre di campioni della specie *H.filicina* l'estratto crudo e quello metanolico non hanno mostrato alcuna attività antibatterica. In genere verso ceppi batterici Gram-negativi, è stato riportato che

l'estratto metanolico ha inibito la crescita di *S.aureus*, mentre l'estratto crudo quella di *P.aeruginosa* e di *C.albicans*. [42-44] Del campione di *H.filicina* usato in questo lavoro, i polisaccaridi non hanno mostrato possedere alcuna attività antibatterica ed antifungina. A causa dei tempi di estrazione non è stato possibile valutare l'attività antivirale. Gli estratti etanolici hanno mostrato un'attività antibatterica verso tutti i ceppi di *Staphylococcus sp.* ed *E. faecalis* testati, e gli estratti acetonicici hanno mostrato un'efficacia maggiore nell'inibizione degli stessi ceppi, al contrario non è stata dimostrata alcuna efficacia nell'attività antimicotica.

Per quanto riguarda il genere *Padina sp.* è stata riportata attività antivirale del polisaccaride verso il virus HSV [45,46] ed attività antimicrobica verso ceppi batterici Gram-positivi e Gram-negativi, e verso miceti da parte di estratti etanolici [47-56]. A causa dei tempi di estrazione non è stato possibile testare in tempo le bioattività del polisaccaride del campione di *P. pavonica* in studio; entrambi gli estratti non hanno mostrato attività inibitoria verso *C.albicans* e verso i ceppi batterici gram-negativi, al contrario si sono mostrati attivi verso tutti i ceppi Gram-positivi testati. Ulteriori studi dovrebbero essere effettuati su questa alga.

Tra le Rhodophyta, per quanto riguarda il genere *Aghardiella sp.* è stato riportata l'attività anti HIV del polisaccaride [57] e l'attività antibatterica dell'estratto metanolico verso ceppi batterici Gram-negativi [58]. I polisaccaridi estratti dal campione preso in esame in questo lavoro non hanno mostrato alcuna attività antibatterica, antivirale ed antifungina. L'estratto etanolico ha mostrato una bassa attività antibatterica verso i ceppi Gram-positivi testati, ed è possibile riportare la prima segnalazione di una presente, seppur poco efficace, attività antifungina; ma la bassa tossicità ed il trattamento del campione crudo (essiccazione al sole) può indirizzare la ricerca ad ulteriori studi riguardo questo settore.

Per quanto riguarda il genere *Gracilaria sp.* è stata riportata in letteratura l'attività antiossidante, antiproliferativa ed antiprotozoaria [59-61] inoltre l'attività antibatterica [63,64], attività antivirali di estratti acquosi (verso il virus HCV) [65] e di polisaccaridi (verso il virus Dengue, il virus H1-364, H1N1, e 2) [66-69]. La poca solubilità a basse temperature del polisaccaride non ha permesso di verificarne l'attività antimicrobica, e

l'estratto etanolicò ha mostrato una blanda attività verso Gram-positivi e verso *C.albicans*.

Per quanto riguarda il genere *Hypnea sp.*, sono state riportate attività antiprotozoarie [70], e da un estratto metanolicò è stata riportata attività antimicrobica verso *B.subtilis*, *S.aureus*, *E.epidermidis*, ma si è dimostrato inattivo verso ceppi batterici Gram-negativi e *C.albicans* [71-73]. Il polisaccaride estratto dal campione locale di *H.musciformis* non ha mostrato alcuna attività verso batteri e virus, così come l'estratto etanolicò non ha mostrato alcuna attività antivirale ed una blanda attività inibitoria verso gli stafilococchi in esame, ma entrambi hanno dimostrato possedere attività inibitoria verso *C. albicans*.

In generale, i campioni di alghe rosse esaminati non hanno mostrato possedere un potenziale antimicrobico da prendere in considerazione, tranne nel caso di *H.musciformis*, per la sua azione antifungina verso *C.albicans*. I campioni di alghe brune hanno dimostrato possedere una buona attività antibatterica nei confronti dei ceppi batterici Gram-positivi, e la mancanza di ulteriori studi sul potenziale antivirale dovrebbe essere approfondito. Promettenti sembrano invece le alghe verdi, dalla cui coltivazione possono trarvi vantaggio contemporaneamente diversi settori industriali.

III.5. Bibliografia

1. Peres, Picard, Nouveau manuel de bionomie benthique de la mer mediterrannée. recueil des travaux de la station marine d'endoume, Bull. N. 31, 1964.
2. McHugh, D. J. "A guide to the seaweed industry. FAO Fisheries Technical Paper 441." *Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nations* (2003).
3. Wijesekara, Isuru, Ratih Pangestuti, and Se-Kwon Kim. "Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae." *Carbohydrate polymers* 84.1 (2011): 14-21.
4. Funahashi, Hiroomi, et al. "Wakame Seaweed Suppresses the Proliferation of 7, 12-Dimethylbenz (a)-anthracene-induced Mammary Tumors in Rats." *Cancer Science* 90.9 (1999): 922-927.
5. Morita, Kunimasa, and Takahisa Nakano. "Seaweed accelerates the excretion of dioxin stored in rats." *Journal of agricultural and food chemistry* 50.4 (2002): 910-917.
6. Trivedi, Nitin, et al. "Enzymatic hydrolysis and production of bioethanol from common macrophytic green alga *Ulva fasciata* Delile." *Bioresource technology* 150 (2013): 106-112.
7. van der Wal, Hetty, et al. "Production of acetone, butanol, and ethanol from biomass of the green seaweed *Ulva lactuca*." *Bioresource technology* 128 (2013): 431-437.
8. Luoma, S. N., G. W. Bryan, and W. J. Langston. "Scavenging of heavy metals from particulates by brown seaweed." *Marine pollution bulletin* 13.11 (1982): 394-396.
9. Chopin, Thierry, et al. "Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability." *Journal of Phycology* 37.6 (2001): 975-986.
10. Costa, L. S., et al. "Biological activities of sulfated polysaccharides from tropical seaweeds." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 64.1 (2010): 21-28.
11. Percival, Elizabeth. "The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function." *British Phycological Journal* 14.2 (1979): 103-117.

12. Talarico, Laura B., et al. "Anti-herpes simplex virus activity of sulfated galactans from the red seaweeds *Gymnogongrus griffithsiae* and *Cryptonemia crenulata*." *International journal of biological macromolecules* 34.1 (2004): 63-71.
13. Schaeffer, David J., and Victor S. Krylov. "Anti-HIV activity of extracts and compounds from algae and cyanobacteria." *Ecotoxicology and environmental safety* 45.3 (2000): 208-227.
14. Talarico, L. B., et al. "The antiviral activity of sulfated polysaccharides against dengue virus is dependent on virus serotype and host cell." *Antiviral research* 66.2 (2005): 103-110.
15. Witvrouw, Myriam, and Etienne De Clercq. "Sulfated polysaccharides extracted from sea algae as potential antiviral drugs." *General Pharmacology: The Vascular System* 29.4 (1997): 497-511.
16. Zandi, Keivan, et al. "Evaluation of in vitro antiviral activity of a brown alga (*Cystoseira myrica*) from the Persian Gulf against herpes simplex virus type 1." *African Journal of Biotechnology* 6.22 (2007).
17. Godoi, Ananda Marques de, et al. "Antiviral Activity of Sulfated Polysaccharide of *Adenantha pavonina* against Poliovirus in HEp-2 Cells." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2014 (2014).
18. Wang, Wei, Shi-Xin Wang, and Hua-Shi Guan. "The antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides: an overview." *Marine drugs* 10.12 (2012): 2795-2816.
19. Gonzalez, M. E., B. Alarcon, and L. Carrasco. "Polysaccharides as antiviral agents: antiviral activity of carrageenan." *Antimicrobial agents and chemotherapy* 31.9 (1987): 1388-1393.
20. Buck, C. et al. 2006 "Carrageenan Is a Potent Inhibitor of Papillomavirus Infection". *PloS Pathogens* 2: Pp 671-680.
21. Laurienzo, Paola. "Marine polysaccharides in pharmaceutical applications: an overview." *Marine drugs* 8.9 (2010): 2435-2465.

22. Quignard, Françoise, Romain Valentin, and Francesco Di Renzo. "Aerogel materials from marine polysaccharides." *New journal of chemistry* 32.8 (2008): 1300-1310.
- 23 Zvyagintseva, Tatiana N., et al. "A new procedure for the separation of water-soluble polysaccharides from brown seaweeds." *Carbohydrate research* 322.1 (1999): 32-39.
24. Zhang, Zhongshan, et al. "Extraction of the polysaccharides from five algae and their potential antioxidant activity in vitro." *Carbohydrate Polymers* 82.1 (2010): 118-121.
- 25 Pereira, Leonel, et al. "Use of FTIR, FT-Raman and ¹³C-NMR spectroscopy for identification of some seaweed phycocolloids." *Biomolecular Engineering* 20.4 (2003): 223-228.
- 26 Hayhoe, E. J., and E. A. Palombo. "Extracts of *Eremophila longifolia* inhibit the cariogenic activities of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*." *Planta Medica* 5.12 (2011): 2476-2482.
- 27 Ishiyama, Munetaka, et al. "A combined assay of cell viability and in vitro cytotoxicity with a highly water-soluble tetrazolium salt, neutral red and crystal violet." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19.11 (1996): 1518-1520.
- 28 National Committee for Clinical Laboratory Standards. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard, M27-A, 2nd edn. Wayne, PA: NCCLS, 2002.
29. Cho, MyoungLae, et al. "The antioxidant properties of ethanol extracts and their solvent-partitioned fractions from various green seaweeds." *Journal of medicinal food* 13.5 (2010): 1232-1239
- 30 Ravikumar, Sundaram, et al. "Antiplasmodial activity of two marine polyherbal preparations from *Chaetomorpha antennina* and *Aegiceras corniculatum* against *Plasmodium falciparum*." *Parasitology research* 108.1 (2011): 107-113.
31. Lee, Jung-Bum, et al. "Antiherpetic activities of sulfated polysaccharides from green algae." *Planta medica* 70.9 (2004): 813-817.
32. Mezghani, Sana, et al. "Antioxidant potential of *Ulva rigida* extracts: protection of HeLa cells against H₂O₂ cytotoxicity." *The Biological Bulletin* 225.1 (2013): 1-7.

33. Spavieri, Jasmine, et al. "Assessment of Dual Life Stage Antiplasmodial Activity of British Seaweeds." *Marine drugs* 11.10 (2013): 4019-4034.
34. Mendes, Gabriella da Silva, et al. "Antiviral activity of the green marine alga *Ulva fasciata* on the replication of human metapneumovirus." *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 52.1 (2010): 03-10.
35. Ivanova, V., et al. "Isolation of a polysaccharide with antiviral effect from *Ulva lactuca*." *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 24.2 (1994): 83-97.
36. Choi, Jae-Suk, et al. "Seasonal variation of antibacterial activities in the green alga *Ulva pertusa* Kjellman." *Journal of Environmental Biology* 35.2 (2014): 341.
37. Ha, Yu-Mi, et al. "Inhibitory effects of seaweed extracts on the growth of the vaginal bacterium *Gardnerella vaginalis*." *Journal of Environmental Biology* 35.3 (2014): 537.
38. Penesyan, Anahit, et al. "Antimicrobial activity observed among cultured marine epiphytic bacteria reflects their potential as a source of new drugs." *FEMS microbiology ecology* 69.1 (2009): 113-124.
39. Ryu, Min Ju, et al. "The green algae *Ulva fasciata* Delile extract induces apoptotic cell death in human colon cancer cells." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal* 49.1 (2013): 74-81
40. Celikler, Serap, et al. "Anti-hyperglycemic and antigenotoxic potential of *Ulva rigida* ethanolic extract in the experimental diabetes mellitus." *Food and Chemical Toxicology* 47.8 (2009): 1837-1840.
41. Orhan, I., et al. "Turkish freshwater and marine macrophyte extracts show in vitro antiprotozoal activity and inhibit FabI, a key enzyme of *Plasmodium falciparum* fatty acid biosynthesis." *Phytomedicine* 13.6 (2006): 388-393.
42. Dulger, Basaran, et al. "Antimicrobial activity of some brown algae from Turkey." *Asian Journal of Chemistry* 21.5 (2009): 4113.
43. Salvador Soler, Noemi, et al. "Antimicrobial activity of Iberian macroalgae." *Scientia Marina*, 2007, vol. 71, num. 1, p. 101-113 (2007).
44. Taskin, E., et al. "Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey)." *African journal of Biotechnology* 6.24 (2007): 2746-2751.

45. Vallinayagam, K., et al. "Antibacterial activity of some selected seaweeds from Pudumadam coastal regions." *Global J. Pharmacol* 3.1 (2009): 50-52.
46. Mohamed, Sahera F., and Fatimah A. Agili. "Antiviral sulphated polysaccharide from brown algae *Padina pavonia* characterization and structure elucidation." *Int J ChemTech Res* 5 (2013): 1469-1476.
47. Ben Ali, A. I., et al. "Seasonal variation of antibacterial activity of the brown alga *padina pavonica* (L) thivy collected from northern coast of tunisia." (2010).
48. El-Fatimy, E. S., and A. A. Said. "Antibacterial activity of methanolic extract of dominant marine alga (*Padina pavonia*) of Tolmeta Coasts, Libya." *J. Am. Sci* 7.4 (2011): 745-751.
49. Nogueira, Lavouisier FB, et al. "Evaluation of antibacterial, antifungal and modulatory activity of methanol and ethanol extracts of *Padina sanctae-crucis*." *African health sciences* 14.2 (2014): 372-376.
50. Manivannan, Karunamoorthy, P. Anantharaman, and T. Balasubramanian. "Antimicrobial potential of selected brown seaweeds from Vedalai coastal waters, Gulf of Mannar." *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 1.2 (2011): 114-120.
51. Taskin, E., et al. "Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey)." *African journal of Biotechnology* 6.24 (2007): 2746-2751.
52. Omar, H. H., et al. "Antibacterial activity of extracts of marine algae from the Red Sea of Jeddah, Saudi Arabia." *African Journal of Biotechnology* 11.71 (2012): 13576-13585.
53. Tüny, İnci, et al. "Antimicrobial activities of the extracts of marine algae from the coast of Urla (Izmir, Turkey)." *Turkish Journal of Biology* 30.3 (2006): 171-175.
54. Dulger, Gorkem, and Basaran Dulger. "Antibacterial Activity of Two Brown Algae (*Cystoseira compressa* and *Padina pavonica*) Against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*." *British Microbiology Research Journal* 4.8 (2014): 918-923.
55. Chander, M. Punnam, Sachithanandam Veeraragavam, and P. Vijayachari. "Antimicrobial and Hemolytic activity of seaweed *Padina gymnospora* from South

Andaman, Andaman and Nicobar Islands of India." *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 3.6 (2014): 364-369.

56. Mahmoud, Ayman M., et al. "Protective Effects of *Turbinaria ornata* and *Padina pavonia* against Azoxymethane-Induced Colon Carcinogenesis through Modulation of PPAR Gamma, NF- κ B and Oxidative Stress." *Phytotherapy Research* 29.5 (2015): 737-748.

57. Witvrouw, Myriam, et al. "Activity of a sulfated polysaccharide extracted from the red seaweed *Aghardhiella tenera* against human immunodeficiency virus and other enveloped viruses." *Antiviral Chemistry and Chemotherapy* 5.5 (1994): 297-303.

58. Radhika, D., C. Veerabahu, and R. Priya. "Antibacterial activity of some selected seaweeds from the Gulf of Mannar coast, South India." *Asian J Pharm Clin Res* 5.4 (2012): 276.

59. Narasimhan, Manoj Kumar, et al. "In vitro Analysis of Antioxidant, Antimicrobial and Antiproliferative Activity of *Enteromorpha antenna*, *Enteromorpha linza* and *Gracilaria corticata* Extracts." *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products* 8.4 (2013): 151.

60. Yang, Jing-Long, et al. "Aqueous extracts of the edible *Gracilaria tenuistipitata* are protective against H₂O₂-induced DNA damage, growth inhibition, and cell cycle arrest." *Molecules* 17.6 (2012): 7241-7254.

61. Yeh, Chi-Chen, et al. "Antiproliferation and induction of apoptosis in Ca9-22 oral cancer cells by ethanolic extract of *Gracilaria tenuistipitata*." *Molecules* 17.9 (2012): 10916-10927.

62. Ravikumar, Sundaram, Samuel Jacob Inbaneson, and Palavesam Suganthi. "Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India." *Parasitology research* 109.1 (2011): 47-52.

63. Sasidharan, Sreenivasan, Ibrahim Darah, and Mohd Kassim Mohd Jain Noordin. "In vitro antimicrobial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and acute oral toxicity of marine algae *Gracilaria changii*." *New biotechnology* 27.4 (2010): 390-396.

- 64.Kolanjinathan, K., P. Ganesh, and M. Govindarajan. "Antibacterial activity of ethanol extracts of seaweeds against fish bacterial pathogens." *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci* 13.3 (2009): 173-177.
- 65.Chen, Kuan-Jen, et al. "Aqueous extract of the edible *Gracilaria tenuistipitata* inhibits hepatitis C viral replication via cyclooxygenase-2 suppression and reduces virus-induced inflammation." *PloS one* 8.2 (2013): e57704.
- 66.Chattopadhyay, Kausik, et al. "Polysaccharides from *Gracilaria corticata*: Sulfation, chemical characterization and anti-HSV activities." *International journal of biological macromolecules* 43.4 (2008): 346-351.
- 67.Mazumder, Sutapa, et al. "Isolation, chemical investigation and antiviral activity of polysaccharides from *Gracilaria corticata* (Gracilariaceae, Rhodophyta)." *International journal of biological macromolecules* 31.1 (2002): 87-95.
- 68.Pujol, Carlos A., et al. "Antiviral activity against dengue virus of diverse classes of algal sulfated polysaccharides." *International journal of biological macromolecules* 51.4 (2012): 412-416.
- 69.Chen, Mei-zhen, et al. "In vitro anti-influenza virus activities of sulfated polysaccharide fractions from *Gracilaria lemaneiformis*." *Virologica Sinica* 25.5 (2010): 341-351.
- 69.Ravikumar, Sundaram, Samuel Jacob Inbaneson, and Palavesam Suganthi. "Seaweeds as a source of lead compounds for the development of new antiplasmodial drugs from South East coast of India." *Parasitology research* 109.1 (2011): 47-52.
- 70.Vasconcelos, Mayron Alves, et al. "Effect of algae and plant lectins on planktonic growth and biofilm formation in clinically relevant bacteria and yeasts." *BioMed research international* 2014 (2014).
- 71.Jassbi, Amir Reza, et al. "Biological activity and chemical constituents of red and brown algae from the Persian Gulf." *Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR* 12.3 (2013): 339.
- 72.Machado, Levi Pompermayer, et al. "Chemical analysis and toxicity of seaweed extracts with inhibitory activity against tropical fruit anthracnose fungi." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94.9 (2014): 1739-1744

Capitolo IV

IV.1. Discussioni finali

Sulla base dei risultati ottenuti in questo studio, relativamente ai ceppi antartici, si può concludere che:

- la percentuale di ceppi antartici attivi nei confronti di almeno un microrganismo bersaglio è apparsa comparabile con quelle riportate in letteratura riguardanti batteri associati a spugne dei mari temperati o tropicali.
- la percentuale di batteri attivi è apparsa superiore a quella riportata per ambienti come la colonna d'acqua ed i sedimenti, avvalorando la tesi che la competizione per lo spazio e le risorse spinge i microrganismi ad adottare diverse strategie di adattamento tra cui la produzione di metaboliti attivi con finalità di interferire la crescita di altri microrganismi.
- *Pseudoalteromonas sp.*, *Psychrobacter sp.* e *Arthrobacter sp.* sono le specie che hanno mostrato maggiore attività antibatterica.
- I due ceppi antartici TB41 e Cal618 producono sostanze di natura volatile (VOC) che presentano attività inibitoria verso patogeni opportunisti della fibrosi cistica appartenenti al gruppo *Burkholderia cepacia* [1-3].
- sulle molecole diffusibili prodotte dai batteri si hanno ancora poche conoscenze e i due ceppi Pli280 e A265 ancora non studiati risultano essere promettenti. Tali risultati dovrebbero generare un maggiore stimolo allo sviluppo della ricerca in questo settore.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dagli estratti di alghe:

- il trattamento di essiccazione ha sicuramente compromesso l'attività delle molecole estratte, non osservandosi alcuna attività antivirale aspettata dai dati di letteratura.

- è stata però registrata un'attività antibatterica ed antifungina ancora non note in letteratura come nel caso dell'alghe rosse *H.musciformis* e *Aghardiella sp.*
- i campioni di alghe brune hanno dimostrato possedere una buona attività antibatterica nei confronti dei ceppi batterici Gram-positivi, e la mancanza di ulteriori studi sul potenziale antivirale dovrebbe essere approfondito.
- promettenti le alghe verdi, i cui molteplici utilizzi ne stimolano la coltivazione.

Sarebbe quindi opportuno continuare a studiare la potenzialità di quelle locali al fine di poterne promuovere la coltivazione regionale senza l'introduzione di specie alloctone con il conseguente rischio ambientale.

In conclusione, è mia opinione che l'integrazione tra le varie discipline dovrà essere essenziale, in quanto:

- le strategie ecologiche permettono di individuare gli organismi più promettenti,
- l'applicazione delle biotecnologie permette il riconoscimento a livello molecolare di determinanti genici la cui presenza è un indice di probabile attività biologica da parte dei microrganismi [4,5].
- l'uso dell'ingegneria genetica permette di creare microrganismi più efficienti nella produzione delle molecole di interesse, e la modifiche delle stesse molecole prodotte consente di ottenerne delle più efficaci;
- le conoscenze biochimiche e microbiologiche consentono di pianificare le condizioni di crescita per ottimizzare la produzione[3,6,7].

IV.2.Bibliografia

1. Romoli, Riccardo, et al. "Characterization of the volatile profile of Antarctic bacteria by using solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry." *Journal of Mass Spectrometry* 46.10 (2011): 1051-1059.
2. Papaleo, Maria Cristiana, et al. "Sponge-associated microbial Antarctic communities exhibiting antimicrobial activity against *Burkholderia cepacia* complex bacteria." *Biotechnology advances* 30.1 (2012): 272-293.
3. Orlandini, Valerio, et al. "Genomic analysis of three sponge-associated *Arthrobacter* Antarctic strains, inhibiting the growth of *Burkholderia cepacia* complex bacteria by synthesizing volatile organic compounds." *Microbiological research* 169.7 (2014): 593-601.
4. Fondi, Marco, et al. "Draft genomes of three Antarctic *Psychrobacter* strains producing antimicrobial compounds against *Burkholderia cepacia* complex, opportunistic human pathogens." *Marine genomics* 13 (2014): 37-38.
5. Fondi, Marco, et al. "Draft genome sequence of the volatile organic compound-producing antarctic bacterium *Arthrobacter* sp. strain TB23, able to inhibit cystic fibrosis pathogens belonging to the *Burkholderia cepacia* complex." *Journal of bacteriology* 194.22 (2012): 6334-6335.
6. Maida, Isabel, et al. "Phenotypic and genomic characterization of the Antarctic bacterium *Gillisia* sp. CAL575, a producer of antimicrobial compounds." *Extremophiles* 18.1 (2014): 35-49.
7. Papaleo, Maria Cristiana, et al. "Bioactive volatile organic compounds from Antarctic (sponges) bacteria." *New biotechnology* 30.6 (2013): 824-838.