

mgr inż. Magdalena Chareża

Rozprawa doktorska

**WPLYW IMMOBILIZACJI ENZYMÓW
MAJĄCYCH ZDOLNOŚĆ DO DEGRADACJI BIOFILMÓW
NA ICH AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA
Z WYKORZYSTANIEM CELULOZY BAKTERYJNEJ
JAKO NOŚNIKA**

Promotor: dr hab. Jolanta Kochel-Karakulska, prof. ZUT

Promotor pomocniczy: dr inż. Radosław Drozd

Praca doktorska realizowana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii
Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego
Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Szczecin, 2023

Publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską zatytułowaną:

„Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”

[P-1] **Szymańska, M.**, Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B., & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653.

IF₂₀₂₂ – 6,953; 100 p. MEiN₂₀₂₂

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: przygotowanie odczynników i medium hodowlanego niezbędnego do produkcji celulozy bakteryjnej (CB), przygotowanie odczynników do analizy napięcia powierzchniowego, produkcję CB, oczyszczanie CB, analizę właściwości wodnych CB, analizę struktury chemicznej CB metodą ATR-FTIR, przygotowanie prób CB do analizy cytotoksyczności oraz analiz materiałowych, takich jak XRD, DSC i TGA, przygotowanie prób CB do oceny morfologii z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Ponadto, opracowałam uzyskane wyniki, wykonałam analizy statystyczne oraz przygotowałam ostateczną wersję manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[P-2] **Szymańska M.**, Karakulska J., Sobolewski P., Kowalska U., Grygorcewicz B., Böttcher D., Bornscheuer U.T., Drozd R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate Polymers*, 246, 116625.

IF₂₀₂₀ – 9,381; 140 p. MEiN₂₀₂₀

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: przygotowanie odczynników i medium hodowlanego niezbędnego do produkcji celulozy bakteryjnej (CB), produkcję CB, przygotowanie nośnika do immobilizacji, wybór mikroorganizmów niezbędnych do uzyskania rekombinowanego enzymu, przygotowanie wektora ekspresyjnego, oczyszczanie rekombinowanego enzymu, przygotowanie nośnika do immobilizacji oraz immobilizację enzymu na powierzchni membran CB, analizę stopnia biofilmowania przez bakterie patogenne na powierzchni CB metodą ATR-FTIR, współudział w wykonaniu analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, przygotowanie enzymu oraz CB do analizy

cytotoksyczności, przygotowanie prób CB do oceny stopnia biofilmowania z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej. Ponadto, opracowałam uzyskane wyniki, wykonałam analizy statystyczne oraz przygotowałam ostateczną wersję manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[P-3] Chareża M., Przygodzka K., Żywicka A., Grygorcewicz B., Sobolewski P., Mozia S., Śmiglak M., Drozd R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4740.

IF₂₀₂₃ – 6,208; 140 p. MEiN₂₀₂₃

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: przygotowanie odczynników i medium hodowlanego niezbędnego do produkcji celulozy bakteryjnej (CB), produkcję CB, przygotowanie nośnika do immobilizacji, wybór mikroorganizmów niezbędnych do uzyskania rekombinowanego enzymu, przygotowanie wektora ekspresyjnego, oczyszczanie rekombinowanego enzymu, przygotowanie nośnika do immobilizacji oraz immobilizację enzymu na membranach CB, analizę stopnia biofilmowania przez bakterie patogenne na powierzchni CB metodą ATR-FTIR, współudział w wykonaniu analiz z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, przygotowanie enzymu oraz CB do analiz cytotoksyczności. Ponadto, opracowałam uzyskane wyniki, wykonałam analizy statystyczne oraz przygotowałam ostateczną wersję manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 60%.

[P-4] Chareża M., Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). Evaluation of argon plasma treated bacterial cellulose usability as carrier for controlled releases enzymes PelA_h and PslG_h able to biofilm eradication. *Applied Sciences*, 13.

IF₂₀₂₃ – 2,838; 100 p. MEiN₂₀₂₃

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań oraz udziale we wszystkich etapach eksperymentu, które obejmowały: przygotowanie odczynników i medium hodowlanego niezbędnego do produkcji celulozy bakteryjnej (CB), produkcję i oczyszczanie CB, analizę struktury chemicznej CB metodą ATR-FTIR, modyfikację CB z wykorzystaniem niskociśnieniowej plazmy przy użyciu argonu jako gazu roboczego, przygotowanie prób CB do oceny morfologii z wykorzystaniem skaningowej mikroskopii elektronowej oraz analiz materiałowych, takich jak XPS, wybór mikroorganizmów niezbędnych do uzyskania rekombinowanych enzymów, przygotowanie wektorów ekspresyjnych, oczyszczanie

rekombinowanych enzymów, przygotowanie enzymu do analiz cytotoksyczności, przygotowanie enzymów do analiz stabilności metodą DSF, przygotowanie nośnika do immobilizacji oraz immobilizację enzymów na powierzchni CB, analizę profilu uwalniania enzymów z powierzchni CB, analizę wpływu enzymów w formie natywnej i immobilizowanych na powierzchni CB na stopień formowania biofilmu. Ponadto, opracowałam uzyskane wyniki, wykonałam analizy statystyczne oraz przygotowałam ostateczną wersję manuskryptu.

Mój udział procentowy szacuję na 70%.

Ogólna liczba punktów za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską, według wykazu czasopism naukowych MEiN z dnia 1 grudnia 2021 r., zgodnie z rokiem ukazania się prac, wynosi 480 punktów.

Sumaryczny Impact Factor (IF) za cykl prac stanowiących rozprawę doktorską, zgodny z rokiem ukazania się prac, wynosi 25,38.

W przypadku wyżej wymienionych prac eksperymentalnych miałam wiodący udział w badaniach, od udziału w opracowaniu koncepcji i metodologii, po analizę, interpretację i opublikowanie wyników. Prowadzone przeze mnie badania miały charakter interdyscyplinarny, dlatego były wykonywane we współpracy z ekspertami z różnych obszarów nauk inżynieryjnych, przyrodniczych i medycznych.

Podczas prowadzenia badań, których wyniki umożliwiły mi przygotowanie publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską, nawiązałam współpracę z naukowcami z Instytutu Biochemii na Uniwersytecie w Greifswaldzie, prof. dr Uwe T. Bornscheuer i dr Dominique Böttcher. Współpracowałam również z dr inż. Anną Żywicką i mgr inż. Katarzyną Przygodzką z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT. Do powstania cyklu publikacji przyczynili się również: dr inż. Piotr Sobolewski z Katedry Inżynierii Polimerów i Biomateriałów na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT, dr inż. Urszula Kowalska z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa ZUT, dr n. med. n. zdr. Bartłomiej Grygorcewicz z Zakładu Medycyny Laboratoryjnej na Wydziale Medycyny i Stomatologii Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, mgr Jakub Hoppe z Zakładu Chemii i Technologii Związków Krzemu na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, dr hab. inż. Beata Zielińska, prof. ZUT z Katedry Fizykochemii Nanomateriałów na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT, prof. dr hab. inż. Sylwia Mozia, dr inż. Ewa Ekiert i dr hab. inż. Dariusz Moszyński, prof. ZUT z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT, dr hab. inż. Ewa Janus, prof. ZUT z Katedry Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych na Wydziale Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT, dr hab. inż. Marcin Śmiglak, dr Michał Dutkiewicz i dr Magdalena Palacz z Poznańskiego Parku Naukowo – Technologicznego, dr inż. Magdalena Jędrzejczak-Silicka z Katedry Nauk o Zwierzętach

Przeżywających na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT, dr inż. Mariusz Madej z Zakładu Mikrobiologii na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Załącznik 1. Kopie publikacji naukowych oraz suplementów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską.

Załącznik 2. Oświadczenia współautorów publikacji naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską wraz z określeniem ich indywidualnego udziału.

Załącznik 3. Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego.

mgr inż. Magdalena Chareża

Autoreferat

**WPLYW IMMOBILIZACJI ENZYMÓW
MAJĄCYCH ZDOLNOŚĆ DO DEGRADACJI BIOFILMÓW
NA ICH AKTYWNOŚĆ KATALITYCZNA
Z WYKORZYSTANIEM CELULOZY BAKTERYJNEJ
JAKO NOŚNIKA**

Szczecin, 2023

Spis treści	
Streszczenie.....	9
Abstract.....	10
1. Wprowadzenie.....	11
2. Hipotezy	17
3. Cel badawczy	18
4. Materiały i metody.....	19
4.1. Synteza i charakterystyka polieteru silikonowego	19
4.2. Oznaczenie napięcia powierzchniowego medium H-S z dodatkiem polieteru silikonowego.....	19
4.3. Mikroorganizmy.....	20
4.4. Synteza i oczyszczanie celulozy bakteryjnej	20
4.5. Analiza wydajności procesu produkcji oraz właściwości wodnych CB	20
4.6. Analiza właściwości termicznych CB	21
4.7. Analiza struktury krystalicznej CB.....	21
4.8. Wyznaczanie porowatości CB.....	22
4.9. Analiza potencjału zeta CB	22
4.10. Modyfikacja CB z wykorzystaniem niskociśnieniowej plazmy przy użyciu argonu jako gazu roboczego.....	22
4.11. Analiza właściwości CB z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni.....	22
4.12. Ocena morfologii CB.....	23
4.13. Analiza składu chemicznego powierzchni CB	23
4.14. Analizy cytotoksyczności	23
4.15. Przygotowanie wektorów ekspresyjnych	24
4.16. Ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych.....	25
4.17. Oznaczanie stężenia białka.....	25
4.18. Analiza stabilności termicznej enzymów PelA _h i PslG _h	25
4.19. Immobilizacja PelA _h i liazы alginianowej na membranach CB	26
4.20. Imobilizacja PelA _h i PslG _h na membranach CB modyfikowanych z wykorzystaniem LPArP	26
4.21. Uwalnianie PelA _h i PslG _h na membranach CB modyfikowanych z wykorzystaniem LPArP	26
4.22. Właściwości operacyjne liazы alginianowej	26

4.22.1. Oznaczenie aktywności	26
4.22.2. Optimum temperaturowe i stabilność termiczna	27
4.23. Wpływ liazy alginianowej w formie rozpuszczonej na stopień inhibicji tworzenia i eradykację biofilmu <i>P. aeruginosa</i> PAO1	27
4.24. Analiza rozwoju biofilmu na powierzchni membran CB z immobilizowanymi enzymami	27
4.24.1. Analiza składu macierzy biofilmu na powierzchni CB	27
4.24.2. Analiza morfologii struktury biofilmu na powierzchni CB	28
4.25. Analiza liczby komórek uwolnionych z biofilmu utworzonego na membranach CB z immobilizowanym enzymem PelA_h.....	28
4.26. Analiza wrażliwości <i>P. aeruginosa</i> na gentamycynę	28
4.27. Analiza wpływu uwalniania enzymów PelA_h i PslG_h z CB modyfikowanej z wykorzystaniem LPArP na inhibicję wytwarzania biofilmu przez <i>P. aeruginosa</i>	28
4.28. Analiza statystyczna.....	29
5. Uzyskane wyniki badań.....	29
6. Wnioski	37
7. Opis pracy naukowo-badawczej.....	38
8. Bibliografia.....	43

Streszczenie

Celem rozprawy doktorskiej było zbadanie możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej (CB) jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii.

W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w wykorzystaniu zarówno naturalnych, jak i syntetycznych polimerów jako materiałów biomedycznych. Wśród naturalnych polimerów szczególnym zainteresowaniem cieszy się celuloza bakteryjna, która jest syntetyzowana przez wiele szczepów bakterii z rodzaju *Komagataeibacter*. Biopolimer ten charakteryzuje się unikalnymi właściwościami materiałowymi, takimi jak wysoka krystaliczność czy wytrzymałość mechaniczna, co predysponuje CB do zastosowań w aplikacjach biomedycznych jako doskonały materiał opatrunkowy lub nośnik dla różnego rodzaju substancji aktywnych. Mimo to, nadal istotnymi czynnikami ograniczającymi powszechne wykorzystanie CB jest kosztowny proces jej wytwarzania oraz brak właściwości bakteriobójczych i antybiofilmowych.

W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej zbadano potencjał polieteru silikonowego jako dodatku do medium hodowlanego Hestrin–Schramm (HS), w celu podniesienia efektywności produkcji CB przez szczep *Komagataeibacter xylinus*. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium poprzez znaczące obniżenie jego napięcia powierzchniowego wpłynęła korzystnie na wydajność procesu syntezy CB. Otrzymany z wykorzystaniem modyfikowanego medium hodowlanego biopolimer charakteryzował się lepszymi parametrami wodnymi, a także nie wykazywał cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych, co potwierdziło jego przydatność w zastosowaniach biomedycznych.

W niniejszej pracy udowodniono również, że immobilizacja na powierzchni membran CB hydrolazy glikozydowej PelA_h lub liazy alginianowej, enzymów mających zdolność do degradacji kluczowych elementów polisacharydowych macierzy biofilmowej, może skutecznie destabilizować proces wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa*. Ponadto wykazano, że unieruchomienie liazy alginianowej na powierzchni CB istotnie zwiększa wrażliwość komórek *P. aeruginosa* na gentamycynę, co umożliwia obniżenie dawki terapeutycznej.

Modyfikacje struktury CB zmieniające jej właściwości fizykochemiczne mogą poszerzyć jej zastosowanie w formie suchej jako nośnika dla substancji aktywnych. W badaniach własnych przeprowadzono modyfikację powierzchni CB niskociśnieniową plazmą argonową, przy użyciu argonu jako gazu roboczego (LPArP). Stwierdzono, że dzięki modyfikacji powierzchni CB z wykorzystaniem LPArP i znajomości właściwości strukturalnych enzymów można kontrolować proces ich uwalniania z powierzchni nośnika. Ponadto, unieruchomienie enzymów PelA_h i PslG_h na modyfikowanej z wykorzystaniem LPArP CB nie wpływa istotnie na zachowanie ich aktywności antybiofilmowej.

Podsumowując, w przeprowadzonych badaniach dowiedziono, że unikalna struktura celulozy bakteryjnej umożliwia jej zastosowanie jako nośnika do immobilizacji specyficznych enzymów, takich jak PelA_h, PslG_h, czy liaza alginianowa, nadających jej

właściwości antybiofilmowe. Takie innowacyjne rozwiązanie może wspomóc walkę z zakażeniami ran wywołanych przez *P. aeruginosa*, poprzez hamowanie procesu formowania biofilmu i zwiększenie lekowrażliwości tych patogennych mikroorganizmów.

Abstract

The aim of the doctoral dissertation was to investigate the potential use of enzymes immobilized on bacterial cellulose (BC) membranes as agents for degrading polysaccharide components of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix and supporting the process of antibiotic therapy.

In recent years, there has been significant progress in the utilization of both natural and synthetic polymers as biomedical materials. Among natural polymers, BC has gained particular interest due to its efficient synthesis by various strains of *Komagataeibacter* bacteria. This biopolymer exhibits unique material properties, such as high crystallinity and mechanical strength, which make BC highly suitable for biomedical applications as an excellent wound dressing material or as a carrier for various active substances. However, despite these advantages, the utilization of BC is still limited by its costly production process and the lack of bactericidal and anti-biofilm properties.

During the research conducted in this doctoral thesis, the potential of silicone polyether as an additive to the Hestrin-Schramm (HS) growth medium was examined to enhance the efficiency of BC production by the *Komagataeibacter xylinus* strain. It was shown that the modification of the physicochemical properties of the cultivation medium, achieved by significantly reducing its surface tension, had a beneficial impact on the yield of BC synthesis process. Furthermore, it was demonstrated that the biopolymer obtained using the modified growth medium exhibited improved water parameters and demonstrated non-cytotoxicity towards eukaryotic cells, confirming its suitability for biomedical applications.

This study also demonstrated that the immobilization of glycoside hydrolase PelA_h or alginate lyase, enzymes capable of degrading key polysaccharide components of the biofilm matrix, on the surface of BC membranes can effectively destabilize the process of biofilm formation by *P. aeruginosa*. Furthermore, it was shown that immobilizing alginate lyase on BC significantly increases the sensitivity of *P. aeruginosa* cells to gentamicin, allowing for a reduction in the therapeutic dose and enhancing the safety of the applied antibiotic therapy.

Modifications of the BC structure, altering its physicochemical properties, can expand its application as a dry carrier for delivering active substances. Therefore, in current research the surface modification of BC using low-pressure argon plasma with argon as the working gas (LPArP) was conducted. It was observed that through surface modification with LPArP and understanding the structural properties of enzymes, the release process from the carrier surface can be controlled. Furthermore, it was also demonstrated that the anti-biofilm activity of PelA_h and PslG_h enzymes was not significantly affected by their immobilization on the LPArP-modified BC.

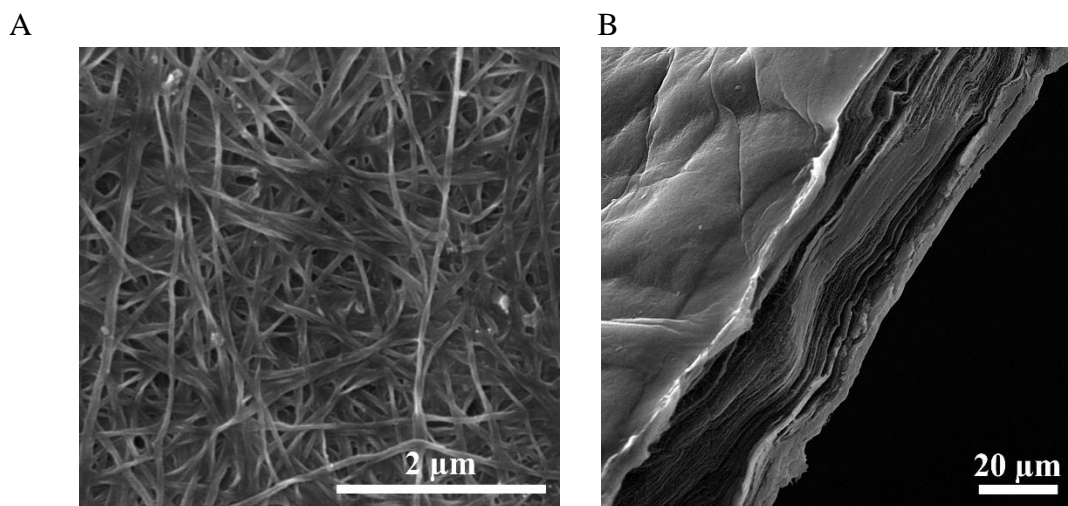
In conclusion, the conducted research has demonstrated that the unique structure of bacterial cellulose enables its use as a carrier for immobilizing specific enzymes, such as

PelA_h, PslG_h, and alginate lyase, conferring it with anti-biofilm properties. This innovative approach can potentially aid in combating wound infections caused by *P. aeruginosa* by inhibiting the biofilm formation process and enhancing the susceptibility of these pathogenic microorganisms to antibiotics.

1. Wprowadzenie

Celuloza jest najczęściej występującym naturalnym polimerem na Ziemi. Stanowi podstawowy składnik strukturalny ściany komórkowej roślin, natomiast może być również syntetyzowana zewnątrzkomórkowo w formie biofilmu przez mikroorganizmy, takie jak grzyby, bakterie i algi (Gilmour i wsp. 2023; Wang i wsp. 2019). Zdolność do syntezy celulozy bakteryjnej (CB) mają szczepy bakterii Gram-ujemnych (*Acetobacter*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Alcaligenes*) i Gram-dodatnich (*Sarcina ventriculi*), ale za najbardziej wydajnego producenta CB uważane są niepatogenne Gram-ujemne, tlenowe pałeczki *Komagataeibacter xylinus* (Raiszadeh-Jahromi i wsp. 2020; Hur i wsp. 2020).

Pod względem struktury chemicznej, zarówno celuloza pochodzenia roślinnego jak i bakteryjnego są liniowymi homopolimerami, składającymi się z cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β -1,4-glikozydowymi. Liniowe łańcuchy β -glukanu układają się w regularne, mikrofibryle (Rycina 1A), stabilizowane przez wewnętrz- i międzycząsteczkowe wiązania wodorowe pomiędzy grupami hydroksylowymi (-OH) monomerów glukozy, tworząc wielowarstwową, trójwymiarową strukturę (Rycina 1B) (Esa i wsp. 2014; Lin i wsp. 2020; Liu i wsp. 2020; Amorim i wsp. 2022).

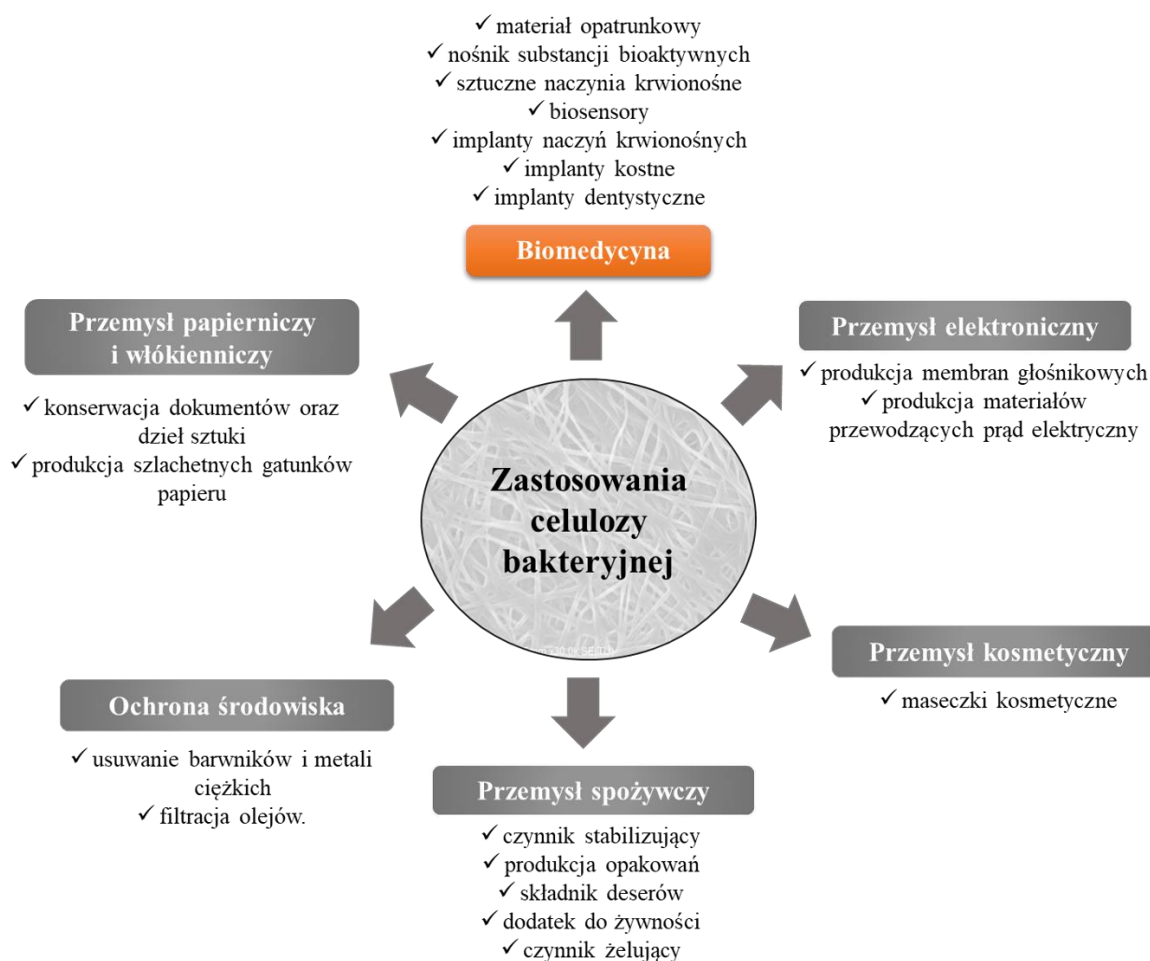


Rycina 1. Struktura powierzchni CB z widoczną siecią mikrofibryli (czerwone strzałki) (A) oraz przekrój poprzeczny obrazujący wielowarstwową strukturę CB (B). Zdjęcia własne.

Pomimo identycznej struktury chemicznej CB i celulozy pochodzenia roślinnego, CB charakteryzuje się wysoką czystością chemiczną, ze względu na brak w jej strukturze takich

zanieczyszczeń jak ligniny czy hemicelulozy Jest również hydrofobowym biopolimerem wyróżniającym się wysoką krystalicznością i porowatością. Ponadto CB jest materiałem biokompatybilnym i biodegradowalnym o dużej zdolności zatrzymywania wody i wytrzymałości mechanicznej (Illa i wsp. 2019; Gorgieva i Trček 2019; Andriani i wsp. 2020).

Wszystkie te cechy sprawiają, że CB jest wykorzystywana w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, papierniczym, elektronicznym, ochronie środowiska i biomedycynie (Rycina 2).



Rycina 2. Przykładowe zastosowania celulozy bakteryjnej (Islam i wsp. 2017; Ul-Islam i wsp. 2020; El-Gendi i wsp. 2022; Marestoni i wsp. 2020).

Pomimo wielu zalet CB i szerokich możliwości jej zastosowania istnieje również szereg ograniczeń związanych z jej wykorzystaniem w skali laboratoryjnej i przemysłowej. Jednym z nich jest ciągle wysoki koszt tradycyjnych mediów hodowlanych. Ponadto, proces syntezy jest stosunkowo długi, a ilość uzyskanego materiału często niesatysfakcjonująca. W związku z tym, zagadnienia związane ze zwiększeniem opłacalności produkcji CB są celem wielu

badania, w których poszukuje się rozwiązań pozwalających na opracowanie prostych i tanich technologii, zwiększających wydajność procesu syntezy CB na skalę przemysłową (Ullah i wsp. 2019; Ul-Islam i wsp. 2020).

Wydajność procesu syntezy CB przez komórki bakteryjne jest ściśle związana ze strukturą i sprawnością wielu szlaków metabolicznych takich jak, szlak Embdena-Meyerhofa-Parnasa (glikoliza), cykl Krebsa (cykl kwasów trójkarboksylowych), szlak pentozofosforanowy i glukoneogeneza. W przypadku wykorzystania glukozy jako źródła węgla, proces syntezy CB oparty jest na czterech głównych etapach, w których kluczową rolę odgrywają białka enzymatyczne. W pierwszym etapie zachodzi fosforylacja glukozy przez glukokinazę, w wyniku czego powstaje glukozo-6-fosforan. Następnie jest on przekształcany przez fosfoglukomutazę w glukozo-1-fosforan, po czym następuje jego konwersja do UDP-glukozy dzięki aktywności UDPG-pirofosforylasy (Rezazadeh i wsp. 2020; Liu i wsp. 2018; Lee i wsp. 2014; Jacek i wsp. 2019; Mishra i wsp. 2022). Ostatecznie, UDP-glukoza jest wykorzystywana do syntezy celulozy poprzez molekularny, wieloetapowy proces, w który zaangażowany jest kompleks enzymatyczny zawierający 4 kluczowe podjednostki białkowe (BcsA, BcsB, BcsC i BcsD) kodowane przez geny (*bcsABCD*) znajdujące się w operonie *bcs* (ang. *bacterial cellulose synthase*) oraz geny *cmcAx*, *ccpAx* i *bglAx* umiejscowione powyżej i poniżej tego operonu (Jacek i wsp. 2019; Augimeri i Strap 2015; Mishra i wsp. 2022). Proces ten jest regulowany zarówno na poziomie transkrypcji jak i na poziomie potranslacyjnym, a najbardziej znanym mechanizmem regulującym jest allosteryczna aktywacja białka BcsA, zlokalizowanego po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej, przez c-di-GMP, który związany jest z domeną regulatorową PilZ obecną w strukturze białka BcsA (Jacek i wsp. 2019; Omadjela i wsp. 2013). Oprócz domeny regulatorowej, białko BcsA zbudowane jest również z domeny katalitycznej, która wykazuje aktywność β -1,4-glikozylotransferazy odpowiedzialnej za przyłączenie monomerów glukozy do łańcuchów β -1,4-glukanu celulozy z UDP – glukozy (Augimeri i Strap 2015; Singhanian i wsp. 2021; Jacek i wsp. 2019). BcsB jest białkiem zlokalizowanym w przestrzeni peryplazmatycznej i jest połączone z błoną cytoplazmatyczną poprzez pojedynczą helisę znajdującą się na C-terminalnym końcu białka. Fragment peryplazmatyczny BcsB składa się z dwóch modułów wiążących węglowodany, które wraz z transbłonowymi helisami należącymi do BcsA tworzą kanał, przez który powstały polimer jest transportowany z cytoplazmy przez przestrzeń peryplazmatyczną w kierunku błony zewnętrznej. BcsC jest białkiem zlokalizowanym w przestrzeni peryplazmatycznej o strukturze molekularnej charakterystycznej dla białek tworzących kanały i pory, co sugeruje, że jego funkcja polega na tworzeniu właśnie tych struktur w błonie komórkowej odpowiedzialnych za wydzielanie celulozy do środowiska zewnętrznego. Natomiast białko BcsD kontroluje proces krystalizacji CB w fibryle (Jacek i wsp. 2019; Omadjela i wsp. 2013; Rezazadeh i wsp. 2020; Liu i wsp. 2018). Geny *ccpAx*, *cmcAx* i *bglAx* flankujące operon *bcs* kodują odpowiednio białko uzupełniające celulozę, endo- β -1,4-glukanazę oraz β -glukozydazę. Białka te nie są kluczowymi elementami wpływającymi na proces syntezy

CB, natomiast biorą udział w prawidłowym tworzeniu struktury łańcuchów glukanowych (Buldum i Mantalaris 2021; Jacek i wsp. 2019).

Sprawność szlaków zaangażowanych w proces syntezy CB może być modyfikowana poprzez stosowanie jako dodatkowych składników medium hodowlanego, różnego rodzaju organicznych i nieorganicznych związków chemicznych, wpływając korzystnie na ilość syntetyzowanego polimeru (Wang i wsp. 2018; Lu i wsp. 2020; Li i wsp. 2012; Gao i wsp. 2023).

Poza czynnikami na poziomie molekularnym, na ilość produkowanej CB oraz jej cechy materiałowe istotny wpływ ma sposób prowadzenia hodowli. Obecnie znane metody produkcji CB obejmują hodowle statyczne, wytrząsane oraz hodowle w bioreaktorach. Celuloza bakteryjna pozyskiwana z hodowli statycznych ma postać żelowej membrany na powierzchni medium hodowlanego, podczas gdy w hodowli wytrząsanej powstaje w formie nieregularnych amorficznych grudek (Wang i wsp. 2019). Hodowle wytrząsane uważane są za bardziej odpowiednie w zastosowaniach komercyjnych, ponieważ zapewniają większą dostępność tlenu i składników odżywczych. Obarczone są jednak powstawaniem mutantów nieprodukujących CB, co znacznie obniża wydajność procesu. Dodatkowo, CB otrzymana w hodowli wytrząsanej charakteryzuje się niskim poziomem polimeryzacji i krystaliczności oraz mniejszą wytrzymałością mechaniczną w porównaniu do hodowli statycznej (Andriani i wsp. 2020; Lahiri i wsp. 2021). Oprócz odpowiedniego systemu fermentacyjnego, kluczowym elementem procesu produkcji CB jest dobór optymalnego medium hodowlanego. Powinno ono być zoptymalizowane do wymagań konkretnego szczepu *K. xylinus*, a także być możliwie proste i tanie w przygotowaniu (Jankau i wsp. 2021; Qian i wsp. 2023; Islam i wsp. 2017). Wszystkie opisane czynniki są kluczowe w doborze systemu produkcji CB, pozwalającego na uzyskanie biopolimeru o właściwościach jakie są wymagane w konkretnym obszarze jego aplikacji.

Nowoczesne opatrunki stosowane w leczeniu ciężko gojących się ran powinny spełniać kilka ważnych kryteriów, takich jak utrzymanie wysokiej wilgotności w miejscu rany, przepuszczalność dla gazów, biokompatybilność czy biodegradowalność. Ważne jest również, aby opatrunek wchłaniał nadmiar wysięku oraz był elastyczny i łatwy do usunięcia (Rezvani Ghomi i wsp. 2019; Zheng i wsp. 2020). Problemem na szeroką skalę w leczeniu ciężko gojących się ran jest występowanie zanieczyszczeń mikrobiologicznych w opatrunkach medycznych, co wymusza częste zmiany i konieczność dodatkowego oczyszczania rany, zwiększając dyskomfort pacjenta i opóźniając proces gojenia (Brandenburg i wsp. 2015). Celuloza bakteryjna spełnia większość warunków stawianych nowatorskim opatrunkom, natomiast jej neutralność antymikrobiologiczna, sprawia, że poszukiwane są rozwiązania pozwalające na bezpieczne zabezpieczenie jej przed kolonizacją przez patogenne bakterie (Zheng i wsp. 2020).

Obecnie główną strategią pozwalającą na rozwiązanie tego problemu jest modyfikacja materiałów opatrunkowych opartych na CB poprzez wprowadzenie do struktury biopolimeru różnego rodzaju grup funkcyjnych lub też wysyceniu membran CB naturalnymi (polimery, olejki eteryczne, enzymy) i syntetycznymi (tlenki metali, nanocząsteczki metali) związkami

nadającymi jej właściwości antymikrobiologiczne (Orlando i wsp. 2020). Niektóre z modyfikacji mogą jednak wywierać negatywny wpływ na środowisko naturalne. Co więcej, w sposób niepożądany mogą wpływać na właściwości materiałowe CB oraz wykazywać toksyczne działanie na komórki ludzkie (Aïssa i wsp. 2019; Betlej i wsp. 2021).

Jednym z patogenów będącym przyczyną poważnych powikłań w terapii przewlekłych ran są bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Spośród nich, w szczególności *P. aeruginosa*, uważany jest za jedną z głównych przyczyn zakażeń szpitalnych, jak i poza szpitalnych.

P. aeruginosa jest tlenowym, Gram-ujemnym bakteryjnym patogenem wszechobecnym w środowisku naturalnym. Bakteria ta występuje między innymi w wodzie i glebie oraz wchodzi w skład mikroflory niektórych zwierząt i roślin (Oliver i wsp. 2015; Azam i Khan 2019; Thi i wsp. 2020). Jest ważną przyczyną zachorowalności i śmiertelności pacjentów z obniżoną odpornością, zwłaszcza ofiar oparzeń. Zakażenia wywołane przez te bakterie mogą powodować różne ostre choroby u hospitalizowanych pacjentów, w tym posocznicę, zapalenie płuc, zapalenie wsierdza, zapalenie ucha, zapalenie rogówki oraz zakażenia skóry i tkanek miękkich. Ponadto *P. aeruginosa* jest powszechnym patogenem w środowisku szpitalnym ze względu na swoją wrodzoną lub nabytą oporność na wiele antybiotyków o szerokim spektrum działania (Hasannejad-Bibalan i wsp. 2021).

Za jedną z głównych przyczyn oporności bakterii na wiele grup antybiotyków, uważana jest ich zdolność do wytwarzania biofilmu, który jest skupiskiem bakterii otoczonych wytwarzaną przez nie zewnątrzkomórkową macierzą polimerową (ang. *Extracellular Polymeric Substances*, EPS) (Taylor i wsp. 2014; Thi i wsp. 2020). W skład macierzy biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa* wchodzi białka, zewnątrzkomórkowe DNA, lipidy i szereg homo- i hetero- egzopolisacharydów. Spośród wymienionych egzopolisacharydy odgrywają kluczową rolę w procesie tworzenia i stabilizacji biofilmu (Ostapska i wsp. 2022; Taylor i wsp. 2014). *P. aeruginosa* wytwarza trzy główne egzopolisacharydy Pel, Psl i alginian jako strukturalny składnik macierzy biofilmu, a ich wzajemne proporcje w strukturze biofilmu są ściśle związane ze specyfiką danego szczepu. Struktura macierzy niemukoidalnych szczepów *P. aeruginosa* zawiera głównie EPS, takie jak Pel i Psl, natomiast w skład macierzy biofilmowej szczepów typu mukoidalnego wchodzi przede wszystkim alginian (Colvin i wsp. 2012; Jennings i wsp. 2015).

Psl jest heteropolisacharydem złożonym z powtarzających się jednostek D-mannozy, D-glukozy i L-ramnozy. Natomiast Pel jest liniowym homopolimerem częściowo de-N-acetylowanej α -1,4-N-acetylgalaktozaminy składającej się z dimerycznych powtórzeń galaktozaminy i N-acetylgalaktozaminy. Alginian jest liniowym, acetylowanym polimerem składającym się z jednostek D-mannuronianu i L-gulonianu połączonych wiązaniami 1,4- β -glikozydowymi. (Baker i wsp. 2016; Jones i Wozniak 2017; Le Mauff i wsp. 2022; Del Cendra i Torrents 2021). Opisane egzopolisacharydy (Pel, Psl, alginian) odpowiadają za utrzymanie struktury oraz adhezję biofilmu do różnego rodzaju powierzchni. EPS pełnią również istotne funkcje w ochronie komórek bakteryjnych przed różnego rodzaju czynnikami środowiskowymi. Egzopolisacharyd Psl zapewnia bakteriom ochronę przed komórkowymi elementami układu immunologicznego. Pel ze względu na swoje właściwości

adsorpcyjne stanowi barierę dla różnego rodzaju środków przeciwbakteryjnych. Natomiast alginian, oprócz ochrony przed układem immunologicznym i środkami bakteriobójczymi, chroni komórki przed czynnikami środowiskowymi, między innymi przed stresem oksydacyjnym powstającym podczas fagocytozy (Del Cendra i Torrents 2021).

Obecne strategie zwalczania biofilmu *P. aeruginosa* w przewlekłych zakażeniach ran opierają się głównie na mechanicznym oczyszczeniu zainfekowanej tkanki. Sposób ten jest jednak bolesny i mało skuteczny ze względu na ograniczenia w usunięciu komórek bakteryjnych z głębszych części rany. Dodatkowo, konieczne jest stosowanie skojarzonej antybiotykoterapii przy zastosowaniu wysokich dawek antybiotyków, w celu przezwyciężenia jego naturalnej wysokiej tolerancji na te środki. Podejście takie ma jednak kilka wad, takich jak występowanie oto – i nefrotoksyczności przy długotrwałym stosowaniu między innymi antybiotyków aminoglikozydowych. Ponadto, nadużywanie i niewłaściwe stosowanie antybiotyków spowodowało pojawienie się oporności wielolekowej (ang. *Multi Drug Resistance*, MDR) (Rasamiravaka i wsp. 2015).

W obliczu wielu ograniczeń stosowania antybiotyków istnieje coraz większa potrzeba opracowywania środków przeciwdrobnoustrojowych, które będą skutecznie kontrolować infekcje wywołane przez bakterie patogenne. Jedną z obiecujących metod może być zastosowanie enzymów, które charakteryzują się wielokierunkowym działaniem między innymi poprzez inhibicję tworzenia biofilmu czy eradykację już wytworzonej macierzy w celu zwiększenia penetracji środków przeciwdrobnoustrojowych. Ponadto, dzięki aktywności katalitycznej enzymów, możliwe jest również bezpośrednie zabijanie komórek bakteryjnych oraz ingerencja w system quorum sensing (Ramakrishnan i wsp. 2022).

Wiele badań potwierdziło skuteczność komercyjnie dostępnych enzymów w walce z biofilmem wytwarzanym przez patogenne bakterie. Badania te opierały się głównie na enzymach należących do klasy hydrolaz, które katalizują reakcję rozkładu składników cukrowych, białkowych oraz kwasów nukleinowych obecnych w macierzy biofilmu. (Molobela i wsp. 2010; Fleming i wsp. 2017; Mohamed i wsp. 2018; Song i wsp. 2020; Mugita i wsp. 2017; Tasia i wsp. 2020). Bardziej obiecującym podejściem jest jednak zastosowanie specyficznej grupy enzymów będących integralną częścią szlaków biosyntezy biofilmu, takich jak glikohydrolazy PelA_h i PslG_h oraz liaza alginianowa. W procesie wytwarzania polisacharydowych składników macierzy, enzymy te są głównie zaangażowane w regulację długości łańcucha oraz w hydrolizę niewłaściwie syntetyzowanych cząsteczek polisacharydów. Zapobiega to gromadzeniu się nadmiarowej ilości polisacharydów w przestrzeni peryplazmatycznej, dzięki czemu komórki mikroorganizmów są chronione przed lizą (Farrell i Tipton 2012). Pomimo istotnych funkcji, jakie te enzymy odgrywają w tworzeniu macierzy biofilmu, dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej, ich potencjał może być wykorzystany w efektywny sposób jako narzędzie terapeutyczne, wspomagające antybiotykoterapię w przebiegu ciężkich infekcji.

Jak wykazano w pracach Baker i wsp. (2016) i Pestrak i wsp. (2019), glikohydrolazy PelA_h i PslG_h w formie rozpuszczonej, nawet w niskich stężeniach mogą zapobiegać tworzeniu i eradykować biofilm *P. aeruginosa*, i skutecznie wspierać działanie antybiotyków

oraz komórek odpornościowych organizmu (Baker i wsp. 2016; Pestrak i wsp. 2019). W wielu pracach potwierdzono również istotną rolę liazы alginianowej w eradykacji biofilmu *P. aeruginosa* oraz jej znaczenie w wspomaganiu procesu antybiotykoterapii. (Daboor i wsp. 2021; Blanco-Cabra i wsp. 2020; Mahajan i wsp. 2021). Dużą zaletą w terapiach antybiofilmowych jest również możliwość stosowania tych enzymów w formie immobilizowanej. Udowodniono, że zabezpieczanie polimerów stosowanych w medycynie enzymem PslG_h hamuje rozwój biofilmu *P. aeruginosa* na ich powierzchniach (Asker i wsp. 2021; Asker i wsp. 2018). Na szczególną uwagę zasługuje również wykorzystanie liazы alginianowej jako składnika nanokompozytów do ukierunkowanej degradacji alginianu w ciężkiх przypadkach zakażeń biofilmowych towarzyszących mukowiscydozie (Wan i wsp. 2020; Patel i wsp. 2019; Li i wsp. 2019).

2. Hipotezy

- 1) Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym poprawia efektywność syntezy celulozy przez *K. xylinus* (**publikacja P-1**).
- 2) Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym może wpływać na niektóre właściwości materiałowe otrzymywanej celulozy bakteryjnej (CB) (**publikacja P-1**).
- 3) Celuloza bakteryjna uzyskana poprzez modyfikacje właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym jest materiałem biozgodnym, niewykazującym toksyczności wobec komórek eukariotycznych (**publikacja P-1**).
- 4) Immobilizacja hydrolazy glikozydowej PelA_h na powierzchni membran CB wpływa na destabilizację struktury macierzy biofilmowej wytwarzanej przez *P. aeruginosa* (**publikacja P-2**).
- 5) Liazа alginianowa immobilizowana na powierzchni CB wpływa na zmiany w strukturze macierzy biofilmowej wytwarzanej przez *P. aeruginosa* (**publikacja P-3**).
- 6) Zmiany w strukturze biofilmu *P. aeruginosa* wytwarzanego na powierzchni CB spowodowane aktywnością liazы alginianowej wpływają na zwiększenie podatności *P. aeruginosa* na gentamycynę (**publikacja P-3**).
- 7) Modyfikacja struktury CB niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego wpływa na jej właściwości fizykochemiczne i morfologiczne (**publikacja P-4**).
- 8) Modyfikacja struktury CB niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego wpływa na uwalnianie enzymów PelA_h i PslG_h z powierzchni CB (**publikacja P-4**).
- 9) Zmiany w profilach uwalniania enzymów PelA_h i PslG_h z CB modyfikowanej niskociśnieniową plazmą przy użyciu argonu jako gazu roboczego wpływają na stopień inhibicji wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa* (**publikacja P-4**).

3. Cel badawczy

Głównym celem publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego i stanowiących podstawę do ubiegania się o stopień naukowy doktora, było zbadanie możliwości wykorzystania enzymów immobilizowanych na membranach z celulozy bakteryjnej (CB) jako czynników degradujących polisacharydowe składniki macierzy biofilmu *P. aeruginosa* oraz wspomagających proces antybiotykoterapii.

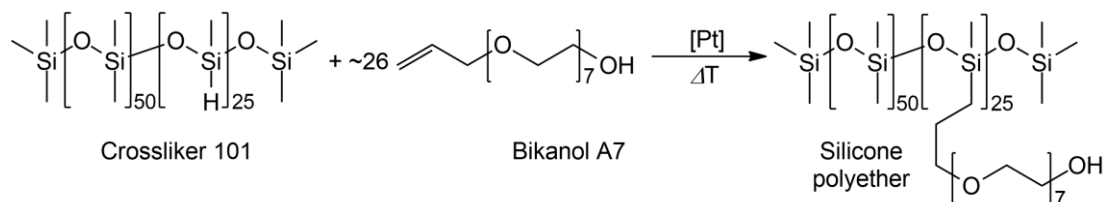
Cele szczegółowe:

1. Ocena wpływu modyfikacji medium (Hestrin–Schramm) H-S polieterem silikonowym na efektywność syntezy celulozy przez szczep *K. xylinus* (**publikacja P-1**).
2. Ocena wpływu modyfikacji medium H-S polieterem silikonowym na właściwości fizykochemiczne i parametry wodne uzyskanej CB (**publikacja P-1**).
3. Ocena cytotoksyczności syntetyzowanych przez *K.xylinus* membran CB względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej linii L929 (**publikacja P-1**).
4. Ocena wpływu immobilizacji białka PelA_h na strukturę biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa* na powierzchni membran CB (**publikacja P-2**).
5. Ocena wpływu immobilizacji liazy alginianowej na strukturę biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa* na powierzchni membran CB (**publikacja P-3**).
6. Ocena wpływu zmian w strukturze biofilmu formowanego przez *P. aeruginosa* na powierzchni CB z unieruchomioną liazą alginianową na zmiany wrażliwości bakterii na genatmycynę (**publikacja P-3**).
7. Ocena wpływu modyfikacji powierzchni CB przy użyciu niskociśnieniowej plazmy z wykorzystaniem argonu jako gazu roboczego na właściwości fizykochemiczne i morfologiczne CB (**publikacja P-4**).
8. Ocena wpływu modyfikacji powierzchni CB niskociśnieniową plazmą z wykorzystaniem argonu jako gazu roboczego na profil uwalniania enzymów PelA_h i PslG_h z powierzchni celulozy (**publikacja P-4**).
9. Ocena wpływu uwalniania enzymów PelA_h i PslG_h z powierzchni CB modyfikowanej niskociśnieniową plazmą z wykorzystaniem argonu jako gazu roboczego na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa* (**publikacja P-4**).

4. Materiały i metody

4.1. Synteza i charakterystyka polieteru silikonowego

Syntezę surfaktantu z grupy polieterów silikonowych (ang. *Silicone Polyether Surfactant*, SPS) oparto na procesie hydrosililowania polieteru allilowego (Bikanol A7) z poli(dimetylo)-ko-(metylo wodoro) siloksanen (Crosslinker 101) w obecności katalizatora Krstedta, jak przedstawiono na **Schemacie 1**.



Schemat 1. Schemat syntezy polieteru silikonowego.

Przebieg reakcji monitorowano przy użyciu techniki spektroskopii fourierowskiej (ang. *Fourier Transform Infrared*, FT-IR) z wykorzystaniem spektrometru FT-IR (Bruker Tensor 27, Bruker Optik, Ettlingen, Germany). Dla każdej próbki zebrano 16 skanów z rozdzielczością 2cm^{-1} w zakresie liczb falowych od 4000cm^{-1} do 600cm^{-1} . W celu określenia masy molekularnej SPS wykorzystano chromatografię żelową (ang. *Gel Permeation Chromatography*, GPC). Jako fazę ruchomą zastosowano tetrahydrofuran przy szybkości przepływu $0,6\text{ml/min}$. Temperatura pieca wynosiła 35°C , natomiast temperatura detektora 40°C . Średnie masy liczbowo i wagowo oraz wskaźnik polidispersyjności obliczono na podstawie krzywej kalibracyjnej dla serii wzorców polistyrenowych w zakresie od $1,31 \times 10^{-3}$ do $3,64 \times 10^6$ Da. Wszystkie analizy zostały przeprowadzone przez dr. Michała Dutkiewicza z Poznańskiego Parku Naukowo – Technologicznego i mgr. Jakuba Hoppe z Zakładu Chemii i Technologii Związków Krzemu Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu (**publikacja P-1**).

4.2. Oznaczenie napięcia powierzchniowego medium H-S z dodatkiem polieteru silikonowego

Napięcie powierzchniowe modyfikowanego poprzez dodatek SPS medium H-S mierzono przy pomocy tensometru (Krüss, K10ST, Germany), z wykorzystaniem metody pierścieniowej, w 25°C . Na podstawie otrzymanych wyników wyznaczono krytyczne stężenie micelizacji (KSM). Analizy przeprowadzono we współpracy z dr hab. inż. Ewą Janus prof. ZUT, z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-1**).

4.3. Mikroorganizmy

Do produkcji CB wykorzystano referencyjny szczep *Komagataeibacter xylinus* ATCC 53524 (American Type Culture Collection) (**publikacja P-1, P-2, P-3, P-4**).

W testach dotyczących wpływu modyfikacji CB i enzymów na inhibicję syntezy i eradykację biofilmu użyto referencyjny szczep *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15692 (PAO1).

Do przygotowania konstruktów genowych użyto szczepy: *E. coli* DH5 α , *E. coli* BL21 (DE3) oraz *E. coli* TOP10 (New England Biolabs) (**publikacja P-2, P-3, P-4**).

4.4. Synteza i oczyszczanie celulozy bakteryjnej

Aby otrzymać membrany CB prowadzono hodowlę stacjonarną szczepu *K. xylinus* z wykorzystaniem medium Hestrin–Schramm (H-S) o składzie: glukoza (20 g/l), ekstrakt drożdżowy (2 g/l), pepton (2 g/l), kwas cytrynowy (1,15 g/l), Na₂HPO₄ (2,7 g/l), MgSO₄·7H₂O (0,06 g/l) z dodatkiem 1% etanolu. Hodowlę prowadzono do 5 dni w płytkach 24-dółkowych oraz w szalkach Petriego w 28°C. Po uzyskaniu membran CB trawiono je przy użyciu 0,1 M roztworu wodorotlenku sodu w 80°C przez 90 min. Następnie próby płukano w wodzie destylowanej do momentu stwierdzenia neutralnego pH, sterylizowano w autoklawie i przechowywano w 4°C (**publikacje P-1, P-2, P-3, P-4**).

4.5. Analiza wydajności procesu produkcji oraz właściwości wodnych CB

W celu zbadania wpływu modyfikacji medium H-S polieterelem silikonowym na efektywność produkcji CB oraz jej parametry wodne, uzyskaną mokrą CB ważono, a następnie suszono w 60°C i ponownie ważono (**publikacja P-1**). Wydajność produkcji CB obliczono przy użyciu równania 1:

$$W \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{W_{sucha}}{V} \quad (1)$$

gdzie: W – wydajność, W_{sucha} – sucha masa CB w g; V – objętość medium hodowlanego w dm³.

Współczynnik uwodnienia (ang. *Moisture Content Ratio*, MCR) obliczono przy użyciu równania 2:

$$MCR = \frac{W_{mokra} - W_{sucha}}{W_{mokra}} \times 100\% \quad (2)$$

gdzie: W_{sucha} – sucha masa CB w g; W_{mokra} – mokra masa CB w g.

Współczynnik utrzymania wody (ang. *Water Holding Capacity*, WHC) obliczono przy użyciu równania 3:

$$WHC = \frac{W_{woda}}{W_{sucha}} \left(\frac{g \text{ wody}}{g \text{ suchej CB}} \right) \quad (3)$$

gdzie: W_{woda} – masa wody usunięta podczas suszenia w g; W_{sucha} – sucha masa CB w g.

4.6. Analiza właściwości termicznych CB

Analizę termiczną CB przeprowadzono metodą skaningowej kolorymetrii różnicowej (ang. *Differential Scanning Calorimeter Analysis*, DSC) i analizy termogravimetrycznej (ang. *Thermogravimetric Analysis*, TGA) (**publikacja P-1**). Pomiary kalorymetryczne wykonano w kalorymetrze Mettler Toledo DSC 1 STARe (Mettler Toledo, Switzerland) sprzężonym z chłodziwą zanurzeniową Huber TC100 (Huber, Germany). Proces prowadzono dla próbek o masie od 6 do 15 mg. Szybkość ogrzewania wynosiła 10°C/min. Analizy TGA wykonano na analizatorze TGA Q50 (TA Instruments, USA). Masy próbek celulozy użyte do analizy wynosiły od 6 do 8 mg. Analizy wykonano w zakresie temperatury pokojowej do 600°C,

z szybkością grzania 10°C/min. Analizy zostały przeprowadzone przez mgr inż. Jakuba Hoppe z Zakładu Chemii i Technologii Związków Krzemu na Uniwersytecie im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

4.7. Analiza struktury krystalicznej CB

Analizy struktury krystalicznej CB przeprowadzono za pomocą metody dyfrakcji rentgenowskiej (ang. *X-ray diffraction*, XRD), przy użyciu dyfraktometru (Aeris, Malvern Panalytical, Germany) z lampą Cu K α ($\lambda=0,15406$ nm). Wskaźnik krystaliczności (CrI) obliczono metodą dekonwolucji pików stosując równanie 4:

$$\text{CrI} = \frac{I_{200} - I_{\text{non-cr}}}{I_{200}} \times 100\% \quad (4)$$

gdzie: I_{200} – maksymalna intensywność pików odpowiadająca płaszczyźnie w próbce o wskaźnikach Millera 200 pod kątem 2θ między 21,4 a 24°C. $I_{\text{non-cr}}$ – intensywność dyfrakcji materiału niekrystalicznego.

Wielkość krystalitów obliczono przy użyciu równania 5 (równanie Scherrera):

$$D_{110} = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (5)$$

gdzie: K – stała Scherrer'a (0,9), λ – długość fali promieniowania rentgenowskiego, θ - kąt Bragg'a, β – zdolność rozdzielcza pików (110) z procedury dopasowania.

Powyższe analizy zostały przeprowadzone przez dr hab. inż. Beatę Zielińską prof. ZUT z Katedry Fizykochemii Nanomateriałów Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Wyniki zostały opracowane przez dra inż. Radosława Drozda z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-1**).

4.8. Wyznaczanie porowatości CB

Porowatość CB określono za pomocą metody gravimetrycznej. Mokra membrana CB ważono, suszono w temperaturze pokojowej przez 24 h, po czym ponownie ważono. Porowatość obliczono zgodnie z równaniem 6:

$$P = \frac{\frac{W_w - W_d}{\rho_{H_2O}}}{\left(\frac{W_w - W_d}{\rho_{H_2O}}\right) + \frac{W_w}{\rho_{PES}}} \times 100\% \quad (6)$$

gdzie: W_w – mokra masa CB w g; W_d – sucha masa CB w g; ρ_{H_2O} – gęstość wody w temperaturze 20°C (0,9982 g/cm³); ρ_{PES} – gęstość CB (1,25 g/cm³) (**publikacja P-2**).

4.9. Analiza potencjału zeta CB

Potencjał zeta błon CB wyznaczono za pomocą analizatora SurPASS™ 3 (Anton Paar GmbH, Austria). Jako elektrolit zastosowano 0,001M roztwór KCl. Do korekty pH użyto kwasu solnego oraz wodorotlenku sodu. Analiza wykonana została przez prof. dr hab. inż. Sylwię Mozię z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-3**).

4.10. Modyfikacja CB z wykorzystaniem niskociśnieniowej plazmy przy użyciu argonu jako gazu roboczego

Modyfikacja CB została przeprowadzona z wykorzystaniem niskociśnieniowej plazmy przy użyciu argonu jako gazu roboczego (ang. *Low-pressure Argon Plasma*, LPArP) za pomocą urządzenia HPT-100 Benchtop Plasma 154 Treater (Henniker Plasma, UK). Proces prowadzono w komorze gazowej o mocy 100 W i przepływie gazu 10 sccm (ang. *standard cubic centimeter per minute*) przez 120 s, 240 s, 480 s i 960 s z każdej strony CB (**publikacja P-4**).

4.11. Analiza właściwości CB z wykorzystaniem spektroskopii osłabionego całkowitego odbicia w podczerwieni

Wszystkie badania dotyczące analizy składu chemicznego powierzchni CB wykonano za pomocą spektrometru fourierowskiego (FT-IR) ALPHA II (Bruker Co., Germany), z wykorzystaniem jednoodbiciowej przystawki wykonanej z diamentu (ang. *Attenuated Total Reflectance*, ATR). Widma zbierano w zakresie liczb falowych 4000 cm⁻¹ – 400 cm⁻¹ przy rozdzielczości 2 cm⁻¹ lub 4 cm⁻¹ (32 skany) (**publikacje P-1, P-2, P-3, P-4**). Zebrane widma ATR-FTIR analizowano z wykorzystaniem oprogramowania SpectraGryph 1.2. i OriginPro2021. Na podstawie uzyskanych pasm adsorpcyjnych obliczono współczynniki krystaliczności, takie jak: LOI (ang. *Lateral Order Index*), jako stosunek pasm przy liczbach falowych 1429 cm⁻¹ i 897 cm⁻¹ oraz TCI (ang. *Total Crystallinity Index*), jako stosunek pasm przy liczbach falowych 1371 cm⁻¹ i 2900 cm⁻¹. Ponadto obliczono wskaźnik wiązań wodorowych HBI (ang. *Hydrogen Bonds Index*), jako stosunek pasm 3400 cm⁻¹ i 1320 cm⁻¹. Zawartość celulozy Ia obliczono na podstawie równania 7:

$$I\alpha = 2,55 \frac{A750}{(A710+A750)} - 0,32 \quad (7)$$

gdzie: A750 – intensywność pasma przy liczbie falowej 750 cm⁻¹ dla celulozy I_α, A710 – intensywność pasma przy liczbie falowej 710 cm⁻¹ dla celulozy I_β.

4.12. Ocena morfologii CB

Analizę morfologii powierzchni CB przeprowadzono techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM). Próby CB przygotowano poprzez całonocne suszenie sublimacyjne za pomocą liofilizatora (Christ Alpha 1-2 LD Plus, Germany), a następnie napyłono złotem (**publikacja P-1**) lub poprzez odwodnienie prób w szeregu alkoholowym i napyłanie chromem (**publikacja P-4**). Zdjęcia wykonane zostały za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SU3500, Hitachi, Japan) przez dr Magdalenę Palacz z Poznańskiego Parku Naukowo-Technologicznego (**publikacja P-1**) i dr inż. Ewę Ekiert z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-4**).

4.13. Analiza składu chemicznego powierzchni CB

Analizę składu chemicznego powierzchni CB przeprowadzono metodą rentgenowskiej spektrometrii fotoelektronów (ang. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS), za pomocą spektroskopu Prevac (PREVAC sp. z oo, Polska) wyposażonego w analizator energii elektronów Scienta SES 2002 (SCIENTA AB, ScientaOmicron, Szwecja) pracujący w trybie stałej energii transmisji 50 eV. Podczas analizy wykorzystano anodę magnezową emitującą promieniowanie linii K_α o energii 1253,6 eV. Próbkę CB przymocowano do uchwytu ze stali nierdzewnej za pomocą dwustronnych krążków samoprzylepnych przewodzących węgiel. Kalibrację skali energii wiązania elektronów dokonano opierając się na położeniu linii węgla C1s na wartości 286,7 eV. Analizy zostały przeprowadzone przez dra hab. inż. Dariusza Moszyńskiego prof. ZUT, z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-4**).

4.14. Analizy cytotoksyczności

Wszystkie analizy cytotoksyczności przeprowadzono zgodnie z normą ISO 10993-5 (**publikacje P-1, P-2 P-3, P-4**). Do badań użyto komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej linii L929 (ATCC® no. CCL-1TM). Zmiany morfologiczne komórek oceniono przy użyciu mikroskopu świetlnego odwróconego (Delta Optical IB-100, Polska lub Nikon TS-100, Japonia), natomiast żywotność komórek określono z wykorzystaniem testu opartego na pomiarze fluorescencji resazuryiny. Powyższe analizy wykonano we współpracy z dr. inż. Piotrem Sobolewskim z Katedry Inżynierii Polimerów i Biomateriałów Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie oraz dr inż.

4.16. Ekspresja i oczyszczanie białek rekombinowanych

Aby uzyskać rekombinowane enzymy PelA_h, PslG_h i liazę alginianową prowadzono hodowlę komórek *E. coli* BL-21 (DE3), zawierających wektor ekspresyjny, w 37°C, w medium LB (ang. *Lysogeny Broth*) (BioMaxima, Polska) z dodatkiem kanamycyny (A&A Biotechnology, Polska) o końcowym stężeniu w medium wynoszącym 50 µg/mL. Hodowlę prowadzono do uzyskania gęstości optycznej komórek ~0,5-0,6 przy długości fali 600 nm. Po uzyskaniu odpowiedniej gęstości optycznej indukowano ekspresję poprzez dodanie IPTG (A&A Biotechnology, Polska) o końcowym stężeniu w medium wynoszącym 1 mM (**publikacja P-2**) lub 0,1 mM (**publikacje P-3, P-4**). Następnie komórki inkubowano przez noc w 20°C (**publikacja P-2**) lub 16°C (**publikacje P-3, P-4**) z wytrząsaniem (200 rpm). Po nocnej inkubacji komórki zebrano przez odwirowanie (9000xg, 25 min, 4°C) i rozpuszczano w buforze lizującym (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl), po czym poddawano dezintegracji ultradźwiękowej za pomocą sonifikatora (Sonoplus, Bandelin, Niemcy). Tak przygotowany lizat komórkowy oczyszczano z wykorzystaniem chromatografii metalopowinowactwa (ang. *Immobilized Metal Affinity Chromatography*, IMAC). Białka zagęszczono z użyciem membrany filtrującej Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, Germany) z wartością odcięcia masy cząsteczkowej 10 kDa. W celu sprawdzenia czystości otrzymanych preparatów enzymatycznych oraz oszacowania masy molekularnej białek wykorzystano metodę elektroforezy w warunkach denaturujących (SDS-PAGE) (**publikacje P-2, P-3, P-4**).

4.17. Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczono metodą Bradforda (Bradford 1976) za pomocą czytnika mikroplótek Tecan Infinite 200 PRO (TECAN, Szwajcaria), z wykorzystaniem albuminy bydlęcej jako standardu oraz poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm, przy użyciu molowego współczynnika ekstynkcji wynoszącego: PelA_h - 44,920 M⁻¹ cm⁻¹, PslG_h - 111,840 M⁻¹ cm⁻¹, liazza alginianowa - 67,630 M⁻¹ cm⁻¹, obliczonych na podstawie sekwencji aminokwasowych poszczególnych białek za pomocą programu ProtParam. Pomiaru wykonano przy użyciu mikro-objętościowej płytki Take3 kompatybilnej z czytnikiem Biotek Synergy HTX (BioTek, USA) (**publikacje P-2, P-3, P-4**).

4.18. Analiza stabilności termicznej enzymów PelA_h i PslG_h

Stabilność termiczną enzymów PelA_h i PslG_h, w formie rozpuszczonej i liofilizowanej, mierzono z wykorzystaniem różnicowej fluorymetrii skaningowej (ang. *Differential Scanning Fluorimetry*, DSF) za pomocą urządzenia Prometheus NT.48 (Nano Temper Technologies GmbH, Niemcy). Próbkę enzymów naniesiono do standardowych kapilar klasy nanoDSF i ogrzewano w zakresie od 20°C do 95°C, z szybkością 1°C na minutę. Proces rozfałdowania białek monitorowano poprzez pomiar intensywności fluorescencji przy długości fali 330 nm i 350 nm. Analizę uzyskanych danych przeprowadzono za pomocą oprogramowania PRThermControl. Analiza została wykonana

przez dra inż. Mariusza Madeja z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego (**publikacja P-4**).

4.19. Immobilizacja PelA_h i liazy alginianowej na membranach CB

Aby określić efektywność procesu immobilizacji przygotowano serie rozcieńczeń białek PelA_h w buforze SBF (ang. *Simulated Body Fluid*) o pH 7,4 (**publikacja P-2**) i liazy alginianowej w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 (**publikacja P-3**). Membrany CB o takiej samej masie przeniesiono do probówki typu falkon i inkubowano z 5 ml roztworu enzymów w temperaturze 25°C z mieszaniem. W równych odstępach czasu pobierano próby roztworu białka i mierzono zmiany w stężeniu zgodnie z protokołem przedstawionym w sekcji 4.15. Wydajność procesu immobilizacji i ilość zaadsorbowanego na CB białka obliczono zgodnie z równaniami 8 (**publikacja P-2**) i 9 (**publikacja P-2, P-3**).

$$W (\%) = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100\% \quad (8)$$

$$Q \left(\frac{mg}{g}\right) = \frac{C_0 - C_e}{W_d} \times V \quad (9)$$

gdzie: W – wydajność adsorpcji; C₀ – stężenie białka przed adsorpcją; C_e – stężenie białka po adsorpcji; Q – ilość zaadsorbowanego białka; W_d – sucha masa CB w g; V – objętość robocza roztworu białka w cm³.

4.20. Immobilizacja PelA_h i PslG_h na membranach CB modyfikowanych z wykorzystaniem LPArP

Proces immobilizacji PelA_h i PslG_h na modyfikowanej CB przeprowadzono nanosząc 5 µl odpowiedniego stężenia enzymu na powierzchnię CB o średnicy ok. 6 mm i zamrożono z wykorzystaniem suchego lodu. Po zamrożeniu próbki suszono z wykorzystaniem liofilizatora (Alpha 1–2 LDplus, Christ, Germany) w -60°C i ciśnieniu 0,1 mBar (**publikacja P-4**).

4.21. Uwalnianie PelA_h i PslG_h na membranach CB modyfikowanych z wykorzystaniem LPArP

Próbki modyfikowanej CB z unieruchomionymi na jej powierzchni enzymami PelA_h i PslG_h przenoszono do probówek typu Eppendorf. i dodawano do nich 500 µl 50 mM buforu fosforanowego (pH 7,4). Uwalnianie białka mierzono poprzez zmiany stężenia zgodnie z protokołem przedstawionym rozdziale 4.17 (**publikacja P-4**).

4.22. Właściwości operacyjne liazy alginianowej

4.22.1. Oznaczenie aktywności

Do oznaczenia aktywności liazy alginianowej jako substrat zastosowano alginian sodu o stężeniu 0,2% (w/v) w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4). Aktywność mierzono poprzez zmianę absorbancji przy długości fali 235 nm przez 5 min w odstępach co 30 s z wykorzystaniem czytnika mikropłytek Tecan Infinite m200 PRO (TECAN, Szwajcaria).

Aktywność liazy alginianowej wyrażono w jednostkach na miligram białka (U/mg) (**publikacja P-3**).

4.22.2. *Optimum temperaturowe i stabilność termiczna*

Optimum temperaturowe liazy alginianowej mierzono w temperaturach: 30, 40, 50, 60, 70 i 80°C. Przed rozpoczęciem pomiaru aktywności substrat inkubowano w każdej z temperatur przez 5 min. W celu oznaczenia stabilności termicznej liazy alginianowej roztwór enzymu przechowywano w temperaturze 37°C i 4°C przez 30 dni w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4). Reakcję pomiaru aktywności przeprowadzono w sposób opisany w rozdziale 4.22.1. Aktywność wyrażono w wartościach względnych, przyjmując najwyższą wartość jako 100% (**publikacja P-3**).

4.23. **Wpływ liazy alginianowej w formie rozpuszczonej na stopień inhibicji tworzenia i eradykację biofilmu *P. aeruginosa* PAO1**

W celu zbadania wpływu liazy alginianowej na eradykację biofilmu *P. aeruginosa* PAO1 hodowlę bakteryjną prowadzono w medium TSB (ang. *Tryptic Soy Broth*) (BioMaxima, Polska) suplementowanym 1% roztworem glukozy, w 37°C przez 24 h. Następnie medium usunięto, każdy dołek przepłukano wodą destylowaną, a następnie dodano enzym w odpowiednich rozcieńczeniach zawieszony w buforze PBS. Biofilm z enzymem inkubowano przez 1 h w 37°C, a następnie barwiono 0,1% roztworem fioletu krystalicznego i mierzono zmiany intensywności jego zabarwienia przy długości fali 595 nm, z użyciem czytnika mikropłytek Tecan Infinite m200 PRO (TECAN, Szwajcaria). Wpływ enzymu na inhibicję formowania biofilmu sprawdzono poprzez dodanie rozcieńczeń enzymów do medium hodowlanego na początku czasu inkubacji. Stopień inhibicji mierzono jako zmianę w intensywności zabarwienia fioletu krystalicznego (**publikacja P-3**).

4.24. **Analiza rozwoju biofilmu na powierzchni membran CB z immobilizowanymi enzymami**

4.24.1. *Analiza składu macierzy biofilmu na powierzchni CB*

Wpływ immobilizacji enzymów PelA_h i liazy alginianowej na stabilność biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa* PAO1 na powierzchni CB analizowano za pomocą spektrometru fourierowskiego (FT-IR) ALPHA II (Bruker Co., Germany), z wykorzystaniem jednodobiciowej przystawki ATR z kryształem diamentowym (ang. *Attenuated Total Reflectance*, ATR). Widma zbierano w zakresie liczb falowych 4000 cm⁻¹ - 400 cm⁻¹ przy rozdzielczości 4 cm⁻¹ (32 skany) (**publikacje P-2, P-3**). Zebrane widma ATR-FTIR analizowano poprzez stosunek intensywności pasm odpowiadających poszczególnym składnikom macierzy biofilmowej *P. aeruginosa*, z wykorzystaniem oprogramowania SpectraGryph 1.2. i OriginPro2021. Dwuwymiarową (2D) analizę korelacyjną otrzymanych widm przeprowadzono za pomocą aplikacji oprogramowania OriginPro2021 (**publikacje P-1, P-3**).

4.24.2. Analiza morfologii struktury biofilmu na powierzchni CB

Próby CB z wytworzonym na jej powierzchni biofilmem utrwalono w szeregu rozcieńczeń alkoholu etylowego. Przed obrazowaniem SEM próbki napyłono złotem z palladem za pomocą urządzenia Q150R ES (Quorum Technologies, Wielka Brytania). Morfologię biofilmu wytworzonego na membranach CB z immobilizowanym enzymem PelA_h wizualizowano za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (VEGA3, TESCAN, Czechy). Badania mikroskopowe przeprowadzono we współpracy z dr inż. Urszulą Kowalską z Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-2**).

4.25. Analiza liczby komórek uwolnionych z biofilmu utworzonego na membranach CB z immobilizowanym enzymem PelA_h

Membrany CB z utworzonym na jej powierzchni biofilmem przepłukano kilkakrotnie w buforze SBF w celu usunięcia komórek planktonicznych, a następnie dokładnie zworteksowano. Do oszacowania liczby komórek bakteryjnych uwolnionych z membran CB wykorzystano cytometr przepływowy BD Accuri C6 Plus (BD Bioscience, USA). Analizy prowadzone były we współpracy z dr. n. med. n. zdr. Bartłomiejem Grygorcewiczem z Zakładu Medycyny Laboratoryjnej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie (**publikacja P-2**).

4.26. Analiza wrażliwości *P. aeruginosa* na gentamycynę

W celu zbadania wpływu immobilizacji liazy alginianowej na membranach CB na wrażliwość bakterii *P. aeruginosa* PAO1 na gentamycynę przeprowadzono proces jednoczesnej immobilizacji enzymu i antybiotyku, zgodnie z protokołem przedstawionym w rozdziale 4.19. W celu wyznaczenia odpowiedniego stężenia gentamycyny wyznaczono minimalne stężenie hamujące (ang. *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC). Ilość uwolnionych komórek z membran CB określono zgodnie z protokołem przedstawionym w rozdziale 4.25. Do analizy przeżywalności bakterii na powierzchni membran CB wykorzystano barwienie fluorescencyjne typu live/dead (LIVE/DEAD BacLight™ Viability Kit). Procent żywych i martwych komórek *P. aeruginosa* PAO1 określono za z wykorzystaniem cytometru BD Accuri C6 Plus (BD Bioscience, USA). Analizy wykonano we współpracy z dr inż. Anną Żywicką z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie (**publikacja P-4**).

4.27. Analiza wpływu uwalniania enzymów PelA_h i PslG_h z CB modyfikowanej z wykorzystaniem LPARP na inhibicję wytwarzania biofilmu przez *P. aeruginosa*

W celu zbadania wpływu PelA_h i PslG_h uwolnionych z membran CB modyfikowanych z wykorzystaniem LPARP na wytwarzanie biofilmu *P. aeruginosa* PAO1, CB z immobilizowanymi enzymami przeniesiono do 96-dołkowych płytek titracyjnych i dodano zawiesinę bakteryjną w medium TSB suplementowanym 1% roztworem glukozy. Hodowlę prowadzono w 37°C przez 24 h. Hamowanie procesu formowania biofilmu przez

P. aeruginosa mierzono jako zmianę intensywności fioletu krystalicznego w sposób opisany w rozdziale 4.23 (**publikacja P-4**).

4.28. Analiza statystyczna

Wszystkie dane przedstawiono jako średnie \pm SEM z trzech powtórzeń biologicznych i technicznych. Analizy statystyczne zostały przeprowadzone z wykorzystaniem oprogramowania Statistica 13 (**publikacje P-1, P-2**) oraz OriginPro2021 (**publikacje P-3, P-4**). Różnice statystyczne między próbkami określano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) oraz testu post-hoc Tukey'a ($p < 0.05$). (**publikacje P-1, P-2, P-3, P-4**).

5. Uzyskane wyniki badań

Etap 1 (publikacja P-1)

Produkcja CB na skalę laboratoryjną oraz przemysłową opiera się głównie na wykorzystaniu wieloskładnikowego medium hodowlanego, które zawiera różnego rodzaju źródła węgla, azotu oraz niezbędne składniki mineralne. Jest to jeden z głównych powodów wysokich kosztów produkcji CB, które zależą od źródła pochodzenia substratów, ich czystości, czy też dostępności. Obecnie na całym świecie trwają intensywne badania nad rozwiązaniem tego problemu. Jedną z obiecujących metod są różnego rodzaju modyfikacje *in situ*, które polegają między innymi na suplementacji standardowego medium hodowlanego dodatkami, wpływającymi na wydajność procesu produkcji CB. Kontrola warunków syntezy CB jest również dobrym sposobem na zmianę lub ukierunkowaną modyfikację właściwości materiałowych tego biopolimeru (Cazón i Vázquez 2021; Ul-Islam i wsp. 2020).

Ze względu na fakt, że celuloza bakteryjna w hodowli statycznej wytwarzana jest przez tlenowe bakterie *K. xylinus* na powierzchni medium hodowlanego założyłam, że modyfikacja jego napięcia powierzchniowego może istotnie wpływać na efektywność syntezy i właściwości materiałowe tego biopolimeru. Zmiana wartości tego parametru może również ułatwiać wymianę gazową pomiędzy cieczą a otoczeniem, co ma istotne znaczenie w kontekście hodowli tlenowych bakterii, do których należy *K. xylinus*. Kluczowym elementem w tego typu modyfikacji są właściwości zastosowanej substancji powierzchniowo czynnej, która oprócz redukcji napięcia powierzchniowego, powinna być bezpieczna dla komórek bakteryjnych i skuteczna w niskich stężeniach.

Dlatego we współpracy z naukowcami z Poznańskiego Parku Naukowo - Technologicznego analizowałam wpływ dodatku polieteru silikonowego (SPS) na efektywność procesu produkcji oraz właściwości CB.

Pierwszym krokiem była synteza SPS oraz jego charakterystyka. Prace z tym związane przeprowadzone zostały częściowo w Poznańskim Parku Naukowo-Technologicznym. Otrzymany SPS charakteryzował się średnią liczbową masą cząsteczkową równą 10700 Da, która została wyznaczona techniką chromatografii żelowej (GPC).

Następnie analizowałam wpływ stężenia SPS na redukcję napięcia powierzchniowego medium hodowlanego H-S. Wykazałam, że dodatek już w bardzo niskich stężeniach polieteru silikonowego do medium H-S obniża jego napięcie powierzchniowe z 60 mN/m do ok. 30 mN/m, a krytyczne stężenie micelizacji (KSM) wynosi $0,8 \times 10^{-2} \%$, co odpowiada wartości 5 $\mu\text{mol/L}$. Ponadto, wykazałam, że związek ten w zakresie wykorzystanych do modyfikacji medium H-S stężeń jest nietoksyczny względem komórek mysich fibroblastów linii L929 oraz nie wpływa na żywotność bakterii *K. xylinus*.

W dalszym etapie badań prowadziłam hodowlę stacjonarną bakterii *K. xylinus* przez 5 dni w medium H-S z dodatkiem SPS. Zaobserwowałam, że modyfikacja medium H-S przez obecność SPS znacznie poprawia wydajność produkcji CB nawet przy najniższym zastosowanym stężeniu surfaktantu ($0,5 \times 10^{-3} \%$), gdzie uzysk mokrej i suchej masy był odpowiednio o ok. 6 % i 11% większy w porównaniu do próby kontrolnej. Najlepsze wyniki otrzymałam przy zastosowaniu stężenia SPS równego 0,01%, bliskiego wartości KSM. W tym przypadku ilość uzyskanej suchej i mokrej masy CB była odpowiednio o 15% i 37% większa w porównaniu z próbą kontrolną.

Właściwości wodne CB są bardzo istotne z punktu widzenia jej zastosowań biomedycznych, takich jak opatrunki na rany. Nowoczesne terapie gojenia ran opierają się na wykorzystaniu tzw. mokrych opatrunków, które mają zdolność do utrzymania odpowiedniej wilgotności rany. Nie tylko przyspiesza to proces gojenia, ale również minimalizuje ból pacjenta podczas zmiany opatrunku. Po uzyskaniu CB ze standardowego i modyfikowanego medium wyznaczyłam parametry CB, takie jak zdolność do zatrzymywania wody (WHC) oraz współczynnik uwodnienia (MCR). Zaobserwowałam, że dodatek SPS do medium hodowlanego miał wpływ na oba te wskaźniki. Szczególnie istotne zmiany zaobserwowałam w zdolności zatrzymywania wody przez CB, której wartość była aż o 1,4 razy większa w próbie z dodatkiem 0,1% SPS w porównaniu z próbą kontrolną.

Następnie przeprowadziłam szczegółową analizę morfologii oraz właściwości fizykochemicznych uzyskanej CB. Na podstawie zdjęć wykonanych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego wykazano, że dodatek SPS do medium hodowlanego nie miał istotnego wpływu na morfologię oraz porowatość CB. Polymer charakteryzował się typową dla CB trójwymiarową strukturą składającą się gęstej sieci mikrofibryli o średnicy w zakresie 80-160 nm, co jest zgodne z literaturowymi doniesieniami dotyczącymi CB syntetyzowanej przez *K. xylinus* (Pogorelova i wsp. 2020; do Nascimento i wsp. 2019).

W celu zbadania czy analizowany surfaktant interferuje ze strukturą wytwarzanej CB wykorzystywałam metodę spektrometryczną ATR-FTIR. W zakresie widma od 800 cm^{-1} do 1800 cm^{-1} , zawierającego szereg charakterystycznych dla CB pasm, zaobserwowałam tylko pasma charakterystyczne dla niemodyfikowanej CB, co sugeruje, że SPS nie integruje się ze strukturą mikrofibryli CB. Na podstawie uzyskanych widm obliczyłam wartości wskaźników krystaliczności, takich jak: LOI i TCI, które nie wykazały istotnych różnic pomiędzy analizowanymi próbami. Znalazło to również potwierdzenie w wynikach otrzymanych z wykorzystaniem techniki dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD). Analiza ta wykazała, że

dodatek SPS do medium hodowlanego nie wpłynął istotnie na krystaliczność otrzymanej CB, a także rozmiary krystalitów mikrofibryli CB. Aby uzupełnić charakterystykę właściwości materiałowych CB, we współpracy z naukowcami z Zakładu Chemii i Technologii Związków Krzemu Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu przeprowadzono analizę stabilności termicznej CB otrzymanej z wykorzystaniem standardowego oraz modyfikowanego medium. W tym celu wykonano analizę termogravimetryczną (TGA) i różnicową kolorymetrię skaningową (DSC). Otrzymane wyniki wykazały brak negatywnego wpływu dodatku SPS na stabilność termiczną otrzymywanej CB, potwierdzając brak oddziaływania analizowanego surfaktantu na strukturę molekularną biopolimeru. Ze względu na docelowe przeznaczenia otrzymanej CB w aplikacjach biomedycznych jako np. materiału opatrunkowego czy nośnika w systemach dostarczania substancji aktywnych, przeanalizowano toksyczność CB względem komórek mysich fibroblastów linii L929. Analiza ta nie wykazała istotnego spadku żywotności badanych komórek oraz wpływu na ich cechy morfologiczne.

Etap 2 (publikacja P-2)

Celuloza bakteryjna posiada wiele unikalnych właściwości, które determinują jej przydatność w aplikacjach biomedycznych. Natomiast brak właściwości bakteriobójczych czy ograniczających proces formowania biofilmu przez bakterie na jej powierzchni ogranicza jej wykorzystanie (Wahid i wsp. 2019). Mając powyższe na uwadze, celem badań była immobilizacja na powierzchni nigdy nie suszonej CB domeny hydrolitycznej enzymu PelA_h, mającej zdolność do rozkładu egzopolisacharydu Pel obecnego w strukturze biofilmu wytwarzanego przez *P. aeruginosa*. Do badań jako metodę immobilizacji wybrałam proces adsorpcji, ponieważ jest to jeden z najprostszych sposobów unieruchamiania enzymów na powierzchni nośnika, opierający się na tworzeniu słabych wiązań pomiędzy nośnikiem a enzymem, poprzez siły Van der Waalsa, oddziaływania elektrostatyczne czy hydrofobowe. Dodatkowo, jest to proces ekonomiczny, ponieważ nie wymaga specjalistycznych odczynników, a dzięki temu nie wpływa na właściwości katalityczne enzymów (Nguyen i Kim 2017).

Badania rozpoczęłam od przygotowania CB jako nośnika do immobilizacji, który charakteryzował się wysokim stopniem krystaliczności oraz porowatością na poziomie 55%. Następnie przeprowadziłam proces immobilizacji enzymu, którego maksymalna efektywność w optymalnych warunkach pozwalała na adsorpcję 38,5 mg/g suchej masy CB przy zastosowaniu początkowego stężenia PelA_h wynoszącego 85,0 mg/g suchej masy CB.

Aby sprawdzić czy sposób orientacji cząsteczek białka PelA_h unieruchomionego na powierzchni CB nie wpływa na jego właściwości katalityczne analizowałam rozkład ładunku na powierzchni białka PelA_h z wykorzystaniem programów Propka i APBS (ang. *Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*) za pośrednictwem serwera PDB2PQR. Otrzymane wyniki wizualizowałam następnie wykorzystując program UCSF Chimera. Analiza ta wykazała, że powierzchnia PelA_h zawiera głównie regiony naładowane ujemnie oraz niewielką ilość

regionów naładowanych dodatnio. Co istotne stwierdziłam, że obszar katalityczny jest ujemnie naładowany, sugeruje to prawidłową orientację unieruchomionego białka na powierzchni nośnika, zapewniającą dostęp do egzopolisacharydu Pel wydzielanego przez komórki *P. aeruginosa* podczas wytwarzania macierzy biofilmu.

Aby zbadać wpływ immobilizacji białka PelA_h na membranach CB na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa* na powierzchni nośnika wykorzystałam metodę ATR-FTIR rozszerzoną o dwuwymiarową (2D) analizę korelacyjną widm. Szczegółowej analizie poddałam region o zakresie spektralnym liczby falowej od 1800 cm⁻¹ do 800 cm⁻¹, który zawiera pasma charakterystyczne dla grup funkcyjnych obecnych w strukturze biofilmu *P. aeruginosa*. Pasma o liczbie falowej 1530 cm⁻¹ przypisane jest do amidu II, co odpowiada akumulacji biomasy, natomiast pasmo przy 1450 cm⁻¹ charakteryzuje drgania zginające CH₂ obecne w strukturze lipidów. Pasma przy 1230 cm⁻¹ przypisane jest rozciągającym drganiom P=O w grupach PO²⁻ fosfodiestrów kwasów nukleinowych, natomiast do pasma przy 1395 cm⁻¹ przypisuje się rozciągające drgania symetryczne C-O grupy karboksylowej (COO⁻) (Suci i wsp. 1998). Przeprowadzona dwuwymiarowa analiza korelacyjna widm ATR-FTIR uwiarydlała najistotniejsze różnice w strukturze biofilmu w regionach charakterystycznych dla jego komponentów węglowodanowych i białkowych. Natomiast tylko niewielkie różnice zaobserwowano w intensywności pasm odpowiadających składnikom macierzy zawierającym grupy karboksylowe. Aby szczegółowo przeanalizować zmiany zawartości poszczególnych komponentów macierzy biofilmu *P. aeruginosa* przeprowadziłam analizę stosunku intensywności poszczególnych pasm obecnych w analizowanych widmach ATR-FTIR. Stosunek pasm przy 1530 cm⁻¹ i 1230 cm⁻¹ (amid II/amid III) odpowiadający zmianom w ilości białek i kwasów nukleinowych wykazał, że w macierzy biofilmu wytworzonej na powierzchni CB wraz ze wzrostem ilości immobilizowanego PelA_h, systematycznie spadała ilość frakcji białkowej, natomiast wzrosła ilość kwasów nukleinowych. Stosunek intensywności pasm 1530 cm⁻¹/1450 cm⁻¹ sugerował wzrastającą ilość lipidów w macierzy biofilmu. Natomiast stosunek intensywności pasm 1230 cm⁻¹/1040 cm⁻¹ wskazywał na rosnącą ilość fosfolipidów, lipopolisacharydów i kwasów nukleinowych z jednoczesnym obniżeniem zawartości polisacharydów.

Wykorzystując metodę skaningowej mikroskopii elektronowej, przeanalizowałam również morfologię biofilmu wytworzonego na powierzchni CB z immobilizowanym enzymem PelA_h. Obrazy SEM pokazały, że powierzchnia kontrolnych membran CB pokryta była równomiernie komórkami bakteryjnymi otoczonymi składnikami macierzy biofilmu. Na membranach pokrytych enzymem PelA_h nie zaobserwowano dużych zmian w morfologii biofilmu natomiast w stosunku do próby kontrolnej kontury komórek *P. aeruginosa* PAO1 były znacznie bardziej widoczne, co może świadczyć o zmianach w strukturze macierzy biofilmu.

Obecność macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu ma między innymi za zadanie utrzymanie spójności jego struktury i ułatwienie adhezji komórek bakteryjnych do kolonizowanej powierzchni. Biorąc to pod uwagę techniką cytometrii przepływowej oceniono wpływ immobilizacji enzymu PelA_h na membranach CB na stabilność biofilmu

P. aeruginosa poprzez zmianę uwolnionych z jej powierzchni komórek *P. aeruginosa*. Zaobserwowano, że ilość uwolnionych komórek bakteryjnych wzrastała proporcjonalnie do ilości PelA_h immobilizowanego na powierzchni nośnika. Wyniki te potwierdzają, że egzopolisacharyd Pel odgrywa kluczową rolę w początkowych etapach wytwarzania i adhezji biofilmu *P. aeruginosa*, a jego brak w macierzy zewnątrzkomórkowej wpływa istotnie na destabilizację struktury biofilmu.

Ze względu na możliwość wykorzystania CB z immobilizowanym enzymem PelA_h jako materiału opatrunkowego przeprowadzono analizę ich cytotoksyczności względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej L929. Wykazano, że zarówno enzym w formie rozpuszczonej, jak i membrany CB z immobilizowanym białkiem PelA_h nie wpływały na żywotność i morfologię analizowanych komórek, co wskazuje na całkowite bezpieczeństwo podczas stosowania w celach medycznych.

Etap 3 (publikacja P-3)

Jedną z głównych frakcji macierzy biofilmu *P. aeruginosa*, zwłaszcza szczepów mukoidalnych, oprócz polisacharydów Pel i Psl jest alginian. Z tego względu w badaniach w ramach etapu 3 pracy doktorskiej uwzględniłam również liazę alginianową ze szlaku syntezy alginianu, która wykazuje zdolność do specyficznej degradacji tego składnika macierzy biofilmowej.

Badania dotyczące wpływu temperatury na aktywność enzymów wykorzystywanych w materiałach opatrunkowych są niezwykle istotne w celu zachowania ich funkcjonalności, zarówno w warunkach przechowywania, jak i po kontakcie z tkankami człowieka. Dlatego, badania w ramach etapu 3 rozpoczęłam od przeprowadzenia charakterystyki uzyskanej rekombinowanej liazy alginianowej, która dotyczyła wpływu temperatury na aktywność i stabilność enzymu. Wykazałam, że optymalna temperatura dla działania enzymu wynosiła 40°C. W przypadku analizy stabilności liazy alginianowej zaobserwowałam, że podczas przechowywania w 4°C utrzymywała się ona na poziomie 80% przez 30 dni, w stosunku do aktywności początkowej. Natomiast w temperaturze 37°C po 4 dniach zaobserwowałam spadek aktywności o 30% w stosunku do aktywności początkowej, a po 30 dniach enzym całkowicie utracił aktywność.

W celu potwierdzenia skuteczności liazy alginianowej w procesie eradykacji biofilmu, przed immobilizacją enzymu na CB przeanalizowałam efektywność jego działania w formie rozpuszczonej wobec biofilmu *P. aeruginosa*. Analizowałam zarówno wpływ enzymu na eradykację, jak i hamowanie formowania macierzy zewnątrzkomórkowej. Najlepsze wyniki zaobserwowałam przy zastosowaniu stężeń liazy alginianowej w zakresie od 6,25 µg/ml do 25,0 µg/ml. Dodatkowo, uzupełniając badania dotyczące charakterystyki tego enzymu, we współpracy z dr. inż. Piotrem Sobolewskim z Katedry Inżynierii Polimerów i Biomateriałów Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wykazałam, że enzym ten nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej linii L929. Wyniki te jednoznacznie potwierdziły zakładaną

przeze mnie możliwość wykorzystania liazы alginianowej jako substancji aktywnej w materiałach opatrunkowych. W kolejnym etapie badań przeprowadziłam proces immobilizacji liazы alginianowej na powierzchni membran CB. Sprawdziłam wpływ początkowego stężenia liazы alginianowej oraz czasu immobilizacji na ilość zaadsorbowanego enzymu. Ustaliłam, że maksymalna efektywność immobilizacji pozwoliła na adsorpcję $\approx 6,0$ mg/g suchej masy nośnika po upływie 120 min. Aby dokładnie wyjaśnić mechanizm adsorpcji, dane eksperymentalne dopasowałam do modeli adsorpcji wykorzystując równania Freundlicha i Langmuira. Analizując otrzymane wyniki zaobserwowałam, że dane doświadczalne lepiej opisuje model Langmuira, co oznacza, że liazа alginianowa oddziałuje z miejscami adsorpcyjnymi na powierzchni CB tworząc monowarstwę. Ponadto, dla zrozumienia mechanizmu wiązania i orientacji molekuł enzymu na powierzchni CB, podobnie jak w publikacji P-2, przeprowadziłam analizę rozkładu ładunku na powierzchni liazы alginianowej. Ustaliłam, że katalityczne centrum aktywne liazы alginianowej charakteryzuje się głównie obszarami naładowanymi dodatnio, co jest wynikiem adaptacji obszaru katalitycznego do ujemnie naładowanej grupy karboksylowej kwasu glukuronowego i mannuronowego obecnych w strukturze alginianu. Pozostała powierzchnia molekularna białka, w analizowanym pH, charakteryzowała się głównie obecnością obszarów naładowanych ujemnie. Dla dopełnienia tej analizy oznaczono potencjał zeta na powierzchni celulozy bakteryjnej. W tym celu nawiązano współpracę z prof. dr hab. inż. Sylwią Mozią z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Wykazano, że przy pH równym 3,0 CB charakteryzowała się dodatnim potencjałem zeta, natomiast przy wartościach pH od 4,0 do 8,0 potencjał zeta był ujemny, a punkt izoelektryczny CB wynosił 3,4. Przyczyną niskiego punktu izoelektrycznego i regionu plateau w zasadowym środowisku jest obecność licznych grup hydroksylowych na powierzchni CB.

Następnie analizowałam wpływ adsorpcji liazы alginianowej na formowanie biofilmu przez *P. aeruginosa* na powierzchni CB. W tym celu zastosowałam protokół oparty o analizę ATR-FTIR, tak jak w publikacji P-2. Analiza stosunku intensywności pasm $1530\text{ cm}^{-1}/1450\text{ cm}^{-1}$ i $1230\text{ cm}^{-1}/1395\text{ cm}^{-1}$, inaczej niż w przypadku publikacji P-2, nie wykazała istotnych różnic. Jednakże podobnie jak w przypadku immobilizacji PelA_h, po przeanalizowaniu stosunku intensywności pasm $1230\text{ cm}^{-1}/1040\text{ cm}^{-1}$ zaobserwowałam, że dzięki immobilizacji liazы alginianowej na powierzchni CB wzrosła zawartość fosfolipidów, lipopolisacharydów i kwasów nukleinowych, a spadła zawartość polisacharydów. Dodatkowo, analizując stosunek intensywności pasm $1530\text{ cm}^{-1}/1230\text{ cm}^{-1}$ mogłam stwierdzić, że po zastosowaniu liazы alginianowej nieznacznie spadła ilość frakcji białkowej w macierzy biofilmu *P. aeruginosa*, podczas gdy ilość kwasów nukleinowych wzrosła. Uzyskane wyniki z analizy widm ATR-FTIR wykazały, że po immobilizacji liazы alginianowej zawartość polisacharydów w macierzy biofilmu *P. aeruginosa* była mniejsza niż w przypadku próby kontrolnej.

Spośród grup antybiotyków, aminoglikozydy są najczęściej wykorzystywane w leczeniu zakażeń wywoływanych przez szczep *P. aeruginosa*, pomimo wzrastającej oporności bakterii na te leki. Ponadto, długotrwałe stosowanie tych antybiotyków wiąże się z ryzykiem występowania efektów ubocznych, takich jak zaburzenia słuchu, uszkodzenia nerek czy wątroby. Dlatego też przeprowadziłam badania mające na celu stwierdzenie, czy równoczesna immobilizacja na membranach CB liazы alginianowej i gentamycyny może zwiększyć wrażliwość komórek *P. aeruginosa* na ten antybiotyk. W tym celu, z wykorzystaniem cytometrii przepływowej sprawdziłam, czy wysycenie powierzchni CB antybiotykiem i enzymem wpłynie na liczbę martwych i żywych komórek *P. aeruginosa* z biofilmu wytworzonego na powierzchni polimeru. Wykazałam, że po immobilizacji na CB wyłącznie antybiotyku w dawce poniżej wartości MIC z nośnika uwolniło się znacznie więcej komórek *P. aeruginosa* w stosunku do CB z immobilizowanym antybiotykiem i enzymem. Ponadto, wykorzystując metodę barwienia fluorescencyjnego live/dead zaobserwowałam, że wysycenie CB tylko gentamycyną w stężeniu 0,25 µg/ml nie wpływało istotnie na żywotność uwolnionych z powierzchni CB bakteryjnych komórek. Natomiast zastosowanie kombinacji antybiotyku i enzymu istotnie zwiększyło efektywność działania gentamycyny, co objawiało się redukcją żywotności uwolnionych komórek o 86,5%. Obserwacja ta była zgodna z wynikami analizy struktury macierzy biofilmu na powierzchni CB z wykorzystaniem ATR-FTIR, wskazującymi na zmiany w składzie macierzy biofilmowej, czego następstwem była obserwowana zwiększona wrażliwość komórek bakteryjnych na modelowy antybiotyk.

Etap 4 (publikacja P-4)

Struktura CB umożliwia immobilizację różnego rodzaju substancji bioaktywnych, w tym enzymów. Jej modyfikacje polegające na wprowadzaniu nowych grup funkcyjnych pozwalają na kształtowanie jej właściwości w zależności od dalszego przeznaczenia. Ponadto, zwiększa to możliwości wykorzystania suchej CB, która w znacznie mniejszym stopniu jest używana w aplikacjach biomedycznych. W związku z tym postawiłam sobie za cel sprawdzenie wpływu modyfikacji CB niskociśnieniową plazmą z użyciem argonu jako gazu roboczego (LPArP) na profile uwalniania glikohydrolaz PelA_h i PslG_h.

W ramach prowadzonych badań przeanalizowałam wpływ czasu ekspozycji CB na LPArP na zmiany w jej strukturze chemicznej. Analizę wpływu modyfikacji na różnice w zawartości poszczególnych grup funkcyjnych na powierzchni CB przeprowadziłam z wykorzystaniem techniki ATR-FTIR. Dodatkowo, we współpracy z dr. hab. inż. Dariuszem Moszyńskim prof. ZUT z Katedry Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wykonano rentgenowską spektrometrię fotoelektronów XPS. Na podstawie uzyskanych widm ATR-FTIR w zakresie liczb falowych od 1800 cm⁻¹ do 800 cm⁻¹ zaobserwowałam, jako wynik modyfikacji powierzchni CB, obecność nowego pasma w przy 1720 cm⁻¹, właściwego dla grupy C=O aldehydów i kwasów karboksylowych. Intensywność tego pasma wzrastała wraz z czasem ekspozycji na LPArP osiągając pleateau po 480 s. Obecność tego

pasma świadczyć może o utlenianiu grupy -OH alkoholi obecnych w podjednostkach glukozowych w strukturze fibryli CB. Potwierdzeniem tej obserwacji były wyniki otrzymane z analizy XPS, które wykazały, że wraz ze zwiększaniem czasu ekspozycji do 480 s na powierzchni CB zmniejszała się systematycznie ilość grup C-OH, przy jednoczesnym wzroście liczby grup C-C/C-H. Modyfikacja powierzchni CB niskociśnieniową plazmą z użyciem argonu jako gazu roboczego nie wpłynęła na ilość wiązań C-O-C, co świadczy o braku oddziaływania zastosowanej modyfikacji na integralność struktury pierścienia piranozowego podjednostek glukozowych mikrofibryli CB. Odnotowano natomiast istotny wzrost grup O=C-O, które prawdopodobnie były następstwem utlenienia grup alkoholi pierwszorzędowych, zlokalizowanych przy atomie węgla C6 podjednostek glukozowych mikrofibryli CB. Na podstawie otrzymanych widm ATR-FTIR przeanalizowałam również wpływ modyfikacji z użyciem LPArP na stopień krystaliczności CB i zaobserwowałam spodziewany jej spadek w wyniku ekspozycji CB na LPArP. Różnice w krystaliczności CB zostały zwizualizowane również na zdjęciach powierzchni modyfikowanego biopolimeru wykonanych za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego. Analiza ta wykazała znaczące zmiany w strukturze mikrofibryli, które charakteryzowały się niejednorodną strukturą, typową dla amorficznej formy CB. W pełni scharakteryzowany materiał posłużył jako nośnik dla białek PelA_h i PslG_h. W tym etapie badań kluczowym okazał się sposób immobilizacji analizowanych enzymów. Wykazałam, że po unieruchomieniu enzymów na membranach CB, etap suszenia powinien być przeprowadzony z wykorzystaniem procesu liofilizacji. Zabieg ten gwarantował zachowanie aktywności katalitycznej analizowanych enzymów. We współpracy z dr. inż. Mariuszem Madejem z Zakładu Mikrobiologii Uniwersytetu Jagiellońskiego przeprowadziłam również analizę stabilności termicznej białek PelA_h i PslG_h, w formie rozpuszczonej i liofilizowanej, przez okres 30 dni. Celem analizy było sprawdzenie zarówno wpływu sposobu przechowywania obu białek, jak i czasu ich przydatności do użycia. Wyniki nie wykazały znaczących różnic pomiędzy formą rozpuszczoną i liofilizowaną, a po 30 dniach oba białka charakteryzowały się nadal wysoką stabilnością termiczną, świadczącą o stabilności struktury analizowanych enzymów. Wskazuje to na możliwość przechowywania tych białek w formie liofilizowanej, co znacznie zwiększa ich użyteczność jako preparatów medycznych. W wcześniejszych badaniach udowodniono, że enzym PelA_h nie wykazuje cytotoksyczności względem komórek eukariotycznych. Z tego względu postanowiłam również sprawdzić wpływ enzymu PslG_h na toksyczność względem komórek mysich fibroblastów tkanki łącznej linii L929. Na podstawie uzyskanych wyników, podobnie jak w przypadku PelA_h, nie wykazałam różnic w żywotności oraz morfologii badanych komórek, co jest istotne w kontekście ich zastosowań biomedycznych.

W kolejnym etapie badań sprawdziłam wpływ modyfikacji powierzchni struktury CB na proces uwalniania PelA_h i PslG_h oraz ich zdolność do inhibicji wytwarzania biofilmu przez bakterie *P. aeruginosa*. Zaobserwowałam, że enzym PelA_h uwalniał się w 80%, natomiast PslG_h w 60%, co może być wynikiem różnej masy molekularnej analizowanych enzymów.

Stwierdziłam, że również profile uwalniania enzymu PelA_h z niemodyfikowanej i modyfikowanej z wykorzystaniem LPARP CB nie różniły się istotnie. Natomiast w przypadku PslG_h odnotowałam szybsze tempo uwalniania enzymu z CB modyfikowanej LPARP w trakcie pierwszych 2 minut. Zastosowane przeze mnie modele farmakokinetyczne, zerowego i pierwszego rzędu oraz modele Higuchiego i Korsmeyera-Peppasa wykazały, że oba białka uwalniały się z powierzchni CB na drodze dyfuzji.

Aby wyjaśnić obserwowane różnice pomiędzy profilami uwalniania obydwu białek przeanalizowałam rozkład potencjału elektrostatycznego na powierzchni molekularnej PelA_h i PslG_h oraz wyznaczyłam ich całkowity ładunek w pH 7,4, który dla PelA_h wynosił -8,24 a dla PslG_h -6,94. Otrzymane wyniki świadczyły o porównywalnym wpływie analizowanych właściwości molekularnych enzymów na ich profil uwalniania. Swoją uwagę skierowałam na ewentualne właściwości strukturalne analizowanych białek, mogące mieć istotny wpływ na obserwowane różnice w tempie uwalniania PslG_h z modyfikowanej CB. W strukturze PslG_h wyróżnia się N-terminalną domenę zawierającą obszar katalityczny i C-terminalną domenę wykazującą podobieństwo do domen wiążących węglowodany (ang. *Carbohydrate Binding Domain*, CBM) (Yu i wsp. 2015). Obserwowane różnice w profilach uwalniania białek PelA_h i PslG_h z powierzchni CB niemodyfikowanej jak i modyfikowanej z użyciem LPARP mogą być wynikiem oddziaływania tej domeny ze strukturą nośnika.

W kluczowym etapie badań przeprowadziłam testy mające na celu ocenę efektywności immobilizacji PelA_h i PslG_h na hamowaniu tworzenia biofilmu przez *P. aeruginosa*. Dla obydwu analizowanych enzymów, niezależnie od formy nośnika, stwierdziłam nieznaczne zmniejszenie zdolności do hamowania procesu formowania biofilmu w porównaniu z ich formą natywną. Może to być związane ze niecałkowitym stopniem uwolnienia enzymów z powierzchni CB. Natomiast wykazałam, że aktywność antybiofilmowa, zarówno PelA_h jak i PslG_h, po uwolnieniu z niemodyfikowanej CB, jak i modyfikowanej z wykorzystaniem LPARP nie różniła się istotnie. Wyniki uzyskanych badań wskazują, że poprzez modyfikację struktury z wykorzystaniem LPARP możliwe jest kontrolowanie procesu uwalniania enzymów, a tym samym ich aktywności antybiofilmowej.

6. Wnioski

Realizacja postawionych celów badawczych pozwoliła na wyciągnięcie następujących wniosków:

1. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym zwiększa efektywność syntezy CB przez *K.xylinus* (**publikacja P-1**).
2. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym nie wpływa na właściwości fizykochemiczne uzyskanej CB (**publikacja P-1**).
3. Modyfikacja właściwości fizykochemicznych medium H-S polieterem silikonowym wpływa na polepszenie parametrów wodnych uzyskanej CB (**publikacja P-1**).
4. CB wytwarzana w medium H-S z dodatkiem polieteru silikonowego nie wykazuje toksyczności względem komórek mysich fibroblastów linii L929 (**publikacja P-1**).

5. Immobilizacja enzymu PelA_h na powierzchni membran z CB istotnie wpływa na destabilizację biofilmu *P. aeruginosa* formowanego na powierzchni nośnika poprzez zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej (**publikacja P-2**).
6. Immobilizacja liazy alginianowej na powierzchni membran z CB istotnie wpływa na destabilizację biofilmu *P. aeruginosa* formowanego na powierzchni nośnika poprzez zmiany w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej (**publikacja P-3**).
7. Immobilizacja liazy alginianowej na powierzchni membran z CB zwiększa wrażliwość *P. aeruginosa* na działanie gentamycyny poprzez destabilizację struktury macierzy zewnątrzkomórkowej biofilmu (**publikacja P-3**).
8. Modyfikacja powierzchni CB z wykorzystaniem niskociśnieniowej plazmy z użyciem argonu jako gazu roboczego (LPArP) zmienia jej właściwości fizykochemiczne (**publikacja P-4**).
9. Modyfikacja powierzchni CB z wykorzystaniem LPArP wpływa na zmiany w uwalnianiu enzymów PelA_h i PslG_h, przy czym jest to ściśle związane ze strukturą molekularną tych enzymów (**publikacja P-4**).
10. Immobilizacja enzymów PelA_h i PslG_h na niemodyfikowanej i modyfikowanej z wykorzystaniem LPArP CB wpływa na ich zdolność do inhibicji formowania biofilmu przez *P. aeruginosa* (**publikacja P-4**).

7. Opis pracy naukowo-badawczej

W 2011 roku rozpoczęłam studia inżynierskie na kierunku biotechnologia, na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. W 2013 roku zdobyłam tytuł inżyniera, broniąc pracę inżynierską pt.: „Rejestracja widm masowych oraz identyfikacja wybranych białek wątroby rosnących prosiąt z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI-TOF”, pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Ożgo prof. ZUT z Katedry Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie. Następnie rozpoczęłam studia magisterskie na kierunku biotechnologia, na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie oraz mikrobiologia stosowana na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa ZUT w Szczecinie. W 2016 roku obroniłam pracę magisterską na kierunku biotechnologia pt.: „Identyfikacja wybranych białek osocza emu zwyczajnego (*Dromaius novaehollandiae*) na podstawie map peptydowych z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI – TOF”, pod kierunkiem dr hab. Małgorzaty Ożgo prof. ZUT z Katedry Fizjologii Cytobiologii i Proteomiki na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie. W trakcie trwania studiów magisterskich rozpoczęłam działalność jako członek, a następnie prezes Studenckiego Koła Naukowego Enzymologów, działającego przy Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii (dawniej Katedra Immunologii, Mikrobiologii i Chemii Fizjologicznej) Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie. Prowadzone przeze mnie prace badawcze dotyczyły immobilizacji enzymów lipolitycznych na modyfikowanych nośnikach biopolimerowych na

bazie celulozy bakteryjnej. Wyniki przeprowadzonych badań pilotowych zostały opisane w pracy magisterskiej pt.: „Czułe na pole magnetyczne, modyfikowane polietylenoiminą sfery celulozy bakteryjnej jako nośnik do immobilizacji esteraz pochodzenia mikrobiologicznego”, którą obroniłam w 2017 roku, pod kierunkiem dr. inż. Radosława Drozda z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii Wydziału Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie. Podczas trwania studiów magisterskich odbyłam jeden semestr studiów na Uniwersytecie Rolniczym w Płowdiw (Bułgaria), w ramach programu Erasmus+. Ponadto, w ramach programu IAESTE odbyłam staż na Uniwersytecie Stanowym w Sao Paulo (UNESP) (Brazylia), który dotyczył identyfikacji *Helicobacter pylori* odpowiedzialnych za występowania wrzodów żołądka, z wykorzystaniem testów oddechowych.

1 października 2017 r. rozpoczęłam studia doktoranckie na kierunku biotechnologia, w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii, na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt ZUT w Szczecinie, pod kierunkiem dr. hab. Jolanty Kochel-Karakulskiej prof. ZUT i dr. inż. Radosława Drozda.

Podczas dotychczasowej pracy badawczej zgromadziłam dorobek obejmujący 14 publikacji naukowych w czasopiśmie indeksowanym w Journal Citation Report, cztery patenty oraz jeden rozdział w monografii. Ponadto byłam wykonawcą w jednym projekcie badawczym OPUS14 finansowanym ze źródeł Narodowego Centrum Nauki pt.: „Analiza mechanizmów zwiększonej efektywności substancji przeciwdrobnoustrojowych względem biofilmów w obecności wirującego pola magnetycznego”, realizowanym w Katedrze Mikrobiologii

i Biotechnologii ZUT w Szczecinie. Byłam również wykonawcą w dwóch projektach badawczo-rozwojowych realizowanych w ramach Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego, pt.: „Biodegradowalne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe filtry na bazie bionanocelulozy do zastosowania w maseczkach ochronnych” oraz „Testowanie w warunkach rzeczywistych innowacyjnych maseczek ochronnych (NanoBioCell) z bionanocelulozy”, realizowanych wraz z naukowcami z Katedry Inżynierii Biopolimerów i Biomateriałów Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie.

W trakcie trwania studiów doktoranckich rozwijałam aktywnie swoje kompetencje naukowe poza macierzystą Uczelnią. Odbyłam dwa staże krajowe, w Katedrze Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Uniwersytetu Ekonomicznego we Wrocławiu i w Zakładzie Biochemii i Żywnienia Człowieka na Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie oraz 1 staż zagraniczny w Instytucie Biochemii na Uniwersytecie w Greifswaldzie. Ponadto uczestniczyłam w licznych konferencjach o zasięgu krajowym i międzynarodowym. Brałam także udział w szkoleniach dotyczących obsługi specjalistycznego sprzętu, takiego jak cytometr przepływowy BC Accuri™ C6 Plus czy termocykler LightCycler 96. Ukończyłam również szkolenia na Audytora wewnętrznego systemu zarządzania jakością zgodnie z wymaganiami normy ISO 9001:2015 i PN-EN ISO/IEC17025:2018.

Obecnie jestem członkiem Studenckiego Koła Naukowego Enzymologów, gdzie wraz z pozostałymi członkami regularnie angażuję się w działania popularyzujące naukę, takie jak Dni Otwarte Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie czy Dni Inżynierii Materiałowej, mające na celu promocję macierzystej Uczelni.

Od 2021 roku jestem członkiem Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów, aktywnie uczestnicząc w organizowanych wykładach i konferencjach.

W 2021 roku za swoją aktywność naukową zostałam uhonorowana Stypendium Naukowym Prezydenta Miasta Szczecin dla doktorantów za wybitne osiągnięcia naukowe.

W ramach pracy badawczej, podczas studiów doktoranckich uczestniczyłam w projekcie naukowym realizowanym z inicjatywy mojego promotora pomocniczego dr. inż. Radosława Drozda, w kooperacji z dr hab. Witoldem Gładkowskim prof. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, dotyczącym wykorzystania CB jako nośnika dla enzymów o aktywności lipolitycznej w reakcji enancjoselektywnej transestryfikacji alkoholi allilowych. Efektem tej współpracy są dwie publikacje naukowe:

- Leśniarek, A., Chojnacka, A., Drozd, R., **Szymańska, M.**, & Gładkowski, W. (2020). Free and immobilized lecithase™ ultra as the biocatalyst in the kinetic resolution of (E)-4-arylbuto-3-en-2-yl esters. *Molecules*, 25(5), 1067.

IF₂₀₂₂ – 4,412, 100 p. MEiN₂₀₂₂

- Leśniarek, A., Chojnacka, A., Drozd, R., **Szymańska, M.**, & Gładkowski, W. (2020). Enantioselective Transesterification of Allyl Alcohols with (E)-4-Arylbuto-3-en-2-ol Motif by Immobilized Lecithase™ Ultra. *Catalysts*, 10(7), 798.

IF₂₀₂₂ – 4,146, 100 p. MEiN₂₀₂₂

Opracowane rozwiązania w ramach współpracy naukowej zostały również opatentowane:

- Leśniarek A., Gładkowski W., Drozd R., **Szymańska M.** Sposób kinetycznego rozdziału racemicznego (E)-4-fenylobuto-3-en-2-olu, numer zgłoszenia P.430758, numer prawa wyłącznego Pat.240592, 2019.
- Leśniarek A., Gładkowski W., Drozd R., **Szymańska M.**, Sposób kinetycznego rozdziału racemicznego octanu (E)-4-fenylobuto-3-en-2-ylu, numer zgłoszenia: P.430751, numer prawa wyłącznego: Pat.239852, 2019.

W ramach dalszych prac dotyczących modyfikacji CB uczestniczyłam w badaniach polegających na otrzymaniu magnetycznego nośnika do immobilizacji enzymów na bazie CB modyfikowanej kwasem cytrynowym. Opracowany nośnik charakteryzował się wysoką stabilnością termiczną i podatnością magnetyczną. Poprzez modyfikację kwasem cytrynowym na powierzchnię nośnika wprowadzono grupy karboksylowe, co umożliwiło skuteczny proces immobilizacji enzymów, takich jak lipaza B z *Candida antarctica* oraz fosfolipaza A z *Aspergillus oryzae*. Proces immobilizacji enzymów pozwolił na poprawę ich stabilności termicznej bez zmiany parametrów, takich jak optimum

temperaturowe i optimum pH. Ponadto, immobilizowane enzymy nie wykazały spadku aktywności podczas wielokrotnego użycia:

- Drozd, R., **Szymańska, M.**, Przygodzka, K., Hoppe, J., Leniec, G., & Kowalska, U. (2021). The simple method of preparation of highly carboxylated bacterial cellulose with Ni-and Mg-ferrite-based versatile magnetic carrier for enzyme immobilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8563.

IF₂₀₂₂ – 5,924, 140 p. MEiN₂₀₂₂

Uczestniczyłam również w badaniach dotyczących wpływu modyfikacji warunków hodowli *K. xylinus* poprzez ekspozycję na czynnik fizyczny, taki jak wirujące pole magnetyczne (WPM). W badaniach tych, wraz ze współautorami, zoptymalizowaliśmy sposób modyfikacji procesu produkcji CB przez dwa szczepy *K. xylinus*, poprzez nieciągłą ekspozycję hodowli na WPM przy częstotliwości 10 Hz i 50 Hz. Wykazaliśmy, że WPM istotnie wpływa na szlaki metaboliczne *K.xylinus* odpowiedzialne za proces syntezy CB, jednak uzyskane różnice są ściśle zależne od szczepu bakteryjnego:

- Drozd, R., **Szymańska, M.**, Żywicka, A., Kowalska, U., Rakoczy, R., Kordas, M., Junka, A.F., & Fijałkowski, K. (2021). Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus*. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107855.

IF₂₀₂₂ – 3,978, 100 p. MEiN₂₀₂₂

W ramach współpracy z naukowcami z Poznańskiego Parku Naukowo-Technologicznego prowadziłam badania, w których z powodzeniem zsyntetyzowano i scharakteryzowano mieszaniny eutektyczne na bazie lewulinianu, a następnie udowodniono, że mają one istotny wpływ na zwiększenie aktywności β -galaktozydazy. Potwierdziliśmy również, że szybkość hydrolizy laktozy w środowisku mieszanin eutektycznych przez β -galaktozydazę była trzykrotnie większa niż w przypadku laktozy rozpuszczonej w buforze. Wyniki tych badań ukazały się w pracy:

- Hoppe, J., Byzia, E., **Szymańska, M.**, Drozd, R., & Smiglak, M. (2022). Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 384, 132498.

IF₂₀₂₂ – 7,514, 200 p. MEiN₂₀₂₂

Z tym samym zespołem uczestniczyłam w badaniach, których celem była synteza i charakterystyka szeregu mieszanin o niskiej temperaturze przejścia na bazie

czwartorzędowych soli amonowych mleczanu choliny, które następnie wykorzystaliśmy w reakcji transestryfikacji katalizowanej przez lipazę B. Wykazaliśmy, że stabilność termiczna tego enzymu w obecności jednej z mieszanin (Ch[Lac]:Gly:EthGly) wzrosła o 8°C w porównaniu do próby kontrolnej. Przeprowadzone reakcje transestryfikacji katalizowane przez lipazę B charakteryzowały się wydajnością do 98% oraz wysoką czystością otrzymanych produktów:

- Hoppe, J., Byzia, E., Drozd, R., **Szymańska, M.**, Bielecki, P., & Smiglak, M. (2022). An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 112518.

IF₂₀₂₂ – 5,268, 100 p. MEiN₂₀₂₂

Wraz ze współpracownikami z Katedry Mikrobiologii i Biotechnologii prowadzę intensywne badania dotyczące opracowania nowych, przyjaznych dla środowiska i ekonomicznych metod zwiększania produktywności procesu wytwarzania celulozy bakteryjnej przez *K. xylinus*. W jednej z prac analizowaliśmy możliwość wykorzystania sacharozy, laktozy i skrobi jako alternatywnych źródeł węgla przekształcanych w cukry proste bezpośrednio w pożywcę hodowlanej przez hydrolazy glikozydowe pochodzenia mikrobiologicznego. Wyniki uzyskanych przez nas badań wykazały, że składniki medium hodowlanego oraz jego pH nie miały wpływu na aktywność hydrolaz glikozydowych, a już niewielka ilość enzymów była w stanie skutecznie przeprowadzić reakcję hydrolizy wybranych oligo- i polisacharydów w cukry proste. Efektywność syntezy CB po zastosowaniu medium z sacharozą i skrobią charakteryzowała się podobną wydajnością w stosunku do próby kontrolnej z glukozą, a w przypadku medium z laktozą była nawet o 40% większa. Zastosowanie tego typu metody wykorzystującej specyficzne enzymy do konwersji niedostępnych źródeł węgla otwiera możliwości wykorzystania różnego rodzaju odpadów przemysłu spożywczego do produkcji CB:

- Przygodzka, K., **Chareza, M.**, Banaszek, A., Zielińska, B., Ekiert, E., & Drozd, R. (2022). Bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* with the use of enzyme-degraded oligo-and polysaccharides as the substrates. *Applied Sciences*, 12(24), 12673.

IF₂₀₂₂ – 2,838, 100 p. MEiN₂₀₂₂

W latach 2020-2021 byłam członkiem multidyscyplinarnego zespołu, wraz z którym brałam udział w badaniach w ramach wdrożeniowych projektów Regionalnego Programu Operacyjnego Województwa Zachodniopomorskiego 2014-2020, mających na celu walkę ze skutkami pandemii COVID-19, pt.: „Biodegradowalne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe filtry na bazie bionanocelulozy do zastosowania w maseczkach

ochronnych” oraz „Testowanie w warunkach rzeczywistych innowacyjnych maseczek ochronnych (NanoBioCell) z bionanocelulozy”. W naszych badaniach opracowaliśmy w pełni biodegradowalne, bakteriobójcze i wirusobójcze maseczki ochronne na bazie filtrów z CB modyfikowanej niskociśnieniową plazmą argonową:

- Żywicka, A., Ciecholewska-Juśko, D., **Chareża, M.**, Drozd, R., Sobolewski, P., Junka, A., Gorgieva, S., El Fray, M., & Fijałkowski, K. (2023). Argon plasma-modified bacterial cellulose filters for protection against respiratory pathogens. *Carbohydrate Polymers*, 302, 120322.

IF₂₀₂₃ – 10,723, 140 p. MEiN₂₀₂₃

Opracowane rozwiązania zostały opatentowane:

- Patent: Fijałkowski, K., El Fray, M., Drozd, R., Żywicka, A., Sobolewski, P., Ciecholewska-Juśko, D., **Szymańska, M.** Sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, numer zgłoszenia: P.430149, 2021.
- Patent: Fijałkowski, K., El Fray, M., Drozd, R., Żywicka, A., Sobolewski, P., Ciecholewska-Juśko, D., **Szymańska, M.** Sposób wytwarzania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie bionanocelulozy, numer zgłoszenia: P.430150, 2021.

W ramach badań nad wpływem różnych czynników na aktywność enzymów uczestniczyłam w projekcie, we współpracy z naukowcami z Wydziału Technologii i Inżynierii Chemicznej ZUT w Szczecinie, polegającym na analizie możliwości zastosowania nowych cieczy jonowych na bazie aminokwasów, jako dodatku do medium reakcyjnego dla enzymów proteolitycznych, takich jak papaina, subtylizyna i bromelaina. Wykazaliśmy, że w zależności od właściwości fizykochemicznych aminokwasu zastosowanego do syntezy analizowanych cieczy jonowych, mogą one mieć neutralny bądź inhibujący wpływ na aktywność enzymów proteolitycznych:

- Roman, B. H., **Chareża, M.**, Janus, E., & Drozd, R. (2023). Evaluation of new L-amino acids triethanolammonium salts usability for controlling protease activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 231, 123218.

IF₂₀₂₂ – 8,025, 100 p. MEiN₂₀₂₂

8. Bibliografia

1. Aïssa, K., Karaaslan, M. A., Renneckar, S., & Saddler, J. N. (2019). Functionalizing cellulose nanocrystals with click modifiable carbohydrate-binding modules. *Biomacromolecules*, 20(8), 3087-3093.
2. de Amorim, J. D. P., da Silva Junior, C. J. G., de Medeiros, A. D. L. M., do Nascimento, H. A., Sarubbo, M., de Medeiros, T. P. M., ... & Sarubbo, L. A. (2022). Bacterial cellulose as a versatile biomaterial for wound dressing application. *Molecules*, 27(17), 5580.

3. Andriani, D., Apriyana, A. Y., & Karina, M. (2020). The optimization of bacterial cellulose production and its applications: a review. *Cellulose*, 27(12), 6747-6766.
4. Asker, D., Awad, T. S., Baker, P., Howell, P. L., & Hatton, B. D. (2018). Non-eluting, surface-bound enzymes disrupt surface attachment of bacteria by continuous biofilm polysaccharide degradation. *Biomaterials*, 167, 168-176.
5. Asker, D., Awad, T. S., Raju, D., Sanchez, H., Lacdao, I., Gilbert, S., ... & Hatton, B. D. (2021). Preventing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms on indwelling catheters by surface-bound enzymes. *ACS Applied Bio Materials*, 4(12), 8248-8258.
6. Augimeri, R. V., & Strap, J. L. (2015). The phytohormone ethylene enhances cellulose production, regulates CRP/FNRKx transcription and causes differential gene expression within the bacterial cellulose synthesis operon of *Komagataeibacter (Gluconacetobacter) xylinus* ATCC 53582. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1459.
7. Azam, M. W., & Khan, A. U. (2019). Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discovery Today*, 24(1), 350-359.
8. Baker, P., Hill, P. J., Snarr, B. D., Alnabelseya, N., Pestrak, M. J., Lee, M. J., ... & Howell, P. L. (2016). Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Science Advances*, 2(5), e1501632.
9. Betlej, I., Salerno-Kochan, R., Jankowska, A., Krajewski, K., Wilkowski, J., Rybak, K., ... & Boruszewski, P. (2021). The Impact of the mechanical modification of bacterial cellulose films on selected quality parameters. *Coatings*, 11(11), 1275.
10. Blanco-Cabra, N., Paetzold, B., Ferrar, T., Mazzolini, R., Torrents, E., Serrano, L., & LLuch-Senar, M. (2020). Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Scientific Reports*, 10(1), 9390.
11. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
12. Brandenburg, K. S., Calderon, D. F., Kierski, P. R., Brown, A. L., Shah, N. M., Abbott, N. L., ... & Czuprynski, C. J. (2015). Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on wound dressings. *Wound Repair and Regeneration*, 23(6), 842-854.
13. Buldum, G., & Mantalaris, A. (2021). Systematic understanding of recent developments in bacterial cellulose biosynthesis at genetic, bioprocess and product levels. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(13), 7192.
14. Cazón, P., & Vázquez, M. (2021). Improving bacterial cellulose films by *ex-situ* and *in-situ* modifications: A review. *Food Hydrocolloids*, 113, 106514.
15. Colvin, K. M., Irie, Y., Tart, C. S., Urbano, R., Whitney, J. C., Ryder, C., ... & Parsek, M. R. (2012). The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environmental microbiology*, 14(8), 1913-1928.
16. Daboor, S. M., Rohde, J. R., & Cheng, Z. (2021). Disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics. *Journal of Cystic Fibrosis*, 20(2), 264-270.
17. del Mar Cendra, M., & Torrents, E. (2021). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms and their partners in crime. *Biotechnology Advances*, 49, 107734.
18. do Nascimento, E. S., Pereira, A. L. S., Barros, M. D. O., Barroso, M. K. D. A., Lima, H. L. S., Borges, M. D. F., ... & Rosa, M. D. F. (2019). TEMPO oxidation and high-speed blending as a combined approach to disassemble bacterial cellulose. *Cellulose*, 26, 2291-2302.
19. El-Gendi, H., Taha, T. H., Ray, J. B., & Saleh, A. K. (2022). Recent advances in bacterial cellulose: a low-cost effective production media, optimization strategies and applications. *Cellulose*, 29(14), 7495-7533.
20. Esa, F., Tasirin, S. M., & Abd Rahman, N. (2014). Overview of bacterial cellulose production and application. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 113-119.
21. Farrell, E. K., & Tipton, P. A. (2012). Functional characterization of AlgL, an alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 51(51), 10259-10266.
22. Fleming, D., Chahin, L., & Rumbaugh, K. (2017). Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(2), 10-1128.

23. Gao, G., Niu, S., Liu, T., Zhang, Y., Zhao, X., Shi, Z., ... & Ma, T. (2023). Fabrication of bacterial cellulose composites with antimicrobial properties by in situ modification utilizing the specific function-suspension containing water-insoluble magnolol. *International Journal of Biological Macromolecules*, 239, 124329.
24. Gilmour, K. A., Aljannat, M., Markwell, C., James, P., Scott, J., Jiang, Y., ... & Zhang, M. (2023). Biofilm inspired fabrication of functional bacterial cellulose through *ex-situ* and *in-situ* approaches. *Carbohydrate Polymers*, 304, 120482.
25. Gorgieva, S., & Trček, J. (2019). Bacterial cellulose: Production, modification and perspectives in biomedical applications. *Nanomaterials*, 9(10), 1352.
26. Hasannejad-Bibalan, M., Jafari, A., Sabati, H., Goswami, R., Jafaryparvar, Z., Sedaghat, F., & Ebrahim-Saraie, H. S. (2021). Risk of type III secretion systems in burn patients with *Pseudomonas aeruginosa* wound infection: A systematic review and meta-analysis. *Burns*, 47(3), 538-544.
27. Hur, D. H., Rhee, H. S., Lee, J. H., Shim, W. Y., Kim, T. Y., Lee, S. Y., ... & Jeong, K. J. (2020). Enhanced production of cellulose in *Komagataeibacter xylinus* by preventing insertion of IS element into cellulose synthesis gene. *Biochemical Engineering Journal*, 156, 107527.
28. Illa, M. P., Sharma, C. S., & Khandelwal, M. (2019). Tuning the physiochemical properties of bacterial cellulose: effect of drying conditions. *Journal of Materials Science*, 54(18), 12024-12035.
29. Islam, M. U., Ullah, M. W., Khan, S., Shah, N., & Park, J. K. (2017). Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose. *International Journal of Biological Macromolecules*, 102, 1166-1173.
30. Jacek, P., Dourado, F., Gama, M., & Bielecki, S. (2019). Molecular aspects of bacterial nanocellulose biosynthesis. *Microbial Biotechnology*, 12(4), 633-649.
31. Jankau, J., Błażyńska-Spychalska, A., Kubiak, K., Jędrzejczak-Krzepkowska, M., Pankiewicz, T., Ludwicka, K., ... & Pęksa, R. (2022). Bacterial cellulose properties fulfilling requirements for a biomaterial of choice in reconstructive surgery and wound healing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 805053.
32. Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., ... & Parsek, M. R. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(36), 11353-11358.
33. Jones, C. J., & Wozniak, D. J. (2017). Psl produced by mucoid *Pseudomonas aeruginosa* contributes to the establishment of biofilms and immune evasion. *MBio*, 8(3), 10-1128.
34. Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, A., Sarkar, T., Pati, S., ... & Ray, R. R. (2021). Bacterial cellulose: Production, characterization, and application as antimicrobial agent. *International journal of molecular sciences*, 22(23), 12984.
35. Le Mauff, F., Razvi, E., Reichhardt, C., Sivarajah, P., Parsek, M. R., Howell, P. L., & Sheppard, D. C. (2022). The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α -1, 4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine. *Communications Biology*, 5(1), 502.
36. Lee, K. Y., Buldum, G., Mantalaris, A., & Bismarck, A. (2014). More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites. *Macromolecular Bioscience*, 14(1), 10-32.
37. Li, S., Wang, Y., Li, X., Lee, B. S., Jung, S., & Lee, M. S. (2019). Enhancing the thermo-stability and anti-biofilm activity of alginate lyase by immobilization on low molecular weight chitosan nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4565.
38. Li, Y., Tian, C., Tian, H., Zhang, J., He, X., Ping, W., & Lei, H. (2012). Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96, 1479-1487.
39. Lin, D., Liu, Z., Shen, R., Chen, S., & Yang, X. (2020). Bacterial cellulose in food industry: Current research and future prospects. *International Journal of Biological Macromolecules*, 158, 1007-1019.
40. Liu, M., Liu, L., Jia, S., Li, S., Zou, Y., & Zhong, C. (2018). Complete genome analysis of *Gluconacetobacter xylinus* CGMCC 2955 for elucidating bacterial cellulose biosynthesis and metabolic regulation. *Scientific Reports*, 8(1), 6266.

41. Liu, W., Du, H., Zhang, M., Liu, K., Liu, H., Xie, H., ... & Si, C. (2020). Bacterial cellulose-based composite scaffolds for biomedical applications: a review. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 8(20), 7536-7562.
42. Lu, T., Gao, H., Liao, B., Wu, J., Zhang, W., Huang, J., ... & Jiang, D. (2020). Characterization and optimization of production of bacterial cellulose from strain CGMCC 17276 based on whole-genome analysis. *Carbohydrate Polymers*, 232, 115788.
43. Mahajan, S., Sunsunwal, S., Gautam, V., Singh, M., & Ramya, T. N. C. (2021). Biofilm inhibitory effect of alginate lyases on mucoid *P. aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 26, 101028.
44. Marestoni, L. D., Barud, H. D. S., Gomes, R. J., Catarino, R. P. F., Hata, N. N. Y., Ressutte, J. B., & Spinosa, W. A. (2021). Commercial and potential applications of bacterial cellulose in Brazil: ten years review. *Polimeros*, 30, e2020047.
45. Mishra, S., Singh, P. K., Pattnaik, R., Kumar, S., Ojha, S. K., Srichandan, H., ... & Sarangi, P. K. (2022). Biochemistry, synthesis, and applications of bacterial cellulose: A review. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 10, 780409.
46. Mohamed, S. H., Mohamed, M. S., Khalil, M. S., Mohamed, W. S., & Mabrouk, M. I. (2018). Antibiofilm activity of papain enzyme against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 8(6), 163-168.
47. Molobela, I. P., Cloete, T. E., & Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria.
48. Mugita, N., Nambu, T., Takahashi, K., Wang, P. L., & Komasa, Y. (2017). Proteases, actinidin, papain and trypsin reduce oral biofilm on the tongue in elderly subjects and in vitro. *Archives of Oral Biology*, 82, 233-240.
49. Nguyen, H. H., & Kim, M. (2017). An overview of techniques in enzyme immobilization. *Applied Science and Convergence Technology*, 26(6), 157-163.
50. Oliver, A., Mulet, X., López-Causapé, C., & Juan, C. (2015). The increasing threat of *Pseudomonas aeruginosa* high-risk clones. *Drug Resistance Updates*, 21, 41-59.
51. Omadjela, O., Narahari, A., Strumillo, J., Mérida, H., Mazur, O., Bulone, V., & Zimmer, J. (2013). BcsA and BcsB form the catalytically active core of bacterial cellulose synthase sufficient for in vitro cellulose synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(44), 17856-17861.
52. Orlando, I., Basnett, P., Nigmatullin, R., Wang, W., Knowles, J. C., & Roy, I. (2020). Chemical modification of bacterial cellulose for the development of an antibacterial wound dressing. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 557885.
53. Ostapska, H., Raju, D., Corsini, R., Lehoux, M., Lacdao, I., Gilbert, S., ... & Sheppard, D. C. (2022). Preclinical evaluation of recombinant microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents in acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(8), e00052-22.
54. Patel, K. K., Tripathi, M., Pandey, N., Agrawal, A. K., Gade, S., Anjum, M. M., ... & Singh, S. (2019). Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *International Journal of pharmaceuticals*, 563, 30-42.
55. Pestrak, M. J., Baker, P., Dellos-Nolan, S., Hill, P. J., Passos da Silva, D., Silver, H., ... & Howell, P. L. (2019). Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG combats wound infection by improving antibiotic efficacy and host innate immune activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(6), 10-1128.
56. Pogorelova, N., Rogachev, E., Digel, I., Chernigova, S., & Nardin, D. (2020). Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties. *Materials*, 13(12), 2849.
57. Qian, H., Liu, J., Wang, X., Pei, W., Fu, C., Ma, M., & Huang, C. (2023). The state-of-the-art application of functional bacterial cellulose-based materials in biomedical fields. *Carbohydrate Polymers*, 300, 120252.

58. Raiszadeh-Jahromi, Y., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., & Amiri, S. (2020). Optimization of bacterial cellulose production by *Komagataeibacter xylinus* PTCC 1734 in a low-cost medium using optimal combined design. *Journal of Food Science and Technology*, 57, 2524-2533.
59. Ramakrishnan, R., Singh, A. K., Singh, S., Chakravorty, D., & Das, D. (2022). Enzymatic dispersion of biofilms: An emerging biocatalytic avenue to combat biofilm-mediated microbial infections. *Journal of Biological Chemistry*, 102352.
60. Rasamiravaka, T., Labtani, Q., Duez, P., & El Jaziri, M. (2015). The formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa*: a review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *BioMed Research International*, 2015.
61. Rezazadeh, M., Babaeipour, V., & Motamedian, E. (2020). Reconstruction, verification and in-silico analysis of a genome-scale metabolic model of bacterial cellulose producing *Komagataeibacter xylinus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 43(6), 1017-1026.
62. Rezvani Ghomi, E., Khalili, S., Nouri Khorasani, S., Esmaeely Neisiany, R., & Ramakrishna, S. (2019). Wound dressings: Current advances and future directions. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(27), 47738.
63. Singhanian, R. R., Patel, A. K., Tsai, M. L., Chen, C. W., & Di Dong, C. (2021). Genetic modification for enhancing bacterial cellulose production and its applications. *Bioengineered*, 12(1), 6793-6807.
64. Song, Y. J., Yu, H. H., Kim, Y. J., Lee, N. K., & Paik, H. D. (2020). The use of papain for the removal of biofilms formed by pathogenic *Staphylococcus aureus* and *Campylobacter jejuni*. *LWT*, 127, 109383.
65. Suci, P. A., Vraný, J. D., & Mittelman, M. W. (1998). Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials*, 19(4-5), 327-339.
66. Tasia, W., Lei, C., Cao, Y., Ye, Q., He, Y., & Xu, C. (2020). Enhanced eradication of bacterial biofilms with DNase I-loaded silver-doped mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale*, 12(4), 2328-2332.
67. Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *Journal of Biotechnology*, 191, 121-130.
68. Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(22), 8671.
69. Ul-Islam, M., Ullah, M. W., Khan, S., & Park, J. K. (2020). Production of bacterial cellulose from alternative cheap and waste resources: A step for cost reduction with positive environmental aspects. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 37, 925-937.
70. Ullah, M. W., Manan, S., Kiprono, S. J., Ul-Islam, M., & Yang, G. (2019). Synthesis, structure, and properties of bacterial cellulose. *Nanocellulose: From Fundamentals to Advanced Materials*, 81-113.
71. Wahid, F., Duan, Y. X., Hu, X. H., Chu, L. Q., Jia, S. R., Cui, J. D., & Zhong, C. (2019). A facile construction of bacterial cellulose/ZnO nanocomposite films and their photocatalytic and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 132, 692-700.
72. Wan, B., Zhu, Y., Tao, J., Zhu, F., Chen, J., Li, L., ... & Zhang, Y. (2020). Alginate lyase guided silver nanocomposites for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* from lungs. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 12(8), 9050-9061.
73. Wang, J., Tavakoli, J., & Tang, Y. (2019). Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods—A review. *Carbohydrate Polymers*, 219, 63-76.
74. Wang, S. S., Han, Y. H., Chen, J. L., Zhang, D. C., Shi, X. X., Ye, Y. X., ... & Li, M. (2018). Insights into bacterial cellulose biosynthesis from different carbon sources and the associated biochemical transformation pathways in *Komagataeibacter* sp. W1. *Polymers*, 10(9), 963.
75. Yu, S., Su, T., Wu, H., Liu, S., Wang, D., Zhao, T., ... & Ma, L. Z. (2015). PslG, a self-produced glycosyl hydrolase, triggers biofilm disassembly by disrupting exopolysaccharide matrix. *Cell Research*, 25(12), 1352-1367.
76. Zhang, Y., Werling, U., & Edlmann, W. (2012). SLiCE: a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Research*, 40(8), e55-e55.
77. Zheng, L., Li, S., Luo, J., & Wang, X. (2020). Latest advances on bacterial cellulose-based antibacterial materials as wound dressings. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 593768.

Załącznik 1

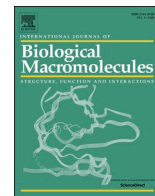
Kopie publikacji naukowych oraz suplementów publikacji
naukowych wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę
doktorską

Rozprawa doktorska

mgr inż. Magdalena Charęza

„Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność
katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”

Szczecin, 2023



Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity

Magdalena Szymańska^a, Jakub Hoppe^b, Michał Dutkiewicz^d, Peter Sobolewski^c,
Magdalena Palacz^d, Ewa Janus^e, Beata Zielińska^f, Radosław Drozd^{a,*}

^a Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 70-311 Szczecin, Poland

^b Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 89b Umultowska Str., 61-614 Poznań Poland

^c Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland

^d Poznań Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, 46 Rubież Str., 61-612 Poznań, Poland

^e Department of Chemical Organic Technology, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 10 Puławskiego Str., 70-322 Szczecin, Poland

^f Department of Nanomaterials Physicochemistry, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 42 Piastów Avenue, 71-065 Szczecin, Poland

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacterial cellulose
Silicone polyether surfactants
Yield
Cytotoxicity

ABSTRACT

The versatility and unique properties of bacterial cellulose (BC) motivate research into enhancing its synthesis. Here a silicone polyether surfactant (SPS) was synthesized and tested as a non-nutritional additive to the cultivation media of *Komagataeibacter xylinus*. The addition of SPS to the Hestrin-Schramm (HS) medium resulted in a concentration-dependent decrease in surface tension from 59.57 ± 0.37 mN/m to 30.05 ± 0.41 mN/m (for 0.1% addition) that was correlated with an increased yield of BC, up to 37% wet mass for surfactant concentration close to its critical micelle concentration (0.008%). Physicochemical characterization of bacterial cellulose obtained in presence of SPS, showed that surfactant is not incorporated into BC structure and has a moderate effect on its crystallinity, thermal stability. Moreover, the water holding capacity was enhanced by over 40%. Importantly, obtained BC did not affect L929 murine fibroblast cell viability. We conclude that SPS provides an eco-friendly approach to increasing BC yield in static culture, enabling more widespread industrial and biomedical applications.

1. Introduction

Bacterial cellulose (BC) is a versatile biomaterial that, thanks to its unique properties and ability to be modified, has potential applications in various industries, such as food packing, biosensors, composites with electromagnetic properties, flexible electrochemical energy storage systems, wound dressings, and controlled drugs release systems [1–7]. Despite the many advantages of this biopolymer, its cost of production remains high and production efficiency is not satisfactory. As a result, wider industrial application of BC is still limited in comparison to other biopolymers, such as chitosan, plant cellulose or lignocellulosic materials [8–13].

Bacterial cellulose, just like cellulose of plant origin, is a

nonbranched polymer composed of anhydrous glucose units connected by β -1-4 glycosidic bonds. However, BC is of higher purity than cellulose from plants tissues that contains hemicellulose, pectin, and lignin. For this reason, the purification of BC is more economical and environmentally friendly. Moreover, the BC produced by *Komagataeibacter xylinus* also exhibits a higher crystallinity index and a higher degree of polymerization, as compared to plant cellulose [14].

To enable the use of BC on a larger scale, research is ongoing into process improvements of BC synthesis by bacteria. Thus far, it is clear that BC production efficiency depends on the biosynthetic potential of the bacterial strain, the culture conditions (pH, temperature, etc.), and the composition of the culture medium [15,16]. The easiest way to produce BC is by cultivation in static culture, resulting in BC being

* Corresponding author at: West Pomeranian University of Technology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland.

E-mail address: rdrozd@zut.edu.pl (R. Drozd).

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>

Received 16 January 2022; Received in revised form 18 March 2022; Accepted 19 March 2022

Available online 22 March 2022

0141-8130/© 2022 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

synthesized as a pellicle at the surface (air-liquid interface) of the medium. However, the microorganisms producing the BC need an appropriate oxygen supply for growth and thus gas exchange is a limiting factor in static cultures. As a result, many alternative types of culturing methods have been developed, using various types of bioreactors that enable agitation of culture media and improve available oxygen levels. For example, recently, a bench-scale, rotating biofilm contact bioreactor has resulted in the highest reported BC production yields [17]. Of course, in static culture, it is also possible to increase BC production. For example, one can use physical factors, such as a rotating magnetic field. This approach may have additional advantages, because the obtained BC had a higher moisture ratio, making it promising for applications as a wound dressing material [18].

Besides the type of culture, another obvious strategy for reducing costs involves replacing the traditional carbon and nitrogen source (e.g. Hestrin–Shramm medium (HS)), with a food processing waste or byproduct that is still rich in nutritional components [19]. However, depending on the specific industrial origin of these substrates, the need for initial pretreatment and/or supplementation typically results in reduced profitability [20]. An alternate approach towards increasing BC productivity relies on various types of in situ modifications, by adding different types of substances to the standard culture medium [18,21,22]. For example, supplementing standard HS culture medium with 1% of vegetable oil resulted in a 5-fold greater BC yield and the obtained BC had a higher water swelling capacity and greater mechanical strength [23]. Besides increased productivity and improved water-related properties, in situ modifications can also result in structural changes, enabling BC-based composite materials [24,25].

From a biochemical point of view, BC synthesis is a complex process involving a number of enzymes from overlapping metabolic pathways. Typically, glucose is the main carbon source. However, during biosynthesis from this carbon source, undesirable byproducts, such as glucuronic acid, are produced that can negatively affect BC yield. As a result, various types of chemical inducers and additives have been explored to minimize this effect [26]. For example, it has been observed that supplementation of basal medium with ethanol significantly reduced glycerol production, while supplementation with ethanol and sodium citrate attenuated the tricarboxylic acid cycle (TCA) and reduced incorporation of carbon source in the catabolic processes, improving of BC synthesis efficiency [27].

Changing the physicochemical properties of the medium can also alter the BC production process. Because *K. xylinus* cells form BC-rich biofilms on the surface of the medium, the BC synthesis process can be affected by surface tension. Surface active agents — surfactants — consisting of amphiphilic compounds with hydrophilic head groups connected to hydrophobic tails can be used to alter surface tension [28,29]. Depending on the structure of the hydrophilic head group, surfactants can be classified as anionic, cationic, amphoteric, or nonionic [30]. Surfactants can have a variety of effects and applications in biological systems. For example, different surfactants can affect the synthesis process and structure of biofilms formed by microbial cells and this has a major influence on eradication from colonized solid or liquid surfaces [29,31]. It has also been reported that surfactants with different chemical structures can act as antibacterial and antifungal agents, for example as polymers coatings for wound dressing applications in chronic wounds infected by pathogenic bacteria [32–36]. Of particular interest for a variety of applications, are silicone surfactants, due to high surface activity and relatively low toxicity [37]. In these surfactants, the permethylated siloxane part acts as a hydrophobic group linked with one, or several, generally, nonionic hydrophilic polyether groups ensuring excellent surface activity [38,39]. However, to our knowledge, there has been no research into the effects of silicone surfactants on BC synthesis by *K. xylinus*.

The aim of this study was to further explore the use of silicone surfactants as a strategy for increasing BC productivity by *K. xylinus*, as well as improving the material and water-related properties of the obtained

biopolymer. Towards this aim, we developed a novel silicone polyether surfactant and used it as an additive to conventional HS medium. In addition to verifying the physicochemical properties of the obtained BC, we also ensured that the additive did not result in cytotoxicity.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Poly(*dimethylsiloxane-co-methylhydrosiloxane*), (Crosslinker 101) with an average molecular weight of 5500 g/mol, consisting of ≈ 50 OSi(CH₃)₂ and ≈ 25 OSi(CH₃)H units, was purchased from Evonik Nutrition & Care GmbH. Hydroxy-terminated allyl polyether (Bikanol A7) with an average molecular weight of 350 g/mol, containing ≈ 7 OCH₂CH₂ units, was purchased from the Institute of Heavy Organic Synthesis “Blachownia”. The Karstedt catalyst (2 wt% in xylene) was purchased from Sigma-Aldrich. All substrates were used as received, without any pretreatment.

2.2. Synthesis of silicone polyether surfactant (SPS)

The synthesis of silicone polyether surfactant (SPS) was carried out based on the hydrosilylation process of hydroxy-terminated allyl polyether with poly(*dimethylsiloxane-co-methylhydrosiloxane*), in the presence of a platinum Karstedt complex as catalyst as shown in Scheme 1. 50 g of Crosslinker 101 and 80 g of Bikanol A7 were placed in a three-neck flask equipped with a thermometer, magnetic stirrer, and a condenser. The mixture was heated to 50 °C and a solution of 50 μ L of Karstedt's catalyst in 12 g of allyl polyether (Bikanol A7), which corresponds to a catalyst concentration of approx. 2×10^{-5} mol Pt/mol Si—H, was added dropwise. The total amount of olefin (Bikanol A7) introduced into the reaction system was a 5 wt% stoichiometric excess, based on the number of Si—H bonds present in the poly(*dimethylsiloxane-co-methylhydrosiloxane*). The heating of the reaction mixture was continued until the temperature reached 110 °C and the formation of the emulsion (turbidity of the reaction mixture), along with a slow increase in viscosity, was observed. When the temperature reached 110 °C, heating was discontinued, but the temperature of the reaction mixture continued to rise to 145 °C and subsequent clarification of the reaction mixture was observed. During cooling, the reaction mixture remained clear and a further increase of viscosity was observed.

2.3. SPS analysis by FT-IR spectroscopy

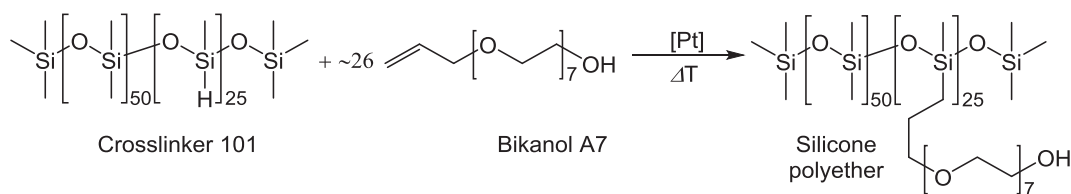
FT-IR spectra were collected at room temperature using a Bruker Tensor 27 spectrophotometer equipped with a single reflection Specac Golden Gate ATR unit. For each sample, 16 scans were collected per spectrum, with a resolution of 2 cm⁻¹ in a range of 4000–600 cm⁻¹.

2.4. Determination of surfactant molecular mass by gel permeation chromatography (GPC)

Gel permeation chromatography analysis of polymers was performed using a chromatographic system consisting of Waters Alliance 2695 separations module, Waters 2414 RI detector, and a set of three serially connected Waters Styragel HR1, HR2, and HR4 columns. Tetrahydrofuran (THF) was used as a mobile phase at the flow rate of 0.6 ml/min; the column oven temperature was 35 °C and the detector temperature was 40 °C. The number average and weight average molecular weights (M_n, M_w), as well as polydispersity index (PDI) values, were calculated based on calibration curve for a series of polystyrene standards (Shodex) in the range of 1.31×10^3 to 3.64×10^6 Da.

2.5. Determination of surface tension of Hestrin–Shramm media

For the determination of critical micelle concentration (CMC) of SPS



Scheme 1. Scheme of silicone polyether synthesis.

and its influence on surface tension, HS media was prepared with the addition of a range of SPS concentrations (0.0005–0.1%). The surface tension was then measured by using a digital tensiometer (Krüss, K10ST, Hamburg, Germany) via the ring method at 25 °C.

2.6. Microorganism

Komagataeibacter xylinus ATCC 53524 was obtained from the collection of the Department Microbiology and Biotechnology of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin.

2.7. Culture conditions

1% of one-week-old starter culture of *K. xylinus* was inoculated into HS medium containing glucose 20 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 2 g/L, citric acid 1.15 g/L, Na₂HPO₄ 2.7 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.06 g/L, and supplemented with 1% ethanol. This served as the media for control cultures, as in our prior work. For the experimental conditions, we added the synthesized SPS as a non-nutritive additive to the culture media to obtain final concentrations of 0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.1%.

2.8. BC purification

Following cultivation, BC pellicles were harvested and rinsed in dH₂O. Next, the pellicles were digested using 0.1 M NaOH at 80 °C in a water bath (3×) and then again rinsed in dH₂O to remove residual NaOH. Purified BC was then stored at 4 °C for further analysis.

2.9. BC yield

The BC synthesis wet mass and dry mass yield was determined by weighing purified non-dried BC using an analytical balance (XA 52/Y, Radwag, Poland), followed by drying at 60 °C until mass was constant and weighing again to determine final, dry mass. The yield of BC was then calculated using Eq. (1):

$$\text{Yield} \left(\frac{\text{g}}{\text{l}} \right) = \frac{W_{\text{dry}}}{V} \quad (1)$$

where: W_{dry} is the dry mass of BC in g, V is the volume of culture media in dm³.

2.10. Water holding capacity (WHC) and moisture content ratio (MCR)

To assess water-related properties, BC samples were removed from storage, the surface water was gently removed using paper filter, and then the wet mass was determined using an analytical balance (XA 52/Y, Radwag, Poland). Next, BC samples were dried overnight at 60 °C in an oven, to completely remove water and then weighted again. The moisture content ratio (MCR) was calculated using Eq. (2) [40]:

$$\text{MCR} = \frac{W_{\text{wet}} - W_{\text{dry}}}{W_{\text{dry}}} \times 100\% \quad (2)$$

where: W_{wet} is the wet mass of cellulose in g, W_{dry} is the dry mass of BC in g.

To determine the water holding capacity, wet BC samples were first

weighted using an analytical balance (XA 52/Y, Radwag, Poland). Next, the BC samples were dried overnight at 60 °C in an oven to completely remove the water and weighted again. The water holding capacity of the BC samples was then calculated using Eq. (3) [41]:

$$\text{WHC} = \frac{W_{\text{water}}}{W_{\text{dry}}} \quad (\text{gwater/gdrycellulose}) \quad (3)$$

where: W_{water} is the mass water removed during drying in g, W_{dry} is the dry mass of BC in g.

2.11. Differential scanning calorimeter analysis (DSC)

Differential Scanning Calorimetry (DSC) was used to examine the thermal behaviour of BC cultivated with presence of SPS. Measurements were carried out using a Mettler Toledo DSC 1 STARe differential scanning calorimeter, coupled with a Huber TC100 immersion cooler. All data were collected at atmospheric pressure, with nitrogen as a purge gas, and with an empty sample pan as the reference. Samples were between 6 and 15 mg in weight. In the first heating cycle, the heating ramp was set from –50 °C to 300 °C, with a heating rate of 10 °C/min.

2.12. Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermal stability of the obtained BC was analyzed using a TGA Q50 thermogravimetric analyzer. TGA experiments were conducted under a nitrogen atmosphere and measured in the dynamic heating regime. The weight of BC samples varied between 6 and 8 mg. Samples were heated from 25 °C to 600 °C at a heating rate of 10 °C/min with a 10 min isotherm at 85 °C under nitrogen atmosphere to remove any remaining water present in the samples. The decomposition temperature was established as the onset temperature for decomposition of the first 5% of the sample (T5%onset) and as the regular onset temperature for decomposition (Tonset) for the whole sample for each of the consecutive steps in multistep decompositions.

2.13. Surface structure analysis of BC by ATR-FTIR

The structure of BC obtained from media with SPS was analyzed by ATR-FTIR. The analysis was carried out using an FTIR spectrophotometer ALPHA II (Bruker Co., Germany) with a diamond ATR adapter. The spectra were collected in the range of 4000–400 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ (32 scans). The collected ATR-FTIR spectra were analyzed using SpectraGryph 1.2 software. The lateral order index (LOI) and total crystallinity index (TCI) were calculated as the ratio of bands 1430 cm⁻¹ to 895 cm⁻¹ and 1370 cm⁻¹ to 2900 cm⁻¹, respectively. The fraction of allomorph Ia was calculated according to Eq. (4) [42]:

$$I\alpha = 2.55 \left(\frac{A_{750}}{A_{710} + A_{750}} \right) - 0.32 \quad (4)$$

2.14. SEM

The morphology of obtained BC was examined using a Hitachi SU3500 scanning electron microscope. For this purpose, purified, wet BC samples were dried overnight by lyophilization in CHRIST Alpha 1–2 LDplus lyophilizer. The dried samples were then sputtered with Au using

SEM DUAL Cressington Sputter Coater 108 Auto. Analysis of SEM images to compute porosity, fiber orientation, and fiber diameter was carried out using a Python-based workflow leveraging the *scikit-image* (also known as *skimage*) [43] and *quanfima* [44] libraries. Using *skimage*, grayscale images were first segmented using the *Niblack* local thresholding algorithm, followed by skeletonization using the default *skimage* 2D skeletonization algorithm, *Zhang's*. Visualization of intermediate steps was carried out using *napari* [45]. The binary data (segmentation mask and skeleton) was then processed using *quanfima* to calculate porosity, fiber orientation, and fiber diameters. The lazy loading of data and parallelization of the computations was enabled using the *dask* library [46]. A Jupyter notebook showing the workflow step-by-step on a single image is available on Zenodo at [https://doi: 10.5281/zenodo.6373917](https://doi.org/10.5281/zenodo.6373917), along with code used for both the lazy *napari* visualization pipeline and full *quanfima* fiber analysis.

2.15. XRD

A diffractometer (Aeris, Malvern Panalytical, Germany) with 0.15406 nm wavelength (Cu-K α radiation generated at 40 kV and 7.5 mA) was used to analyze the crystal structure of the cellulose samples. X-ray scanning was performed at a rate of 0.01°/s in range 10° to 30° 2 θ . The crystallinity index (CrI) was calculated using the peak deconvolution method [47] using OriginPro software. A Gaussian-shape function was used to fit the peaks and the broad peak centered around 21.5 degrees was assigned to be the amorphous contribution. CrI was calculated using Eq. (5):

$$\text{CrI}\% = \frac{I_{200} - I_{\text{non-cr}}}{I_{200}} \times 100\% \quad (5)$$

where: I_{200} is the maximum intensity of the peak corresponding to the plane in the sample with the Miller indices 200 at a 2θ angle between 21.5 and 24 degrees, $I_{\text{non-cr}}$ is the intensity of diffraction of the non-crystalline material.

The crystallite size was calculated using the Scherrer Eq. (6):

$$D_{110} = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos\theta} \quad (6)$$

where: K is the Scherrer constant (0.9), λ is the X-ray wavelength, θ is the Bragg angle and β is the FWHM of the (110) peak from the fitting procedure [48].

2.16. Cytotoxicity of SPS and SPS-modified BC

Cytotoxicity testing of SPS and BC obtained from culture with addition of SPS was performed as described previously, [49] based on ISO10993-5 and NCI60 [50], using L929 murine fibroblasts. The cell line, as well as all cell culture reagents (Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, penicillin, streptomycin, trypsin, etc.), were purchased from Sigma Aldrich. Cells (passage 15–20) were maintained in complete growth medium: DMEM containing 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. To screen for any potential toxicity of SPS itself, L929 cells were seeded in parallel in two 96-well plates, one at 10000 cells per well and the second at 5000 cells per well. Both plates were then incubated for 24 h to allow for cell attachment and spreading and then the growth media was aspirated and replaced with growth media containing eight serial two-fold dilutions of SPS stock (2% in water), spanning from 0.1% to 0.0008% (5 technical replicates were performed). Sterile water was used as a vehicle control (sham). After further 24 h of culture, the viability of the cells seeded at 10000 cells per well was assessed using an inverted light microscope (Delta Optical IB-100) and resazurin viability assay [51] using fluorescent plate reader (Bio-tek Synergy HTX, excitation 540 nm, emission 590 nm). The same assessment was performed after 48 h of culture for the plate seeded at

5000 cells per well.

To test for potential cytotoxicity of BC obtained from culture with SPS, two assays were performed: extract assay and direct contact assay. For the extract assay, extracts were prepared by soaking samples ($\sim 10 \text{ cm}^2$) in 5 mL of growth media (2 cm^2/mL ratio, exceeding the ISO10993 recommendation for thick samples) for 24 h at 37 °C. In parallel, L929 cells were seeded in a 96-well plate, 10,000 cells per well, and incubated for 24 h to allow for attachment and spreading. Then, the media was aspirated and replaced with 100 μL of extract (6 technical replicates). After further 24 h of culture, cell viability was assessed, as described above. For the direct contact assay, L929 cells were plated in a 24-well plate (50,000 cells per well) and incubated for 24 h to allow for attachment and spreading. Then, media was aspirated and replaced with fresh growth media and BC discs ($\sim 2 \text{ cm}^2$ each, 5 samples per material), presoaked in growth media, were placed directly on top of the cell monolayer. The cells were then incubated for 24 h and cell viability was assessed using an inverted light microscope, before and after removal of BC samples, and using resazurin assay as described above.

2.17. Statistical analysis

The results were analyzed by using Statistica 14 software. Prior to the analysis, the data was checked for its normality using the Shapiro-Wilk test. Next, means were compared by one-way ANOVA, followed by Tukey post-hoc test. Means were considered as significantly different at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. The properties of SPS

To confirm that the reaction proceeded as planned, with the conversion of substrates into the desired product, the postreaction mixture was analyzed using FT-IR. The spectra of the substrates and the product are shown in Fig. 1.

Analysis and comparison of the spectra confirmed the expected structure of the obtained product. The presence of a band at 3469 cm^{-1} can be assigned to stretching vibrations of the O—H bond, while bands at 2958, 2867 and 1259 cm^{-1} are characteristic of stretching vibrations of C—H bonds present in methyl, and methylene groups. The band at 1088 cm^{-1} can be assigned to C—O bonds present in polyether chains, while bands at 1012 and 797 cm^{-1} are characteristic of Si—O bond vibrations of the siloxane chain. Simultaneously, the absence of bands characteristic of Si—H bond that can be observed in the spectrum of

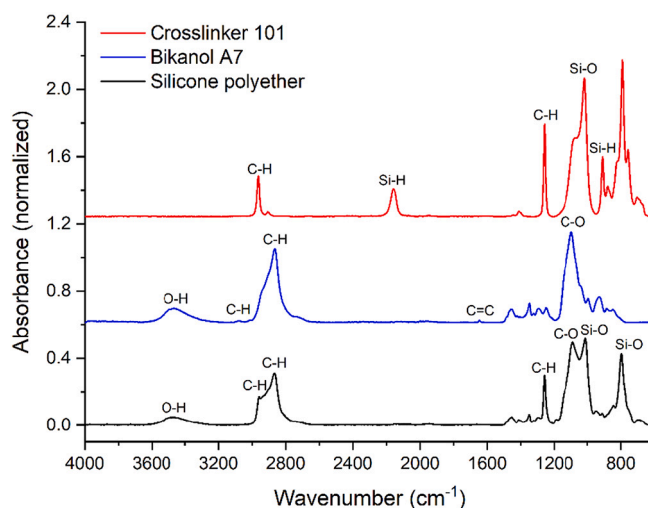


Fig. 1. FTIR spectra of synthesized SPS and substrates (Crosslinker 101 and Bikanol A7) used for its synthesis.

Crosslinker 101 at 2159 and 914 cm^{-1} , as well as those of olefinic C—H and C=C bond vibrations present in the Bikanol A7 spectrum at 3079 and 1646 cm^{-1} , respectively, confirm the complete conversion of substrates used.

3.2. Gel permeation chromatography (GPC)

To further confirm the correct polysiloxane (Crosslinker 101) functionalization, its sample and the sample of the synthesized silicone polyether were subjected to GPC analysis, the results of which are presented in Fig. S1. It can be seen that both the number and weight average molecular weight (M_n and M_w) of the polymer after functionalization increased from about 5400 and 8800 Da determined for the starting polysiloxane to about 10,700 and 24,000 Da, respectively. At the same time, the polydispersity index PDI increased only slightly from 1.62 for the starting polysiloxane to 1.91 for the silicone polyether. The obtained results confirm the proper polysiloxane functionalization and no side reaction occurrence. The above-mentioned slight increase in PDI value and a lower than theoretical M_n molecular weight calibrated for the synthesized silicone polyether can be explained by the use of allyl polyether of average molecular weight of approximately 350 g/mol as a substrate which is also characterized by specific molecular weight distribution.

3.3. Influence of SPS on the surface tension of HS media and BC yield

The effectiveness of a surfactant is determined by the change in surface tension. The most efficient surfactants have the ability to decrease the surface tension of water from 72 to 30 mN/m [52]. Silicone-based surfactants are a particularly interesting group because they can decrease the surface tension of water to approx. 20 mN/m, making them more surface-active, as compared to hydrocarbon surfactants [37]. In this study, we assessed the concentration-dependent reduction of HS medium surface tension for the synthesized SPS. Fig. 2a shows the measured surface tension as a function of SPS concentration in the medium. The lowest concentration of SPS, 0.0005%, reduced the surface tension of media solution from 59.57 ± 0.37 mN/m to 50.26 ± 0.58 mN/m, whereas the highest (0.1%) reduced it to 30.05 ± 0.41 mN/m. A sharp decrease in HS surface tension was observed up to 0.01% of SPS, while further addition of SPS to 0.1% resulted in a more gradual decrease. The critical micelle concentration (CMC) of SPS in HS media was found to correspond to 0.008% which is equivalent to molarity of 0.005 mmol/L (see Fig. 2a).

The physicochemical interaction between bacterial cells and the medium has an impact on the attachment strength and/or colonization by the microorganisms. Typically, this decreases with increasing surface tension, but this depends on the specific microorganism, which may prefer surfaces with higher surface tension, and on whether the surface tension of the organism exceeds that of the medium or not [53]. Likewise, it has been reported [54] that the surface tension of the liquid medium also has an impact on the physicochemical interactions between the substrate surface and microalgae cells, as well as microalgae biofilm formation. When the surface tension of the medium was equal to the average free energy of the cells and substrate surface biofilm formation was minimal. However, when the surface tension was higher or lower, biofilm formation increased. Importantly, the surfactant had no impact on the surface properties of cells or substrate surface [54]. However, changing the surface tension of the liquid media surface could impact the BC productivity of *K. xylinus* strains, because in static cultures the BC forms in the biofilm at the gas-liquid interface, and the production of BC is directly related to the properties of the air-liquid interface surface [3]. Similar to other surfactants, the monolayer of SPS formed on air-HS media interface can promote retardation of mass transfer and increase of rigidity of air-media interface [55,56]. The oxygen availability is critical for *K. xylinus* cells that are aerobic bacteria for which forming of bacterial cellulose-based biofilm on colonized media surface

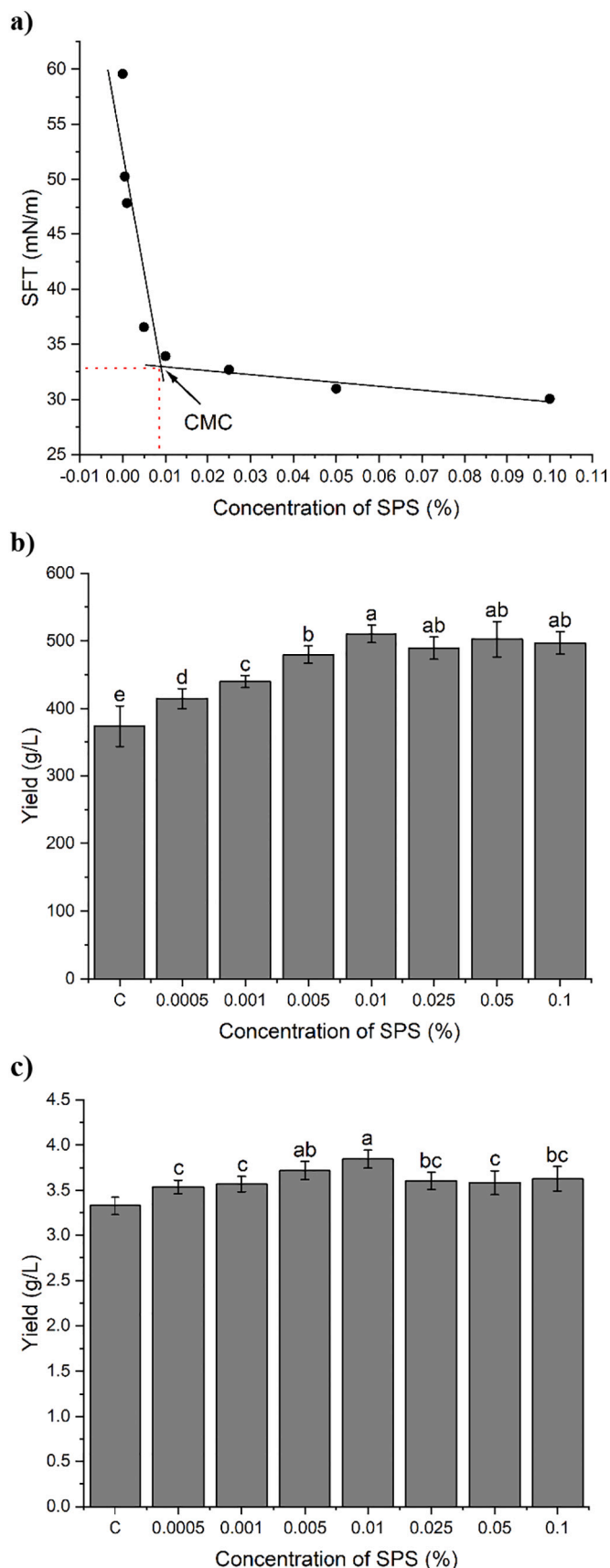


Fig. 2. Influence of SPS concentration on a) the surface tension of HS media and BC yield in terms of wet (b) and dry mass (c). Means that have no superscript in common are significantly different from each other ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviations.

is one of the solutions of non-disabled access to atmospheric oxygen [57]. Further, for the case of *K. hansenii* cells, BC pellicle formation is also affected by cell motility, which can be modified by media viscosity and surface tension. The reduction of cell motility of *K. hansenii* results in decreasing BC process synthesis efficiency, whereas overexpression of motility genes significantly improves this biopolymer production [58]. Here, the addition of SPS significantly alters the surface tension, which can also influence bacterial cell adhesion at the air-liquid interface and ability to “swim”, critical factors for biofilm pellicle formation on liquid surfaces [59,60].

The influence of a range of SPS concentrations (0.0005, 0.001, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 and 0.1%) on BC yield after 5 days of cultivation at 28 °C according to wet (Fig. 2 b) and dry mass (Fig. 2 c) of BC is presented in Fig. 2 b,c. The addition of SPS significantly improved BC production, even at the lowest concentration tested (0.0005%), where approx. 6% greater amount of dry BC and 11% of wet BC was obtained, as compared to control culture. Mirroring the trend in the surface tension data, BC yield increased with SPS concentration up to 0.01%, close to CMC, amounting to 3.95 ± 0.099 g/L of dry and 510.40 g/L of wet BC, corresponding to increases of 15% and 37%, respectively, compared to control cultures. However, for higher concentrations of SPS, no further gains were observed: for the 0.025, 0.05 and 0.1% it was 484.07, 502.53 and 497.22 g/L of the wet mass and 3.60 ± 0.097 , 3.58 ± 0.13 , and 3.63 ± 0.14 g/L of dry mass, respectively. However, the BC yield obtained for these higher SPS concentrations was still higher than the control medium. We conclude that SPS has great potential to be used as a non-nutrient additive for improvement of BC synthesis. In contrast, a different non-ionic surfactant, Tween-80, has been previously observed to decrease BC production by *K. xylinus* [61]. The possible multi-side SPS influence on *K. xylinus* cells environment can be a stressor factor that pushes them for higher BC synthesis with changed water properties.

3.4. Water holding capacity (WHC) and moisture content ratio (MCR)

The water holding capacity and moisture content of BC are two of its most important properties from the point of view of biomedical applications, such as wound dressings. Modern wound healing therapy has focused on maintaining a moist environment and wound dressing materials that can absorb and release water are considered the most favorable. In addition to maintenance of appropriate wound moisture, wet dressing materials help minimize of pain and wound trauma during the wound dressing exchange [62,63].

Surprisingly, the addition of SPS during BC biosynthesis had a significant, positive effect on both the WHC (Fig. 3a) and MCR (Fig. 3b) of the obtained BC membranes. The maximum WHC ($133.97 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{drycellulose}}$)—over 1.4 times greater than the WHC of the control ($93.43 \text{ g}_{\text{water}}/\text{g}_{\text{drycellulose}}$)—was obtained when 0.1% of SPS was added to the culture medium. However, all concentrations of SPS including and above 0.005% yielded similar values. For the case of MCR, all values were > 99%, with the highest value measured for BC obtained when 0.05% of SPS was present in the medium (99.29%). Again, the effect of the highest SPS concentrations ($\geq 0.1\%$) was similar and not statistically significant. Collectively these results suggest that the addition of SPS to the medium influenced not only the biosynthetic process but also the structure of the obtained BC, such as the porosity or nanofiber structure/size [63]. Further, higher WHC explains the higher wet vs. dry yield.

3.5. Membrane morphology by SEM

Substances added to the culture medium during BC synthesis can affect nanofibers morphology. For example, addition of a nonionic surfactant Tween-80 resulted in slightly wider nanofibrils [61]. To assess any such effects of SPS on the micromorphological structure of the obtained BC, we used scanning electron microscopy. SEM analysis of BC was performed on dried BC membranes using 3500 \times magnification for surface and 50 \times for cross-section of BC. Representative SEM images of

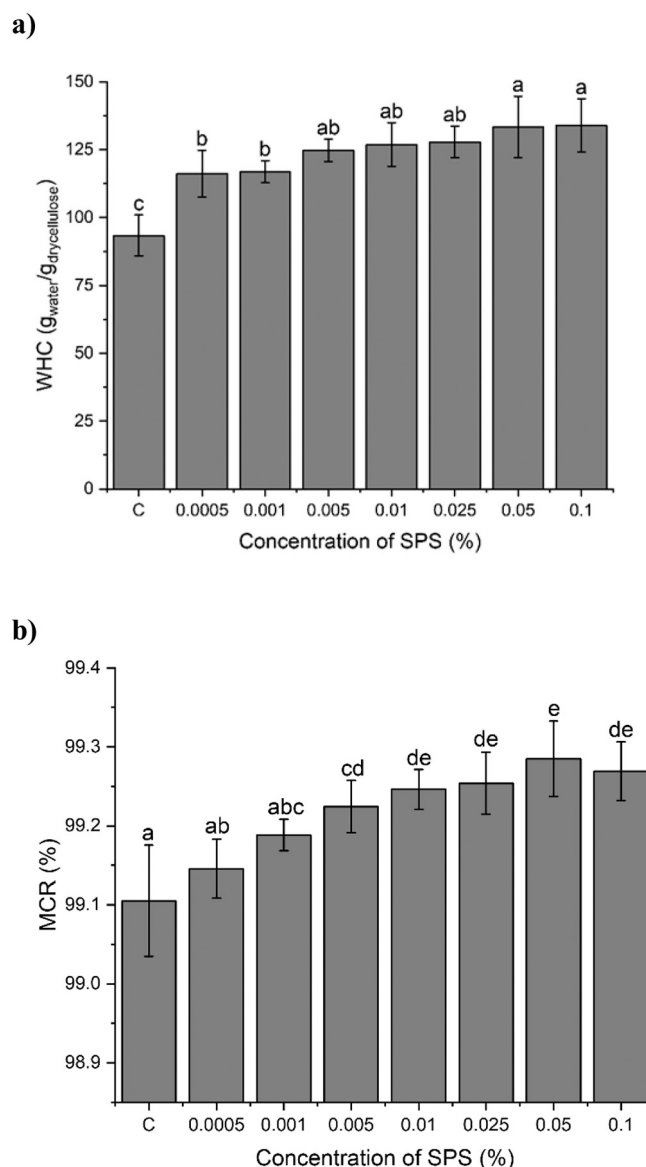


Fig. 3. Water holding capacity (WHC) (a) and moisture content ratio (MCR) (b) of BC obtained after cultivations with different concentrations of SPS. Means that have no superscript in common are significantly different from each other ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviation.

BC obtained after cultivation with range of SPS concentration are shown in Fig. 4 and Fig. S2. The surface of all samples exhibited the characteristic three-dimensional network of cellulose nanofibres and resulting high porosity. However, SEM images did not reveal a significant influence of SPS on the surface morphology of BC pellicles. It's possible that subtle structural effects are lost during sample preparation, such as fixation, dehydration, or drying.

The results of fiber parameter analysis from SEM imaging are presented in Table S1. As can be seen for all samples the nanofiber orientations were largely random, while nanofiber diameters were similar, primarily in the 80–160 nm range that is consistent with earlier reported values for BC from other *Komagataeibacter* sp. strains [64]. Overall, the outcome of the analysis is consistent with visual inspection: the data do not indicate that there was any significant effect of the presence of SPS during culture on the nanofiber orientation, diameter, or porosity of obtained BC.

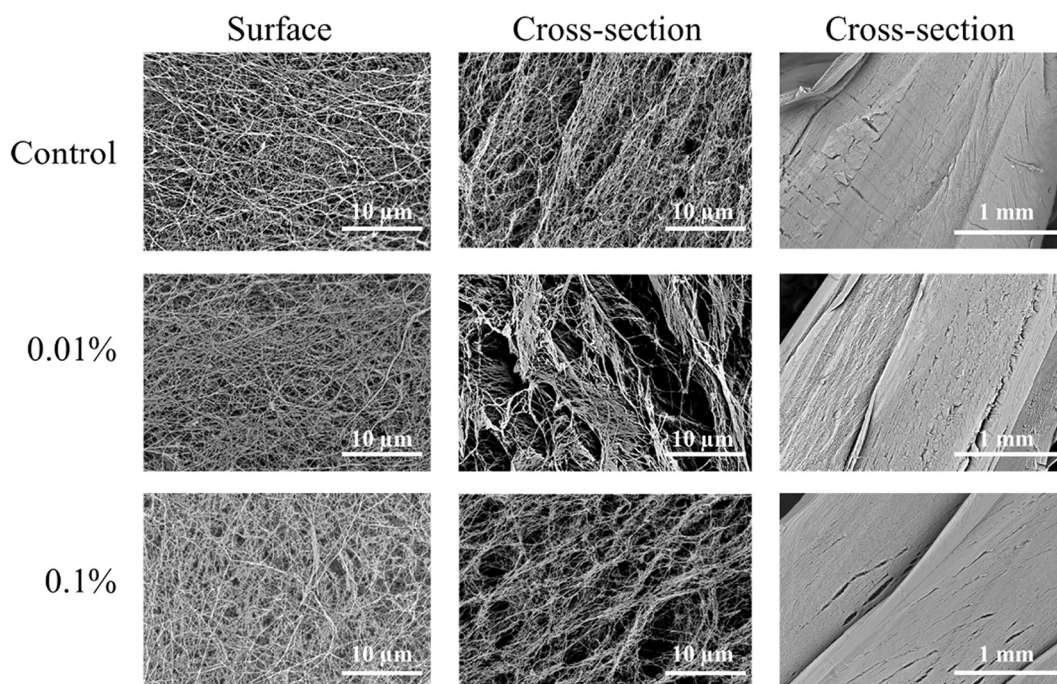


Fig. 4. Representative SEM images of BC obtained from control and cultures in HS media with the addition of 0.01% and 0.1% of SPS. The images obtained at 50 and 3500 magnification.

3.6. ATR-FTIR analysis of BC obtained from cultures supplemented with SPS

ATR-FTIR analysis was performed to characterize the surface of bacterial cellulose after in situ modification of its synthesis process with SPS. All of the ATR spectra obtained after 5 days of cultivation in HS medium with different concentrations of SPS are shown in Fig. 5. The typical FTIR spectra for BC was obtained with set of bands in the range of 800 cm^{-1} to 1800 cm^{-1} with mostly visible signals from adsorbed water at 1641 cm^{-1} , δCH_2 (symmetric) of C-6 at 1427 cm^{-1} , δCOH in plane from C-2 and C-3 at 1134 cm^{-1} , δOC of β -glycosidic linkage at 1160 cm^{-1} , δCO at C-6 at 1030 cm^{-1} and δCOC of β -glycosidic linkage for amorphous BC fraction at 897 cm^{-1} . In the next region of spectra from 2600 cm^{-1} to 3600 cm^{-1} characteristic bands for δOH from hydrogen

and covalent bands at 3334 cm^{-1} and δCH at 2895 cm^{-1} were observed [18]. The main disadvantage of using additives to HS media to enhance BC synthesis is the high probability of their incorporation into the BC structure during synthesis by *K. xylinus* cells [61]. This can result in undesired changes in the properties of the BC membranes and/or may require additional purification steps/methods. Importantly, here ATR-FTIR analysis did not identify the presence of any bands that could indicate the modification of BC by SPS. Moreover, the crystallinity indexes values (LOI, TCI) and hydrogen bond index did not differ significantly between the BC obtained from cultivation media with different amounts of SPS (Table 1). Similar observations were reported by Huang et al., [21] where addition of surfactant Tween-80 at a concentration 0.1% did not have an effect on BC fibril structure when analyzed by FT-IR. Both our synthesized SPS and Tween-80 share non-ionic character.

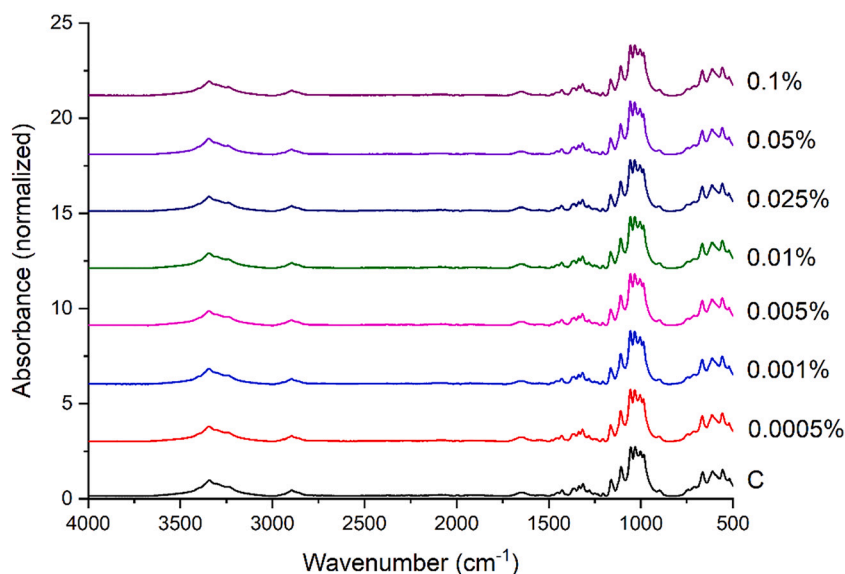


Fig. 5. The ATR-FTIR spectra of BC obtained from the culture in HS media with the addition of SPS in the analyzed range of concentrations.

Table 1

The values of crystallinity indexes (LOI, TCI), hydrogen bond index (HBI) and mass fraction of crystalline allomorph I_{α} in crystals of BC nanofibrils produced by *K. xylinus* in cultivation medium with different concentrations of SPS.

Concentration of SPS [%]	IR crystallinity		HBI	Cellulose I_{α} index
	A1372/A2900 (TCI)	A1429/A897 (LOI)	A3400/A1320	
Control	1.396 ± 0.10	0.955 ± 0.05	5.597 ± 0.35	0.802 ± 0.02
0.0005	1.374 ± 0.09	0.994 ± 0.08	5.676 ± 0.45	0.798 ± 0.03
0.001	1.365 ± 0.05	1.036 ± 0.08	5.797 ± 0.16	0.806 ± 0.03
0.005	1.372 ± 0.04	1.054 ± 0.07	5.946 ± 0.23	0.823 ± 0.04
0.01	1.364 ± 0.06	1.003 ± 0.05	5.971 ± 0.15	0.821 ± 0.02
0.025	1.356 ± 0.10	1.069 ± 0.09	5.650 ± 0.26	0.824 ± 0.02
0.05	1.363 ± 0.07	0.985 ± 0.06	5.725 ± 0.10	0.811 ± 0.02
0.1	1.288 ± 0.06	0.985 ± 0.05	5.644 ± 0.21	0.799 ± 0.01

HBI – hydrogen bonds index, TCI – total crystallinity index, LOI – lateral order index.

The strong packing of cellulose fibrils on the molecular level, among others, depends on the structure and stability of the dense network of inter-molecular and intramolecular hydrogen bonds between glucose units, such as the primary alcohols hydroxyl group and the ring oxygen [65,66]. Potential interference with the BC synthesis process on the cellular level or modification of BC fibrils by substances added to the cultivation media can be manifested by differences in crystallinity and the ratio of I_{α} and I_{β} cellulose crystalline allomorphs [42]. The non-ionic character of the synthesized SPS potentially decreases its reactivity with free hydroxyl groups on the surface of BC nanofibrils, causing less disruption of hydrogen bond formation during initial stages of microfibrils structure development.

3.7. XRD

In order to further assess any impact of SPS present in the culture media on the crystalline structure of BC nanofibrils, we used X-ray diffraction (XRD) (Fig. 6). The analysis showed a moderate influence of addition of SPS on the molecular structure of BC microfibrils. The crystallite sizes were in the range of 5.5–5.8 nm, which is consistent with earlier reported values [67]. Likewise, SPS had little effect on the crystallinity (CrI) of BC microfibrils. Initially, CrI slightly increased with SPS concentration, followed by a downward trend of CrI for BC obtained from the cultures with SPS concentrations exceeding 0.01. However, observed differences between BC samples were not significant. The

addition of non-ionic surfactant Tween-80 to *K. xylinus* cultivation media at a concentration of 0.1% also had no significant effect on BC nanofibrils crystallinity and crystallites size [61,68].

3.8. Thermal stability of produced bacterial cellulose

The thermal stability and thermal properties of BC obtained from cultivation using medium supplemented with SPS were evaluated by thermogravimetric analysis (TGA) and differential scanning calorimetry (DSC). Fig. 7 and Table 2 present TGA results for the dry BC membranes produced by *K. xylinus* in the presence of SPS during cultivation. In the first stage, with heating up to 100 °C, the mass loss of all BC samples was similar and minimal. This can be ascribed to the loss of residual water. All BC samples were stable up to 280 °C; above this value, BC starts to decompose and depolymerize. These observations are in good agreement with earlier findings that indicated that the first stage of thermal degradation of BC lasts up to around 100–120 °C and BC starts to decompose around 250 °C [69,70]. Overall, the results for all materials were similar, but as can be seen in Fig. 7, the highest thermal stability, $T_{\text{onset}} = 327.7$ °C, was obtained for the control sample of a BC, obtained without addition of SPS. The BC obtained with the addition of 0.0005–0.1% SPS had similar thermal stability, with just slightly lower onset temperatures compared to the control. The lowest decomposition temperature was noted for BC obtained in presence of the highest concentration of SPS. With increasing temperature from 320 °C to 370 °C

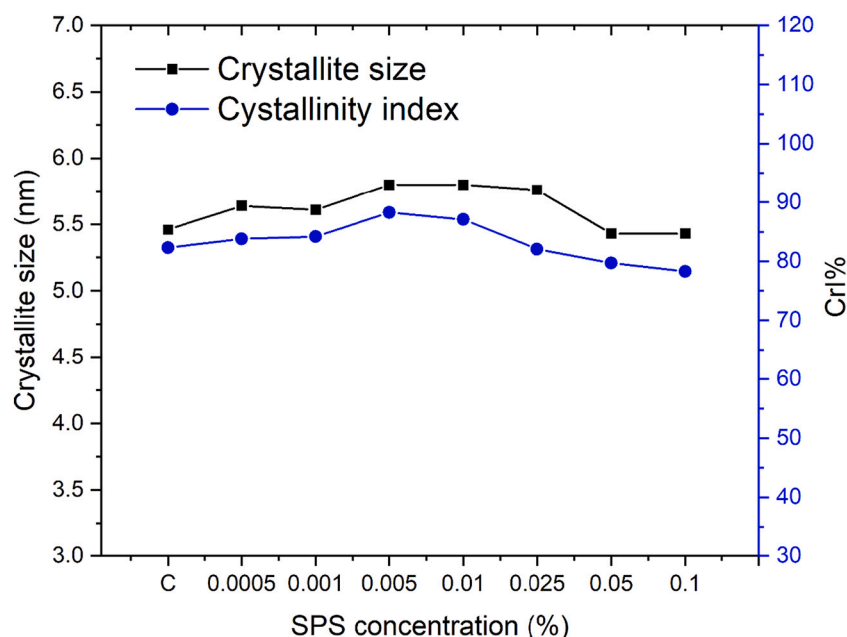


Fig. 6. The XRD analysis of BC pellicles obtained from *K. xylinus* cultures cultivated in the presence of SPS.

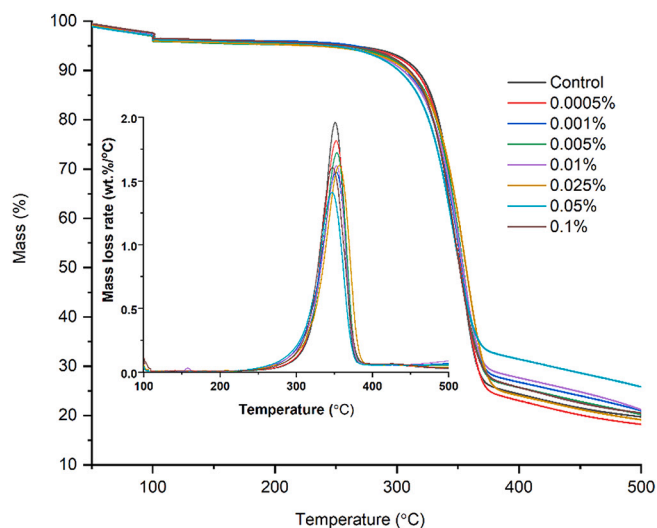


Fig. 7. TGA thermograms for bacterial cellulose produced by *K. xylinus* in the presence of various concentrations of SPS in cultivation media.

Table 2

Thermogravimetric analysis of bacterial cellulose produced by *K. xylinus* in the presence of SPS in nitrogen atmosphere.

Concentration of SPS [%]	Heating rate	T_{onset}	T_{endset}	Mass loss
	[°C/min]	[°C]	[°C]	
Control	10	327.7	366.0	78.7
0.0005	10	324.7	366.6	79.5
0.001	10	324.2	367.0	80.0
0.005	10	326.3	367.4	80.8
0.01	10	325.9	366.0	85.3
0.025	10	325.7	371.9	79.7
0.05	10	319.7	363.2	75.8
0.1	10	320.1	361.8	77.7

significant mass loss (~75–85%) was observed for all samples. The values continuously increase from 78.72% to 85.33% starting from control to 0.0005% of SPS concentration which corresponded with the highest value of BC yield. Then the mass loss starts to go down for BC obtained from cultivation with higher concentration of SPS (0.025–0.1%). In the final stage, the thermal degradation of BC was finished and carbon residue was observed. Overall, the observed changes in the mass loss can be related to the degradation of BC by depolymerization, dehydration, and decomposition of glucose units, followed by the formation of a carbon residue [69]. DSC thermograms of BC produced by *K. xylinus* in the presence of SPS are shown in supplementary Fig. S3. Overall, the shapes of the DSC curves obtained for all materials were similar. Importantly, we did not observe the crystalline phase transition temperature peak around 100–140 °C that is typical for amorphous BC. As a result, we conclude that irrespective of the amount of SPS added to cultivation media, the crystallinity of the obtained BC is not significantly affected and remains high.

3.9. Cytotoxicity

Because of the potential application of BC as a biomaterial, for example in wound dressings, and for assessing the overall environmental safety of the synthesized SPS, we conducted a cytotoxicity screening in vitro using L929 murine fibroblasts. First, we screened for

potential toxicity of SPS alone, over the same range of concentrations that was used in the BC synthesis cultures. After 24 h of exposure to SPS, the resazurin viability assay indicated a modest, 10–20% reduction in L929 viability for all tested concentrations (Fig. 8a). However, by inverted light microscopy evidence of cytotoxicity were not observed, such as altered morphology (Supplementary Fig. S4). Instead, robust growth is observed in all conditions and cell density is visually similar to vehicle control. Thus, the SPS may interact unfavourably with resazurin or act as a mild inhibitor of growth. After 48-h exposure to SPS, the resazurin viability assay indicated >90% viability for doses below 0.025% SPS, followed by a trend of decreasing viability for SPS concentrations exceeding 0.025% (Fig. 8b). This was confirmed by microscopy, where robust growth and confluent cell monolayers were observed for doses <0.025% SPS (See supplementary information). Higher doses also exhibited robust growth, but were subconfluent. Again, no evidence of cytotoxicity was observed, such as altered morphology. We conclude that at higher concentrations, SPS may act as a mild growth inhibitor of L929 murine fibroblasts.

Next, we screened for potential cytotoxicity of BC obtained from SPS-supplemented cultures. First, extracts of BC were prepared in accordance with ISO10993 guidelines (>1.25 cm²/mL) by incubating samples in complete growth media for 24 h. Following 24-h incubation with extracts, no reduction in L929 cell viability was observed by resazurin viability assay (Fig. 8c) and light microscopy (data not shown). All BC samples prepared with SPS were similar to the control BC. Thus, the results confirm that the BC purification process eliminates any SPS.

To test the obtained BC further, from the point of view of potential applications in wound dressings, a direct contact assay was conducted, where BC discs were placed directly on top of L929 cell monolayers for 24 h. After this time, discs were removed and the resazurin viability assay indicated a 10–20% reduction in viability for all tested materials (Fig. 8d). No differences were observed between the BC synthesized with SPS present and the control BC. Further, despite the reduction in viability, all tested materials remained above the 70% viability threshold identified by ISO10993 as indicative of cytotoxicity. The observed effect is likely due to mechanical trauma during disc removal, because microscopy with discs in place showed very dense, confluent monolayers and no signs of cytotoxicity (Fig. 8e-h). These results are also in good agreement with our previous direct contact assay of modified BC [49]. Thus, we conclude that the inclusion of SPS in the *K. xylinus* culture media does not have an adverse effect on the safety profile of obtained BC.

4. Conclusions and future perspectives

In this study, we investigated the potential of a new silicone polyether surfactant as a non-nutritive media additive for enhancing BC synthesis. The addition of 0.01% SPS to traditional HS cultivation medium enhanced BC yield by over 30% for wet mass and 15% for dry mass, without any adverse effects on its chemical structure or fiber morphology. Further, BC obtained from SPS had improved water-related properties and displayed no cytotoxicity. We believe that the synthesized surfactant has great potential to be an environmentally friendly and cost-effective factor for enhanced production of bacterial cellulose process as a non-nutrient additive. Further, the obtained BC is well suited for successful used in biomedical applications, such as wound dressings or carriers for various types pharmaceuticals. Apart from the increased effectiveness of BC synthesis, the observed changes in water properties of BC depending on the amount of added SPS, suggest an opportunity for the direct improvement of BC properties for specific usages where appropriate hydration is crucial. Beyond that, the

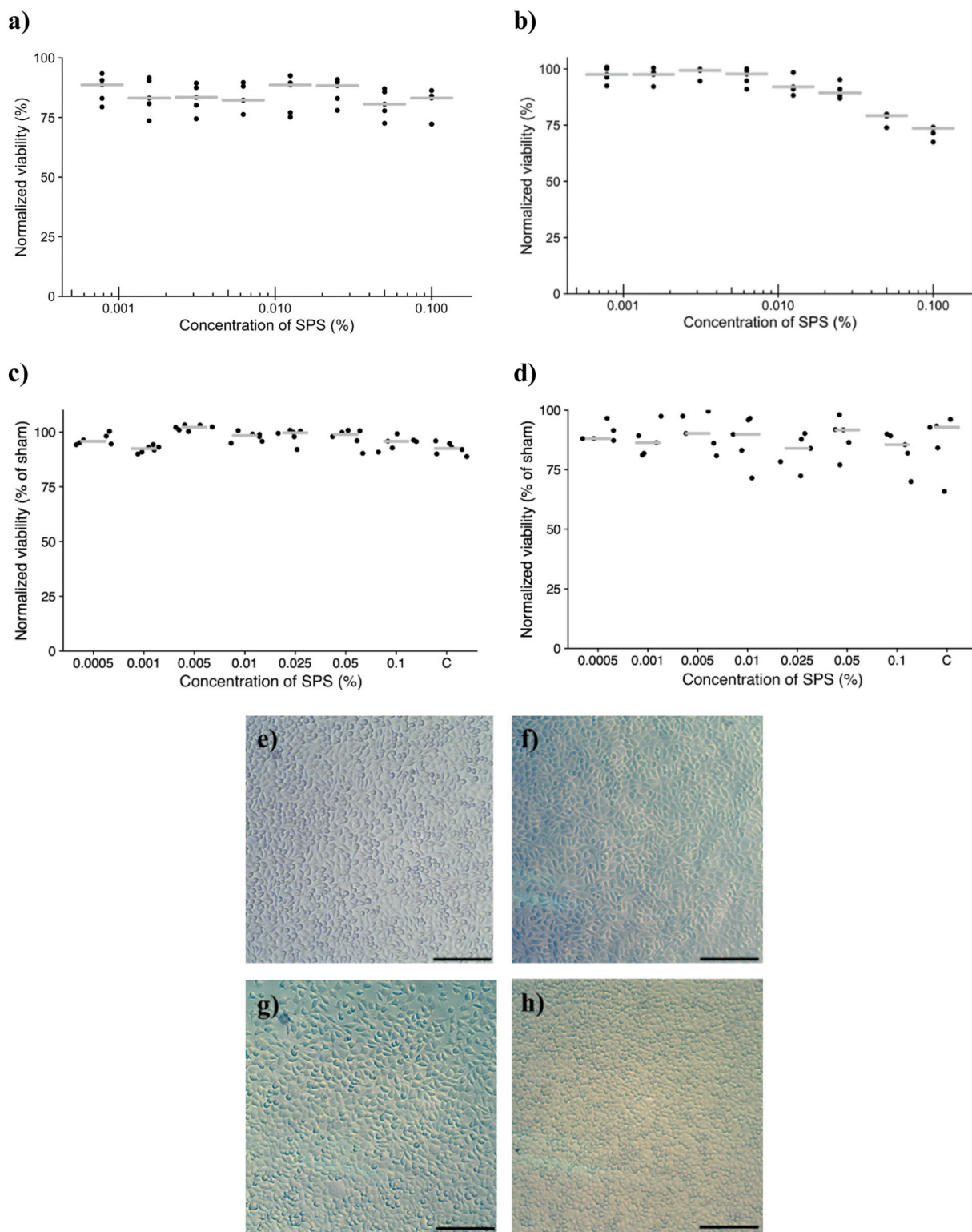


Fig. 8. Normalized cell viability of L929 murine fibroblasts exposed to a range of SPS concentrations for 24 h (a) and 48 h (b). Normalized cell viability of L929 murine fibroblasts cultured for 24 h in liquid extracts of SPS-modified BC (c). Normalized cell viability of L929 murine fibroblasts cultured for 24 h in direct contact with SPS-modified BC (d). Dots represent technical replicates, except for panel d, where they represent means of technical replicates ($n = 5$ samples); grey bars indicate medians. Representative micrographs of L929 cells after 24 h in direct contact with BC. e) Sham (no disc). f) Control BC. g) BC from 0.0125% SPS culture. h) BC from 0.1% SPS culture. Images taken with discs in place—prior to removal. Scale bar indicates 200 μm.

improved yield and modified properties may enable wider application of BC, for example in new kinds of nanocomposites. The high structural homogeneity of bacterial cellulose obtained from *K. xylinus* cultures with addition SPS is an advantage for such applications, where BC may serve as the base material for new, “green” nanocomposites.

CRedit authorship contribution statement

Magdalena Szymańska: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Investigation, Visualization. Jakub Hoppe: Investigation, Visualization. Michał Dudkiewicz: Investigation, Resources, Writing - Review & Editing. Peter Sobolewski: Methodology, Investigation, Writing - Review & Editing. Magdalena Palacz: Investigation. Ewa Janus: Investigation, Writing - Review & Editing. Beata Zielińska: Investigation. Radosław Drozd: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Project administration, Investigation, Writing - Original Draft, Visualization, Supervision.

Declaration of competing interest

The authors declare no conflict of interest.

Data availability

Data will be made available on request.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

References

- H. Wu, Y. Zhong, Y. Tang, Y. Huang, G. Liu, W. Sun, P. Xie, D. Pan, C. Liu, Z. Guo, Precise regulation of weakly negative permittivity in CaCu₃Ti₄O₁₂ metacomposites by synergistic effects of carbon nanotubes and grapheme, *Adv. Compos. Hybrid Mater.* 5 (2022) 419–430, <https://doi.org/10.1007/s42114-021-00378-y>.
- Z. Sun, H. Qi, M. Chen, S. Guo, Z. Huang, S. Maganti, V. Murugadoss, M. Huang, Z. Guo, Progress in cellulose/carbon nanotube composite flexible electrodes for supercapacitors, *Eng. Sci.* (2021), <https://doi.org/10.30919/es8d588>.
- J. Wang, J. Tavakoli, Y. Tang, Bacterial cellulose production, properties and applications with different culture methods - a review, *Carbohydr. Polym.* 219 (2019) 63–76, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.05.008>.
- O.M. Atta, S. Manan, M. Ul-Islam, A.A.Q. Ahmed, M.W. Ullah, G. Yang, Silver decorated bacterial cellulose nanocomposites as antimicrobial food packaging materials, *ES Food Agrofor.* 6 (2021) 12–26, <https://doi.org/10.30919/esfaf590>.
- A. Jasim Li, W. Zhao, L. Fu, M.W. Ullah, Z. Shi, G. Yang, Fabrication of pH-electroactive bacterial cellulose/polyaniline hydrogel for the development of a controlled drug release system, *ES Mater. Manuf.* 1 (2018) 41–49, <https://doi.org/10.30919/esmm5f120>.
- B.O.O. Boni, L. Lamboni, B.M. Bakadia, S.A. Hussein, G. Yang, Combining silk sericin and surface micropatterns in bacterial cellulose dressings to control fibrosis and enhance wound healing, *Eng. Sci.* 10 (2020) 68–77, <https://doi.org/10.30919/es8d906>.
- J. Cai, W. Xu, Y. Liu, Z. Zhu, G. Liu, W. Ding, G. Wang, H. Wang, Y. Luo, Robust construction of flexible bacterial cellulose@Ni(OH)₂ paper: toward high 2 capacitance and sensitive H₂O₂ detection, *Eng. Sci.* 5 (2019) 21–29, <https://doi.org/10.30919/es8d669>.
- M. Culebras, G.A. Collins, A. Beaucamp, H. Geaney, M.N. Collins, Lignin/Si hybrid carbon nanofibers towards highly efficient sustainable Li-ion anode materials, *Eng. Sci.* 17 (2022) 195–203, <https://doi.org/10.30919/es8d608>.
- L. Mu, Y. Dong, L. Li, X. Gu, Y. Shi, Achieving high value utilization of bio-oil from lignin targeting for advanced lubrication, *ES Mater. Manuf.* 11 (2021) 72–80, <https://doi.org/10.30919/esmm5f146>.
- A. Vijeata, G.R. Chaudhary, A. Umar, S. Chaudhary, Distinctive solvatochromic response of fluorescent carbon dots derived from different components of *Aegle marmelos* plant, *Eng. Sci.* 15 (2021) 197–209, <https://doi.org/10.30919/es8e512>.
- X. Li, K. Chen, X. Ji, X. Yuan, Z. Lei, M.W. Ullah, J. Xiao, G. Yang, Microencapsulation of poorly water-soluble finasteride in polyvinyl alcohol/chitosan microspheres as a long-term sustained release system for potential embolization applications, *Eng. Sci.* 13 (2020) 106–120, <https://doi.org/10.30919/es8d1159>.
- G. Qi, Y. Liu, L. Chen, P. Xie, D. Pan, Z. Shi, B. Quan, Y. Zhong, C. Liu, R. Fan, Z. Guo, Lightweight Fe₃C@Fe/C nanocomposites derived from wasted cornstalks with high-efficiency microwave absorption and ultrathin thickness, *Adv Compos. Hybrid Mater.* 4 (2021) 1226–1238, <https://doi.org/10.1007/s42114-021-00368-0>.
- F.G. Blanco Parte, S.P. Santos, C.-C. Chou, V. Verma, H.-T. Wang, S. Ismadji, K.-C. Cheng, Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose, *Crit. Rev. Biotechnol.* 40 (2020) 397–414, <https://doi.org/10.1080/07388551.2020.1713721>.
- S.M. Choi, E.J. Shin, The nanofication and functionalization of bacterial cellulose and its applications, *Nanomaterials* 10 (2020) 406, <https://doi.org/10.3390/nano10030406>.
- K.-Y. Lee, G. Buldum, A. Mantalaris, A. Bismarck, More than meets the eye in bacterial cellulose: biosynthesis, bioprocessing, and applications in advanced fiber composites, *Macromol. Biosci.* 14 (2014) 10–32, <https://doi.org/10.1002/mabi.201300298>.
- M. Ul Islam, M.W. Ullah, S. Khan, N. Shah, J.K. Park, Strategies for cost-effective and enhanced production of bacterial cellulose, *Int. J. Biol. Macromol.* 102 (2017) 1166–1173, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.110>.
- M. Bagherniya, V. Babaeipour, A. Soleimani, Optimization of bacterial nano-cellulose production in bench-scale rotating biological contact bioreactor by response surface methodology, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.* (2021) 407–416, <https://doi.org/10.30492/ijcce.2020.38040>.
- R. Drozd, M. Szymańska, A. Żywicka, U. Kowalska, R. Rakoczy, M. Kordas, M. Konopacki, A.F. Junka, K. Fijałkowski, Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus*, *Biochem. Eng. J.* 166 (2021), 107855, <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107855>.
- G. Pacheco, C.R. Nogueira, A.B. Meneguim, E. Trovatti, M.C. Silva, R.T. Machado, S.J. Ribeiro, E.C. da Silva Filho, H. da S. Barud, Development and characterization of bacterial cellulose produced by cashew tree residues as alternative carbon source, *Ind. Crop. Prod.* 107 (2017) 13–19, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.026>.
- V. Revin, E. Liyaskina, M. Nazarkina, A. Bogatyreva, M. Shchankin, Cost-effective production of bacterial cellulose using acidic food industry by-products, *Braz. J. Microbiol.* (2018) 151–159, <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.12.012>.
- H.-C. Huang, L.-C. Chen, S.-B. Lin, C.-P. Hsu, H.-H. Chen, In situ modification of bacterial cellulose network structure by adding interfering substances during fermentation, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 6084–6091, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.03.031>.
- A. Krystynowicz, W. Czaja, A. Wiktorowska-Jezińska, M. Gonçalves-Miśkiewicz, M. Turkiewicz, S. Bielecki, Factors affecting the yield and properties of bacterial cellulose, *J. Ind. Microbiol.* 29 (2002) 189–195, <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000303>.
- A. Żywicka, A.F. Junka, P. Szymczyk, G. Chodaczek, J. Grzesiak, P.P. Sedghizadeh, K. Fijałkowski, Bacterial cellulose yield increased over 500% by supplementation of medium with vegetable oil, *Carbohydr. Polym.* 199 (2018) 294–303, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.126>.
- C. Campano, A. Balea, A. Blanco, C. Negro, Enhancement of the fermentation process and properties of bacterial cellulose: a review, *Cellulose* 23 (2016) 57–91, <https://doi.org/10.1007/s10570-015-0802-0>.
- T.R. Stumpf, X. Yang, J. Zhang, X. Cao, In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C* 82 (2018) 372–383, <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.11.121>.
- C. Molina-Ramírez, C. Enciso, M. Torres-Taborada, R. Zuluaga, P. Gañán, O.J. Rojas, C. Castro, Effects of alternative energy sources on bacterial cellulose characteristics produced by *Komagataeibacter medellinensis*, *Int. J. Biol.* 117 (2018) 735–741, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.05.195>.
- Y. Li, C. Tian, H. Tian, J. Zhang, X. He, W. Ping, H. Lei, Improvement of bacterial cellulose production by manipulating the metabolic pathways in which ethanol and sodium citrate involved, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96 (2012) 1479–1487, <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4242-6>.
- S. Landsmann, C. Lizandara-Pueyo, S. Polzar, A new class of surfactants with multinuclear, inorganic head groups, *J. Am. Chem. Soc.* 132 (2010) 5315–5321, <https://doi.org/10.1021/ja1011178>.
- S.L. Percival, D. Mayer, R.S. Kirsner, G. Schultz, D. Weir, S. Roy, A. Alavi, M. Romanelli, Surfactants: role in biofilm management and cellular behaviour, *Int. Wound J.* 16 (2019) 753–760, <https://doi.org/10.1111/iwj.13093>.
- T. Ivanković, J. Hrenović, Surfactants in the environment, *Arh Hig Rada Toksikol.* 61 (2010) 95–110, <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>.
- B.V.G. Nguyen, T. Nagakubo, M. Toyofuku, N. Nomura, A.S. Utada, Synergy between sophorolipid biosurfactant and SDS increases the efficiency of *P. aeruginosa* biofilm disruption, *Langmuir* 36 (2020) 6411–6420, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.0c00643>.
- P. Das Ghatak, S.S. Mathew-Steiner, P. Pandey, S. Roy, C.K. Sen, A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption, *Sci. Rep.* 8 (2018) 873, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19175-7>.
- M.F. Khan, L. Zepeda-Velazquez, M.A. Brook, Tunable, antibacterial activity of silicone polyether surfactants, *Colloids Surf. B* 132 (2015) 216–224, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2015.05.016>.
- A. Labena, M.A. Hegazy, R.M. Sami, W.N. Hozzein, Multiple applications of a novel cationic Gemini surfactant: anti-microbial, anti-biofilm, biocide, salinity corrosion inhibitor, and biofilm dispersion (part II), *Molecules* 25 (2020), <https://doi.org/10.3390/molecules25061348>.
- E. Paluch, A. Piecuch, E. Obłąk, Ł. Lamch, K.A. Wilk, Antifungal activity of newly synthesized chemodegradable dicephalic-type cationic surfactants, *Colloids Surf. B* 164 (2018) 34–41, <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.01.020>.

- [36] S.L. Percival, D. Mayer, A.-M. Salisbury, Efficacy of a surfactant-based wound dressing on biofilm control, *Wound. Rep. Reg.* 25 (2017) 767–773, <https://doi.org/10.1111/wrr.12581>.
- [37] J. Tan, Z. He, Y. Miao, M. Lin, Synthesis and surface properties of polyether-based silicone surfactants with different siloxane groups, *J. Surfactant Deterg.* 22 (2019) 875–883, <https://doi.org/10.1002/jsde.12276>.
- [38] Y. Huang, L. Meng, M. Guo, P. Zhao, H. Zhang, S. Chen, J. Zhang, S. Feng, Synthesis, properties, and aggregation behavior of tetrasiloxane-based anionic surfactants, *Langmuir* 34 (2018) 4382–4389, <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00825>.
- [39] B. Kekevi, H. Berber, H. Yildirim, Synthesis and characterization of silicone-based surfactants as anti-foaming agents, *J. Surfact. Deterg.* 15 (2012) 73–81, <https://doi.org/10.1007/s11743-011-1277-0>.
- [40] P. Cazón, M. Vázquez, G. Velázquez, Regenerated cellulose films with chitosan and polyvinyl alcohol: effect of the moisture content on the barrier, mechanical and optical properties, *Carbohydr. Polym.* 236 (2020), 116031, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116031>.
- [41] S.T. Schrecker, P.A. Gostomski, Determining the water holding capacity of microbial cellulose, *Biotechnol. Lett.* 27 (2005) 1435–1438, <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1465-y>.
- [42] H. Yamamoto, F. Horii, A. Hirai, In situ crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses I α and I β at the early stage of incubation, *Cellulose* 3 (1996) 229–242, <https://doi.org/10.1007/bf02228804>.
- [43] S. van der Walt, J.L. Schönberger, J. Nunez-Iglesias, F. Boulogne, J.D. Warner, N. Yager, E. Guillard, T. Yu, scikit-image: image processing in python, *PeerJ* 2 (2014), e453, <https://doi.org/10.7717/peerj.453>.
- [44] R. Shkarin, A. Shkarin, S. Shkarina, A. Cecilia, R.A. Surmenev, M.A. Surmeneva, V. Weinhardt, T. Baumbach, R. Mikut, Quanfima: an open source python package for automated fiber analysis of biomaterials, *PLoS One* 14 (2019), e0215137, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215137>.
- [45] napari contributors, napari: A Multi-dimensional Image Viewer for Python, 2019, <https://doi.org/10.5281/zenodo.3555620>.
- [46] Dask Development Team, Dask: library for dynamic task scheduling, URL, <https://dask.org>, 2016.
- [47] S. Park, J.O. Baker, M.E. Himmel, P.A. Parilla, D.K. Johnson, Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance, *Biotechnol. Biofuels* 3 (2010) 10, <https://doi.org/10.1186/1754-6834-3-10>.
- [48] J. Gu, J.M. Catchmark, Impact of hemicelluloses and pectin on sphere-like bacterial cellulose assembly, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 547–557, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.040>.
- [49] M. Szymańska, J. Karakulska, P. Sobolewski, U. Kowalska, B. Grygorcewicz, D. Böttcher, U.T. Bornscheuer, R. Drozd, Glycoside hydrolase (PelA α) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing, *Carbohydr. Polym.* 246 (2020), 116625, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.
- [50] S.L. Holbeck, J.M. Collins, J.H. Doroshov, Analysis of Food and Drug Administration-approved anticancer agents in the NCI60 panel of human tumor cell lines, *Mol. Cancer Ther.* 9 (2010) 1451–1460, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-10-0106>.
- [51] T.L. Riss, R.A. Moravec, A.L. Niles, S. Duellman, H.A. Benink, T.J. Worzella, L. Minor, Cell viability assays, in: G. Sittampalam, N. Coussens (Eds.), *Assay Guidance Manual*, Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda, MD, 2004, pp. 1–23.
- [52] S. De, S. Malik, A. Ghosh, R. Saha, B. Saha, A review on natural surfactants, *RSC Adv.* 5 (2015) 65757–65767, <https://doi.org/10.1039/C5RA11101C>.
- [53] K. Becker, Attachment strength and colonization patterns of two macrofouling species on substrata with different surface tension (in situ studies), *Mar. Biol.* 301–309 (1993).
- [54] X. Zhang, H. Yuan, Z. Jiang, D. Lin, X. Zhang, Impact of surface tension of wastewater on biofilm formation of microalgae *Chlorella* sp., *Bioresour. Technol.* 266 (2018) 498–506, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.06.082>.
- [55] R. Atta, D. Gavril, V. Loukopoulos, G. Karaiskakis, Study of the influence of surfactants on the transfer of gases into liquids by inverse gas chromatography, *J. Liq. Chromatogr.* 1023 (2004) 287–296, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.013>.
- [56] S. Zhang, D. Wang, F. Bu, X. Zhang, P. Fan, Gas-liquid mass transfer in the presence of ionic surfactant: effect of counter-ions and interfacial turbulence, *Surf. Interface Anal.* 45 (2013) 1152–1157, <https://doi.org/10.1002/sia.5242>.
- [57] P. Ross, R. Mayer, M. Benziman, Cellulose biosynthesis and function in bacteria, *Microbiol. Rev.* 55 (1991) 35–58, <https://doi.org/10.1128/mr.55.1.35-58.1991>.
- [58] P. Jacek, M. Rynajallo, S. Bielecki, Structural changes of bacterial nanocellulose pellicles induced by genetic modification of *Komagataeibacter hansenii* ATCC 23769, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103 (2019) 5339–5353, <https://doi.org/10.1007/s00253-019-09846-4>.
- [59] M. Morse, A. Huang, G. Li, M.R. Maxey, J.X. Tang, Molecular adsorption steers bacterial swimming at the air/water interface, *Biophys. J.* 105 (2013) 21–28, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.02.019>.
- [60] A. Yang, W.S. Tang, T. Si, J.X. Tang, Influence of physical effects on the swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa*, *Biophys. J.* 112 (2017) 1462–1471, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.02.019>.
- [61] D.R. Ruka, G.P. Simon, K.M. Dean, In situ modifications to bacterial cellulose with the water insoluble polymer poly-3-hydroxybutyrate, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 1717–1723, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.11.007>.
- [62] W.-C. Lin, C.-C. Lien, H.-J. Yeh, C.-M. Yu, S.-H. Hsu, Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications, *Carbohydr. Polym.* 94 (2013) 603–611, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.076>.
- [63] M. Ul-Islam, T. Khan, J.K. Park, Water holding and release properties of bacterial cellulose obtained by in situ and ex situ modification, *Carbohydr. Polym.* 88 (2012) 596–603, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.006>.
- [64] N. Pogorelova, E. Rogachev, I. Digel, S. Chernigova, D. Nardin, Bacterial cellulose nanocomposites: morphology and mechanical properties, *Materials* 13 (2020) 2849, <https://doi.org/10.3390/ma13122849>.
- [65] M. Wohlert, T. Benselfelt, L. Wågberg, I. Furó, L.A. Berglund, J. Wohlert, Cellulose and the role of hydrogen bonds: not in charge of everything, *Cellulose* 29 (2022) 1–23, <https://doi.org/10.1007/s10570-021-04325-4>.
- [66] Y. Nishiyama, Structure and properties of the cellulose microfibril, *J. Wood Sci.* 55 (2009) 241–249, <https://doi.org/10.1007/s10086-009-1029-1>.
- [67] M. Ul-Islam, J.H. Ha, T. Khan, J.K. Park, Effects of glucuronic acid oligomers on the production, structure and properties of bacterial cellulose, *Carbohydr. Polym.* 92 (2013) 360–366, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.09.060>.
- [68] H. Hosseini, S.M. Mousavi, Influence of surfactant and molarity on the properties of bacterial cellulose/polyaniline: experimental and density functional theory, *Carbohydr. Polym.* 250 (2020), 116903, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116903>.
- [69] F. Mohammadkazemi, M. Azin, A. Ashori, Production of bacterial cellulose using different carbon sources and culture media, *Carbohydr. Polym.* 117 (2015) 518–523, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.10.008>.
- [70] F. Jahan, V. Kumar, R.K. Saxena, Distillery effluent as a potential medium for bacterial cellulose production: a biopolymer of great commercial importance, *Bioresour. Technol.* 250 (2018) 922–926, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.094>.

Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity

Magdalena Szymańska¹, Jakub Hoppe², Michał Dutkiewicz², Peter Sobolewski³, Magdalena Palacz⁴, Ewa Janus⁵, Beata Zielińska⁶, Radosław Drozd^{1*}

¹Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 70-311 Szczecin, Poland.

²Faculty of Chemistry, Adam Mickiewicz University, 89b Umultowska Str., 61-614 Poznan, Poland

³Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland

⁴ Poznan Science and Technology Park, Adam Mickiewicz University Foundation, ul. Rubież 46, 61-612 Poznan, Poland.

⁵Department of Chemical Organic Technology, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 10 Puławskiego Str., 70-322 Szczecin, Poland.

⁶Department of Nanomaterials Physiochemistry, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Piastow Ave. 42, 71-065 Szczecin, Poland.

*Corresponding author: Radosław Drozd, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, Department of Microbiology and Biotechnology, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland; Tel.: +48 517456798; E-mail address: rdrozd@zut.edu.pl.

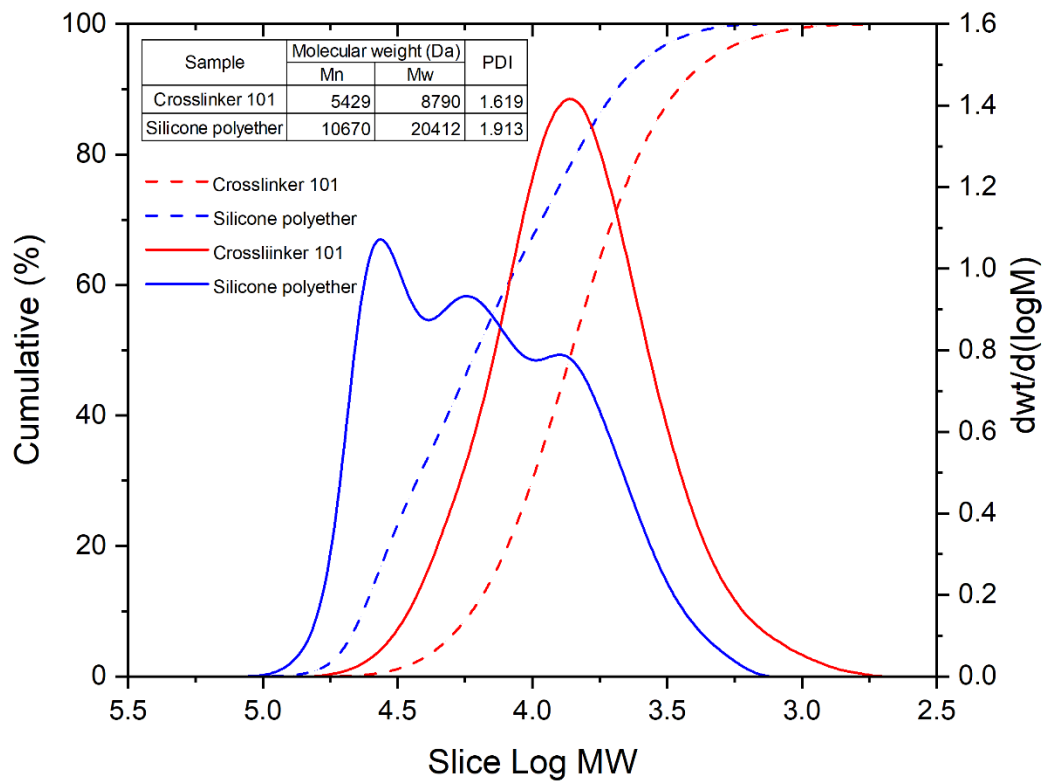


Fig.S1. Molecular weight distribution plots for Crosslinker 101 and silicone polyether.

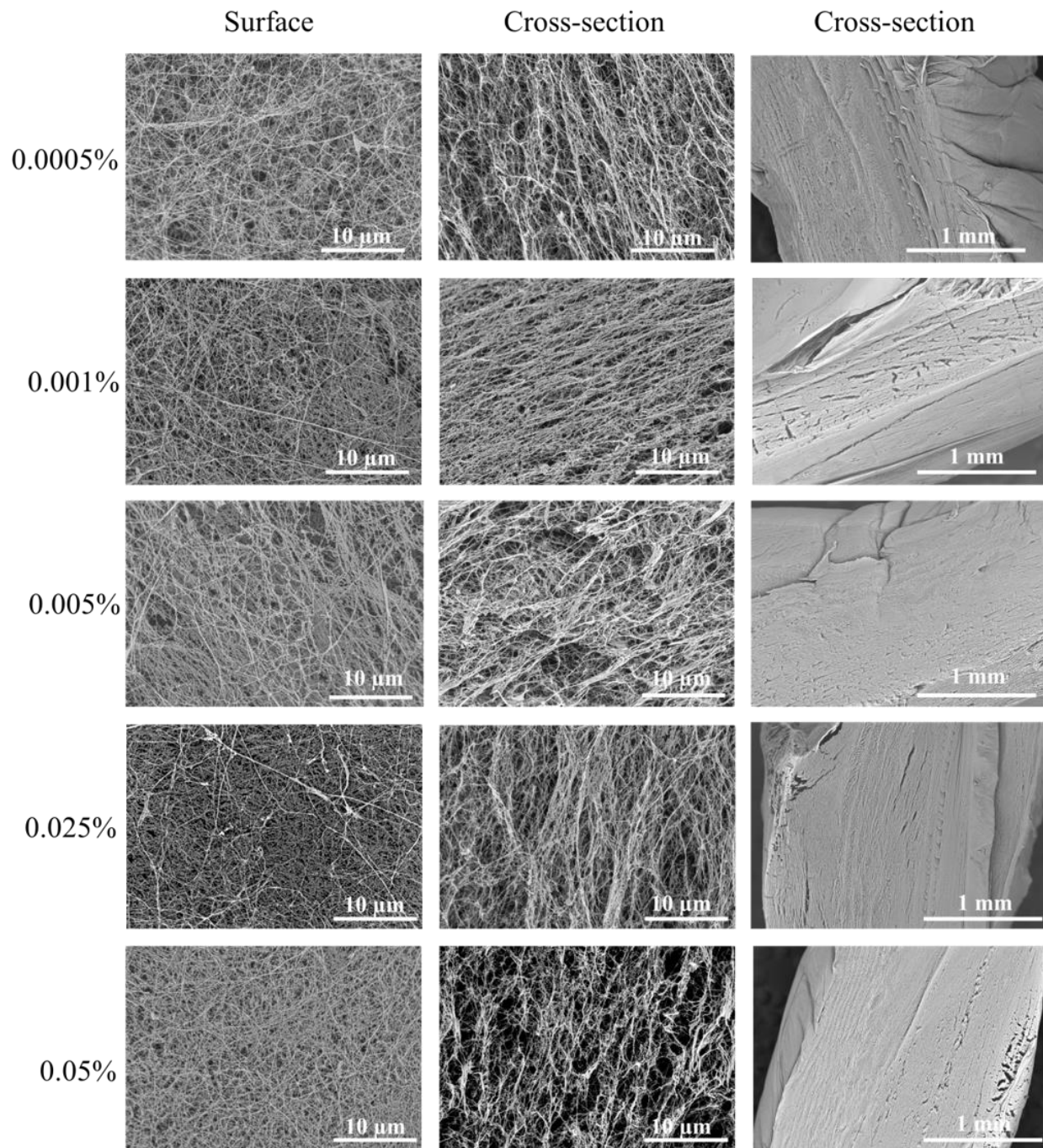


Fig.S2. Representative SEM images of control BC and BC obtained from culture in HS media with the addition of 0.0005%, 0.001%, 0.005%, 0.025% and 0.05% SPS (surface and cross-section of BC).

Table S1. Fiber parameters from SEM image analysis.

CONCENTRATION OF SPS*[%]	ORIENTATION [°]	DIAMETER [NM]	POROSITY [%]
0.01	90 ± 55	123 ± 45	42.0
	86 ± 55	120 ± 44	42.4
0.02	93 ± 54	121 ± 44	41.3
	91 ± 53	120 ± 44	41.2
0.1	89 ± 53	123 ± 45	41.5
	96 ± 51	122 ± 45	41.6
0.25	87 ± 51	121 ± 44	41.9
	81 ± 51	130 ± 45	39.7
0.5	93 ± 57	120 ± 44	40.3
	88 ± 58	119 ± 43	41.7
1.0	88 ± 53	122 ± 44	40.3
2.0	80 ± 57	121 ± 44	42.2
	84 ± 59	118 ± 44	42.9
Control	85 ± 47	122 ± 43	42.3
	86 ± 58	124 ± 44	42.4

* From cultures with different amount of SPS present in the culture media, two representative samples were imaged and then the images were analyzed using the developed workflow. For the fiber orientation and diameter calculations, for each sample, approx. 100–150 thousand fiber segments were quantified and the results are presented as mean ± standard deviation.

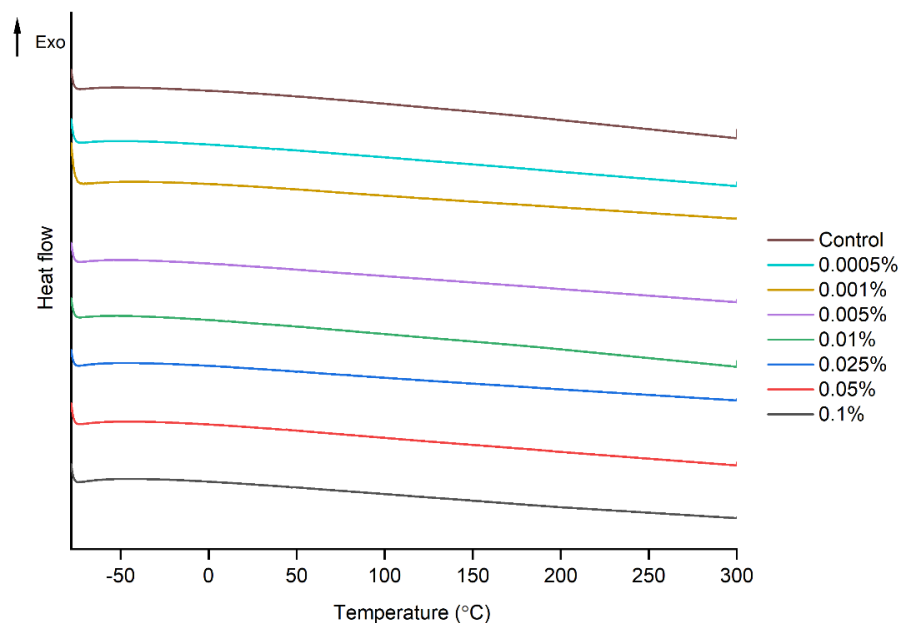


Fig. S3. DSC thermograms of BC obtained from culture in HS media with the addition of a range of SPS concentrations.

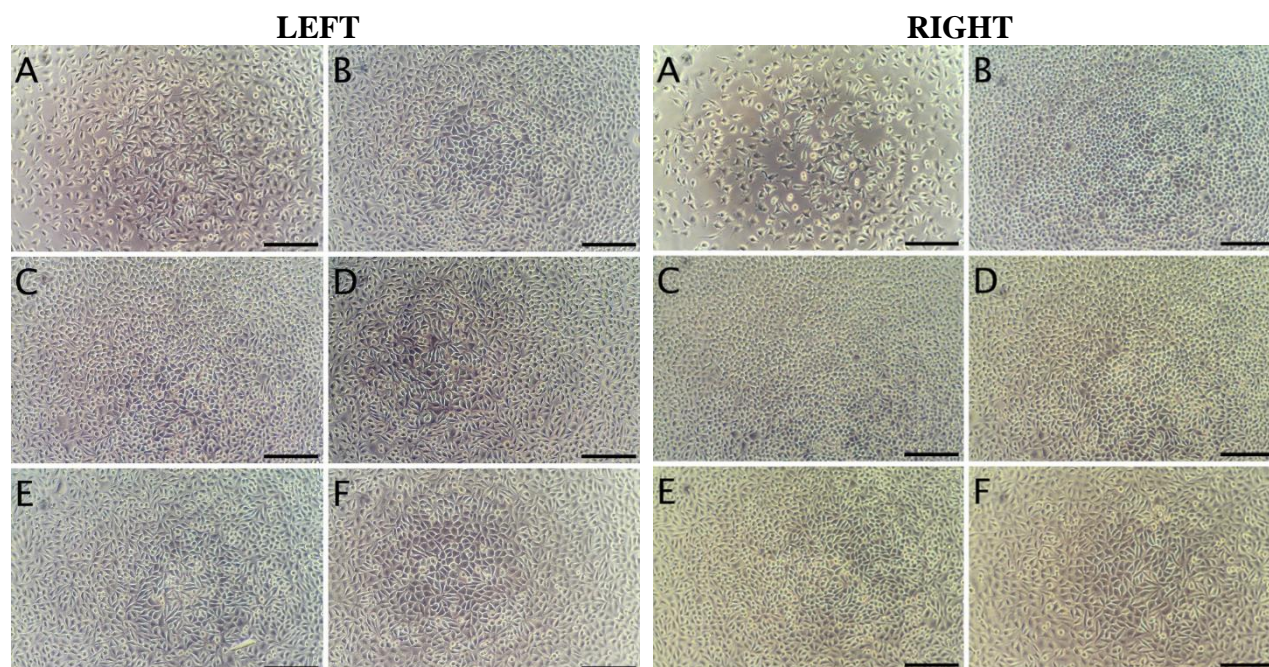
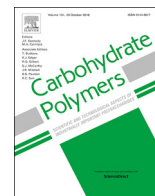


Fig. S4. LEFT - representative micrographs of L929 cells. A) 24 hours after seeding (10000 cells per well). B) After 24-hour incubation with vehicle. C, D, E, F) After 24-hour incubation with 0.0016%, 0.003%, 0.0125%, and 0.1% SPS, respectively. **RIGHT**- Representative micrographs of L929 cells. A) 24 hours after seeding (5000 cells per well). B) After 48-hour incubation with vehicle. C, D, E, F) After 48-hour incubation with 0.0016%, 0.003%, 0.0125%, and 0.1% SPS, respectively. Scale bar indicates 200 μ m.



Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing

Magdalena Szymańska^a, Jolanta Karakulska^a, Peter Sobolewski^b, Urszula Kowalska^c,
Bartłomiej Grygorcewicz^d, Dominique Böttcher^e, Uwe T. Bornscheuer^e, Radosław Drozd^{a,*}

^a Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311, Szczecin, Poland

^b Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311, Szczecin, Poland

^c Center of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Science and Fisheries, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 35 Klemensa Janickiego Str., 71-270, Szczecin, Poland

^d Department of Laboratory Medicine, Chair of Microbiology, Immunology and Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin, 72 Powstańców Wielkopolskich Str., 70-111, Szczecin, Poland

^e Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis, Institute of Biochemistry, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, D-17487, Greifswald, Germany

ARTICLE INFO

Keywords:

Bacterial cellulose
Biofilm
Pseudomonas aeruginosa
PelA_h
Wound dressings

ABSTRACT

Bacterial cellulose (BC) is recognized as a wound dressing material well-suited for chronic wounds; however, it has no intrinsic antimicrobial activity. Further, the formation of biofilms can limit the effectiveness of the pre-saturation of BC with antimicrobial agents. Here, to hinder biofilm formation by *P. aeruginosa*, we immobilized the hydrolytic domain of PelA (a glycohydrolase involved in the synthesis of biofilm polysaccharide Pel) on the surface of BC. The immobilization of 32.35 ± 1.05 mg PelA_h per g BC membrane resulted in an eight-fold higher *P. aeruginosa* cell detachment from BC membrane, indicating reduced biofilm matrix stability. Further, 1D and 2D infrared spectroscopy analysis indicated systematic reduction of polysaccharide biofilm elements, confirming the specificity of immobilized PelA_h. Importantly, BC-PelA_h was not cytotoxic towards L929 fibroblast cells. Thus, we conclude that PelA_h can be used in BC wound dressings for safe and specific protection against biofilm formation by *P. aeruginosa*.

1. Introduction

Natural polymers are becoming increasingly popular due to rising interest in environmentally friendly and sustainable materials. One of the most popular biopolymers is bacterial cellulose (BC), synthesized by the bacterium *Komagataeibacter xylinus*. Due to its unique properties, BC can be used in various applications e.g., paper production, textile industry, environmental protection, and in medical applications (Drozd et al., 2019; Fijałkowski, Żywicka, Drozd, Kordas, & Rakoczy, 2016). Importantly, the chemical structure of BC can be modified by the addition of specific functional groups and, thus, BC can be utilized as a carrier for the immobilization of enzymes (Drozd, Rakoczy, Wasak, Junka, & Fijałkowski, 2018, 2019; Wu, Wu, & Su, 2017) or microorganisms (Nguyen, Ton, & Le, 2009; Yao et al., 2011; Żywicka, Banach et al., 2019; Żywicka, Wenelska et al., 2019). Further, high stability, biocompatibility, high water holding capacity, and the possibility of sterilization make BC useful as a wound dressing material. However,

despite many advantages, native BC does not have any bactericidal properties, nor does it stimulate faster wound healing. For this reason, in order to increase its functionality, it is necessary to modify it, for example by introducing into its structure other polymers, such as chitosan, or antiseptics (e.g. octenidine) (Lin, Lien, Yeh, Yu, & Hsu, 2013; Moritz et al., 2014).

Bacterial colonization of wound dressing materials is the major problem in wound healing therapy. The degree of colonization is the result of a combination of pathogenicity and virulence of the microorganism and the condition of the patient's immune system. *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* are frequently responsible for wound infections and problems with wound healing. Importantly, both can live in the form of biofilms: communities of these microorganisms surrounded by an extracellular matrix (Bessa, Fazii, Di Giulio, & Cellini, 2015; DeLeon et al., 2014). The matrix consists of various extracellular polymer substances (EPS) that maintain the three-dimensional structure of the biofilm. Additionally, the matrix is

* Corresponding author.

E-mail address: rdrozd@zut.edu.pl (R. Drozd).

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>

Received 5 April 2020; Received in revised form 30 May 2020; Accepted 8 June 2020

Available online 12 June 2020

0144-8617/ © 2020 Elsevier Ltd. All rights reserved.

responsible for the adhesion of the biofilm to both biotic and abiotic surfaces. Finally - and perhaps most importantly - the matrix protects the bacteria against the effective action of bactericides and immune cells of the host organism (Flemming & Wingender, 2010).

A promising strategy to combat infections caused by microorganisms that form biofilms is to disrupt the integrity of the extracellular matrix structure and thus cause the bacteria to become more sensitive to antimicrobial agents. While various low-molecular substances can induce degradation of the extracellular matrix, enzymes that can hydrolyze matrix components could be an attractive method for biofilm eradication (Kaplan, 2009; Kaplan, 2010). To date, many commercially available enzymes have been tested as potential tools for biofilm eradication.

Due to the presence of proteins and polysaccharides as the main components of the biofilm matrix, amylolytic or proteolytic enzymes are most favorable (Fleming, Chahin, & Rumbaugh, 2017; Hogan et al., 2017; Molobela, Cloete, & Beukes, 2010; Shukla & Rao, 2013). For example, Dispersin B is a well-known enzyme used in biofilm eradication, produced by *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. It belongs to the glycoside hydrolase family of enzymes and cleaves poly- β -1,6-N-acetylglucosamine, the main component of the biofilm matrix of many bacterial species (Dobrynina et al., 2015; Fekete et al., 2011; Izano et al., 2008; Kaplan, Rangunath, Ramasubbu, & Fine, 2003; Kaplan, Rangunath, Velliyagounder, Fine, & Ramasubbu, 2004; Kaplan, 2009; Little et al., 2014, 2015; Ramasubbu, Thomas, Rangunath, & Kaplan, 2005). Dispersin B increases the susceptibility of *A. actinomycetemcomitans* to cationic and anionic detergents and *Actinobacillus pleuropneumoniae* to the effective action of ampicillin (Izano et al., 2007, 2008). Dispersin B could also be used in combination with bactericidal nanoparticles or in an immobilized form (Chen & Lee, 2018; Tan, Ma, Liu, Yu, & Han, 2015). A promising alternative approach to biofilm eradication is the use of enzymes that are elements of EPS biosynthesis pathways, including alginate lyase and the hydrolytic domains of PelA and PslG proteins (PelA_h and PslG_h). Alginate lyase reduces sputum viscosity in cystic fibrosis and enhances phagocytosis. Additionally, alginate lyase is an enzyme that increases the effectiveness of antibiotic therapy by disrupting the integrity of the three-dimensional structure of biofilms by hydrolyzing alginate. Thus, this enzyme could be used in combination with antibiotics such as gentamicin (Ghadam, Akhlaghi, & Ali, 2017; Hatch & Schiller, 1998; Patel et al., 2019).

Alternately, *Pseudomonas aeruginosa* produces at least three exopolysaccharides as components of its biofilm matrix: alginate, Pel, and Psl. Pel is a positively charged polysaccharide, consisting of partially acetylated N-acetylglucosamine and N-acetylgalactosamine, connected by 1–4 glycosidic bonds. Pel is responsible for initiation and stabilization of the interaction between cells in the biofilm structure, and in some cases, could also play a role in cell adhesion to a surface. Pel also protects bacteria against certain aminoglycoside antibiotics. At present, the exact structure and biosynthesis process of Pel exopolysaccharide has not been fully understood. However, it is known that molecules involved in the mechanisms of synthesis and secretion of Pel are coded by an operon containing 7 genes (*pelA* - G) (Colvin et al., 2011; Franklin, Nivens, Weadge, & Howell, 2011; Jennings et al., 2015; Marmont et al., 2017). The product of the first gene in the operon is the PelA molecule and bioinformatic analysis suggests that it is a 105 kD multidomain protein located in the periplasm (Franklin et al., 2011). Presumably, PelA consists of five domains and three of them have catalytic activity (Colvin et al., 2013). The first domain belongs to the glycoside hydrolase family and is particularly crucial in determining chain length and/or hydrolyzing mis-synthesized Pel molecules (Baker et al., 2016).

Thus far, the mechanisms of action of PelA_h and PslG_h on biofilm structure have only been partially elucidated by Baker et al. (2015) and Le Mauff et al. (2019). Likewise, their use in the biofilm eradication process has been investigated only to a minor extent. One of the first of such studies was carried out by Baker et al. (2016), demonstrating that

PelA_h and PslG_h, even at low concentrations, could prevent the formation and remove already formed *Pseudomonas spp.* biofilm. More recently, Pestrak et al. (2019) showed that in *P. aeruginosa*-infected wounds, PelA_h and PslG_h enhanced antibiotic therapy effectiveness and allowed for dosage reduction. In particular, the combination of PslG_h and tobramycin resulted in better penetration of the antibiotic into the biofilm and faster wound healing in an *in vivo* model. Further, PslG_h also affected the host immune system resulting in greater complement deposition and increased neutrophil phagocytosis and reactive oxygen species production.

However, while PelA_h is essential during the synthesis of Pel and for creating the biofilm structure, the possibility of using it as a therapeutic element of a wound dressing has not yet been tested. The present study explores the potential of PelA_h protein immobilization to protect BC-based wound dressings from bacterial biofilm formation. Thus, the main aim of our study was the development of a novel wound dressing based on BC produced by *K. xylinus*, with immobilized PelA_h providing protection against *P. aeruginosa* biofilm formation. Toward this aim, we conducted a detailed study of the properties of the developed dressing material, including the effect of immobilized PelA_h protein on *P. aeruginosa* biofilm.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

All reagents and bacteria cultivation media components used in this study were purchased from Merck KGaA (Poland) and Biomaxima SA (Poland). All chemicals were at least reagent grade and used without further purification. Oligonucleotides and plasmid pET28a were purchased from Merck KGaA. Polymerase PfuPlus were purchased from Roboklon GmbH (Germany). InnuPREP Plasmid Mini Kit 2.0 (Analytic Jena AG, Germany) and ROTI®Prep PCR purification kit, were ordered from Carl Roth GmbH, (Germany). *DpnI* restriction enzyme and *E. coli* BL-21 (DE3) competent cells were purchased from New England Biolabs (Germany). *E. coli* TOP-10 competent cells were purchased from Thermo Fisher Scientific (Germany). Roti®Garose His Beads were purchased from Carl Roth GmbH (Germany). The L929 cell line and all mammalian cell culture reagents were purchased from Merck KGaA (Poland).

2.2. Bacterial strains

Plasmid and strains used in this study were provided by the Department of Biotechnology and Enzyme Catalysis at the University of Greifswald. *K. xylinus* (ATCC®53524™) and *P. aeruginosa* PAO-1 were provided from the collection of the Department Microbiology and Biotechnology of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin.

2.3. Cloning, expression, and purification of PelA_h

To obtain the target gene sequence that encodes the protein construct fragment of *pelA* (GenBank ID: AAG06452.1) from the genomic DNA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 and vector pET28a were amplified separately by polymerase chain reaction. For amplification of *pelA* gene primers: forward (5'-CTGCATATGGGCGGGCCGTCACGCGTGGCG-3') and reverse (5'-TTTCTCGAGTCACGGTTGCACCTCGACGTC-3') were designed. For amplification of pET28a primers were designed as following: forward (5'-TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC-3') and reverse (5'-CATATGGCTGCCGCGCGG-3'). PCR reactions were carried by using PluPlus! DNA Polymerase (Roboclon). After confirmation of PCR products, 0.5 μ l of *DpnI* was added to 50 μ l of unpurified insert and vector separately and digested in 37 °C for 1 h according to the FastCloning method (Li et al., 2011). Digested insert and vector were purified, and gene was assembled with the pET28a (Merck

KGaA) expression vector using SLiCE mix (Zhang, Werling, & Edelmann, 2012) containing the following components: appropriate amount of vector and insert DNA (1:3 M ratio), 1 μ l 10x SLiCE buffer, 1 μ l SLiCE extract, 1 μ l ATP and MilliQ Water to a total volume of 10 μ l. The SLiCE reaction mixture was incubated at 37 °C for 1 h. 4 μ l of the SLiCE reaction solution was added to 50 μ l TOP10 chemically competent *E. coli* cells (Thermo Fisher Scientific). The obtained (generated) construct was confirmed by DNA sequencing using the Mix2Seq Kit (Eurofins). After confirmation, the construct was transformed to chemically competent *E. coli* BL-21 (DE3) (New England Biolabs) cells. *E. coli* BL-21 (DE3) cells harboring the expression vector were grown in 1 L of LB medium containing kanamycin (50 μ g/mL) at 37 °C. When OD₆₀₀ reached 0.5 – 0.6, protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 1 mM. After induction, the cells were incubated overnight at 20 °C with shaking at 200 rpm. After overnight incubation, cells were harvested by centrifugation at 4000xg for 25 min at 4 °C and pellets were washed two times with washing buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol and 5 mM imidazole) and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol). The cells were lysed using sonication pulses (2 \times 2 min) and then centrifuged for 30 min at 4 °C and 9000xg. Protein was purified by Nickel-based IMAC using Roti®Garose His Beads preequilibrated with washing buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10 % (v/v) glycerol). A column with loaded protein was washed with washing buffer and expressed protein was eluted with elution buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 % (v/v) glycerol). The eluted fractions were concentrated to around 1.5 ml volume using a Vivaspin® 6 ultra-centrifugation filter device (Sartorius AG) with a 10 kDa cutoff. To check the purity of the obtained protein, SDS-PAGE analysis was performed (Fig. S1).

2.4. Preparation of bacterial cellulose (BC) membranes

The culture of *K. xylinus* was carried out in 24-well plates, in Hestrin–Shramm (HS) medium containing glucose 20 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 2 g/L, citric acid 1.15 g/L, Na₂HPO₄ 2.7 g/L, and MgSO₄·7H₂O 0.06 g/L with 1% ethanol. The prepared medium was inoculated with 1% of a 1-week-old starter culture. The cultivation was carried out at 28 °C for 4 days. After this time, the formed BC membranes were collected and rinsed in dH₂O for 24 h. The next day, BC membranes were digested with 0.1 M NaOH at 80 °C (3x) to remove bacterial cells and residual medium components. Following digestion, BC membranes were rinsed again in dH₂O until the pH was stabilized and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min. The prepared BC membranes were stored at 4 °C prior to further analysis.

2.5. Porosity of BC membranes

The porosity of the BC membranes was determined using the gravimetric method. Wet BC membranes were weighed using an analytical balance, dried at room temperature for 24 h, and then weighed again. Porosity was calculated using Eq. 1:

$$P = \frac{\frac{W_w - W_d}{\rho_{H_2O}}}{\left(\frac{W_w - W_d}{\rho_{H_2O}}\right) + \frac{W_w}{\rho_{PES}}} \times 100 \quad (1)$$

where: W_w is the weight of wet membrane, W_d is the weight of dry membrane, ρ_{H_2O} is the density of water at 20 °C (0.9982 g/cm³), ρ_{PES} is the density of BC, 1.25 g/cm³ (Lee, Blaker, & Bismarck, 2009; Mozia, Grylewicz, Zgrzebnicki, Darowna, & Czyżewski, 2019).

2.6. PelA_h immobilization on BC membranes

A range of concentrations of PelA_h enzyme, from 0.005 to 0.75 mg/

mL, were prepared in SBF (Simulated Body Fluid) buffer (pH 7.4), corresponding to 5–85 mg/g of dry mass of carrier. Wet BC membranes with approximately equal mass were incubated in the appropriate enzyme solution in a total volume of 5 ml with mixing at 25 °C for 5 h. Every hour, a 200- μ l sample of the mixture was taken and protein concentration was measured using a microplate reader with Greiner UV-star 96 well plates at 280 nm. The percentage adsorption (%) and the amount of adsorbed protein were calculated according to Eq. 2 and 3, respectively:

$$\text{Yield [\%]} = \frac{C_0 - C_e}{C_0} \times 100 \quad (2)$$

$$Q \left[\frac{\text{mg}}{\text{g}} \right] = \frac{C_0 - C_e}{W} \times V \quad (3)$$

where: C_0 is the protein concentration before adsorption, C_e is the protein concentration after adsorption, W is the dry mass of BC membranes in g, and V is the volume of the solution in cm³ (Oshima, Taguchi, Ohe, & Baba, 2011).

2.7. The effect of PelA_h immobilization on *P. aeruginosa* biofilm formation on BC

To check the effect of enzyme immobilization on the ability of *P. aeruginosa* to form a biofilm on BC membranes, the reference strain *P. aeruginosa* PAO-1 was grown in BHI at 37 °C overnight. Following the cultivation, the culture was normalized to an OD₆₀₀ of 0.2, diluted 1:100, and spread on BC membranes with immobilized PelA_h. Finally, *P. aeruginosa* PAO-1 cells were grown at 37 °C overnight.

2.8. *Pseudomonas aeruginosa* cell amount on BC membranes

The amount of *P. aeruginosa* PAO-1 released from BC membranes was assessed according to the literature (Tran et al., 2009). BC membranes with formed *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 biofilm were rinsed gently twice with SBF buffer (pH 7.4) to remove nonadherent bacterial cells. Then, 5 mL of SBF buffer was added to each BC membrane and the samples were vortexed three times for 1 min. The number of bacterial cells released from BC membranes was determined using a BD Accuri C6 Plus flow cytometer.

2.9. Protein concentration determination

Protein concentrations were assayed using the Bradford method, with bovine serum albumin as a standard (Bradford, 1976), or by measurement of absorbance at 280 nm using a molar extinction coefficient equal to 44,920 M⁻¹ cm⁻¹, as calculated according to the amino acids sequence of PelA_h (UniProt accession code Q9HZE4).

2.10. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectral studies of BC membranes

Prior to attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy, samples were dried at room temperature for 24 h. The analysis was carried out using an FTIR spectrophotometer ALPHA II (Bruker Co., Germany) with diamond ATR adapter. The spectra were collected in the range of 4000–400 cm⁻¹ with a resolution of 4 cm⁻¹ (32 scans). The obtained ATR-FTIR spectra were analyzed using SpectraGryph 1.2 software. The lateral order index (LOI) of dried samples BC was calculated from the ratio of band intensities at 1427 cm⁻¹ and 895 cm⁻¹. The total crystallinity index (TCI) was calculated from the ratio of bands intensities at 1370 cm⁻¹ and 2900 cm⁻¹. The allomorph Ia was calculated according to Eq. 4:

$$I_\alpha = 2.55 \left(\frac{A_{750}}{(A_{710} + A_{750})} \right) - 0.32 \quad (4)$$

where: A_{750} is an intensity at 750 cm^{-1} for I_{α} , A_{710} is an intensity at 710 cm^{-1} for I_{β} (Yamamoto, Horii, & Hirai, 1996).

2.11. Scanning electron microscopy (SEM)

BC morphology was examined using VEGA3 (TESCAN) scanning electron microscope. For this purpose, the BC membrane samples with formed biofilm were fixed with 2 % glutaraldehyde (v/v) in SBF (pH 7.4) at room temperature for 16 h. Following incubation with glutaraldehyde, samples were rinsed three times in SBF buffer (pH 7.4) for 15 min and dehydrated in ethanol-water series with increasing ethanol concentration (20 %, 40 %, 60 %, 80 %, 95 % v/v) and finally two times in absolute ethanol for 15 min. The dehydrated samples were then dried at room temperature (Tran et al., 2009). Prior to SEM imaging, samples were sputtered with Au/Pd (60:40) using Q150R ES device (Quorum Technologies, Laughton, United Kingdom).

2.12. Cell viability studies

Potential for cytotoxicity or growth inhibitory effect of PelA_h protein was screened using L929 murine fibroblast cell culture, based on ISO 10993-5 and NCI-60 methodology (Holbeck, Collins, & Doroshow, 2010). Briefly, a sub-confluent T25 flask of L929 cells was trypsinized and two 96-well plates were plated: one seeded with 10,000 cells per well and the second seeded with 5000 cells per well. Cells were maintained in complete growth media: Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin. Following 24 h of culture, the media was aspirated and replaced with 100 μL of complete growth media containing either 1 mg/mL PelA_h protein and serial, 3-fold dilutions, or elution buffer as vehicle control. Cell viability was assessed using an inverted light microscope and resazurin viability assay (Riss et al., 2004) after 24 h of culture (plate seeded with 10,000 cells per well) and 48 h (plate seeded with 5000 cells per well).

2.13. Effect of immobilized PelA_h on cytotoxicity of BC membranes

Potential cytotoxicity of BC membranes with immobilized PelA_h was assessed by testing liquid extracts and performing direct-contact tests, based on ISO 10993-5. Briefly, L929 cells were plated in two plates: one 96-well plate seeded with 10,000 cells per well and one 24-well plate, seeded with 50,000 cells per well. Both plates were then incubated for 24 h. In parallel, BC membranes ($\sim 2\text{ cm}^2$ and $\sim 3\text{--}4\text{ mm}$ thick) with immobilized PelA_h and control, untreated BC membranes were placed individually in wells of 12-well plate, covered with 2 mL of complete growth media, and incubated for 24 h in a CO_2 incubator at 37°C . Next, the 96-well plate was aspirated, and 100 μL of media incubated with each BC membrane was added in triplicate. As a sham control, media incubated in an empty well was used. In parallel, the 24-well plate was aspirated, and 500 μL of complete media was added to each well, followed by careful placement of each BC membrane directly on top of the cell monolayer. After a further 24 h of culture, cell viability was assessed using an inverted light microscope and resazurin viability assay (Riss et al., 2004).

2.14. Statistical analysis

For statistical analysis of the normality of the results, the Shapiro-Wilk test was performed. Statistical analysis of the results was determined by analysis of variance ANOVA, and the statistical significance was performed by Tukey's multiple comparison test. The level of statistical significance was $p < 0.05$. All statistical tests were conducted with Statistica 13 software.

3. Results and discussion

3.1. PelA_h immobilization on BC membranes - carrier properties

One of the features of *K. xylinus* is the production of high-quality cellulose, in the form of microfibrils forming a characteristic 3D structure in stationary culture. Each fibril is a linear chain composed of glucose monomers connected by β -1,4-glycosidic bonds. Further, the structure of BC consists of numerous intermolecular and intramolecular hydrogen bonds that stabilize a microfibril chain, which is stiff, linear and insoluble in most solvents (Czaja, Krystynowicz, Bielecki, & Brown, 2006; Wang, Zhu, & Du, 2011). Here, BC cultivation was carried out for 4 days and the molecular characteristic of obtained BC were typical of young cellulose produced by *K. xylinus* (Drozd, Rakoczy, Konopacki, Frąckowiak, & Fijałkowski, 2017). After purification, the wet mass of the BC membranes was $0.96 \pm 0.02\text{ g}$ and dry mass was $9.92 \pm 0.28\text{ mg}$. The obtained values are typical for non-modified BC membranes, where the dry mass of pellicles is approx. 1% of that of hydrated BC (Portela, Leal, Almeida, & Sobral, 2019). From the point of view of potential application as a wound dressing material, the porosity and crystallinity of BC are the most important parameters, because they determine the mechanical properties, water vapor transmission, and/or water holding capacity (Li et al., 2015). The porosity of the BC membranes obtained here was $55.34 \pm 0.02\%$. Meanwhile, the crystallinity index values, LOI and TCI, were 2.3 ± 0.18 and 1.6 ± 0.04 , respectively, whereas the content of the cellulose $\text{I}\alpha$ allomorph was 66.4 ± 0.64 . These properties of BC membranes are critical for its potential applications and affect the process of adsorbing or releasing of active agents, thereby influencing the enzyme immobilization process (Bayne, Ulijn, & Halling, 2013; Shah, Ul-Islam, Khattak, & Park, 2013).

3.2. PelA_h immobilization on BC membranes - process efficiency

PelA_h was immobilized on the BC membranes by physical adsorption, as a result of the interactions between polar groups of amino acids on the protein surface and the surface of the carrier by weak physical forces. Analysis of the charge distribution on the surface of PelA_h at pH 7.4 showed that the enzyme molecular surface is mainly negatively charged (-7.77 [e]), in agreement with the results of Le Mauff et al. (2019) (Fig. S2), but putatively also contains positively charged patches (Fig. S3). These regions can be a responsible for facilitating the anchoring of the enzyme via electrostatic integrations to the negatively charged surface of BC membranes (Drozd et al., 2018). Importantly, according to Le Mauff et al. (2019), the active site and surrounding region of the protein surface is negatively charged, which likely enables the correct orientation of immobilized PelA_h , ensuring access to Pel exopolysaccharide secreted by bacterial cells during biofilm formation. The immobilization process was carried out in SBF buffer at pH 7.4 at 25°C for 5 h. The initial amount of PelA_h in the adsorption medium was varied from 5- mg/g to 85 mg/g per dry mass of the BC carrier. The results of adsorption capacity and efficiency of immobilization are presented in Fig. 1. The adsorbed quantity increased with increasing initial protein amount and reached a maximum value of $38.5 \pm 5.01\text{ mg per g}$ of the dry mass of BC membrane for the initial amount of PelA_h 85 mg/g. The yield of immobilization gradually increased up to a maximal value 23 % for samples treated with an initial protein amount of 55 mg/g, with final quantity of immobilized PelA_h $32.35 \pm 1.05\text{ mg/g}$. While the yields are somewhat modest, at this stage we did not focus on process optimization, but rather testing the hypothesis that immobilized PelA_h could disrupt biofilm formation. The effectiveness of the immobilization process depends on many factors, including the pH, temperature, and ionic strength of the adsorption medium (Jesionowski, Zdarta, & Krajewska, 2014; Zdarta, Meyer, Jesionowski, & Pinelo, 2018), thus optimization of conditions will require dedicated studies. Importantly, a greater amount of immobilized protein may not actually be beneficial. At the start of the adsorption

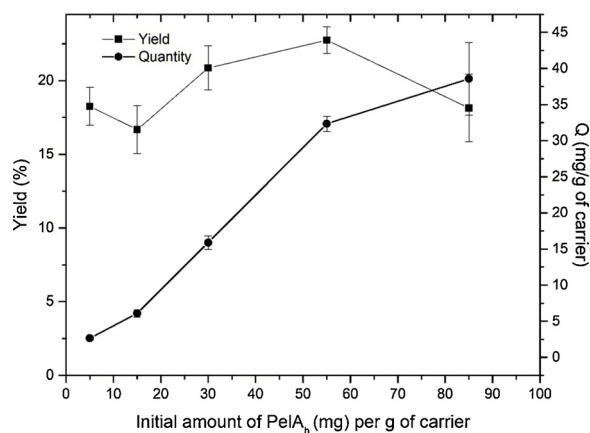


Fig. 1. Effect of initial amount of PelA_h (5.0–85 mg/g of dry mass of BC membranes) on the adsorption quantity and yield of immobilization. Error bars represent standard deviation.

process, the protein interacts mostly by hydrophobic and electrostatic interaction with the carrier and can cover the available surface. In the next stage, however, it is possible that a second layer forms, with the protein adsorbing not on the carrier surface but on the present protein adlayer (Hirsh et al., 2010; Roah, Farrar, & Perry, 2005). Thus, as a consequence of this process, the apparent biocatalyst activity can be reduced, which is why we tested different initial loading amounts (Hoarau, Badieyan, & Marsh, 2017).

3.3. Biofilm formation analysis by ATR-FTIR spectroscopy

In order to assess the effect of immobilized PelA_h protein on biofilm formation, we cultured *P. aeruginosa* PAO-1 on BC membranes impregnated with different amounts of PelA_h protein (5.0–85 mg/g of BC membranes), as well as control samples without addition of enzyme. Representative ATR-FTIR spectra of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilms on BC membranes are presented in Fig. 2. The spectral region between 1800 cm⁻¹ and 800 cm⁻¹ was analyzed, because it represents fingerprints of biofilms typical for *Pseudomonas* sp. (Suci, Vraný, & Mittelman, 1998). The bands within this spectral region can be assigned to specific functional groups of proteins, nucleic acids, and carbohydrates. Because these are the main components of the biofilm matrix, changes in the intensity of these bands reflect the impact of immobilized PelA_h (Pink, Smith-Palmer, Chisholm, Beveridge, & Pink, 2005). The collected ATR-FTIR spectra were characterized by set of bands at the following wavenumbers: 1640 cm⁻¹, 1530 cm⁻¹, 1450 cm⁻¹, 1400 cm⁻¹, 1230 cm⁻¹, 1080 cm⁻¹, and 1040 cm⁻¹ where, depending on the quantity of immobilized PelA_h, the main changes in intensities were observed (Fig. 2a–d). The spectral bands observed at 1640 cm⁻¹ (amide I) and 1540 cm⁻¹ (amide II) were assigned to C=O stretching, C–N, –NH, and –NH₂ bending of protein and peptide amides (Table 1). The band at 1530 cm⁻¹ (amide II) is defined as a biomarker of biomass accumulation (Quilès, Humbert, & Delille, 2010; Wang, Ding, Wang, Xu, & Zhou, 2013). The visible band at 1450 cm⁻¹ corresponds to C–H deformation of CH₂ bending bonds, while the band at 1395 cm⁻¹ is associated with symmetric stretching C–O of carboxylate group (COO⁻). The band observed at 1230 cm⁻¹ relates to P=O stretching of > PO₂⁻ of phosphodiester of nucleic acids (Maquelin et al., 2002; Ojeda & Dittrich, 2012). The region between 1200 cm⁻¹ and 900 cm⁻¹ corresponds to C–O–H, C–C, P–O–P and P=O (stretching) and C–O–C, C–O (ring vibration), thus defining this region as the „carbohydrate region”. In this region, two dominant bands were observed at 1080 cm⁻¹ and 1040 cm⁻¹. The band at 1080 cm⁻¹ was assigned to P=O (symmetric stretching) of > PO₂⁻ corresponding to polyphosphate products, nucleic acids, phosphodiester, and phosphorylated proteins. The last significant band near 1040 cm⁻¹ was assigned to C–O or C–C

stretching and C–O–H bending vibration, typical for carbohydrate components of biofilms (Ojeda & Dittrich, 2012; Sekkal et al., 1993).

3.3.1. 2D–COS analysis

In order to examine the effect of the presence of immobilized PelA_h protein on the composition of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm formed on BC membranes, two-dimensional correlation spectroscopy was performed. The synchronous (a) and asynchronous (b) 2D correlation map of IR spectra of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm on BC membranes after immobilization with different initial amounts of PelA_h protein is presented in Fig. 3. The synchronous spectra (Fig. 3a) show a set of auto peaks on the diagonal position, in the region between 1200 cm⁻¹ and 900 cm⁻¹, and two distinct auto peaks at 1530 cm⁻¹ and 1395 cm⁻¹. The intensity of the auto peaks indicated that the most significant differences occurred within regions characteristic for carbohydrates and proteins, whereas only minor changes in the intensity of carboxylic groups were observed. Changes in auto peak intensity were accompanied by the presence of positive and negative cross-peaks. Three positive cross-peaks between ~1040 cm⁻¹ x ~1530 cm⁻¹, ~1400 cm⁻¹ x ~1530 cm⁻¹ and ~1040 cm⁻¹ x ~1395 cm⁻¹ were found. Compiling these signals from 2D analysis with those from 1D spectra (Fig. 2b–d), indicates that with increasing amount of immobilized PelA_h on BC, the band intensities decreased. However, a significant effect was observed only for BC impregnated with at least 15 mg/g of enzyme, with no significant differences between the last two tested enzyme quantities. Our results are consistent with biofilm disruption, because during undisturbed development of *Pseudomonas* sp. biofilm an increase in amide II, phospholipids, carboxyl group, and carbohydrate is expected, indicating an accumulation of biofilm components (Quilès & Humbert, 2014). Similarly, Delille, Quilès, and Humbert (2007) observed a gradual decrease in the intensity of these bands for *Pseudomonas fluorescens* biofilm formed with low carbon medium as a stressor.

In addition to the positive cross-peaks, the synchronous spectra contain several negative cross-peaks between ~1140 cm⁻¹ x ~1530 cm⁻¹, ~1450 x ~1530 cm⁻¹, ~1230 cm⁻¹ x 1530 cm⁻¹, ~1038 cm⁻¹ x ~1230 cm⁻¹, ~980 cm⁻¹ x ~1395 cm⁻¹ and ~980 x ~1530 cm⁻¹. The negative cross-peaks indicate that changes in the amount of the specific components of the biofilm matrix are occurring in opposite directions (Noda, Dowrey, Marcott, Story, & Ozaki, 2000). Specifically, here the discovered negative cross-peaks show that immobilized PelA_h yielded a reduction of protein and peptide amides and carbohydrate components, but also an increase in the amount of lipids and nucleic acids (Table 1).

3.3.2. Analysis of biofilm component changes via ratio of specific bands from ATR-FTIR spectra

To analyze the effect of the amount of immobilized PelA_h on the changes in the intensities of individual bands reflecting changes in biofilm structure, we calculated the average integrated areas of selected bands analyzed in 1D and 2D–COS spectra (Fig. 4). The ratio between bands at 1530 cm⁻¹ and 1230 cm⁻¹ (amide II/amide III) was assigned to relative changes in protein and nucleic acid components of biofilm (Fig. 4a). The values of this band ratio indicate that with increasing amount of PelA_h immobilized on BC membranes, the amount of protein of biofilm decreased while the amount of nucleic acids increased. The magnitude of change in this biofilm component proportion was significant for the initial amount of PelA_h 15 mg/g but beyond this further change in this parameter was not significant. Meanwhile, Fig. 4b shows the ratio between 1530 cm⁻¹ and 1450 cm⁻¹ corresponding to protein and lipid components of analyzed biofilm, respectively. Over the range of initial PelA_h concentrations from 15 to 85 mg/g dry mass of BC, this ratio was statistically different from that of samples with the lowest amount of PelA_h and control samples, indicating increasing presence of lipids in the biofilm. Meanwhile, the ratio of the band at 1530 cm⁻¹ to that at 1395 cm⁻¹ decreased with increasing PelA_h immobilization, indicating decreased carboxyl group content, but this effect was

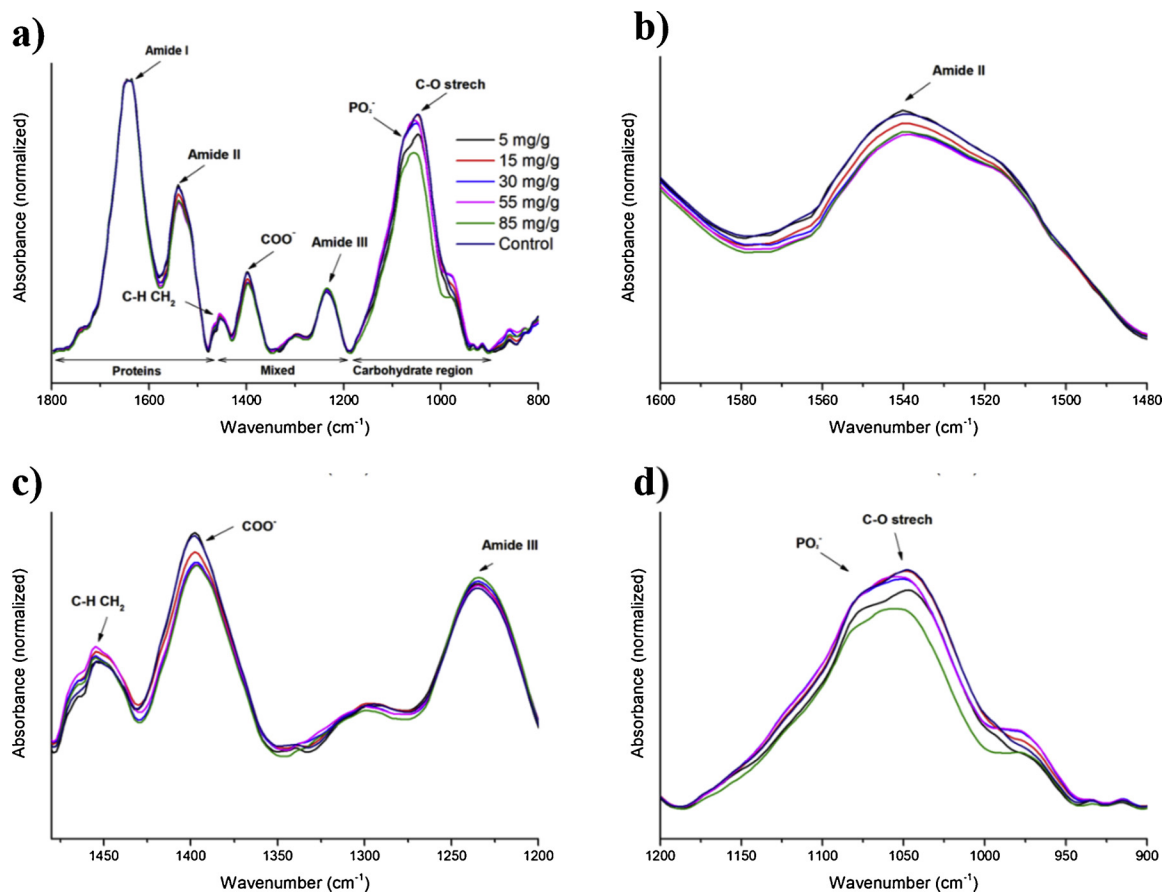


Fig. 2. The ATR – FTIR spectra of biofilms formed by *P. aeruginosa* PAO-1 on BC membranes impregnated with PelA_h. Spectra were normalized at 1640 cm⁻¹ (amide I).

statistically significant only for the highest loading of PelA_h (Fig. 4c). Finally, the changes in the ratio of the band at 1230 cm⁻¹ to that at 1040 cm⁻¹ indicated an increasing amount of phospholipids, LPS, and nucleic acids with decreasing polysaccharide content (Fig. 4d, e)

The specific degradation of biofilm by PelA_h results in the decomposition of Pel polymer that has *N*-acetylgalactosamine and *N*-acetylglucosamine as principal elements, which can also contribute to the intensity of ATR-FTIR bands specific for protein amide II (1540 cm⁻¹, C–N) (Jennings et al., 2015; Kumirska et al., 2010). The observed decreased intensity of this band can thus be interpreted as indicating a reduction in the amount of Pel present in the biofilm matrix structure. The *P. aeruginosa* biofilm can also contain alginate that is composed from galacturonic acid rich in COO⁻ (1395 cm⁻¹) and reduction in band intensity can also indicate change in amount of this element of biofilm matrix (Kovács, Nyerges, & Izvekov, 2008; Nivens, Ohman, Williams, & Franklin, 2001; Wozniak et al., 2003).

Table 1

Assignments bands for analyzed ATR-FTIR spectra *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm formed on BC membranes.

Wavenumber [cm ⁻¹]	Assignment	Corresponding components
1640	N–H coupled with C–N (amide I)	Proteins
1530	N–H coupled with C–N (amide II)	Proteins
1450	C–H CH ₂	Lipids
1395	C=O str (sym) of COO ⁻	Amino acids, fatty acid chains
1230	P=O str (asym) of > PO ₂ , C–O–C stretching, amide III vibrations	Phosphodiester, Phospholipids, LPS, nucleic acids, ribose
1080	P=O str (sym) of > PO ₂	Phosphodiester, Phospholipids, LPS, nucleic acids
1040	O–H coupled with C–O	Polysaccharides

(Assignments according to Banyay, Sarkar, & Gräslund, 2003; Filip & Hermann, 2001; Maquelin et al., 2002; Quilès et al., 2010; Wang et al., 2013).

3.4. Influence of PelA_h immobilization on *P. aeruginosa* cell release from BC

Given the important role of biofilm matrix in protecting bacterial cells and facilitating their adhesion, we assessed the effect of the immobilized PelA_h protein on the detachment of *P. aeruginosa* PAO-1 cells from biofilm, by analyzing the quantity of cells released from BC membranes. Fig. 5 shows the amount of *P. aeruginosa* PAO-1 cells recovered from the BC membranes impregnated with different initial amount of PelA_h (5–85 mg/g of carrier) and covered with biofilm. The number of cells was determined by measuring CFU of adherent cells released to SBF buffer using flow cytometry. The largest amount of *P. aeruginosa* PAO-1 cells was released from BC membranes impregnated with 85 and 55 mg of PelA_h per g of carrier - the CFU was 3 × 10⁵ and 4 × 10⁵, respectively. No statistically significant changes were observed between 5, 15 and 30 mg/g PelA_h loadings, but number of liberated cells was significantly higher than that for control samples without PelA_h enzyme. These results indicate that the presence of immobilized PelA_h enzyme had an influence on biofilm formation: the

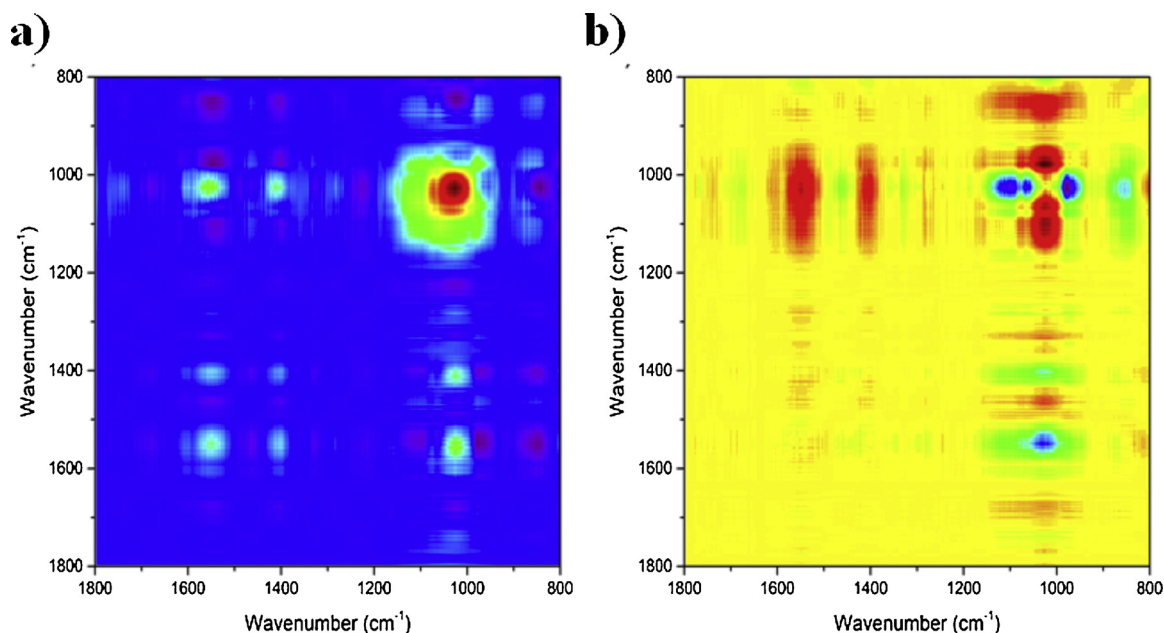


Fig. 3. Two-dimensional correlation spectroscopy (2D-COS): (a) synchronous and (b) asynchronous spectra of *P. aeruginosa* biofilm grown on BC membranes over the spectral range of 1800 cm^{-1} – 800 cm^{-1} .

disrupted integrity of the biofilm matrix, resulted in easier release of adherent cells from the BC surface. This observation is in good agreement with the existing literature, including the results of Tian, Xu, Hutchins, Yang, and Li (2014) which suggested that Pel plays a critical role in the initial bacterial cell attachment to a colonized surface. Moreover, in an earlier study Ghafoor, Hay, and Rehm (2011) showed that *P. aeruginosa* mutants deficient in Pel production lost their ability to form stable biofilms. Likewise, glass surfaces modified with the glycohydrolase PslG_h with specificity towards Psl were found to have inhibited attachment of bacterial cells (Asker, Awad, Baker, Howell, & Hatton, 2018). At the same time, previous studies also indicate that the glycoside hydrolase PelA_h does not influence directly bacterial cell growth (Baker et al., 2016). However, Pestrak et al. (2019) reported that the addition of PelA_h can enhance the action of several antibiotics. Overall, the immobilization of PelA_h on the BC surface may allow for more effective inhibition of bacterial growth using smaller doses of antibiotics, even without reducing the number of bacterial cells, by potentially destabilizing the biofilm (Ghafoor et al., 2011; Pestrak et al., 2019; Tian et al., 2014).

3.5. SEM analysis of biofilm morphology

Additionally, scanning electron microscopy was used to assess the morphology of the *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm cultivated on BC membranes with the PelA_h enzyme (85 mg/g mg per g of carrier) as compared to controls without immobilized PelA_h (Fig. 6a, b). The SEM images showed that after overnight incubation, the surface of control BC membranes was evenly covered with bacterial cells and appeared smooth, indicating bacterial cells surrounded by elements of biofilm matrix. In contrast, on BC membranes impregnated with PelA_h the individual *P. aeruginosa* PAO-1 cells are much more distinct and visible. Snarr et al. (2017) observed the similar effect of PelA_h treatment on biofilm formed by *Aspergillus fumigatus*, with a visible reduction of polysaccharide elements of the biofilm matrix associated with cell wall of hyphae. Likewise, Soler-Arango, Figoli, Muraca, Bosch, and Brelles-Mariño (2019) observed that using gas discharge plasma resulted in the significant reduction *P. aeruginosa* biofilm matrix and bacterial cells were more distinct on SEM images.

3.6. Cytotoxicity of native and immobilized PelA_h

From the standpoint of possible application in wound dressings, it was important to confirm that the obtained BC membranes were not cytotoxic (Morin & Tomaselli, 2007; Wittaya-areekul & Prahsarn, 2006). To check for potential cytotoxicity of the PelA_h protein itself, L929 murine fibroblasts were exposed to a range of enzyme concentrations (~ 0.004 – 1 mg/mL) for either 24 or 48 h. After 24 h, no dose response was observed (Fig. 7e). Likewise, microscopy did not reveal any changes in morphology that could indicate cytotoxicity (Fig. 7b). After 48 h, a $\sim 21\%$ reduction in viability was noted for the highest amount of enzyme, 1 mg/mL (Fig. 7f); however, microscopy did not indicate cytotoxicity (Fig. 7d). Based on the observed normal morphology at 48 h and the lack of pronounced cytotoxicity after 24 h, the reduction in viability was ascribed to a modest growth inhibitory effect (10–15 %) of the highest enzyme dose on L929 cells, which typically have a doubling time of $\sim 20\text{ h}$, rather than cytotoxicity.

Next, potential cytotoxicity of BC membranes with immobilized PelA_h was assessed, based on ISO10993-5. We tested the effect of both liquid extracts prepared in complete growth media, as well as BC membranes placed in direct contact with L929 cells. After 24-h incubation, there was no cytotoxic effect of extracts of BC membranes with immobilized PelA_h or control membranes with no enzyme (Fig. 8e). More importantly, there was also no decrease in the viability of L929 cells incubated in direct contact with either type of BC membranes (Fig. 8f). Further, microscopy revealed robust cell proliferation beneath of the tested membranes and removal of the BC membranes did not appear to cause damage to the monolayer (Fig. 8a–d), indicating low adhesion.

Overall, our results are in good agreement with previous data obtained for IMR-90 human lung fibroblast cells treated with by PelA_h protein (Baker et al., 2016). In another study, Snarr et al., 2017 also confirmed a lack of toxicity of PelA_h using IMR-90 human lung fibroblast cells and lung cancer (line A549) cells. In addition, PelA_h protein has also been shown to be nontoxic to human red blood cells and did not have any impact on neutrophil function (Pesttrak et al., 2019). Collectively all these results indicate that neither native nor immobilized PelA_h affects the morphology nor viability of mammalian cells. Thus, these promising *in vitro* results motivate further studies of these materials as wound dressings in animal models, in order to assess

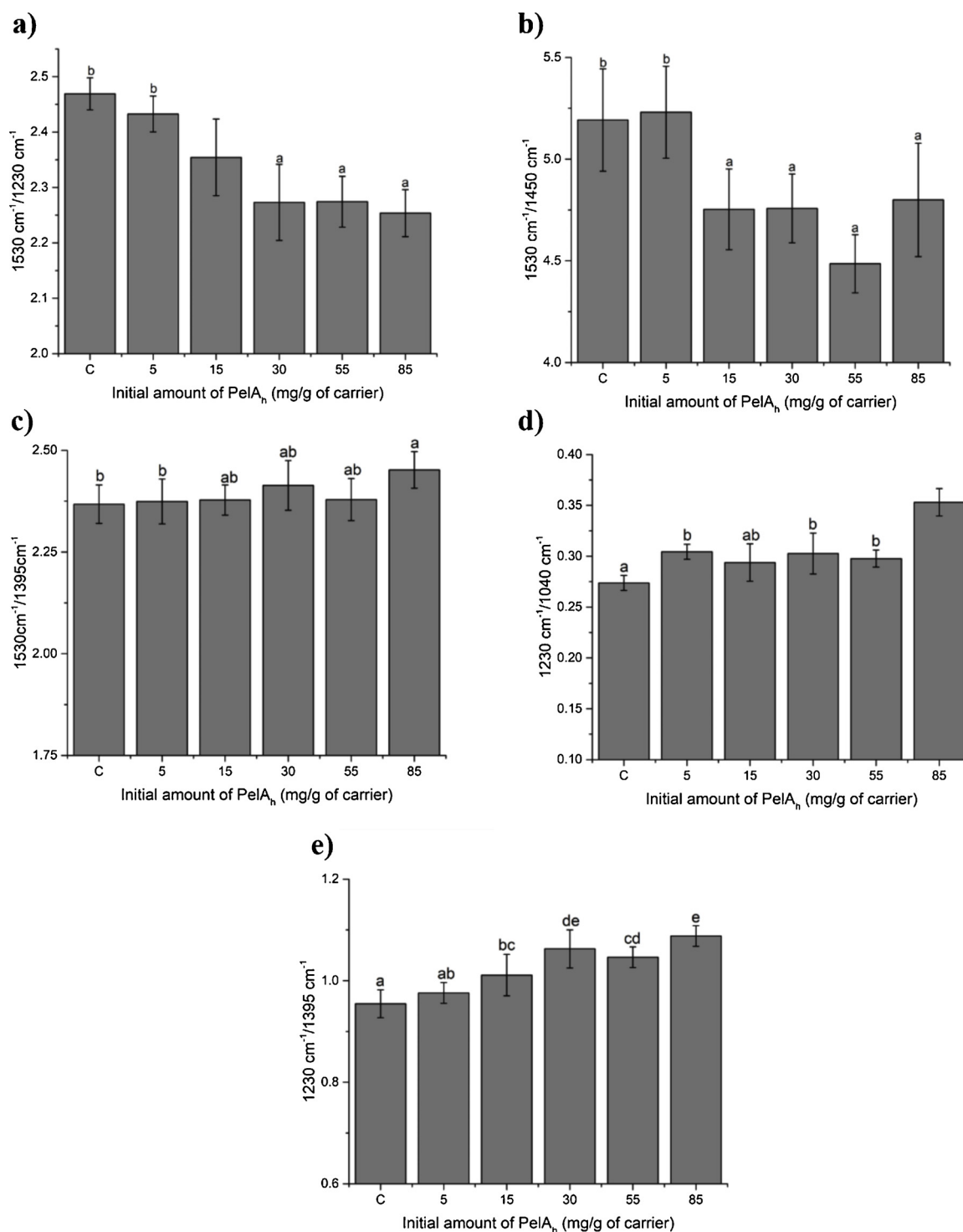


Fig. 4. The relative changes in the band ratio 1530 cm⁻¹:1230 cm⁻¹ (a), 1530 cm⁻¹:1450 cm⁻¹ (b), 1530 cm⁻¹:1395 cm⁻¹ (c), 1230 cm⁻¹:1040 cm⁻¹ (d) and 1230 cm⁻¹:1395 cm⁻¹ (e). Means that have no superscript in common are significantly different from each other ($p < 0.05$). Error bars represent standard deviation.

risk of sensitization and irritation.

4. Conclusions

Bacterial biofilms are responsible for almost 80 % of microbial infections in humans. Bacterial cells within biofilm reveal from 10 to 1000 times the highest resistance to antibiotics than planktonic form of these bacteria (Khatoun, McTiernan, Suuronen, Mah, & Alarcon, 2018). One of the main challenges in the treatment of chronic wounds is the

protection against biofilm-mediated infection. In case of BC-based wound dressings, due to the structure of BC it is possible to carry out several modifications aimed at obtaining bactericidal properties, by introduction of specific functional group or by the addition of another biopolymer (Figueiredo et al., 2015; Lin et al., 2013). Alternately, one can rely on adsorbing an active substance to be delivered to the wound, such as quaternary ammonium salts or octenidine (Moritz et al., 2014; Żywicka, Fijałkowski, Junka, Grzesiak, & El Fray, 2018). However, antibiotics and antiseptic agents are not always able to fully inhibit

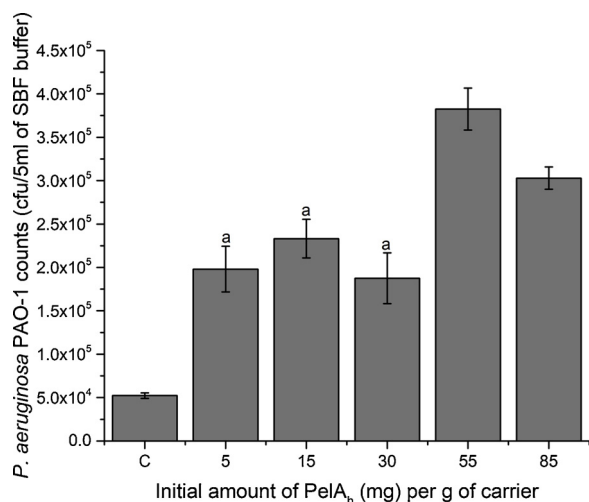


Fig. 5. Amount of *P. aeruginosa* PAO-1 cells released from BC membranes. Means that have no superscript in common are significantly different from each other ($p > 0.05$). Error bars represent standard deviation.

microbial growth, particularly if a biofilm is formed. Further, the phenomenon of drug resistance forces us to look for new safe and effective methods for the treatment microbial infections, particularly those caused by bacteria that form biofilms. Here we explored a novel approach towards addressing this problem in chronic wound infection. We developed an effective method of BC dressing protection by immobilization of the hydrolytic domain of the PelA_h protein on BC membranes. We showed that immobilized PelA_h resulted in destabilization of biofilm formed by *Pseudomonas aeruginosa*. Importantly, no cytotoxic effect was detected indicating the safe application of PelA_h in novel BC-based dressing materials. Collectively, our results suggest the potential of the obtained materials in the development of „intelligent” wound dressings that can mitigate the risk of *P. aeruginosa* infection during chronic wound therapy. Further, the developed method can be potentially improved by combining a set of specific glycohydrolases, including those specific for other elements of biofilm matrix. This could yield a synergistic effect, allowing for even more effective biofilm eradication and as well as decreasing the required dosage of any additional antimicrobial chemotherapeutic.

CRediT authorship contribution statement

Magdalena Szymańska: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Writing - original draft, Investigation, Visualization. **Jolanta Karakulska:** Writing - review & editing. **Peter Sobolewski:** Investigation, Writing - review & editing. **Urszula Kowalska:** Investigation. **Bartłomiej Grygorcewicz:** Investigation, Writing - review & editing. **Dominique Böttcher:** Resources, Writing - review & editing. **Uwe T. Bornscheuer:** Resources, Writing - review & editing. **Radosław Drozd:** Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Project administration, Investigation, Writing - original draft, Visualization, Supervision.

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by the Dean of the Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, Poland (Grant No. 517-01-027-8232/17).

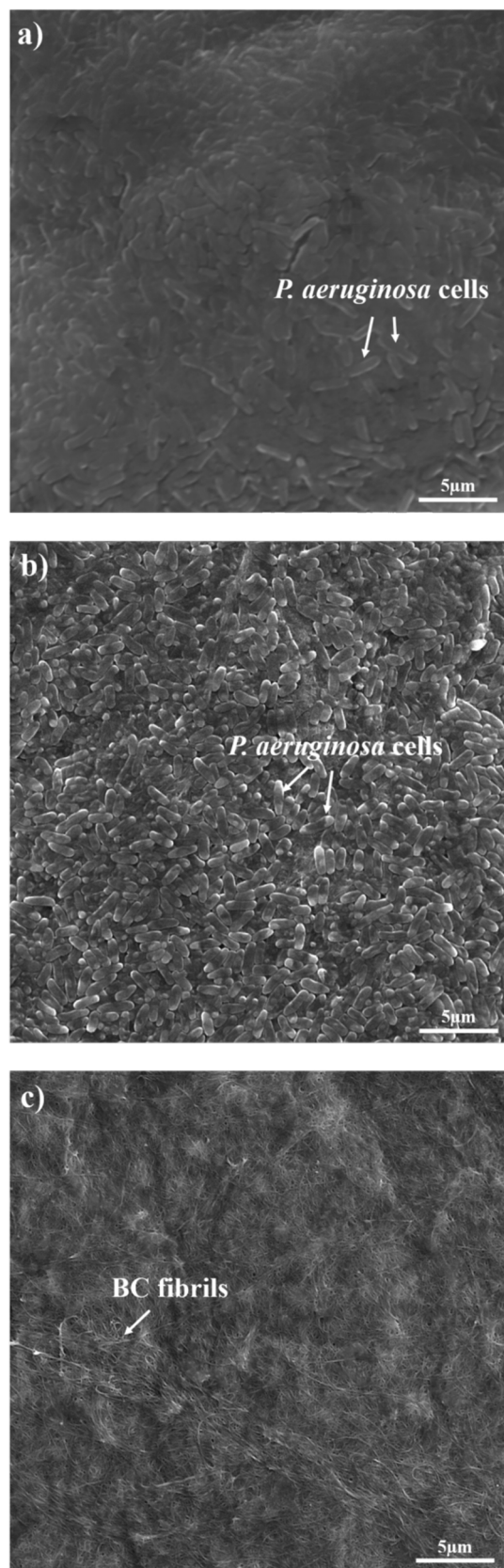


Fig. 6. Representative SEM (6000 x magnification) micrograph of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm formed on BC membranes (a) without enzymatic treatment (Control) and (b) with 85 mg/g of PelA_h per g of carrier (c) the BC membrane without biofilm.

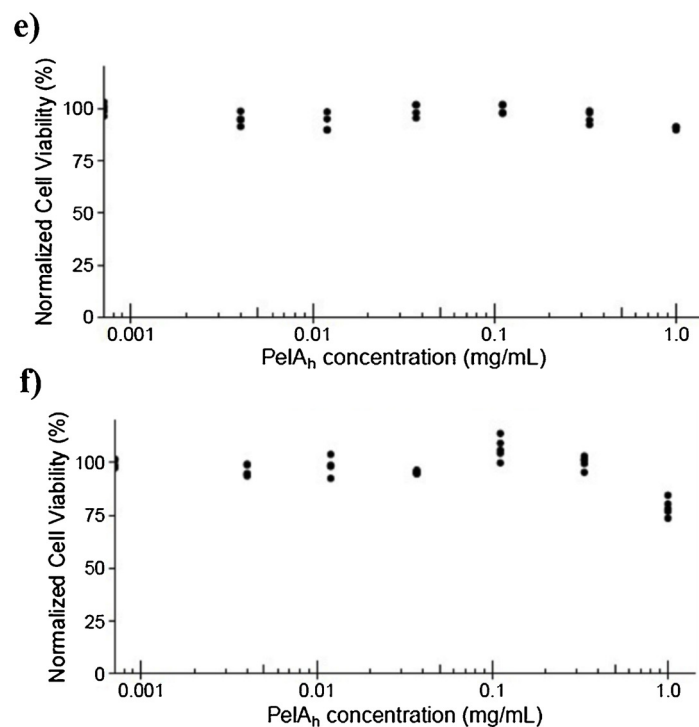
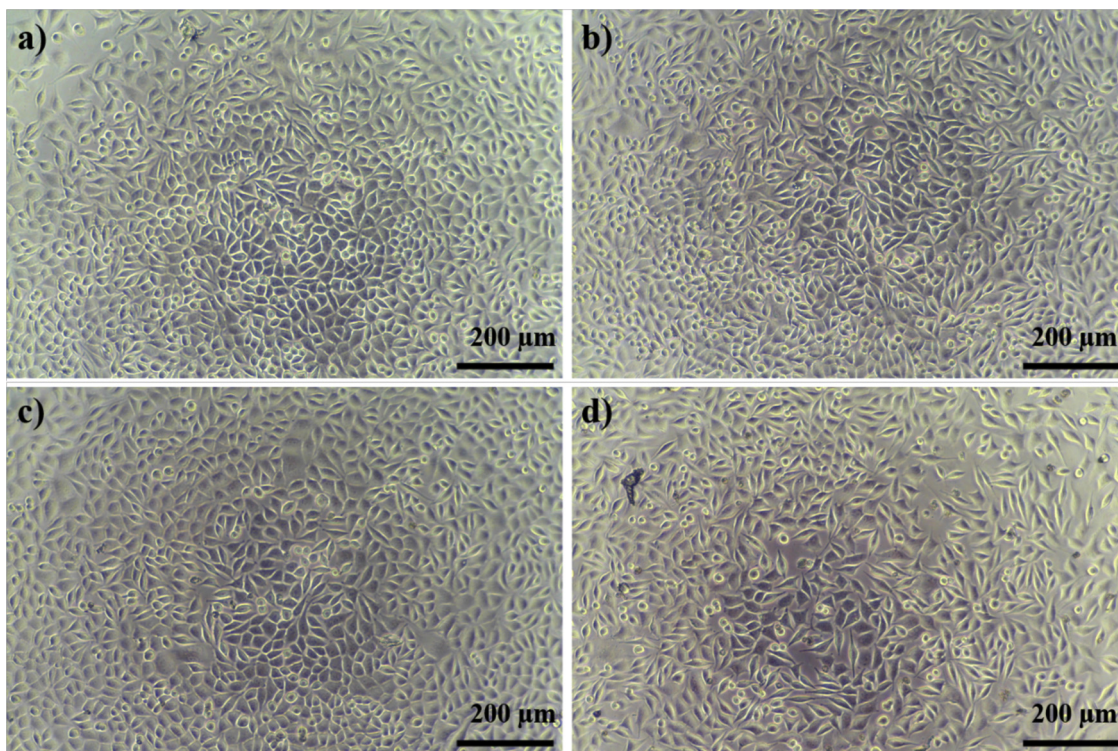


Fig. 7. Representative micrographs of L929 cells exposed to (a) vehicle control or (b) 1 mg/mL PelA_h protein for 24 h; (c) vehicle control or (d) 1 mg/mL PelA_h protein for 48 h and cell viability normalized to vehicle control of L929 cells exposed to range of recombinant enzyme for (e) 24 h and (f) 48 h. Each point represents a technical replicate, n = 5.

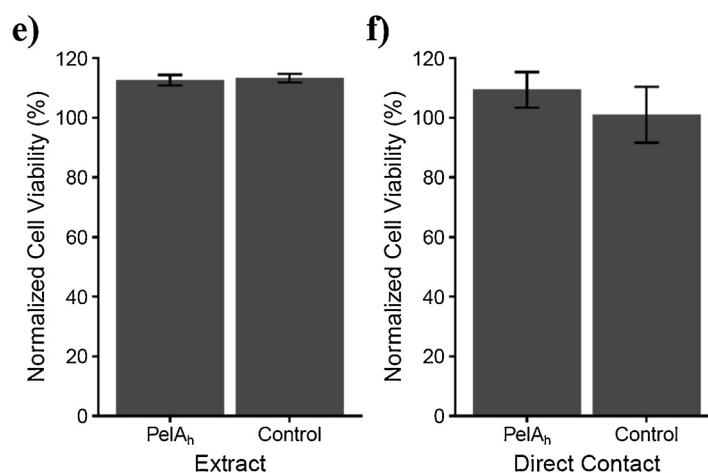
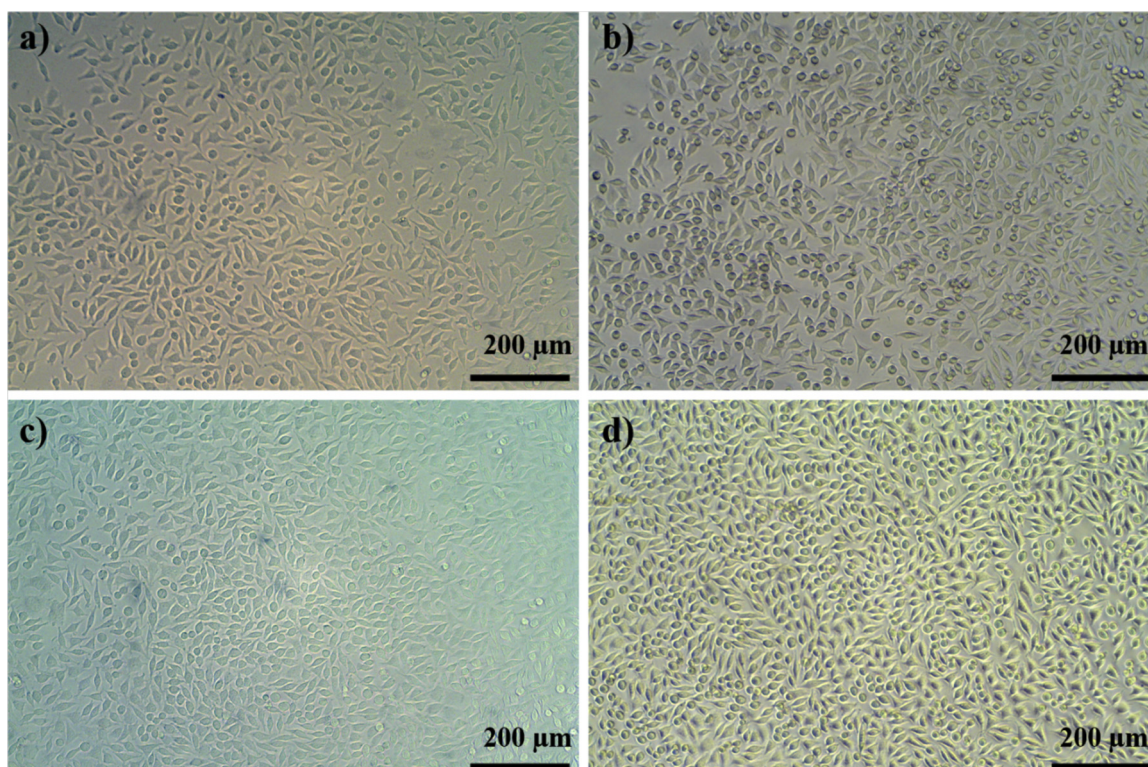


Fig. 8. Representative micrographs of L929 cells after 24 h of incubation in direct contact with cellulose discs with the immobilized enzyme (top row) or without (bottom row). Micrographs on the left were taken with disc remaining in well, while those on the right are of the same well, but after careful removal of the disc and viability of L929 cells (normalized to sham) after 24 h of: (e) incubation with liquid extracts (complete media, 24 h, 37 °C) of cellulose discs with PelA_h protein or without (Control) or (f) incubation in direct contact with cellulose discs with PelA_h protein or without (Control). Error bars represent standard deviation.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.

References

- Asker, D., Awad, T. S., Baker, P., Howell, P. L., & Hatton, B. D. (2018). Non-eluting, surface-bound enzymes disrupt surface attachment of bacteria by continuous biofilm polysaccharide degradation. *Biomaterials*, *167*, 168–176.
- Baker, P., Whitfield, G. B., Hill, P. J., Little, D. J., Pestrak, M. J., Robinson, H., et al. (2015). Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG reveals that its levels are critical for Psl polysaccharide biosynthesis and biofilm formation. *The Journal of Biological Chemistry*, *290*, 28374–28387.
- Baker, P., Hill, P. J., Snarr, B. D., Alnabeseya, N., Pestrak, M. J., Lee, M. J., et al. (2016). Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Science Advances*, *2*, e1501632.
- Banyay, M., Sarkar, M., & Gräslund, A. (2003). A library of IR bands of nucleic acids in solution. *Biophysical Chemistry*, *104*, 477–488.
- Bayne, L., Ulijn, R. V., & Halling, P. J. (2013). Effect of pore size on the performance of immobilised enzymes. *Chemical Society Reviews*, *42*, 9000–9010.
- Bessa, L. J., Fazii, P., Di Giulio, M., & Cellini, L. (2015). Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. *International Wound Journal*, *12*, 47–52.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254.
- Chen, K.-J., & Lee, C.-K. (2018). Twofold enhanced dispersin B activity by N-terminal

- fusion to silver-binding peptide for biofilm eradication. *International of Biological Macromolecules*, 118, 419–426.
- Colvin, K. M., Gordon, V. D., Murakami, K., Borlee, B. R., Wozniak, D. J., Wong, G. C. L., et al. (2011). The pel polysaccharide can serve a structural and protective role in the biofilm matrix of *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS Pathogens*, 7, e1001264.
- Colvin, K. M., Alnabseya, N., Baker, P., Whitney, J. C., Howell, P. L., & Parsek, M. R. (2013). PelA deacetylase activity is required for Pel polysaccharide synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 195, 2329–2339.
- Czaja, W., Krystynowicz, A., Bielecki, S., & Brown, R. M. (2006). Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials*, 27, 145–151.
- DeLeon, S., Clinton, A., Fowler, H., Everett, J., Horswill, A. R., & Rumbaugh, K. P. (2014). Synergistic interactions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* in an *in vitro* wound model. *Infection and Immunity*, 82, 4718–4728.
- Delille, A., Quilès, F., & Humbert, F. (2007). *In situ* monitoring of the nascent *Pseudomonas fluorescens* biofilm response to variations in the dissolved organic carbon level in low-nutrient water by attenuated total reflectance-fourier transform infrared spectroscopy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 5782–5788.
- Dobrynia, O. Y., Bolshakova, T. N., Umyarov, A. M., Boksha, I. S., Lavrova, N. V., Grishin, A. V., et al. (2015). Disruption of bacterial biofilms using recombinant dispersin B. *Microbiology*, 84, 498–501.
- Drozd, R., Rakoczy, R., Konopacki, M., Frąckowiak, A., & Fijałkowski, K. (2017). Evaluation of usefulness of 2DCorr technique in assessing physicochemical properties of bacterial cellulose. *Carbohydrate Polymers*, 161, 208–218.
- Drozd, R., Rakoczy, R., Wasak, A., Junka, A., & Fijałkowski, K. (2018). The application of magnetically modified bacterial cellulose for immobilization of laccase. *International of Biological Macromolecules*, 108, 462–470.
- Drozd, R., Szymańska, M., Rakoczy, R., Junka, A., Szymczyk, P., & Fijałkowski, K. (2019). Functionalized magnetic bacterial cellulose beads as carrier for licitase® ultra immobilization. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 187, 176–193.
- Fekete, A., Borbás, A., Gyémánt, G., Kandra, L., Fazekas, E., Ramasubbu, N., et al. (2011). Synthesis of β -(1–6)-linked N-acetyl-D-glucosamine oligosaccharide substrates and their hydrolysis by Dispersin B. *Carbohydrate Research*, 346, 1445–1453.
- Figueiredo, A. R. P., Figueiredo, A. G. P. R., Silva, N. H. C. S., Timmons, A. B., Almeida, A., Silvestre, A. J. D., et al. (2015). Antimicrobial bacterial cellulose nanocomposites prepared by *in situ* polymerization of 2-aminoethyl methacrylate. *Carbohydrate Polymers*, 123, 443–453.
- Fijałkowski, K., Zywicka, A., Drozd, R., Kordas, M., & Rakoczy, R. (2016). Effect of *Glucacetobacter xylinus* cultivation conditions on the selected properties of bacterial cellulose. *Polish Journal of Chemical Technology*, 18, 117–123.
- Filip, Z., & Hermann, S. (2001). An attempt to differentiate *Pseudomonas spp.* And other soil bacteria by FT-IR spectroscopy. *European Journal of Soil Biology*, 37, 137–143.
- Fleming, D., Chahin, L., & Rumbaugh, K. (2017). Glycoside hydrolases degrade polymicrobial bacterial biofilms in wounds. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e01998–16.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8, 623–633.
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology*, 2, 167.
- Ghadam, P., Akhlaghi, F., & Ali, A. A. (2017). One-step purification and characterization of alginate lyase from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* with destructive activity on bacterial biofilm. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20, 467–473.
- Ghafoor, A., Hay, I. D., & Rehm, B. H. A. (2011). Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture. *Applied and Environmental Microbiology*, 77, 5238–5246.
- Hatch, R. A., & Schiller, N. L. (1998). Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 974–977.
- Hirsh, S. L., Bilek, M. M., Nosworthy, N. J., Kondyurin, A., dos Remedios, C. G., & McKenzie, D. R. A. (2010). Comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir*, 26, 14380–14388.
- Hoarau, M., Badiéyan, S., & Marsh, E. N. G. (2017). Immobilized enzymes: Understanding enzyme – Surface interactions at the molecular level. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 15, 9539–9551.
- Hogan, S., Zapotoczna, M., Stevens, N. T., Humphreys, H., O'Gara, J. P., & O'Neill, E. (2017). Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. *The Journal of Hospital Infection*, 96, 177–182.
- Holbeck, S. L., Collins, J. M., & Doroshov, J. H. (2010). Analysis of food and drug administration-approved anticancer agents in the NCI60 panel of human tumor cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics*, 9, 1451–1460.
- Izano, E. A., Sadovskaya, I., Vinogradov, E., Mulks, M. H., Velliagounder, K., Ragunath, C., et al. (2007). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and antibiotic resistance in *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 43, 1–9.
- Izano, E. A., Sadovskaya, I., Wang, H., Vinogradov, E., Ragunath, C., Ramasubbu, N., et al. (2008). Poly-N-acetylglucosamine mediates biofilm formation and detergent resistance in *Agregatibacter actinomycetemcomitans*. *Microbial Pathogenesis*, 44, 52–60.
- Jennings, L. K., Storek, K. M., Ledvina, H. E., Coulon, C., Marmont, L. S., Sadovskaya, I., et al. (2015). Pel is a cationic exopolysaccharide that cross-links extracellular DNA in the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 11353–11358.
- Jesionowski, T., Zdzarta, J., & Krajewska, B. (2014). Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption*, 20, 801–821.
- Kaplan, J. B. (2009). Therapeutic potential of biofilm-dispersing enzymes. *The International Journal of Artificial Organs*, 32, 545–554.
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, 89, 205–218.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185, 4693–4698.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 2633–2636.
- Khatoun, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4, e01067.
- Kovács, A., Nyerges, B., & Izvekov, V. (2008). Vibrational analysis of N-Acetyl- α -D-glucosamine and β -D-glucuronic acid. *The Journal of Physical Chemistry A*, 112, 5728–5735.
- Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., et al. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine Drugs*, 8, 1567–1636.
- Le Mauff, F., Bamford, N. C., Alnabseya, N., Zhang, Y., Baker, P., Robinson, H., et al. (2019). Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* biofilm disruption by fungal and bacterial glycoside hydrolases. *The Journal of Biological Chemistry*, 294, 10760–10772.
- Lee, K.-Y., Blaker, J. J., & Bismarck, A. (2009). Surface functionalisation of bacterial cellulose as the route to produce green polylactide nanocomposites with improved properties. *Composites Science and Technology*, 69, 2724–2733.
- Li, C., Wen, A., Shen, B., Lu, J., Huang, Y., & Chang, Y. (2011). FastCloning: A highly simplified, purification-free, sequence- and ligation-independent PCR cloning method. *BMC Biotechnology*, 11, 92.
- Li, Y., Jiang, H., Zheng, W., Gong, N., Chen, L., Jiang, X., et al. (2015). Bacterial cellulose/hyaluronan nanocomposite biomaterials as wound dressings for severe skin injury repair. *Journal of Materials Chemistry B*, 3, 3498–3507.
- Lin, W.-C., Lien, C.-C., Yeh, H.-J., Yu, C.-M., & Hsu, S.-H. (2013). Bacterial cellulose and bacterial cellulose-chitosan membranes for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, 94, 603–611.
- Little, D. J., Bamford, N. C., Pokrovskaya, V., Robinson, H., Nitz, M., & Howell, P. L. (2014). Structural basis for the de-N-acetylation of poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine in Gram-positive bacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 289, 35907–35917.
- Little, D. J., Milek, S., Bamford, N. C., Ganguly, T., DiFrancesco, B. R., Nitz, M., et al. (2015). The protein BpsB is a poly- β -1,6-N-acetyl-D-glucosamine deacetylase required for biofilm formation in *Bordetella bronchiseptica*. *The Journal of Biological Chemistry*, 290, 22827–22840.
- Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L.-P., van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D., et al. (2002). Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 255–271.
- Marmont, L. S., Whitfield, G. B., Rich, J. D., Yip, P., Giesbrecht, L. B., Stremick, C. A., et al. (2017). PelA and PelB proteins form a modification and secretion complex essential for Pel polysaccharide-dependent biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Biological Chemistry*, 292, 19411–19422.
- Molobela, P., Cloete, T. E., & Beukes, M. (2010). Protease and amylase enzymes for biofilm removal and degradation of extracellular polymeric substances (EPS) produced by *Pseudomonas fluorescens* bacteria. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 1515–1524.
- Morin, R. J., & Tomaselli, N. L. (2007). Interactive dressings and topical agents. *Clinics in Plastic Surgery*, 34, 643–658.
- Moritz, S., Wiegand, C., Wesarg, F., Hessler, N., Müller, F. A., Kralisch, D., et al. (2014). Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. *International Journal of Pharmaceutics*, 471, 45–55.
- Moza, S., Grylewicz, A., Zgrzebnicki, M., Darowna, D., & Czyżewski, A. (2019). Investigations on the properties and performance of mixed-matrix polyethersulfone membranes modified with halloysite nanotubes. *Polymers*, 11. <https://doi.org/10.3390/polym11040671>.
- Nguyen, D. N., Ton, N. M. N., & Le, V. V. M. (2009). Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* immobilization in bacterial cellulose by 'adsorption-incubation' method. *International Food Research Journal*, 16, 59–64.
- Nivens, D. E., Ohman, D. E., Williams, J., & Franklin, M. J. (2001). Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *Journal of Bacteriology*, 183, 1047–1057.
- Noda, I., Dowrey, A. E., Marcott, C., Story, G. M., & Ozaki, Y. (2000). Generalized two-dimensional correlation spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 54, 236A–248A.
- Ojeda, J. J., & Dittrich, M. (2012). Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. *Methods in Molecular Biology (Clifton, NJ)*, 881, 187–211.
- Oshima, T., Taguchi, S., Ohe, K., & Baba, Y. (2011). Phosphorylated bacterial cellulose for adsorption of proteins. *Carbohydrate Polymers*, 83, 953–958.
- Patel, K. K., Tripathi, M., Pandey, N., Agrawal, A. K., Gade, S., Anjum, M. M., et al. (2019). Alginate lyase immobilized chitosan nanoparticles of ciprofloxacin for the improved antimicrobial activity against the biofilm associated mucoid *P. Aeruginosa* infection in cystic fibrosis. *International Journal of Pharmaceutics*, 563, 30–42.
- Pesttrak, M. J., Baker, P., Dellos-Nolan, S., Hill, P. J., da Silva, D. P., Silver, H., et al. (2019). Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG combats wound infection by improving antibiotic efficacy and host innate immune activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63, e00234–19.
- Pink, J., Smith-Palmer, T., Chisholm, D., Beveridge, T. J., & Pink, D. A. (2005). An FTIR study of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm development: Interpretation of ATR-FTIR data in the 1500–1180 cm^{-1} region. *Biofilms*, 2, 165–175.
- Portela, R., Leal, C. R., Almeida, P. L., & Sobral, R. G. (2019). Bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microbial Biotechnology*, 12, 586–610.
- Quilès, F., & Humbert, F. (2014). On the production of glycogen by *Pseudomonas*

- fluorescens* during biofilm development: An *in situ* study by attenuated total reflection-infrared with chemometrics. *Biofouling*, 30, 709–718.
- Quilès, F., Humbert, F., & Delille, A. (2010). Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75, 610–616.
- Ramasubbu, N., Thomas, L. M., Ragunath, C., & Kaplan, J. B. (2005). Structural analysis of dispersin B, a biofilm-releasing glycoside hydrolase from the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Journal of Molecular Biology*, 349, 475–486.
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell viability assays. In G. Sittampalam, & N. Coussens (Eds.). *Assay guidance manual* (pp. 1–23). Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Roah, P., Farrar, D., & Perry, C. C. (2005). Interpretation of protein adsorption: Surface-induced conformational changes. *Journal of the American Chemical Society*, 127, 8168–8173.
- Sekkal, M., Huvenne, J.-P., Legrand, P., Sombret, B., Mollet, J.-C., Mouradi-Givernaud, A., et al. (1993). Direct structural identification of polysaccharides from red algae by FTIR microspectrometry I: Localization of agar in *Gracilaria verrucosa* sections. *Microchimica et Ichnoanalytica Acta*, 112, 1–10.
- Shah, N., Ul-Islam, M., Khattak, W. A., & Park, J. K. (2013). Overview of bacterial cellulose composites: A multipurpose advanced material. *Carbohydrate Polymers*, 98, 1585–1598.
- Shukla, S. K., & Rao, T. S. (2013). Dispersal of Bap-mediated *Staphylococcus aureus* biofilm by proteinase K. *The Journal of Antibiotics*, 66, 55–60.
- Snarr, B. D., Baker, P., Bamford, N. C., Sato, Y., Liu, H., Lehoux, M., et al. (2017). Microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents with cross-kingdom activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, 7124–7129.
- Soler-Arango, J., Figoli, C., Muraca, G., Bosch, A., & Brelles-Mariño, G. (2019). The *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix and cells are drastically impacted by gas discharge plasma treatment: A comprehensive model explaining plasma-mediated biofilm eradication. *PLoS One*, 14, e0216817.
- Suci, P. A., Vranj, J. D., & Mittelman, W. W. (1998). Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials*, 19, 327–339.
- Tan, Y., Ma, S., Liu, C., Yu, W., & Han, F. (2015). Enhancing the stability and antibiofilm activity of DspB by immobilization on carboxymethyl chitosan nanoparticles. *Microbiological Research*, 178, 35–41.
- Tian, L., Xu, S., Hutchins, W. C., Yang, C.-H., & Li, J. (2014). Impact of the exopolysaccharides Pel and Psl on the initial adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to sand. *Biofouling*, 30, 213–222.
- Tran, P. L., Hammond, A. A., Mosley, T., Cortez, J., Gray, T., Colmer-Hamood, J. A., et al. (2009). Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 3586–3592.
- Wang, J., Zhu, Y., & Du, J. (2011). Bacterial cellulose: A natural nanomaterial for biomedical for biomedical applications. *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, 11, 285–306.
- Wang, H., Ding, S., Wang, G., Xu, X., & Zhou, G. (2013). *In situ* characterization and analysis of *Salmonella* biofilm formation under meat processing environments using a combined microscopic and spectroscopic approach. *International Journal of Food Microbiology*, 167, 293–302.
- Wittaya-areekul, S., & Prahsarn, C. (2006). Development and *in vitro* evaluation of chitosan–polysaccharides composite wound dressings. *International Journal of Pharmaceutics*, 313, 123–128.
- Wozniak, D. J., Wyckoff, T. J. O., Starkey, M., Keyser, R., Azadi, P., O'Toole, G. A., et al. (2003). Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 7907–7912.
- Wu, S.-C., Wu, S.-M., & Su, F.-M. (2017). Novel process for immobilizing an enzyme on a bacterial cellulose membrane through repeated absorption. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 92, 109–114.
- Yamamoto, H., Horii, F., & Hirai, A. (1996). *In situ* crystallization of bacterial cellulose II. Influences of different polymeric additives on the formation of celluloses Ia and Ib at the early stage of incubation. *Cellulose*, 3, 229–242.
- Yao, W., Wu, X., Zhu, J., Sun, B., Zhang, Y. Y., & Miller, C. (2011). Bacterial cellulose membrane – A new support carrier for yeast immobilization for ethanol fermentation. *Process Biochemistry*, 46, 2054–2058.
- Zdarta, J., Meyer, A. S., Jesionowski, T., & Pinelo, M. (2018). A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*, 8, 92. <https://doi.org/10.3390/catal8020092>.
- Zhang, Y., Werling, U., & Edelman, W. (2012). SLiCE- a novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Research*, 40, e55.
- Żywicka, A., Fijałkowski, K., Junka, A. F., Grzesiak, J., & El Fray, M. (2018). Modification of bacterial cellulose with quaternary ammonium compounds based on fatty acids and amino acids and the effect on antimicrobial activity. *Biomacromolecules*, 19, 1528–1538.
- Żywicka, A., Banach, A., Junka, A. F., Drozd, R., & Fijałkowski, K. (2019). Bacterial cellulose as a support for yeast immobilization - Correlation between carrier properties and process efficiency. *Journal of Biotechnology*, 291, 1–6.
- Żywicka, A., Wenelska, K., Junka, A., Chodaczek, G., Szymczyk, P., & Fijałkowski, K. (2019). Immobilization pattern of morphologically different microorganisms on bacterial cellulose membranes. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 35, 11.

Glycoside hydrolase (PelA_h) prevents Pseudomonas aeruginosa biofilm formation on cellulose-based wound dressing

Magdalena Szymańska^a, Jolanta Karakulska^a, Peter Sobolewski^b, Urszula Kowalska^c, Bartłomiej Grygorcewicz^d, Dominique Böttcher^e, Uwe T. Bornscheuer^e, Radosław Drozd^a

^aDepartment of Microbiology Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland

^bDepartment of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology, Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland

^cCenter of Bioimmobilisation and Innovative Packaging Materials, Faculty of Food Science and Fisheries, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 35 Klemensa Janickiego Str., 71-270 Szczecin, Poland

^dDepartment of Microbiology, Immunology and Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin

^eDepartment of Biotechnology and Enzyme Catalysis Institute of Biochemistry, University of Greifswald, Felix-Hausdorff-Str. 4, D-17487 Greifswald

1.1 Purification of PelA_h protein.

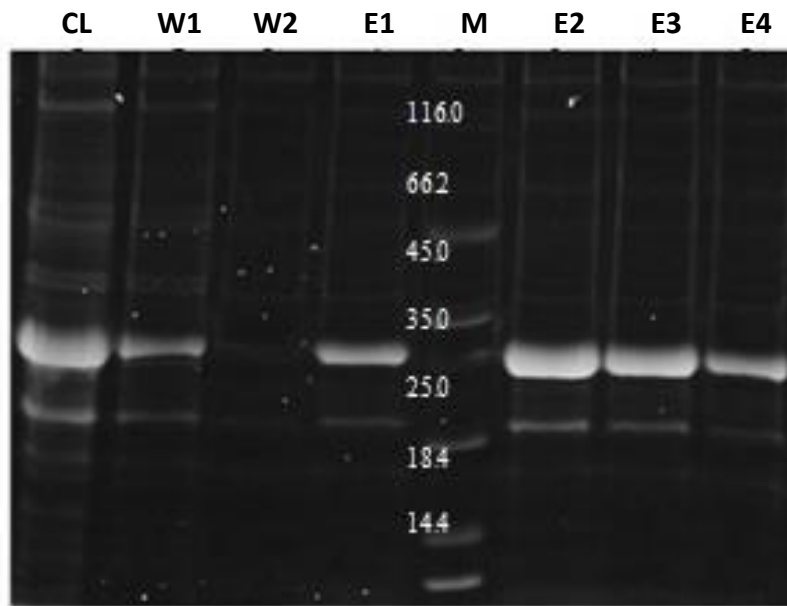


Fig. S1. SDS-PAGE (TCE-staining) of PelA_h purification steps. Lane 1 contains cell lysate. Lane 2 contains washing fraction 1. Lane 3 contains washing fraction 2. Lane 4 contains elution fraction 1. Lane 5 contains protein molecular weight marker (Pierce™ Unstained Protein MW Marker, Thermo Fisher Scientific). Lane 6 contains elution fraction 2. Lane 7 contains elution fraction 3. Lane 8 contains elution fraction 4. SDS-PAGE electrophoresis was performed on 12.5% polyacrylamide gel containing 1% of 2,2,2 – trichloroethanol as a fluorescent dye. Electrophoresis was carried out at 200 V and terminated when the dye front reaches close to the bottom of the gel. The gel was rinsed with purified water, and bands were visualized by incubation 5 min. under UV transilluminator. Obtained protein was stored at -20°C for further analysis. The molecular weight of PelA_h was 30 kDa.

1.2 Electrostatic potential of PelA_h protein.

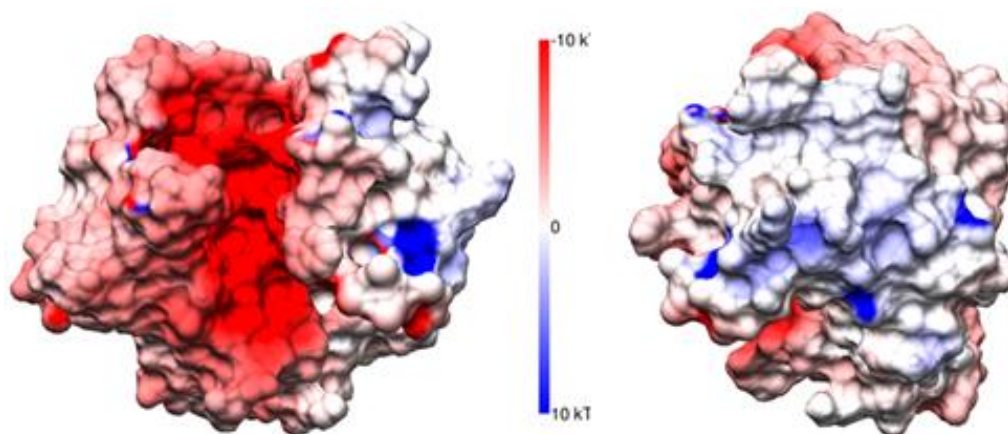


Fig. S2. Distribution of electrostatic potential on the molecular surface PelA_h protein (PDB:5TCB) [1]. The potential was calculated according to PROPKA prediction of pK_a values of titratable aminoacid [2]. The electrostatic potential was calculated with assumption of enviroment pH 7.4 with using an APBS solver via PDB2PQR server. The results of calculation was analysed with the UCSF Chimera 1.13.1rc package [3].

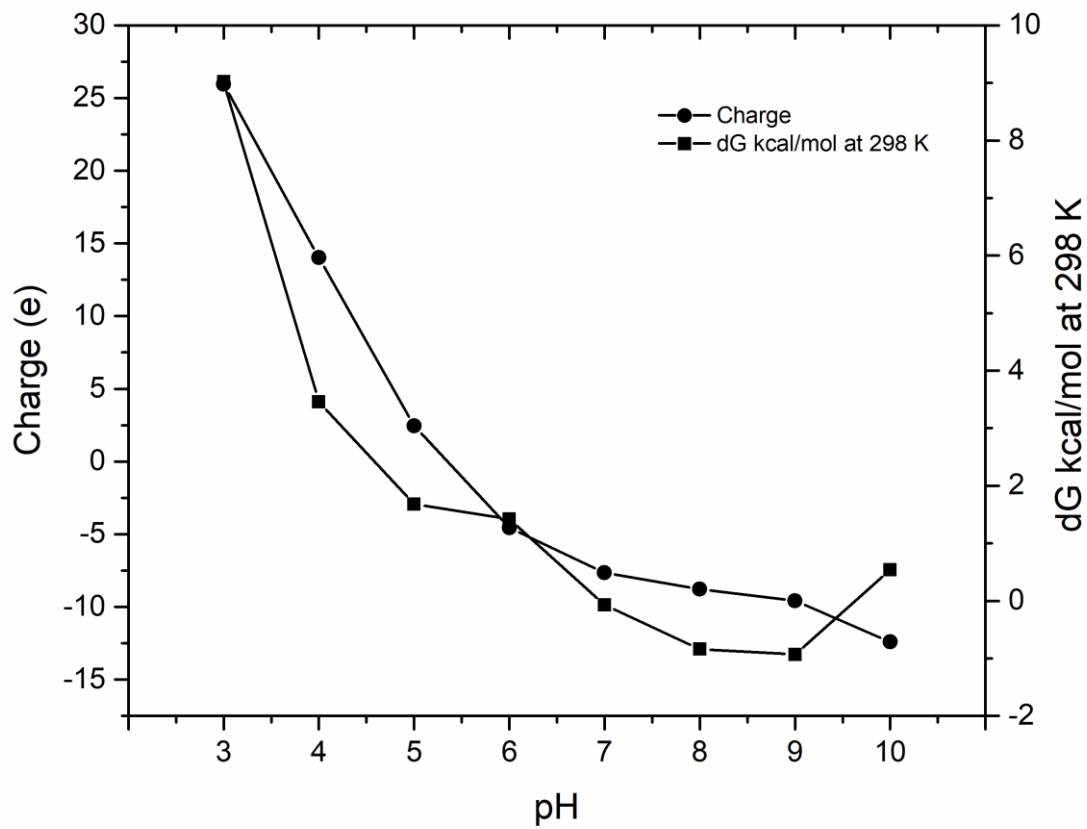


Fig. S3. The predicted influence of pH on the charge and free energy of unfolding of the PeIA_h protein in folded state. The predicted isoelectric point was 5.3 and pH for maximum stability was 8.7 for which the free energy is -1.0 kcal/mol at 298K [3].

1.3 ATR-FTIR spectra of BC membranes in SBF buffer.

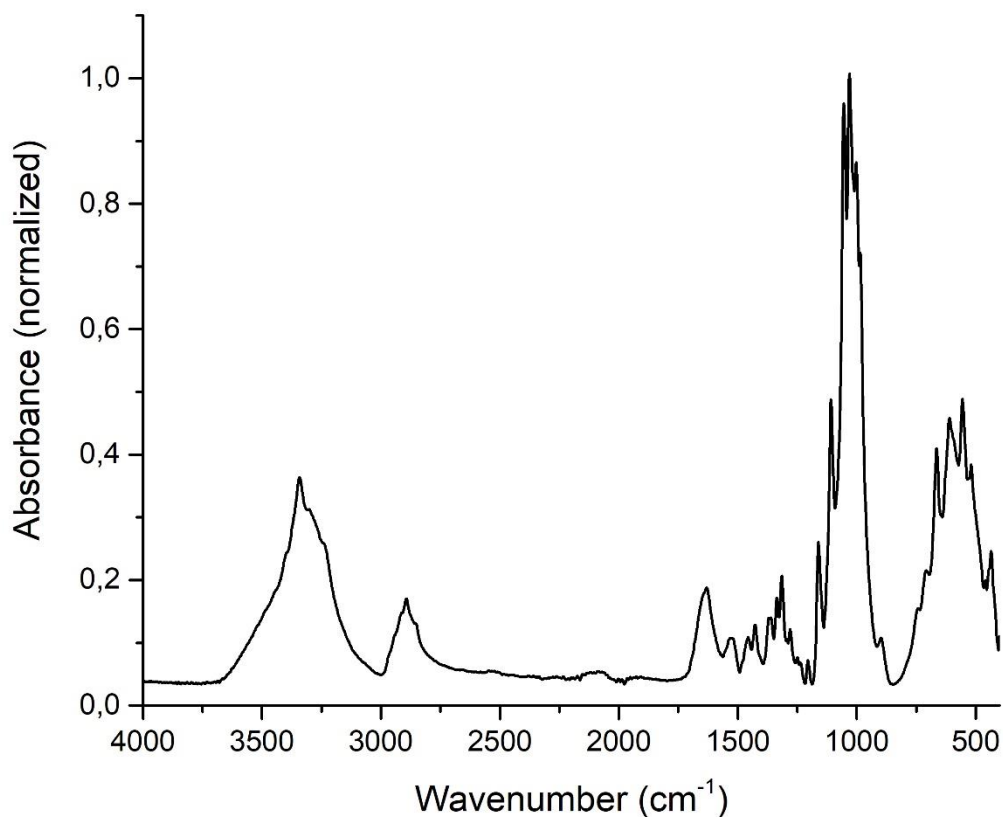


Fig. S4. The ATR – FTIR spectra of dried BC membrane in SBF buffer (pH 7.4).

2. References

[1] Snarr BD, Baker P, Bamford NC, Sato Y, Liu H, Lehoux M, Gravelat FN, Ostapska H, Baistrocchi SR, Cerone RP, Filler EE, Parsek MR, Filler SG, Howell PL, and Sheppard DC. Microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents with cross-kingdom activity. (2017). PNAS. 114 (27) 7124-7129.

[2] PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa predictions Mats H.M. Olsson, Chresten R. Sondergard, Michal Rostkowski, and Jan H. Jensen Journal of Chemical Theory and Computation, to be submitted (2010).

[3] Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC and Ferrin TE. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. (2004). *J.Comput. Chem.* 25(13) 1605-1612.

[4] Dolinsky TJ, Nielsen JE, McCammon JA and Baker NA. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup, execution, and analysis of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. (2004). *Nucleic Acids Res.* 32 W665-W667.



Article

Enhancement of Inhibition of the *Pseudomonas* sp. Biofilm Formation on Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing by the Combined Action of Alginate Lyase and Gentamicin

Magdalena Chareża ¹, Katarzyna Przygodzka ¹, Anna Żywicka ¹, Bartłomiej Grygorcewicz ², Peter Sobolewski ³, Sylwia Mozia ⁴, Marcin Śmiglak ⁵ and Radosław Drozd ^{1,*}

- ¹ Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastów Avenue, 71-311 Szczecin, Poland
 - ² Department of Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin, Powstańców Wielkopolskich 72, 70-111 Szczecin, Poland
 - ³ Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology, Piastów 45, 70-311 Szczecin, Poland
 - ⁴ Department of Inorganic Chemical Technology and Environment Engineering, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin, Poland
 - ⁵ Poznan Science and Technology Park (PPNT), Rubież 5, 61-612 Poznan, Poland
- * Correspondence: rdrozd@zut.edu.pl; Tel.: +48-517-456-798

Abstract: Bacterial biofilms generally contribute to chronic infections, including wound infections. Due to the antibiotic resistance mechanisms protecting bacteria living in the biofilm, they are a serious problem in the wound healing process. To accelerate the wound healing process and avoid bacterial infection, it is necessary to select the appropriate dressing material. In this study, the promising therapeutic properties of alginate lyase (AlgL) immobilised on BC membranes for protecting wounds from *Pseudomonas aeruginosa* infection were investigated. The AlgL was immobilised on never dried BC pellicles via physical adsorption. The maximum adsorption capacity of AlgL was 6.0 mg/g of dry BC, and the equilibrium was reached after 2 h. The adsorption kinetics was studied, and it has been proven that the adsorption was consistent with Langmuir isotherm. In addition, the impact of enzyme immobilisation on bacterial biofilm stability and the effect of simultaneous immobilisation of AlgL and gentamicin on the viability of bacterial cells was investigated. The obtained results showed that the AlgL immobilisation significantly reduced the amount of polysaccharides component of the *P. aeruginosa* biofilm. Moreover, the biofilm disruption by AlgL immobilised on BC membranes exhibited synergism with the gentamicin, resulting in 86.5% more dead *P. aeruginosa* PAO-1 cells.

Keywords: bacterial cellulose; alginate lyase; biofilm eradication; antibiotic susceptibility



Citation: Chareża, M.; Przygodzka, K.; Żywicka, A.; Grygorcewicz, B.; Sobolewski, P.; Mozia, S.; Śmiglak, M.; Drozd, R. Enhancement of Inhibition of the *Pseudomonas* sp. Biofilm Formation on Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing by the Combined Action of Alginate Lyase and Gentamicin. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>

Academic Editors: Manuel Simões and Lúcia Chaves Simões

Received: 5 February 2023
Revised: 22 February 2023
Accepted: 24 February 2023
Published: 1 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The world is struggling with the growing phenomenon of antibiotic resistance, primarily caused by unchecked and often excessive use of antimicrobials. Despite ongoing research, few new antibiotics have been discovered recently, whereas the phenomenon of antimicrobial resistance continues to grow. Moreover, antibiotics are only effective against microorganisms in the form of planktonic cells, while most bacteria produce protective biofilms that prevent the penetration and effective action of antibiotic molecules into their structure [1–3]. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen that causes nosocomial infections that are particularly dangerous for immunocompromised patients. Treatment of such infections with standard antibiotic therapy is often unsatisfactory due to the ability of these bacteria to form structurally complex biofilms composed primarily of exopolysaccharides, eDNA, proteins, and lipids [4,5]. This kind of bacterial biofilms are typically responsible for chronic infections, including wound infections, e.g., pressure,

venous leg, and diabetic foot ulcers. They delay the wound healing process, reduce the action of bactericides, and impair the host immune system. A widely used method for removing biofilms from chronic wounds and improving the healing process is the mechanical removal of necrotic tissue and microorganisms. An alternative solution is to administer compounds called adjuvants along with antibiotics. The use of phages (viruses that attack bacterial cells) can also be effective, such as those that can produce enzymes such as polysaccharide depolymerase, which can decompose the extracellular polymeric substances (EPS) matrix, allowing the phages to diffuse into the biofilm and attach to cellular structures, enabling replication [3,6,7]. Additionally, to destabilise the EPS matrix and enhance antibiotic therapy, it is also possible to use other types of enzymes, such as glycosidases, proteases and DNase [8]. A particularly interesting group of enzymes are those that play key roles in the biochemical pathways of biofilm matrix synthesis. These include enzymes such as glycoside hydrolases PelA_H, PslG_H, and alginate lyase (AlgL), which, under favourable circumstances, can degrade Pel, Psl, and alginate polymers present in the EPS matrix produced by *P. aeruginosa* strains [9–12]. In fact, alginate is the most abundant extracellular matrix polysaccharide in the EPS of many bacteria. This polymer consists of β -D-mannuronate (M) and α -L-guluronate (G) as monomeric units that are linked in three different kinds of blocks, poly β -D-mannuronate (polyM), poly α -L-guluronate (polyG) or the heteropolymer (polyM/G) [13–15]. Additionally, the alginate produced by *P. aeruginosa* has O-acetyl groups on the C2- and/or C3- position of the β -D-mannuronate residues, which significantly affects the physicochemical properties (e.g., viscosity, ability to bind divalent cations, and water-binding capacity) of the biofilm matrix and the structure of the biofilm. The typically highly hydrated alginate-containing biofilm matrix protects bacterial cells against dehydration and the host immune system. Additionally, the biofilm matrix also contributes to antibiotic resistance mechanisms. Further, it has been observed that antibiotic concentrations below the minimal inhibitory concentration (MIC) value can result in an increase in alginate synthesis by *P. aeruginosa* [16,17]. Additionally, Hatch and Schiller reported that negatively charged alginate could block the bactericidal activity of positively charged antibiotics, such as aminoglycosides and polymyxin B [18]. The biosynthesis of alginate by *Pseudomonas* sp. is coded primarily in a single operon that consists of twelve genes. Among them, the *algL* gene is responsible for encoding alginate lyase (AlgL) [19]. AlgL is an element of the polymer transport apparatus, which moves alginate across the periplasm to porin-like protein AlgE and results in secretion. AlgL also plays an important role in regulating alginate synthesis by degrading excess polysaccharides, which can be toxic to the bacterial cell [14,20,21]. AlgL can degrade alginate via a β -elimination mechanism of the glycosidic bonds to form unsaturated oligosaccharides. Due to their substrate specificity, AlgLs can be distinguished as G block specific, M block specific, or poly M/G specific [22,23]. Importantly, it has been shown that AlgL can effectively inhibit biofilm formation by mucoid *P. aeruginosa* [24] and increases the sensitivity of bacterial cells to various antibiotics [13,25,26]. Thanks to these important properties, many medicinal and pharmaceutical applications based on this enzyme are being developed, including advanced delivery systems based on silver nanocomposite particles or other biopolymers, such as chitosan and hyaluronan, as carriers for AlgL. These solutions have been successfully applied to treat *P. aeruginosa* lung infections [27–32]. Of the many biopolymers, bacterial cellulose (BC) is often considered an excellent carrier for various bioactive compounds, including enzymes. Additionally, due to its unique water properties, BC is an ideal material for wound dressing application, tissue regeneration, and as temporary skin substitutes. BC is non-toxic, non-carcinogenic, and biocompatible, plus it has an unusual capacity to retain moisture and can absorb exudates from the injured tissues, accelerating granulation [33]. At the same time, the neutrality of BC in some circumstances can be a disadvantage, and it is typically considered only as a physical barrier for microbes in chronic wound therapy. However, BC could provide much more effective protection against microbial growth if it could be combined with enzymes able to degrade biofilm and/or antibiotics. In fact, using pristine BC as a carrier for enzymes has many advantages, thanks to only a marginal effect

on their structure and catalytic properties [34–38]. Despite this, the use of BC as a carrier of AlgL via immobilisation to improve its properties as versatile wound dressing material has not been reported. As a result, the aim of this study was the analysis of the effect of immobilisation of AlgL via physical adsorption on never-dried BC on the stability of biofilm formed by *Pseudomonas* sp. and its susceptibility to aminoglycoside antibiotic gentamicin.

2. Results and Discussion

2.1. Characteristic of Recombinant AlgL and the Effect of Temperature on the Enzymatic Activity of AlgL

The recombinant AlgL with a His₆ tag at the N-terminus was purified by metal affinity chromatography with Ni²⁺ resin column, and usually, approximate 10 mg/mL recombinant enzyme from litre of bacterial cell culture was obtained with the specific activity of 150.0 U/mg. This result is similar to those reported by Xiao et al., who purified recombinant AlgL from *Pseudomonas* sp. QD03 with a yield of 10.3 mg/L of cultivation medium and a specific activity of 188.5 U/mg [15]. The molecular mass of recombinant alginate lyase determined using SDS-PAGE was 40 kDa and agreed with the value predicted from the amino acid sequence. To determine how long the recombinant AlgL, potentially used in medical dressings, will be stable, both under long-term storage at 4 °C and when applied to the wound at human body temperature, its temperature optimum and stability at 4 °C and 37 °C for 30 days were tested. The effect of temperature on AlgL was analysed within the broad range of the temperature from 30 °C to 80 °C. The optimal temperature for alginate lyase activity was established at 40 °C (Figure 1a). These results were comparable to Ghadam et al., who demonstrated that AlgL has the best enzymatic activity at 37 °C, whereas the enzyme stability at 4 °C and 37 °C at pH 7.4 were studied. After 4 days of storage at 4 °C, AlgL remains at almost 100% of the initial activity [10]. Subsequently, the activity of the enzyme decreases and reaches 20% of initial activity after 21 days and which remains at this level for 30 days. The storage of AlgL at 37 °C caused a decrease in activity by about 70% after 4 days and by about 95% after 21 days, while after 30 days, the enzyme completely lost its activity.

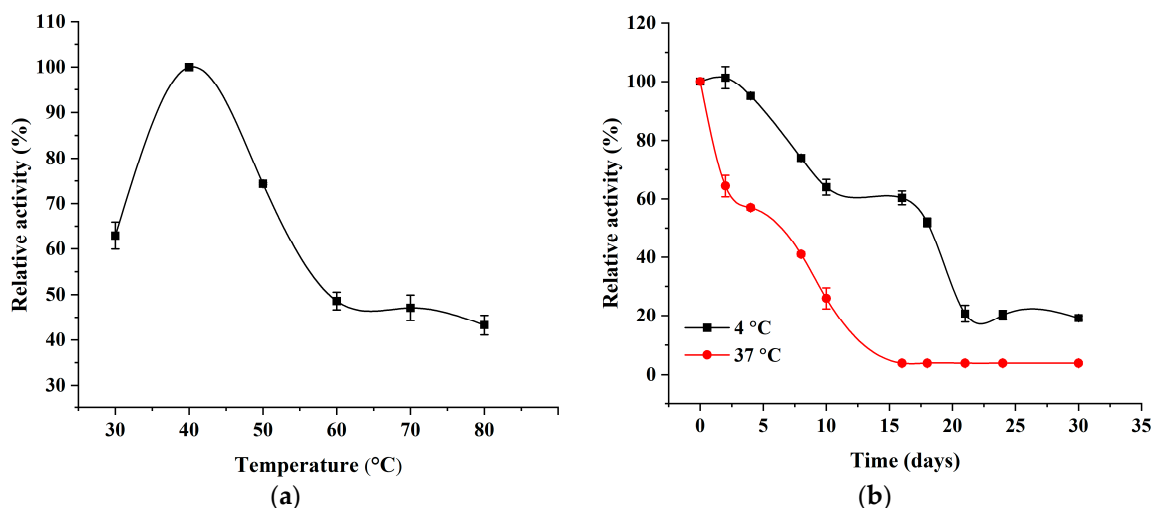


Figure 1. Effects of temperature on the activity (a) and time depended on stability at 4 °C and 37 °C (b) of soluble AlgL.

2.2. *P. aeruginosa* PAO-1 Biofilm Inhibition and Disruption of Biofilm Biomass with Alginate Lyase

To evaluate the potential clinical application of AlgL, the effective inhibition of biofilm formation and eradication of 24 h mature biofilm of *P. aeruginosa* PAO-1 were tested. The effect of AlgL on biofilms was evaluated by crystal violet staining. The prophylactic treatment of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm with AlgL was tested in concentrations from 0.8 µg/mL to 25.0 µg/mL. The enzyme was added at the time of inoculation, and the biofilm was

incubated for 24 h at 37 °C. As shown in Figure 2a, the inhibitory effect depended on enzyme dose, and even a small amount of enzyme significantly affected the biofilm formation. The AlgL at a concentration of 0.8 µg/mL did not influence biofilm formation inhibition, while in the range of 1.6 µg/mL and 3.2 µg/mL in 28% and 39%, inhibition of biofilm formation was observed. At the higher concentration of AlgL 6.25 µg/mL, the maximal inhibition (50%) of biofilm formation was observed. However, the further increase of its amount to 25 µg/mL did not have any significant effect. The results for eradicating 24 h mature *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm are presented in Figure 2b. The lowest concentration of AlgL resulted in only around 10% of eradication rate, while the concentration of 1.6 µg/mL showed 37%. Application of AlgL concentration from 3.2 to 12.5 µg/mL resulted in 48%, 49%, and 53% biofilm eradication, respectively. However, the best effect was obtained at a concentration of 25.0 µg/mL, where around 60% of biofilm eradication was obtained. According to Tavafi et al., AlgL can inhibit the biofilm formation in the mucoid *P. aeruginosa* infections by more than 97% in the concentration of 9.37 µg/mL and 18.75 µg/mL, while the eradication rate was also more than 97% in the concentration of 18.75 µg/mL and 37.5 µg/mL [39].

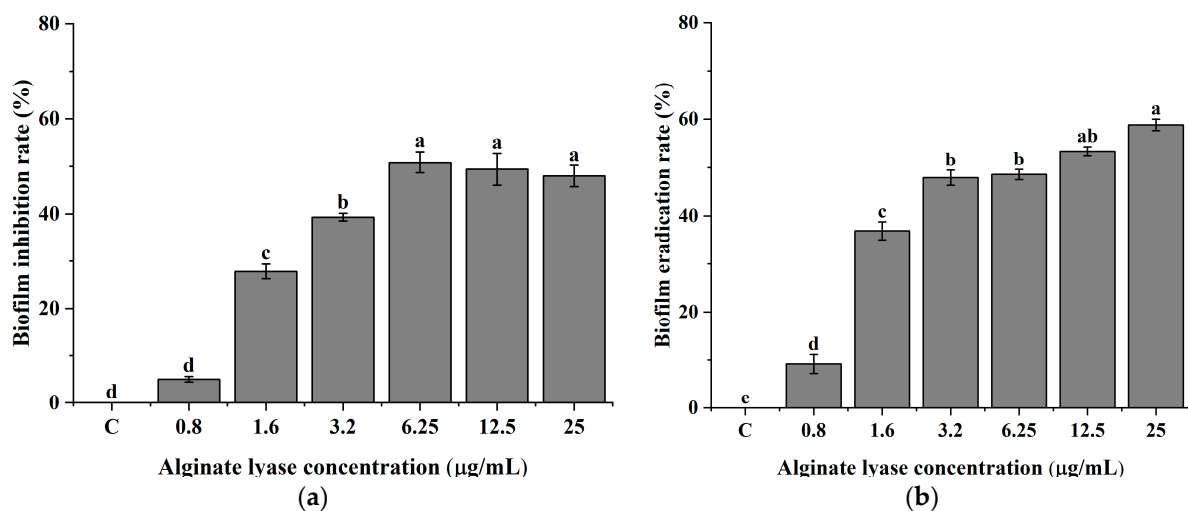


Figure 2. Dose–response of *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm formation inhibition (a) and disruption of biofilm biomass (b). The means with the same superscript are not significantly different, with $p > 0.05$. Error bars represent standard deviation.

2.3. Cytotoxicity Study of AlgL

Ideal wound dressings should be characterised by many features, of which biocompatibility plays one of the most important roles [40]. BC, as a natural polymer, is widely used as a wound dressing material precisely because of its compatibility with living tissue. Introduction to its structure or immobilisation of various types of compounds may, however, cause a cytotoxic effect [41,42]. It has been proven that some enzymes from the group of glycohydrolases with potential use in biofilm eradication may be toxic to mammalian cells [43]. For this reason, a dose–response study of the potential cytotoxicity of recombinant AlgL on mammalian subcutaneous fibroblasts (murine L929 cell line) was examined. The cell viability after exposure to a range of concentrations (1–250 µg/mL) of AlgL for 24 and 48 h was assessed (Figure 3). In both cases, no adverse effect on cell viability was observed using the resazurin assay, and light microscopy confirmed robust growth and normal morphology for all doses (Figure 4). Our results are in line with results from previous studies by Bayer et al., who found that AlgL from *Bacillus circulans* shows no cytotoxic effect when added intravenously to rabbits [44]. On the other hand, this research differs significantly from the findings conducted by Redman et al., who find out the cytotoxicity effect of algae-origin AlgL against fibroblast cell line CCD110 and human epithelial cell line

after 3 h treatment [43]. Despite the fact that, in this work, it was found that recombinant AlgL from *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 has no cytotoxic potential, additional research on human cells is necessary to make it suitable for biomedical application.

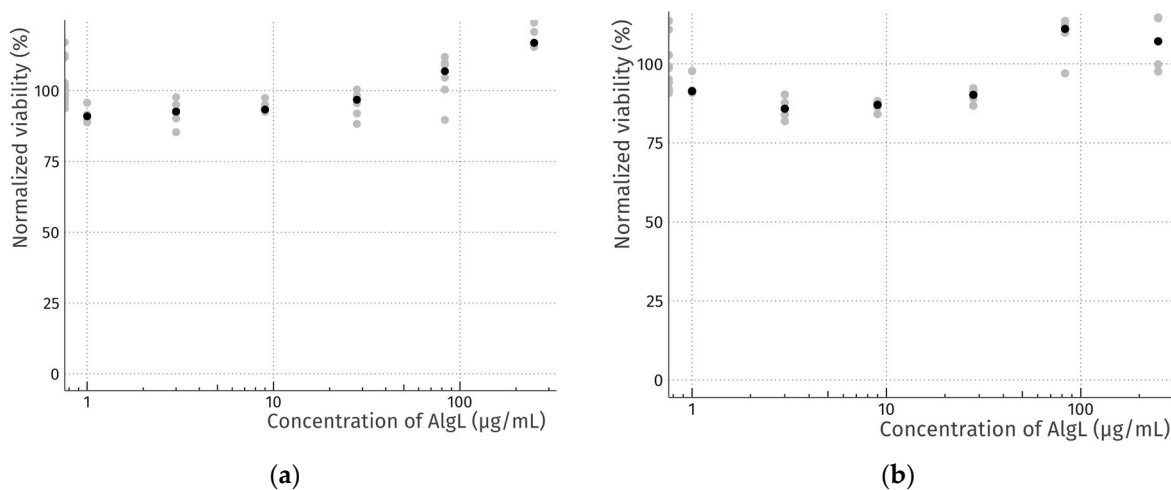


Figure 3. Cell viability of L929 murine fibroblasts exposed to a range of concentrations of recombinant AlgL for 24 h (a) and 48 h (b). Data were normalised to vehicle control (PBS). Grey dots represent technical replicates, and black dots indicate medians.

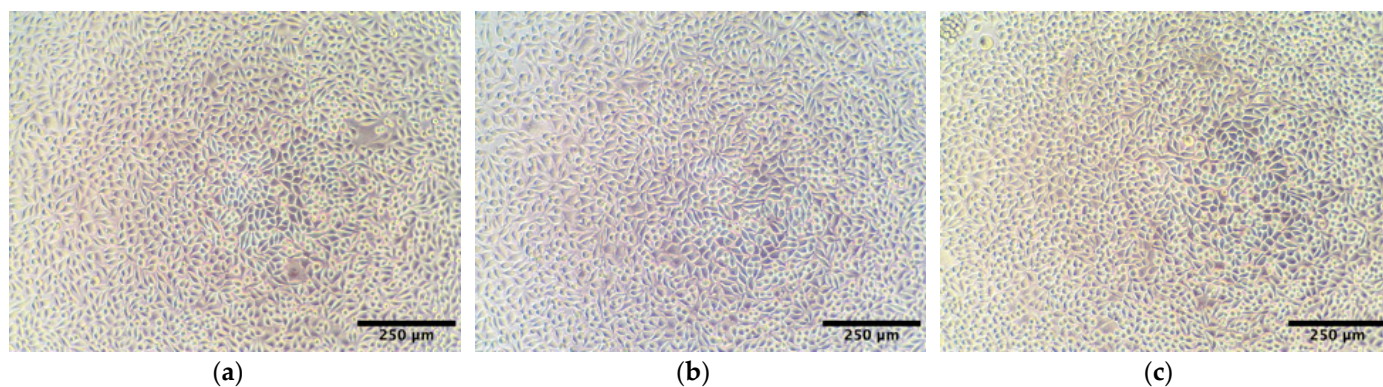


Figure 4. Morphology of L929 cells of non-treated cells (a) and incubated with AlgL (250 µg/mL) for 24 h (b) and 48 h (c).

2.4. Immobilisation of AlgL on BC Pellicles

One of the simplest methods of enzyme immobilisation is adsorption on the surface of the carrier. The adsorption mechanism is based on weak bonds such as Van der Waal's forces and electrostatic and hydrophobic interactions. The immobilisation by adsorption is an economical process that does not require specialised reagents. Moreover, due to the lack of functionalisation of the carrier and mild conditions of the process, it usually does not significantly influence the enzyme's activity and stability [45]. Figure 5a shows the electrostatic surface potential of AlgL at pH 7.4. The catalytic active centre of AlgL is characterised by an electropositive potential that is a consequence of accommodation to negatively charged alginate surface coming from the carboxyl group of glucuronic and mannuronic acid [46]. The remaining areas of the protein surface are largely interspersed with both electropositive and electro-negative patches. The ζ -potential of BC depends on the solution pH, and is shown in Figure 5b. BC has positive ζ -potential in an acidic condition at pH 3.0 and negative ζ -potential at pH values from 4.0 to 8.0, with the isoelectric point at pH 3.4 where ζ -potential is equal to zero. The reason for the low isoelectric point and plateau region in the alkaline pH range is the presence of acidic -OH groups on the BC

surface. The plateau observed at high pH values is the result of a complete dissociation of the acid functional groups, and thus, the BC surface is negatively charged [47].

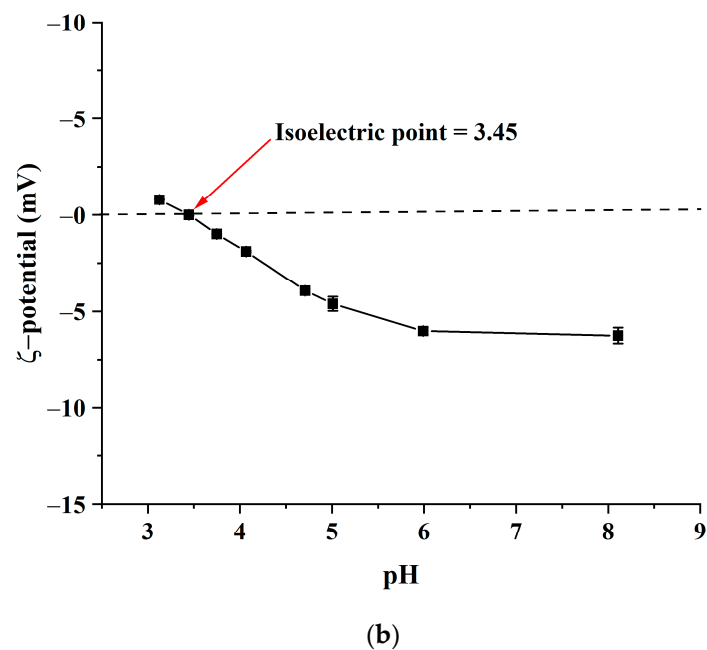
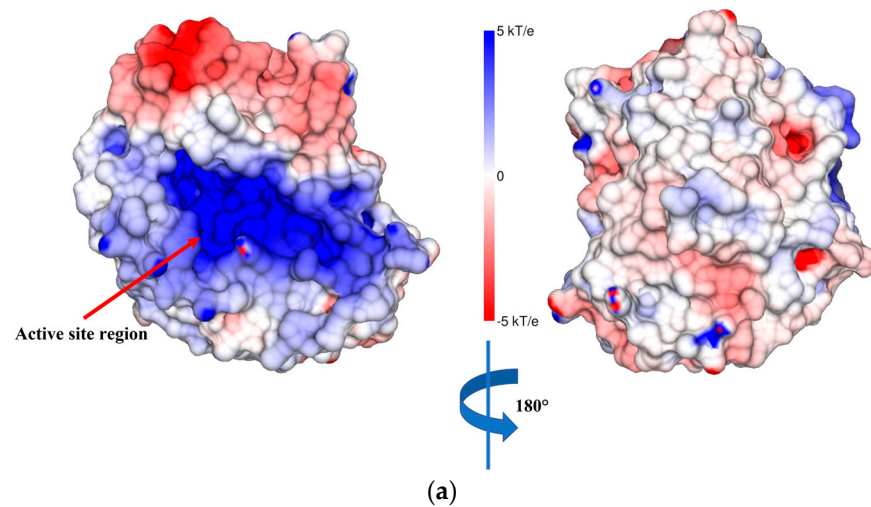


Figure 5. Distribution of electrostatic potential on the molecular surface of AlgL protein (PDB:4OZV) [48] (a). The potential was [49] calculated according to the predicted by using the PROPKA server the pK values of titratable amino acid. The electrostatic potential was calculated with the assumption of environment pH 7.4 using an APBS solver via a PDB2PQR server. The results of the calculation were analysed with the UCSF Chimera 1.13.1rc package [50]. The ζ -potential of BC membranes depends on the pH of the solution (b).

Figure 6a shows the effect of the initial concentration of AlgL (mg/g of dry BC) on the adsorption on BC membranes at pH 7.4. The results show that the amount of AlgL absorbed increases with an increasing concentration of the protein and then tends to level off. The maximum amount of AlgL absorbed on BC was 6.0 mg/g of dry BC. Figure 6b shows the effect of time on the amount of AlgL adsorbed per gram of BC at pH 7.4. As shown, the adsorption of the AlgL sharply increases during the first 60 min. The equilibrium is reached after 2 h of the adsorption process.

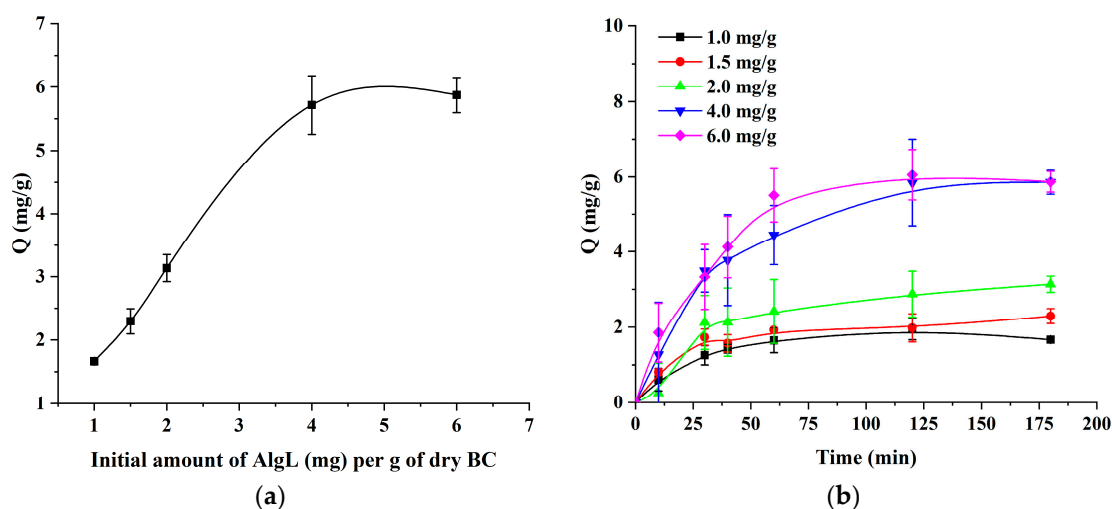


Figure 6. (a) The effect of different AlgL concentrations on the adsorption on BC. (b) The effect of time on the amount of AlgL adsorbed onto BC.

2.5. Adsorption Kinetics

To elucidate the mechanism of AlgL adsorption onto BC membranes, the Langmuir and Freundlich isotherm models were utilised. The Langmuir isotherm theory assumed that the adsorbate could form a monolayer of molecules on a homogenous surface and interact with adsorption sites, and the likelihood of increased adsorption increases with the available surface. In contrast to the Langmuir isotherm model, the Freundlich model describes multilayer adsorption on heterogeneous surfaces, and the stronger binding sites on the support are occupied first, and the binding strength decreases with increasing occupied sites [51–53]. The adsorption isotherms of AlgL were determined by the adsorption experiment at 25 °C using 50 mM phosphate buffer at pH 7.4 as media. The Langmuir and Freundlich constants and value of R^2 for the AlgL adsorption on BC membranes are listed in Table 1 while the linear fitting of both adsorption isotherm models is presented in Figure 7. According to these data calculated by the Langmuir isotherm model, the maximum monolayer coverage capacity (q_m) and the Langmuir isotherm constant (b) were 45.79 mg/g and 0.0009 L/mg, respectively. The R_L value for the different concentrations of AlgL immobilised on BC membranes is shown in Figure 8. For all tested AlgL amounts, the R_L value is below 1, which indicates that the adsorption was more favourable for a higher initial concentration of AlgL. The affinity between the adsorbate and adsorbent is determined by the separation factor (R_L); when this value is between 0 and 1, the Langmuir isotherm model is observed to be favourable [54,55]. For the Freundlich isotherm model, the adsorption capacity (K_f) and adsorption intensity ($1/n$) were 1.28 (L/g) and 0.62, respectively. The correlation coefficient shown, that the Langmuir isotherm represents a better fit of experimental data than Freundlich isotherm (Table 1) and indicated that the adsorption was the main reason for AlgL immobilisation on BC [56].

Table 1. Langmuir and Freundlich isotherms constants and values of R^2 for the adsorption of AlgL on BC membranes.

Langmuir Isotherm			Freundlich Isotherm		
b (L/mg)	q_m (mg/g)	R^2	K_f (L/g)	$1/n$	R^2
0.009	45.79	0.9984	1.28	0.62	0.9596

b —Langmuir constant, q_m —maximum adsorption capacity, K_f —Freundlich isotherm constant, $1/n$ —adsorption intensity.

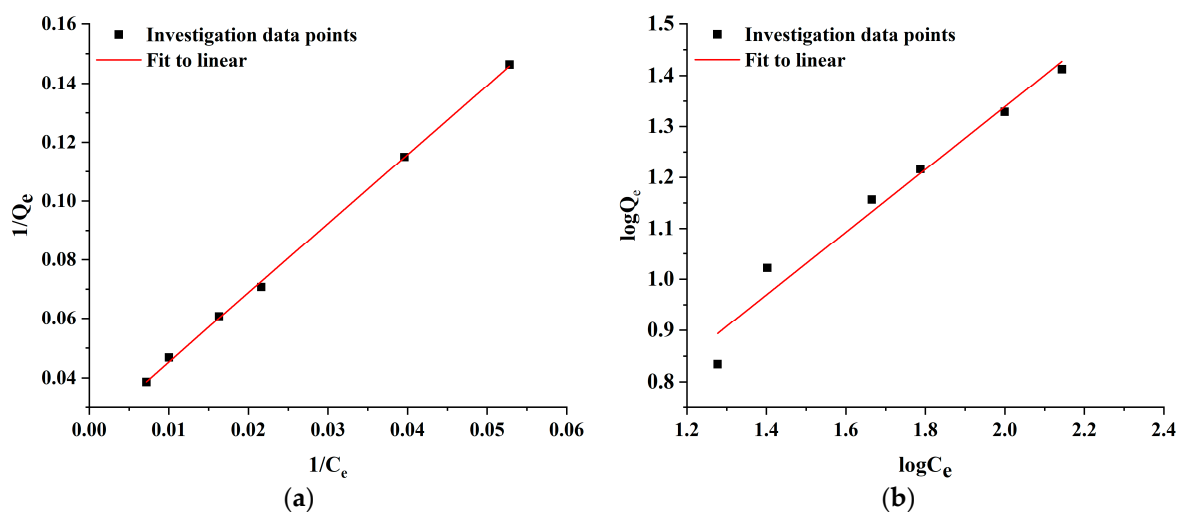


Figure 7. The linear fitting of Langmuir isotherm model (a) and Freundlich isotherm model (b) for adsorption kinetics.

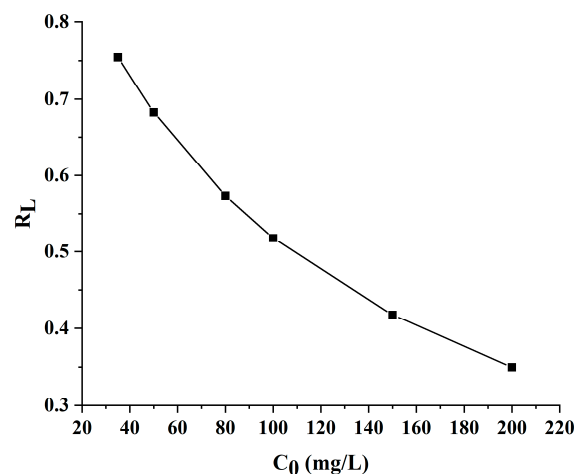


Figure 8. Separation factor R_L for the adsorption of AlgL on BC.

2.6. Analysis of the AlgL Influence on the Biofilm Development on BC Surface by ATR-FTIR

The *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm formed on BC membranes with immobilised AlgL was analysed using ATR-FTIR. To investigate the detailed differences between the impact of immobilised AlgL on biofilm formation on BC membranes, 2D correlation analysis was applied. The synchronous map (Figure 9a) revealed four major auto-bands on the diagonal position at 990 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} , 1145 cm^{-1} , and 1509 cm^{-1} . The most intensive changes in the bands' intensity were found for the autoband at 990 cm^{-1} , followed by 1030 and 1146 cm^{-1} and 1509 cm^{-1} . The presence of the band around 990 cm^{-1} is indicative of O-CH₃ stretching from polysaccharide units. The band at 1030 cm^{-1} is assigned to C-O-C group vibrations in the cyclic carbohydrate structure. The absorption band at 1145 cm^{-1} corresponds to C-O-C stretching vibration from phospholipids and saccharides in the biofilm, while the auto-band with low intensity at 1509 cm^{-1} is assigned to C=O stretching [57–61]. In addition, a set of positive cross bands 990 cm^{-1} vs. 1145 cm^{-1} , 1030 cm^{-1} vs. 1145 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1030 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 940 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1110 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1130 cm^{-1} , 940 cm^{-1} vs. 1030 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1230 cm^{-1} was visible. The strongest negative cross bands were found for 990 cm^{-1} vs. 1509 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1395 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 1230 cm^{-1} , 990 cm^{-1} vs. 940 cm^{-1} . The observed bands, especially negative cross bands, indicate on changes in proportion between the polysaccharide components of the biofilm matrix and probably increasing amount of eDNA [62,63].

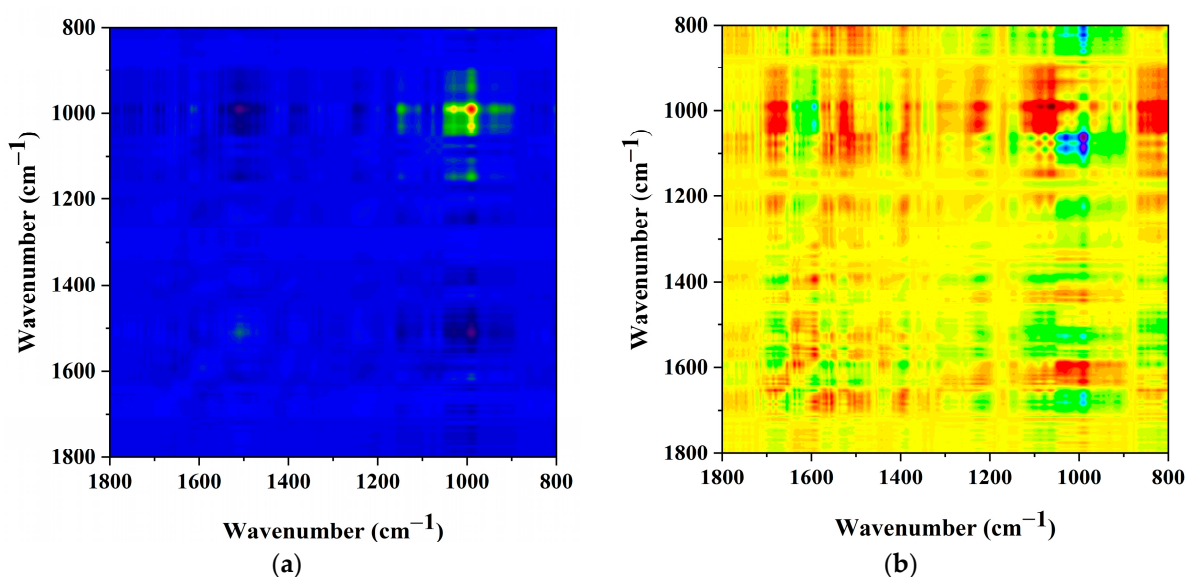


Figure 9. The 2D correlation analysis of the ATR-FTIR spectra with a range of 1800 cm^{-1} to 800 cm^{-1} BC pellicles with immobilised AlgL covered by *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm on its surface ((a), synchronous; (b), asynchronous plots).

Figure 10 shows the 1D ATR-FTIR spectra of biofilm developed by *P. aeruginosa* PAO-1 on BC membranes with immobilised AlgL (6.0 mg/g of dry BC) and control BC without the enzyme. The spectral region in the wavenumber range of 1800–800 cm^{-1} was examined, which includes spectral bands corresponding to chemical species indicating the significant components of microbial biofilm (protein and nucleic acids ~1600–1180 cm^{-1} , polysaccharides ~1200–900 cm^{-1}) [12]. The most significant changes were observed in the region between 1200–900 cm^{-1} , which can be assigned mainly to the symmetric stretching vibration of PO_2^- groups in nucleic acids and a set of bands specific for C-O and C-O-P stretching vibrations of various oligo- and polysaccharides [64,65]. To investigate further possible changes in the protein, lipids, and carboxyl group components of the *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm, the ratio between the bands 1530 cm^{-1} /1450 cm^{-1} (Figure S1a) and 1230 cm^{-1} /1395 cm^{-1} was analysed (Figure S1b). The ratio between the band 1530 cm^{-1} , which is assigned to amide II and marking accumulation of biofilm biomass, and the band 1450 cm^{-1} representing CH_2 bending in lipids show no significant changes between this component of biofilm (Figure S1a). No significant changes were also observed in the case of the ratio between band 1230 cm^{-1} assigned to P=O stretching of $>\text{PO}_2^-$ of phosphodiester of nucleic acids and 1395 cm^{-1} symmetric stretching C-O of the carboxylate group (COO^-) (Figure S1b). In contrast, the ratio between the bands 1230 cm^{-1} and 1040 cm^{-1} indicated that the application of AlgL increased the phospholipid, LPS, and nucleic acid content while the polysaccharide content decreased (Figure 11a). Moreover, the band ratio between 1530 cm^{-1} and 1230 cm^{-1} , assigned to amide II and amide III, respectively, shows that the immobilisation of AlgL slightly influences on protein and nucleic acids contents in biofilm formed on BC membranes. As shown in Figure 11b, it was observed that the application of the highest tested concentration of AlgL resulted in a slight decrease in the amount of proteins while the amount of nucleic acids increased.

2.7. Synergistic Effect of AlgL and Gentamicin

The use of biofilm-dispersing enzymes such as AlgL as an adjuvant which acts by degradation of the extracellular polymer matrix (EPS) surrounding the bacterial cells in biofilm, leads to an increase in their susceptibility to antibiotics and immune cells [66]. As previously reported, the use of AlgL increases the susceptibility of *P. aeruginosa* to various types of antibiotics such as tobramycin, ciprofloxacin [26,67,68], gentamicin, ceftazidime, piperacillin, amikacin [29,69]. From a large variety of different types of antibiotics, amino-

glycoside antibiotics, despite the increase in the number of strains showing resistance to at least one clinically used one, are still the most commonly used in the treatment of infections caused by gram-negative bacteria, including *P. aeruginosa*. Unfortunately, high doses of these antibiotics result in the appearance of many toxic effects, such as nephrotoxicity, ototoxicity, or neuromuscular toxicity [70–72].

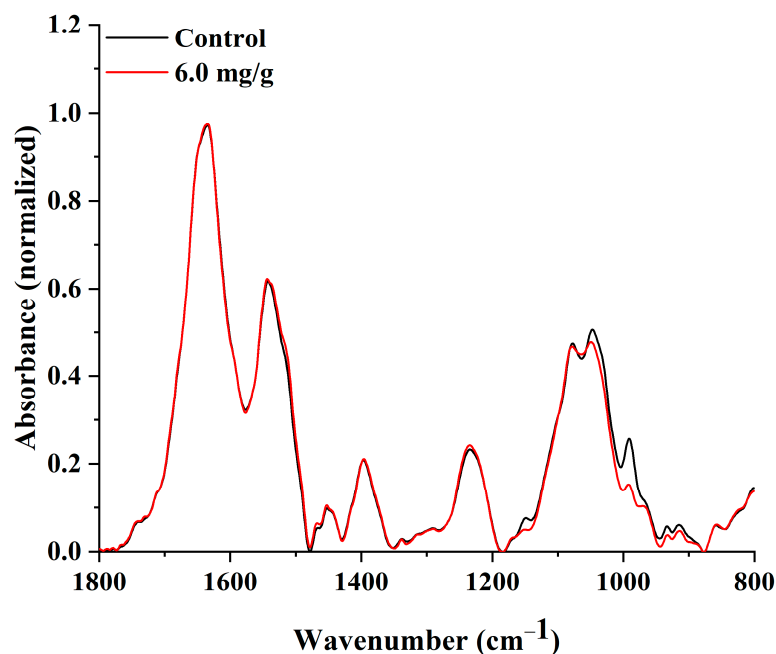


Figure 10. The ATR-FTIR spectra of biofilm of *P. aeruginosa* PAO-1 formed of BC membranes with immobilised AlgL (6.0 mg/g of dry BC) and native BC as a control.

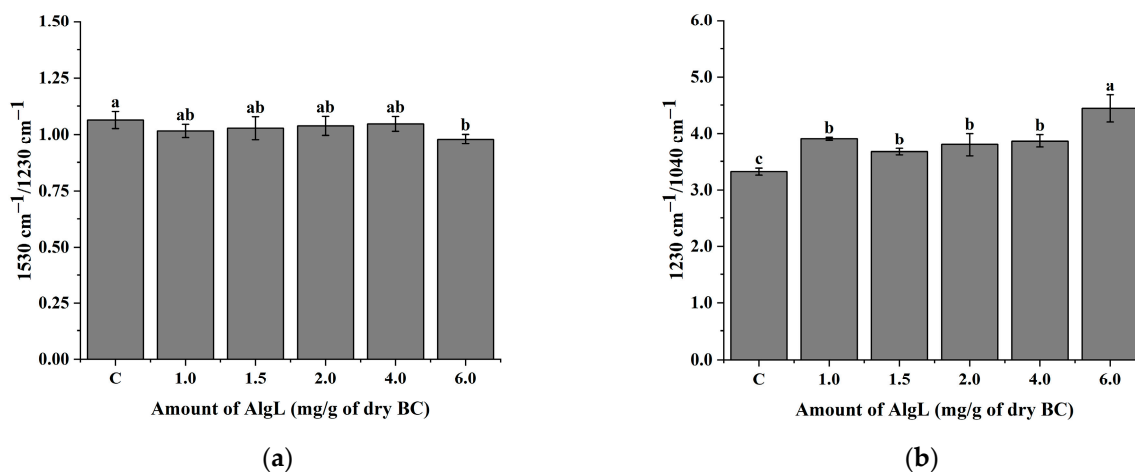


Figure 11. The relative changes in the band ratio, $1530\text{ cm}^{-1}/1230\text{ cm}^{-1}$ (a) and $1230\text{ cm}^{-1}/1040\text{ cm}^{-1}$ (b). The means with the same superscript (a, b) are not significantly different, with $p > 0.05$. Error bars represent standard deviation.

In these studies, due to the risk of using high doses of aminoglycoside antibiotics the synergistic effects of gentamicin as a representative bactericidal agent immobilised together with AlgL on BC membranes was investigated. The concentration of gentamicin was selected based on the determined MIC value by preparing a wide range of gentamicin concentrations from 1.0 to 0.062 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As shown in Figure S2 for *P. aeruginosa* PAO-1, the MIC value of gentamicin was 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For this reason, a concentration equal to 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and two concentrations below the MIC value were selected for immobilisation,

whereas AlgL concentration was selected according to the results from ATR–FTIR that showed a significant impact of enzyme immobilisation on the EPS structure of biofilm formed on the BC pellicles surface. The total amount of *P. aeruginosa* cells released from BC membranes with immobilised gentamicin and AlgL is shown in Figure 12a. The number of bacterial cells realised from BC with immobilized AlgL was only slightly lower compared to biofilm formed on control BC and any effect on their vitality was not observed Figure 12b. It was noted that the application of gentamicin alone in the concentration of 1.0 µg/mL and 0.5 µg/mL and in combination with AlgL did not show significant changes in the number of *P. aeruginosa* PAO-1 cells, which may suggest that the concentrations of gentamicin used were too high to see any changes. However, in the case of a gentamicin concentration equal to 0.25 µg/mL, a significantly lower number of cells was observed in the case of the combination of enzyme and antibiotic. Therefore, it could be concluded that AlgL disturbs the biofilm matrix development, that results in the reduction of the protective barrier against antibiotics and a visible significant reduction of cell proliferation rate. To further investigate the effect of the enzyme and the antibiotic, the cells were stained with the live–dead method. Figure 12b presents results of live and dead staining of *P. aeruginosa* PAO-1 cells dispersed from biofilm formed on BC. The results show that non-treated samples and samples with immobilised only AlgL did not affect the number of dead cells. Furthermore, the use of gentamicin in the concentration of 1.0 µg/mL in combination with AlgL does not exhibit a statistically significant difference compared to the sample treated with gentamicin only. Whereas after using the gentamicin at a concentration of 0.5 µg/mL and AlgL, it was observed increased over 30% the number of dead *P. aeruginosa* PAO-1 cells compared to the sample treated with gentamicin only. However, the best effect of simultaneous immobilisation of gentamicin and AlgL was observed at a concentration of 0.25 µg/mL of the antibiotic, where the use of the antibiotic alone did not affect the viability of *P. aeruginosa* PAO-1 cells, while in combination with the AlgL, 86.5% dead cells were observed.

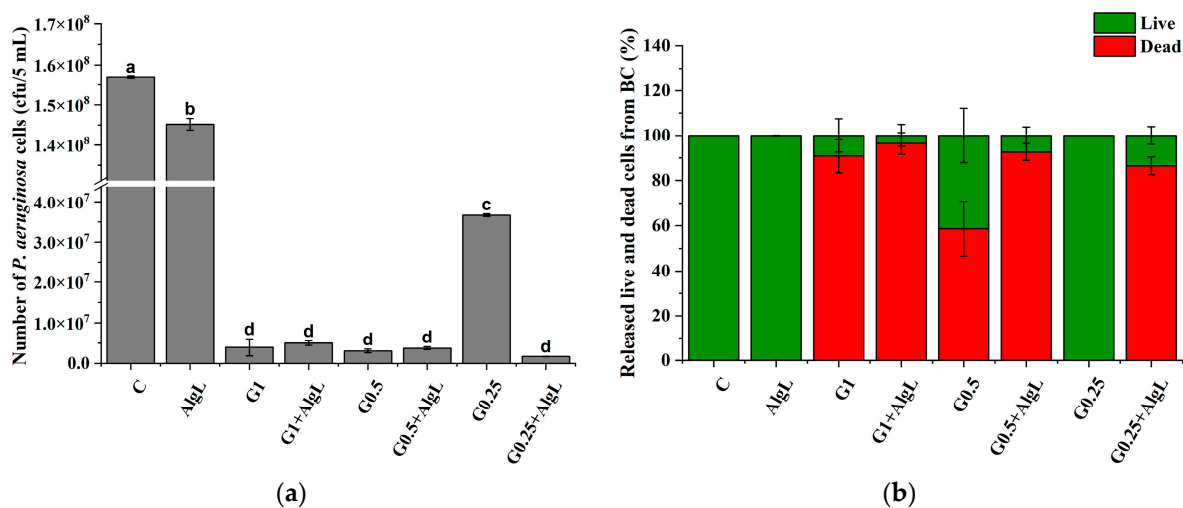


Figure 12. Amount of the *P. aeruginosa* PAO-1 cells (a) and the percentage of the live and dead cells of *P. aeruginosa* PAO-1 (b) released from BC with immobilised AlgL (0.2 mg/mL) and gentamicin (0.25–1 µg/mL) (b). The means with the same superscript (a–d) are not significantly different, with $p > 0.05$. Error bars represent standard deviation.

3. Materials and Methods

3.1. Cloning and Expression of AlgL from *P. aeruginosa* PAO-1

Recombinant alginate lyase was prepared according to a previously described protocol in [12] used for recombinant PelA_h hydrolase with slight modifications. The alginate lyase *algL* cDNA (GenBank ID AAG06935.1) was amplified from the genomic DNA of *P. aeruginosa* PAO-1, with omission predicted by SignalP 5.0 server signal peptide sequence

region. The pET28a (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was used as a vector DNA template. Insert and vector was amplified using the primers listed in Table S1 and Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) by polymerase chain reaction. PCR amplified insert and vector DNA was then treated with DpnI for one hour at 37 °C. Next, the *algL* gene was assembled with the pET28a (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) expression vector using the SLiCE method [73]. For the protein expression, *Escherichia coli* DH5 α cells (New England Biolabs) were transformed with a prepared construct. Routinely, to ensure that the selected clones harbour the correct construct, the colony polymerase chain reaction was carried out using primers specific to the T7 promoter and terminator (T7-fwd and T7_rev) that flanking insertion site (Table S1). The reaction was performed using GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), and products were analysed by agarose gel electrophoresis. After confirmation, the construct was transformed into chemically competent *E. coli* BL-21 (DE3) (New England Biolabs) cells. *E. coli* BL-21 (DE3) cells harbouring the expression vector were grown in 1 L of LB medium containing kanamycin (50 μ g/mL) at 37 °C. When OD₆₀₀ reached 0.5–0.6, protein expression was induced by the addition of IPTG to a final concentration of 0.1 mM. Afterwards, the cells were incubated overnight at 16 °C with shaking at 200 rpm. After overnight incubation, cells were harvested by centrifugation at 4000 \times g for 25 min at 4 °C and pellets were washed twice with washing buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole) and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl). The cells were disrupted with a sonicator (Bandelin, Sonoplus) and then centrifuged for 30 min at 4 °C and 9000 \times g. The recombinant protein was purified by nickel-based IMAC using cOmplete His-Tag Purification Resin (Roche) preequilibrated with washing buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole). A column with loaded protein was washed with a washing buffer, and expressed protein was eluted with elution buffer (20 mM Tris–HCl pH 8.0, 300 mM NaCl). The eluted fractions were concentrated to around 1.5 mL volume using an Amicon[®] Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) with a 10 kDa cut-off. To check the purity of the obtained protein and molecular mass estimation, the SDS-PAGE analysis was performed. The protein concentration was measured by UV absorbance at 280 nm using a Take3 microvolume plate and a Biotek Synergy HT plate reader (BioTek, Santa Clara, CA, USA).

3.2. Operational Properties of Recombinant AlgL

3.2.1. Determination of the Activity of Alginate Lyase

For the determination of the activity of AlgL, sodium alginate (Fluka, Buchs, Switzerland) at a concentration of 0.2% (*w/v*) in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) was used as a substrate. A total of 290 μ L heated to 30 °C of substrate solution was transferred to 96-well UV transparent polystyrene microtiter plates (Greiner, Frickenhausen, Germany), and 10 μ L of enzyme solution was added before starting the reaction. Next, the absorbance change at 235 nm for 5 min with 30 s intervals was measured using Tecan Infinite 200 Pro microplate reader at 30 °C. One unit of AlgL was an increase in 1.0-unit absorbance at 235 nm per minute per mL of 0.2% sodium alginate solution at assay condition. The enzyme activity was expressed as units per mg protein. The results were the average of three biological replicates and three technical replicates.

3.2.2. Temperature Optimum and Thermal Stability Determination

The temperature optimum of AlgL was measured at 30, 40, 50, 60, 70, and 80 °C. Prior to adding, the substrate solution was incubated at given temperatures for 5 min to obtain suitable temperatures. The reaction of measurement of AlgL activity was carried out as mentioned above. The activity was expressed in relative terms, taking the highest activity at a given temperature of 100%. For determination of the thermal stability of the AlgL enzyme was stored at 4 °C and 37 °C for 30 days in 50 mM phosphate buffer (pH 7.0). The measurement of AlgL activity was carried out as mentioned above. The residual activity of AlgL was expressed in relative terms, taking initial activity as 100%.

3.3. Anti-Biofilm Activity Assays of AlgL

The biofilm inhibition and eradication were tested based on previously described methods with slight modification [9,74]. *P. aeruginosa* PAO-1 were obtained from the collection of the Department of Microbiology and Biotechnology of the West Pomeranian University of Technology in Szczecin. *P. aeruginosa* PAO-1 inoculum was prepared in TSB medium and incubated for 18 h at 37 °C on a shaker at 160 rpm. The inoculum was adjusted to 0.5 of the McFarland scale and then diluted 1:1000 in TSB medium supplemented with 1% glucose. For biofilm inhibition assay, 95 µL of diluted culture was transferred to sterile 96-well polystyrene microtiter plates, and 5 µL of alginate lyase at a final concentration of 0.8, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, and 25.0 µg/mL was added. The plates were incubated statically for 24 h at 37 °C. The nonadherent cells were removed by flushing three times in deionised water, and the biofilm was stained with 0.1% (*w/v*) crystal violet for 10 min. The excess of dye was removed by flushing with deionised water. Finally, the dye was solubilised in 96% (*v/v*) ethanol for 10 min., and the absorbance was measured by Tecan Infinite 200 Pro microplate reader at 595 nm. For biofilm eradication assay, 100 µL of *P. aeruginosa* PAO-1 culture was transferred to sterile 96-well polystyrene microtiter plates and incubated statically for 24 h at 37 °C. After incubation, the culture was gently removed, and the attached biofilm was rinsed three times in deionised water to remove nonadherent cells. Each well was filled with alginate lyase diluted in PBS buffer to a final concentration of 0.8, 1.6, 3.2, 6.25, 12.5, and 25.0 µg/mL and incubated at 37 °C for 1 h. Biofilm staining was prepared as described above. All experiments were carried out in triplicate.

3.4. AlgL Cytotoxicity Assay

To screen for any potential cytotoxicity of the recombinant AlgL enzyme towards mammalian subcutaneous cells, *in vitro* dose–response experiments were carried out using murine L929 fibroblasts, as described in our previous work [12]. Briefly, cells, passages 10–25, were maintained in Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) containing 10% foetal bovine serum (FBS), 2 mM L- glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/mL streptomycin. L929 cell line and all cell culture reagents were purchased from Merck (Poznań, Poland), while all plasticware was purchased from VWR (Gdańsk, Poland). For the dose–response assays, two 96-well plates were seeded in parallel: one with 10,000 cells per well for a 24 h experiment and one with 5000 cells per well for a 48 h experiment. After 24 h of culture, the media in both plates was aspirated and replaced with serial, threefold dilutions of recombinant AlgL or vehicle control (PBS) (4–6 technical replicates). The enzyme was prepared as a sterile, 2 mg/mL stock in PBS and was diluted 1:8 with media to yield the highest tested dose, 250 µg/mL. After incubation for 24 or 48 h, cell viability was assessed using an inverted light microscope (Delta Optical IB-100, Mińsk Mazowiecki, Poland) and resazurin cell viability assay [75].

3.5. Preparation of BC

The BC production was conducted as previously described [76]. Hestrin–Shramm (HS) (glucose 20 g/L, yeast extract 2.0 g/L, peptone 2 g/L, citric acid 1.15 g/L, Na₂HPO₄ 2.7 g/L, and MgSO₄ × 7H₂O 0.06 g/L supplemented with 1% ethanol and 0.01% of silicone polyether surfactant) medium was inoculated with 1-week-old starter culture of *K. xylinus* ATCC 53524. The cultivation was carried out in 24-well plates at 28 °C for 4 days. Following cultivation, the synthesised BC membranes were collected and rinsed in dH₂O for 24 h. The next day, BC membranes were digested with 0.1 M NaOH at 80 °C (3×) to remove bacterial cells and residual medium components. Finally, BC membranes were rinsed again in dH₂O until the pH was stabilised and sterilised by autoclaving at 121 °C for 15 min. The prepared BC membranes were stored at 4 °C before further analysis.

3.6. Zeta Potential of BC Membranes Determination

The isoelectric point (pH(I)) and pH-dependent zeta potential of the BC membranes was measured using SurPASS™ 3 analyser (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). The

0.001 M KCl solution in ultrapure water was applied as an electrolyte, while the pH was adjusted using HCl and KOH standardised solutions.

3.7. Adsorption Experiment

The adsorption of AlgL on BC nanofibers was established according to [12] with slight modification. AlgL in concentrations from 0.2 mg/mL to 0.035 mg/mL were prepared in 50 mM phosphate buffer (pH 7.5). 5 mL of enzyme solution were incubated with ~0.035 g of wet BC membranes for 240 min at 25 °C with mixing. In the first hour, 100 µL samples were taken every 10 min. Then, the samples were collected every hour. Protein concentration was measured using a microplate reader with Greiner UV-star 96 well plates at 280 nm and calculated according to Lambert–Beer's Law using molecular extinction coefficient (67,630 (M⁻¹cm⁻¹)):

$$Q_e = \frac{(C_0 - C_e) * V}{W} \quad (1)$$

where C_0 is the initial and equilibrium concentration of AlgL (mg/mL), C_e is the equilibrium concentration of AlgL (mg/mL), V is the volume of solution (mL), and W is the wet mass of BC membranes (g).

3.8. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) Determination

To determine MIC, doubling serial dilutions of gentamicin in MHB (Mueller Hinton Broth) were set up in 96-well microtiter plates, starting with 100 µL gentamicin and 100 µL *P. aeruginosa* PAO-1 inoculum adjusted to 0.5 of the McFarland scale and then diluted 1:100 in MHB. The positive control consisted of 100 µL inoculum and 100 µL MHB, while the negative controls consisted of 100 µL MHB only. Each set of tests and controls was set up with three replicates. The microtiter plate was incubated for 24 h at 37 °C. After incubation, the optical density of the microbial growth was determined at 600 nm using a microplate reader Tecan Infinite m200pro. The results are expressed as the average of three replicates. The MIC value was defined as the concentration of the ionic liquid that inhibited the growth of the microorganism by at least 90%.

3.9. Biofilm Development Analysis on BC Membranes with Immobilised Alginate Lyase

The ability of *P. aeruginosa* PAO-1 to grow and form biofilm on BC with immobilised AlgL was analysed according to [12,77]. To analyse the changes in the biofilm matrix on BC membranes, attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy was used. BC samples with formed biofilm on their surface were dried at room temperature for 24 h before analysis. The analysis was conducted using an FTIR spectrophotometer ALPHA II (Bruker Co., Ettlingen, Germany) with a diamond ATR adapter. The spectra were collected in the range 4000–400 cm⁻¹ with a resolution of 2 cm⁻¹ (32 scans). The obtained ATR-FTIR spectra were analysed using SpectraGryph 1.2 software. From each spectrum, the baseline was removed, and then spectra were normalised to the area of the band at the amide II region (≈1530 cm⁻¹). The preprocessed spectra were used for 2D correlation spectroscopy analysis using OriginPro2021. Next, the significant cross bands were selected and evaluated according to the ratio between the area of bands depending on the amount of immobilised AlgL.

3.10. Assessment of Antibiotic Susceptibility by Flow Cytometry Method

AlgL in a concentration of 0.2 mg/mL and gentamicin sulphate salt (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) in a concentration in the range of 0.25–1.0 µg/mL were immobilised on BC membranes, as mentioned above. Next, the overnight culture of *P. aeruginosa* PAO-1 was normalised to 0.5 MacFarland scale and diluted 1:100 in TSB medium supplemented with 1% of glucose. Following the 50 µL of prepared bacterial suspension was spread on the surface of BC membranes with immobilised AlgL and gentamicin and incubated at 37 °C for 24 h. After incubation, BC membranes were rinsed in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) to remove the nonadherent cell, rinsed again in 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)

and vortexed three times for 1 min. Next, the solution with released bacterial cells was centrifuged for 10 min at 6000 rpm and rinsed in 1 mL of 50 mM phosphate buffer (pH 7.4). The live/dead staining was done using SYTO 9 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and propidium iodide (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. The number of live and dead bacterial cells released from one BC membrane was assessed using a BD Accuri C6 Plus flow cytometer.

3.11. Statistical Analysis

Statistical analyses were conducted using OriginPro2021. The statistical significance differences of means were tested by Tukey's multiple comparison test, and statistical significance was considered with $p < 0.05$.

4. Conclusions

Bacterial cellulose has been found to be an ideal material for wound dressing applications. In its wet state, it meets all the conditions that an ideal dressing should have, such as high tensile strength, flexibility, good water-holding capacity, biodegradability, and biocompatibility. Moreover, the highly porous structure of BC, due to the presence of numerous hydroxyl groups, allows for the immobilisation of various compounds on its surface, giving BC new unique properties [41,78]. In this work, the potential of BC membranes as a carrier for simultaneous immobilisation of AlgL purified from *P. aeruginosa* PAO-1 and gentamicin for wound dressing applications was investigated. The use of alginate, an enzyme that catalysed degradation of alginate, an essential component of the biofilm matrix of mucoid *P. aeruginosa* strains, resulted in the inhibition of exopolysaccharides formation by a tested strain of *P. aeruginosa* PAO-1 on BC membranes. This allowed the gentamicin present in the dressing to be more effective against *P. aeruginosa* cells, even at a very low dose. To sum up, this innovative dressing material may be a solution to the widespread overuse of antibiotics and, consequently, the problem of antibiotic resistance that has been growing for years.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms24054740/s1>.

Author Contributions: Conceptualisation, M.C. and R.D.; methodology, M.C. and R.D.; formal analysis, R.D.; investigation, M.C., K.P., S.M., P.S. and A.Ž.; data curation, M.C.; writing—original draft preparation, M.C., R.D. and M.Š.; writing—review and editing, M.C., B.G., P.S. and R.D.; visualisation, M.C.; supervision, R.D.; project administration, R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Brindhadevi, K.; LewisOscar, F.; Mylonakis, E.; Shanmugam, S.; Verma, T.N.; Pugazhendhi, A. Biofilm and quorum sensing mediated pathogenicity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Process Biochem.* **2020**, *96*, 49–57. [CrossRef]
2. Gebreyohannes, G.; Nyerere, A.; Bii, C.; Sbhata, D.B. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon* **2019**, *5*, e02192. [CrossRef]
3. Wright, G.D. Antibiotic adjuvants: Rescuing antibiotics from resistance. *Trends Microbiol.* **2016**, *24*, 862–871. [CrossRef]
4. Haghi, F.; Zeighami, H.; Monazami, A.; Toutouchi, F.; Nazaralian, S.; Naderi, G. Diversity of virulence genes in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wound infections. *Microb. Pathog.* **2018**, *115*, 251–256. [CrossRef]
5. Thi, M.T.T.; Wibowo, D.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8671. [CrossRef]

6. Brandenburg, K.S.; Calderon, D.F.; Kierski, P.R.; Brown, A.L.; Shah, N.M.; Abbott, N.L.; Schurr, M.J.; Murphy, C.J.; McAnulty, J.F.; Czuprynski, C.J. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on wound dressings. *Wound Repair Regen.* **2015**, *23*, 842–854. [[CrossRef](#)]
7. Sadekuzzaman, M.; Yang, S.; Mizan, M.; Ha, S.D. Current and recent advanced strategies for combating biofilms. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2015**, *14*, 491–509. [[CrossRef](#)]
8. Li, Y.; Li, X.; Hao, Y.; Liu, Y.; Dong, Z.; Li, K. Biological and physiochemical methods of biofilm adhesion resistance control of medical-context surface. *Int. J. Biol. Sci.* **2021**, *17*, 1769–1781. [[CrossRef](#)]
9. Baker, P.; Hill, P.J.; Snarr, B.D.; Alnabelseya, N.; Pestrak, M.J.; Lee, M.J.; Jennings, L.K.; Tam, J.; Melnyk, R.A.; Parsek, M.R.; et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilised to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1501632. [[CrossRef](#)]
10. Ghadam, P.; Akhlaghi, F.; Ali, A.A. One-step purification and characterisation of alginate lyase from a clinical *Pseudomonas aeruginosa* with destructive activity on bacterial biofilm. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **2017**, *20*, 467–473.
11. Pestrak, M.J.; Baker, P.; Dellos-Nolan, S.; Hill, P.J.; Da Passos Silva, D.; Silver, H.; Lacdao, I.; Raju, D.; Parsek, M.R.; Wozniak, D.J.; et al. Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* glycoside hydrolase PslG combats wound infection by improving antibiotic efficacy and host innate immune activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00234-19. [[CrossRef](#)]
12. Szymańska, M.; Karakulska, J.; Sobolewski, P.; Kowalska, U.; Grygorcewicz, B.; Böttcher, D.; Bornscheuer, U.T.; Drozd, R. Glycoside hydrolase (PelA_H) immobilisation prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *246*, 116625. [[CrossRef](#)]
13. Blanco-Cabra, N.; Paetzold, B.; Ferrar, T.; Mazzolini, R.; Torrents, E.; Serrano, L.; LLuch-Senar, M. Characterization of different alginate lyases for dissolving *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 9390. [[CrossRef](#)]
14. Ghadaksaz, A.; Fooladi, A.A.I.; Mahmoodzadeh Hosseini, H.; Amin, M. The prevalence of some *Pseudomonas* virulence genes related to biofilm formation and alginate production among clinical isolates. *J. Appl. Biomed.* **2015**, *13*, 61–68. [[CrossRef](#)]
15. Xiao, L.; Han, F.; Yang, Z.; Lu, X.; Yu, W. A Novel Alginate lyase with high activity on acetylated alginate of *Pseudomonas aeruginosa* FRD1 from *Pseudomonas* sp. QD03. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 81–88. [[CrossRef](#)]
16. Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2010**, *35*, 322–332. [[CrossRef](#)]
17. Tielen, P.; Kuhn, H.; Rosenau, F.; Jaeger, K.-E.; Flemming, H.-C.; Wingender, J. Interaction between extracellular lipase LipA and the polysaccharide alginate of *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol.* **2013**, *13*, 159. [[CrossRef](#)]
18. Hatch, R.A.; Schiller, N.L. Alginate lyase promotes diffusion of aminoglycosides through the extracellular polysaccharide of mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 974–977. [[CrossRef](#)]
19. Franklin, M.J.; Nivens, D.E.; Weadge, J.T.; Howell, P.L. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, alginate, Pel, and Psl. *Front. Microbiol.* **2011**, *2*, 167. [[CrossRef](#)]
20. Farrell, E.K.; Tipton, P.A. Functional characterisation of AlgL, an alginate lyase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **2012**, *51*, 10259–10266. [[CrossRef](#)]
21. Jain, S.; Ohman, D.E. Role of an alginate lyase for alginate transport in mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **2005**, *73*, 6429–6436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Xu, F.; Wang, P.; Zhang, Y.-Z.; Chen, X.-L. Diversity of three-dimensional structures and catalytic mechanisms of alginate lyases. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, e02040-17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Zhu, B.; Yin, H. Alginate lyase: Review of major sources and classification, properties, structure-function analysis and applications. *Bioengineered* **2015**, *6*, 125–131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Mahajan, S.; Sunsunwal, S.; Gautam, V.; Singh, M.; Ramya, T.N.C. Biofilm inhibitory effect of alginate lyases on mucoid *P. aeruginosa* from a cystic fibrosis patient. *Biochem. Biophys. Rep.* **2021**, *26*, 101028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Alipour, M.; Suntres, Z.E.; Omri, A. Importance of DNase and alginate lyase for enhancing free and liposome encapsulated aminoglycoside activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2009**, *64*, 317–325. [[CrossRef](#)]
26. Daboor, S.M.; Rohde, J.R.; Cheng, Z. Disruption of the extracellular polymeric network of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by alginate lyase enhances pathogen eradication by antibiotics. *J. Cyst. Fibros.* **2021**, *20*, 264–270. [[CrossRef](#)]
27. Islan, G.A.; Bosio, V.E.; Castro, G.R. Alginate lyase and ciprofloxacin co-immobilisation on biopolymeric microspheres for cystic fibrosis treatment. *Macromol. Biosci.* **2013**, *13*, 1238–1248. [[CrossRef](#)]
28. Li, S.; Wang, Y.; Li, X.; Lee, B.S.; Jung, S.; Lee, M.-S. Enhancing the thermo-stability and anti-biofilm activity of alginate lyase by immobilisation on low molecular weight chitosan nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 4565. [[CrossRef](#)]
29. Mohapatra, B.R. Biocatalytic characteristics of chitosan nanoparticle-immobilised alginate lyase extracted from a novel *Arthrobacter* species AD-10. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2020**, *23*, 101458. [[CrossRef](#)]
30. Montanari, E.; Di Meo, C.; Sennato, S.; Francioso, A.; Marinelli, A.L.; Ranzo, F.; Schippa, S.; Coviello, T.; Bordini, F.; Matricardi, P. Hyaluronan-cholesterol nanohydrogels: Characterisation and effectiveness in carrying alginate lyase. *N. Biotechnol.* **2017**, *37*, 80–89. [[CrossRef](#)]
31. Patel, K.K.; Surekha, D.B.; Tripathi, M.; Anjum, M.M.; Muthu, M.S.; Tilak, R.; Agrawal, A.K.; Singh, S. Antibiofilm potential of silver sulfadiazine-loaded nanoparticle formulations: A study on the effect of DNase-I on microbial biofilm and wound healing activity. *Mol. Pharm.* **2019**, *16*, 3916–3925. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

32. Wan, B.; Zhu, Y.; Tao, J.; Zhu, F.; Chen, J.; Li, L.; Zhao, J.; Wang, L.; Sun, S.; Yang, Y.; et al. Alginate lyase guided silver nanocomposites for eradicating *Pseudomonas aeruginosa* from lungs. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2020**, *12*, 9050–9061. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Portela, R.; Leal, C.R.; Almeida, P.L.; Sobral, R.G. Bacterial cellulose: A versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microb. Biotechnol.* **2019**, *12*, 586–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ahmed, J.; Gultekinoglu, M.; Edirisinghe, M. Bacterial cellulose micro-nano fibres for wound healing applications. *Biotechnol. Adv.* **2020**, *41*, 107549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Asanarong, O.; Minh Quan, V.; Boonrungsiman, S.; Sukyai, P. Bioactive wound dressing using bacterial cellulose loaded with papain composite: Morphology, loading/release and antibacterial properties. *Eur. Polym. J.* **2021**, *143*, 110224. [[CrossRef](#)]
36. Blanco Parte, F.G.; Santoso, S.P.; Chou, C.-C.; Verma, V.; Wang, H.-T.; Ismadji, S.; Cheng, K.-C. Current progress on the production, modification, and applications of bacterial cellulose. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2020**, *40*, 397–414. [[CrossRef](#)]
37. Fatima, A.; Yasir, S.; Khan, M.S.; Manan, S.; Ullah, M.W.; Ul-Islam, M. Plant extract-loaded bacterial cellulose composite membrane for potential biomedical applications. *J. Bioresour. Bioprod.* **2021**, *6*, 26–32. [[CrossRef](#)]
38. Shao, W.; Liu, H.; Wang, S.; Wu, J.; Huang, M.; Min, H.; Liu, X. Controlled release and antibacterial activity of tetracycline hydrochloride-loaded bacterial cellulose composite membranes. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *145*, 114–120. [[CrossRef](#)]
39. Tavafi, H.; Ali, A.A.; Ghadam, P.; Gharavi, S. Screening, cloning and expression of a novel alginate lyase gene from *P. aeruginosa* TAG 48 and its antibiofilm effects on *P. aeruginosa* biofilm. *Microb. Pathog.* **2018**, *124*, 356–364. [[CrossRef](#)]
40. Rezvani Ghomi, E.; Khalili, S.; Nouri Khorasani, S.; Esmaeely Neisiany, R.; Ramakrishna, S. Wound dressings: Current advances and future directions. *J. Appl. Polym. Sci.* **2019**, *136*, 47738. [[CrossRef](#)]
41. Picheth, G.F.; Pirich, C.L.; Sierakowski, M.R.; Woehl, M.A.; Sakakibara, C.N.; de Souza, C.F.; Martin, A.A.; Da Silva, R.; de Freitas, R.A. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2017**, *104*, 97–106. [[CrossRef](#)]
42. Zheng, L.; Li, S.; Luo, J.; Wang, X. Latest advances on bacterial cellulose-based antibacterial materials as wound dressings. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2020**, *8*, 593768. [[CrossRef](#)]
43. Redman, W.K.; Welch, G.S.; Williams, A.C.; Damron, A.J.; Northcut, W.O.; Rumbaugh, K.P. Efficacy and safety of biofilm dispersal by glycoside hydrolases in wounds. *Biofilm* **2021**, *3*, 100061. [[CrossRef](#)]
44. Bayer, A.S.; Park, S.; Ramos, M.C.; Nast, C.C.; Eftekhari, F.; Schiller, N.L. Effects of alginate on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **1992**, *60*, 3979–3985. [[CrossRef](#)]
45. Nguyen, H.H.; Kim, M. An Overview of techniques in enzyme immobilisation. *Appl. Sci. Conver. Technol.* **2017**, *26*, 157–163. [[CrossRef](#)]
46. Xu, F.; Dong, F.; Wang, P.; Cao, H.-Y.; Li, C.-Y.; Li, P.-Y.; Pang, X.-H.; Zhang, Y.-Z.; Chen, X.-L. Novel molecular insights into the catalytic mechanism of marine bacterial alginate lyase AlyGC from polysaccharide lyase Family 6. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 4457–4468. [[CrossRef](#)]
47. Lee, K.-Y.; Quero, F.; Blaker, J.J.; Hill, C.A.S.; Eichhorn, S.J.; Bismarck, A. Surface only modification of bacterial cellulose nanofibres with organic acids. *Cellulose* **2011**, *18*, 595–605. [[CrossRef](#)]
48. Wolfram, F.; Arora, K.; Robinson, H.; Neculai, A.M.; Yip, P.; Howell, P.L. Expression, purification, crystallisation and preliminary X-ray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* AlgL. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* **2012**, *68*, 584–587. [[CrossRef](#)]
49. Olsson, M.H.M.; Søndergaard, C.R.; Rostkowski, M.; Jensen, J.H. PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical pKa predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 525–537. [[CrossRef](#)]
50. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—a visualisation system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)]
51. Anah, L.; Astrini, N. Isotherm adsorption studies of Ni(II) ion removal from aqueous solutions by modified carboxymethyl cellulose hydrogel. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* **2018**, *160*, 12017. [[CrossRef](#)]
52. Kalam, S.; Abu-Khamsin, S.A.; Kamal, M.S.; Patil, S. Surfactant adsorption isotherms: A review. *ACS Omega* **2021**, *6*, 32342–32348. [[CrossRef](#)]
53. Scheufele, F.B.; Módenes, A.N.; Borba, C.E.; Ribeiro, C.; Espinoza-Quiñones, F.R.; Bergamasco, R.; Pereira, N.C. Monolayer-multilayer adsorption phenomenological model: Kinetics, equilibrium and thermodynamics. *J. Chem. Eng.* **2016**, *284*, 1328–1341. [[CrossRef](#)]
54. Fegade, U.; Jethave, G.; Su, K.-Y.; Huang, W.-R.; Wu, R.-J. An multifunction Zn_{0.3}Mn_{0.4}O₄ nanospheres for carbon dioxide reduction to methane via photocatalysis and reused after five cycles for phosphate adsorption. *J. Environ. Chem. Eng.* **2018**, *6*, 1918–1925. [[CrossRef](#)]
55. Goher, M.E.; Hassan, A.M.; Abdel-Moniem, I.A.; Fahmy, A.H.; Abdo, M.H.; El-Sayed, S.M. Removal of aluminum, iron and manganese ions from industrial wastes using granular activated carbon and Amberlite IR-120H. *Egypt. J. Aquat. Res.* **2015**, *41*, 155–164. [[CrossRef](#)]
56. Sadegh, H.; Ali, G.A.; Dodangeh, F.; Nadagouda, M.N. Adsorption of ammonium ions onto multi-walled carbon nanotubes. *Studia UBB Chemia* **2017**, *62*, 233–245. [[CrossRef](#)]
57. Bosch, A.; Massa, N.E.; Donolo, A.; Yantorno, O. Molecular characterisation by infrared spectroscopy of *Bordetella pertussis* G grown as biofilm. *Phys. Stat. Sol.* **2000**, *220*, 635–640. [[CrossRef](#)]
58. Choong, Y.K.; Sun, S.-Q.; Zhou, Q.; Ismail, Z.; Rashid, B.A.A.; Tao, J.-X. Determination of storage stability of the crude extracts of *Ganoderma lucidum* using FTIR and 2D-IR spectroscopy. *Vib. Spectrosc.* **2011**, *57*, 87–96. [[CrossRef](#)]

59. Jaiswal, S.; Mishra, P. Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-silver nanoparticles with improved stability and selective toxicity to bacteria over mammalian cells. *Med. Microbiol. Immunol.* **2018**, *207*, 39–53. [[CrossRef](#)]
60. Ramya, S.; George, R.P.; Rao, R.S.; Dayal, R.K. Detection of algae and bacterial biofilms formed on titanium surfaces using micro-Raman analysis. *Appl. Surf. Sci.* **2010**, *256*, 5108–5115. [[CrossRef](#)]
61. Xu, W.; Song, Z.; Li, Y.; Ding, C.; Chen, H. Effect of DC Corona discharge on *Ammopiptanthus Mongolicus* seeds. *IEEE Trans. Plasma Sci.* **2021**, *49*, 2791–2798. [[CrossRef](#)]
62. Quilès, F.; Humbert, F.; Delille, A. Analysis of changes in attenuated total reflection FTIR fingerprints of *Pseudomonas fluorescens* from planktonic state to nascent biofilm state. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2010**, *75*, 610–616. [[CrossRef](#)]
63. Suci, P.A.; Vraný, J.D.; Mittelman, M.W. Investigation of interactions between antimicrobial agents and bacterial biofilms using attenuated total reflection fourier transform infrared spectroscopy. *Biomaterials* **1998**, *19*, 327–339. [[CrossRef](#)]
64. Naumann, D. Infrared spectroscopy in microbiology. *Encycl. Anal. Chem.* **2000**, *102*, 131.
65. Robert, P.; Marquis, M.; Barron, C.; Guillon, F.; Saulnier, L. FT-IR investigation of cell wall polysaccharides from cereal grains. Arabinoxylan infrared assignment. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 7014–7018. [[CrossRef](#)]
66. Thorn, C.R.; Howell, P.L.; Wozniak, D.J.; Prestidge, C.A.; Thomas, N. Enhancing the therapeutic use of biofilm-dispersing enzymes with smart drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *179*, 113916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Daboor, S.M.; Raudonis, R.; Cheng, Z. Characterizations of the viability and gene expression of dispersal cells from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms released by alginate lyase and tobramycin. *PLoS ONE* **2021**, *16*, e0258950. [[CrossRef](#)]
68. Lamppa, J.W.; Griswold, K.E. Alginate lyase exhibits catalysis-independent biofilm dispersion and antibiotic synergy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2013**, *57*, 137–145. [[CrossRef](#)]
69. Alkawash, M.A.; Soothill, J.S.; Schiller, N.L. Alginate lyase enhances antibiotic killing of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms. *APMIS* **2006**, *114*, 131–138. [[CrossRef](#)]
70. Jamshidzadeh, A.; Heidari, R.; Mohammadi-Samani, S.; Azarpira, N.; Najbi, A.; Jahani, P.; Abdoli, N. A comparison between the nephrotoxic profile of gentamicin and gentamicin nanoparticles in mice. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2015**, *29*, 57–62. [[CrossRef](#)]
71. Jospe-Kaufman, M.; Siomin, L.; Fridman, M. The relationship between the structure and toxicity of aminoglycoside antibiotics. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2020**, *30*, 127218. [[CrossRef](#)]
72. Ren, H.; Liu, Y.; Zhou, J.; Long, Y.; Liu, C.; Xia, B.; Shi, J.; Fan, Z.; Liang, Y.; Chen, S.; et al. Combination of azithromycin and gentamicin for efficient treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1667–1678. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Zhang, Y.; Werling, U.; Edelmann, W. SLiCE: A novel bacterial cell extract-based DNA cloning method. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, e55. [[CrossRef](#)]
74. Burton, E.; Yakandawala, N.; LoVetri, K.; Madhyastha, M.S. A microplate spectrofluorometric assay for bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *34*, 1–4. [[CrossRef](#)]
75. Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell viability assays. In *Assay Guidance Manual*; Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences: Bethesda, MD, USA, 2016.
76. Szymańska, M.; Hoppe, J.; Dutkiewicz, M.; Sobolewski, P.; Palacz, M.; Janus, E.; Zielińska, B.; Drozd, R. Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *208*, 642–653. [[CrossRef](#)]
77. Tran, P.L.; Hammond, A.A.; Mosley, T.; Cortez, J.; Gray, T.; Colmer-Hamood, J.A.; Shashtri, M.; Spallholz, J.E.; Hamood, A.N.; Reid, T.W. Organoselenium coating on cellulose inhibits the formation of biofilms by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 3586–3592. [[CrossRef](#)]
78. Wahab, R.A.; Elias, N.; Abdullah, F.; Ghoshal, S.K. On the taught new tricks of enzymes immobilisation: An all-inclusive overview. *React. Funct. Polym.* **2020**, *152*, 104613. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Enhancement of inhibition the Pseudomonas sp., biofilm formation on bacterial cellulose based wound dressing by combined action of alginate lyase and gentamicin

Magdalena Szymańska¹, Katarzyna Przygrodzka¹, Anna Żywicka¹, Bartłomiej Grygorcewicz², Piotr Sobolewski³, Sylwia Mozia⁴, Marcin Śmiglak, Radosław Drozd¹

¹Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastow Avenue, 71-311, Szczecin, Poland

²Department of Laboratory Medicine, Chair of Microbiology, Immunology and Laboratory Medicine, Pomeranian Medical University in Szczecin, 72 Powstańców Wielkopolskich Str., 70-111, Szczecin, Poland

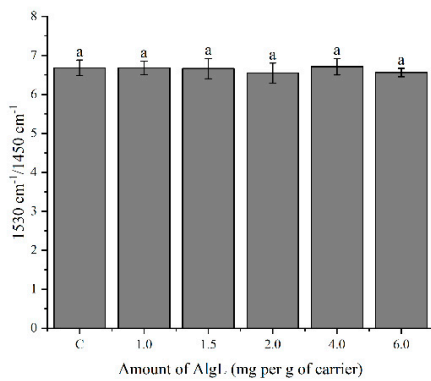
³Department of Polymer and Biomaterials Science, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastow Avenue, 71-311, Szczecin, Poland

⁴Department of Inorganic Chemical Technology and Environment Engineering, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, ul. Pułaskiego 10, 70-322 Szczecin, Poland

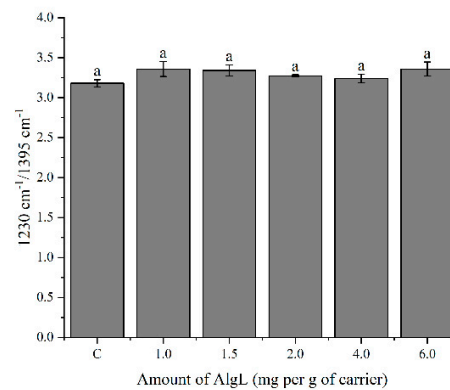
⁵Poznan Science and Technology Park (PPNT), Rubież 5, 61-612 Poznan, Poland

Table S1. Oligonucleotides for PCR amplification and colony-PCR.

Primer	Sequence (5' to 3')
AlgL_fwd	cctggtgccgcgcggcagccatATGGCCGACCTGGTACCCCCGCC
AlgL_rvs	aagcttgctgacggagctgaattcTCAACTCCCCCTTCGCGGC
pET28a_fwd	tgagatccggctgctaacaagc
pET28a_rvs	catatggctgccgcgagg
T7_fwd	TAATACGACTCACTATAGGG
T7_rvs	GCTAGTTATTGCTCAGCGG



(a)



(b)

Figure S1. The relative changes in the band ratio 1530 cm⁻¹/1450 cm⁻¹ (a) and 1230 cm⁻¹/1395 cm⁻¹ (b). The means with the same superscript are not significant different with $p > 0.05$. Error bars represent standard deviation.

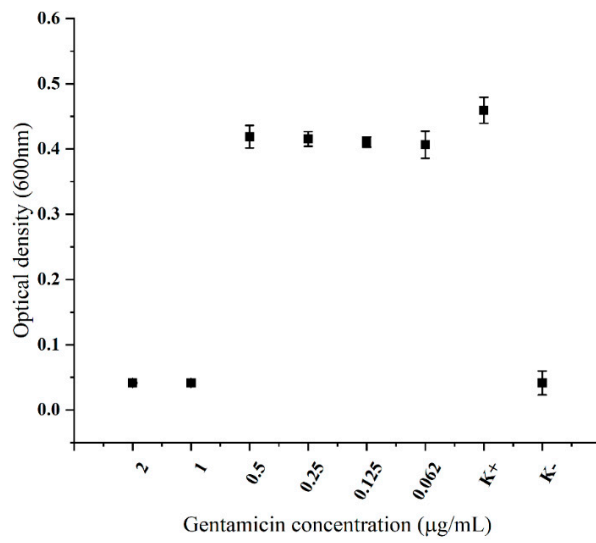


Figure S2. Minimal inhibitory concentration (MIC) of gentamicin for *P. aeruginosa* PAO-1. K- is a negative control, and K+ is a positive control.

Article

An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm

Magdalena Chareza ¹, Ewa Ekiert ², Dariusz Moszyński ², Mariusz Madej ³, Magdalena Jędrzejczak-Silicka ⁴ and Radosław Drozd ^{1,*}

¹ Department of Microbiology and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Animal Husbandry, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 45 Piastow Avenue, 71-311 Szczecin, Poland; magdalena.szymanska@zut.edu.pl

² Department of Inorganic Chemical Technology and Environment Engineering, Faculty of Chemical Technology and Engineering, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, 42 Piastow Avenue, 71-065 Szczecin, Poland; ewa.dabrowa@zut.edu.pl (E.E.); dariusz.moszynski@zut.edu.pl (D.M.)

³ Department of Microbiology, Faculty of Biochemistry, Biophysics, and Biotechnology, Jagiellonian University, Gronostajowa 7, 30-387 Kraków, Poland; mariusz.madej@uj.edu.pl

⁴ Laboratory of Cytogenetics, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Klemensa Janickiego 29, 71-270 Szczecin, Poland; magdalena.jedrzejczak@zut.edu.pl

* Correspondence: rdrozd@zut.edu.pl; Tel.: +48-517456798

Abstract: Bacterial cellulose is a unique biopolymer that has found numerous biomedical applications, such as being an excellent wound-dressing material or a carrier for delivering active compounds. The purpose of this study was to analyze the ability of modified bacterial cellulose (BC) using low-pressure Ar plasma to control the release of glycoside hydrolases with antibiofilm activity, namely PelA_h and PslG_h, from *Pseudomonas aeruginosa*. The chemical composition and morphology of the BC surfaces were characterized using photoelectron spectroscopy (XPS), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and scanning electron microscopy (SEM). The analyses revealed significant changes in the chemical composition of the BC surface due to the introduction of charged functional groups and the conversion of its well-ordered structure into a more amorphous form. The release profiles of enzymes from both forms of the carrier were different and depended on their structural properties. However, a significant impact of BC modification on protein release behavior from the carrier was observed only for PslG_h. Both enzymes, when immobilized on pristine and argon plasma-modified BC, retained their ability to effectively reduce biofilm levels, similarly to their soluble form. Ar plasma-modified BC with immobilized specific hydrolases can be used as an effective tool for inhibiting *P. aeruginosa* biofilm development.

Keywords: bacterial cellulose; argon plasma; biofilm; surface modification; immobilization



Citation: Chareza, M.; Ekiert, E.; Moszyński, D.; Madej, M.; Jędrzejczak-Silicka, M.; Drozd, R. An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Appl. Sci.* **2023**, *13*, 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>

Academic Editor: Anthony William Coleman

Received: 26 May 2023

Revised: 27 June 2023

Accepted: 28 June 2023

Published: 1 July 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Extensive skin damage is a common health issue that has become a major problem in healthcare systems around the world. Damaged skin loses its natural protective mechanism and becomes a target for microorganisms, leading to severe wound infections, delaying the healing process, disfiguring, and even potentially threatening life [1]. Dynamically developing skin tissue engineering is leading to the development of modern dressing materials. Contrary to standard ones, modern ones are designed not only to cover the surface of the wound but also to support healing; therefore, more advanced materials that are classified as interactive and bioactive are being used [2]. Modern bioactive dressings should be highly hygroscopic to keep the wound bed moist and absorb exudate. In addition, they should ensure a free flow of oxygen and are characterized by a high mechanical

strength and flexibility, thanks to which the dressing can adapt to various parts of the body. It should easily detach from the wound while changing the dressing, be biocompatible, and have homeostatic and antimicrobial action, preventing infection and bacterial biofilm formation [1,3]. One of the biomaterials that meets most of the above criteria is bacterial cellulose (BC) [4]. In addition, the advantage of BC used in biomedicine is also the ability to modify its structure via various in situ and ex situ modifications [5]. The in situ modification of BC can be achieved by supplementing the culture medium with various types of organic and inorganic substances. These modifications can lead to enhanced porosity, water-holding capacity, and rehydration rates, which are crucial properties for wound-dressing materials. However, a significant challenge in the use of biomaterials involving BC is their susceptibility to bacterial infections, which restricts their applications in biomedicine. As a result, there has been a growing interest in the development of methods to confer antibacterial and antibiofilm properties to natural polymeric materials, including bacterial cellulose [6–8].

One of the possible methods for the ex situ modification of BC is the use of plasma, which is a well-known approach for effectively modifying the surfaces of various polymers. Depending on the composition of the gas phase, plasma technology offers the possibility of targeted polymer modification by introducing different functional groups or converting existing ones on the polymer surface. Various gas plasma technologies for polymer modification can be classified into two types based on the temperature of the gas: “hot” plasma and “cold” plasma [9]. Earlier studies have demonstrated that the surface of BC can be improved for various applications through the use of different types of plasmas. The application of nitrogen plasma for BC modification has been found to improve the adhesion of eukaryotic cells to the BC surface and increase its porosity [10,11]. The modification of BC membranes’ surfaces using oxygen plasma can lead to a decrease in the effective pore area and water flux, while increasing the number of O-H groups. As a result, there is a significant change in the water contact angle, making the membrane surface more hydrophilic [12]. The modification of BC with argon plasma can confer bactericidal properties, making it suitable for use as antibacterial and antiviral filters based on BC [11]. Moreover, the introduction of new functional groups on the surfaces of polymer matrices through plasma exposure may affect the release process of active compounds, including enzymes, from the surfaces of polymeric materials, especially in applications related to biofilm eradication [13–16].

Pseudomonas aeruginosa and *Staphylococcus aureus* are the most frequently isolated bacterial pathogens found in wounds of various origins. Unlike wounds infected by *S. aureus*, which can readily colonize the upper layers of the wound, *P. aeruginosa* tends to establish itself in the deeper regions of the wound bed, making eradication more challenging. *P. aeruginosa* is known for its high resistance to antimicrobial agents, resulting in a significant prolongation of the wound healing process or even complete stoppage of healing [17,18]. The main reason for the increased risk associated with *P. aeruginosa* infections is its ability to form biofilms, which are recognized as the most significant virulence factors of this bacterium. Biofilms exhibit a complex structure composed primarily of proteins, nucleic acids, lipids, biosurfactants, and exopolysaccharides. The presence of exopolysaccharides plays a crucial role due to their diverse functions, including bacterial adhesion to surfaces, protection against phagocytosis and the immune system, and restriction of antibiotic diffusion within the biofilm structure. *P. aeruginosa* is capable of synthesizing three of the polysaccharides involved in biofilm matrix formation: alginate, Pel, and Psl. However, the specific types and quantities of the polysaccharides produced can vary depending on the strain [19–23]. Psl is a neutral polysaccharide composed of repeating units of D—mannose, D—glucose, and D—rhamnose, while until recently, the exact structure of Pel remained unclear. In the latest research, Le Mauff et al. described the structure of Pel as a linear homopolymer of partially de-N-acetylated α -1,4-GalNAc comprised predominantly of dimeric repeats of galactosamine and N—acetylgalactosamine [24,25]. To prevent the development of these polysaccharide components of the biofilm matrix, it

is possible to use an enzyme with specific activity against the *P. aeruginosa* matrix, such as PelA_h and PslG_h glycoside hydrolases [26–30]. In the field of medicine, it is crucial to develop suitable approaches for creating non-fouling biomaterials. Currently, there is a growing interest in the use of immobilized PelA_h and PslG_h on polymer surfaces in medical applications. These proteins have shown potential in limiting the development of *P. aeruginosa* biofilms, thereby aiding the effectiveness of antibiotics and the immune system. Asker et al. investigated the immobilization of PslG_h on surfaces such as silica glass, polydimethylsiloxane, polystyrene, and indwelling catheters, confirming the ability of surface-attached enzymes to effectively inhibit *P. aeruginosa* biofilm formation. Similarly, Szymanska et al. conducted studies demonstrating that the adsorption of PelA_h on BC surfaces could reduce the polysaccharide components of the *P. aeruginosa* matrix, thereby expanding the utility of BC as a wound-dressing material [26,27,30,31].

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of combining surface modification of BC using low-pressure argon plasma (LPArP) with the immobilization of antibiofilm enzymes, namely PelA_h and PslG_h, on *P. aeruginosa* biofilm formations.

2. Materials and Methods

2.1. Cloning, Expression, and Purification of PelA_h and PslG_h

PelA_h was purified as previously described [26]. To obtain the target gene sequence that encodes the protein construct fragment of *pslG* (GenBank ID AAG05625.1) from the genomic DNA of *P. aeruginosa*, PAO-1 and pET28a were used as a vector template and amplified separately through polymerase chain reactions using Phusion[®] High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs). For *pslG* gene amplification, primers were designed as follows: forward (5'-TGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACCATGGAGATCCAGGACTGAAGGC-3') and reverse (5'-AGCCGGATCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTCTCCAGACCAGCATCTGCA-3'). For pET28a, primers were designed as follows: forward (5'-TGAGATCCGGCTGCTAACAAAGC-3') and reverse (5'-CATATGGCTGCCGCGCGG-3'). Construct was prepared according to the FastCloning and SLiCE methods [26,32]. The expression and purification of recombinant PslG_h was performed according to previous work [26,32]. To check the purity of the obtained protein, SDS-PAGE analysis was performed. The protein concentration was measured via UV absorbance at 280 nm using a Biotek Synergy HT plate reader (BioTek, Santa Clara, CA, USA) using a molar extinction coefficient equal to 44,920 M⁻¹ cm⁻¹, as calculated according to the amino acid sequence of PelA_h (UniProt accession code: Q9HZE4), and 111,840 M⁻¹ cm⁻¹, calculated according to the amino acid sequence of PslG_h (UniProt accession code: Q9I1N2).

2.2. Preparation of BC Membranes

The BC production was performed according to Chareza et al., with slight modifications [32]. A culture of *Komagataeibacter xylinus* ATCC[®] 53524 that was purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) was set up in 9 cm petri dishes with liquid Hestrin-Schramm (HS) medium containing glucose at 20 g/L, yeast extract at 2.0 g/L, peptone at 2 g/L, citric acid at 1.15 g/L, Na₂HPO₄ at 2.7 g/L, and MgSO₄×7H₂O at 0.06 g/L with 1% ethanol and 0.01% of silicone polyether. Before pouring the cultivation medium on the petri dishes, the medium was inoculated with 1% of a 1-week-old culture of *K. xylinus* that was previously shaken vigorously for 5 min. The cultivation was carried out at 28 °C for 4 days. After this time, the formed BC membranes were collected and transferred to plastic containers with deionized water for 24 h at 4 °C. In the next step, the BC membranes were digested with 0.1 M of NaOH at 80 °C (3×) to remove bacterial cells and residual medium components. Following digestion, the BC membranes were transferred again to plastic containers with extensive amounts of deionized water. The water was changed periodically until the pH stabilized to a neutral range. Finally, the pure BC membranes were dried at 64 °C and sterilized by autoclaving at 121 °C for 15 min.

2.3. Modification of BC with Low-Pressure Argon Plasma (LPArP)

LPArP treatment of the BC membranes was performed using an HPT-100 Benchtop Plasma Treater (Henniker Scientific, Runcorn, UK). The process was carried out with argon as the process gas in the gas chamber, at a power of 100 W and flow rate of 10 standard cubic centimeters per minute (SCCM) that was constant in all experiments. To determine the optimal time for BC modification, the samples were treated with LPArP for various durations of 120, 240, 480, and 960 s from both sides.

2.4. Characterization of BC Surfaces after LPArP Treatment

2.4.1. Attenuated Total Reflectance–Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR–FTIR)

After the Ar plasma modification of the BC, the chemical structure of the surfaces of BC was analyzed using ATR-FTIR. The analysis was carried out using an ALPHA II FTIR spectrophotometer (Bruker Daltonic, Bremen Germany) with a diamond ATR adapter. The spectra were collected in the wavenumber range of 3800–400 cm^{-1} with a resolution of 2 cm^{-1} (32 scans). The processing of collected ATR-FTIR spectra was performed using SpectraGryph 1.2 and OriginPro2021 software. The IR indices of the BC crystallinity, such as the total crystallinity index (TCI), lateral order index (LOI), and hydrogen bond intensity (HBI), were calculated from the band's absorbance ratios of $A_{1371} \text{ cm}^{-1} / A_{2900} \text{ cm}^{-1}$, $A_{1429} \text{ cm}^{-1} / A_{897} \text{ cm}^{-1}$, and $A_{3400} \text{ cm}^{-1} / A_{1320} \text{ cm}^{-1}$, respectively. The allomorph I_{α} content was calculated using Equation (1):

$$I_{\alpha} = 2.55 - \left(\frac{A_{750}}{A_{710} + A_{750}} \right) - 0.32 \quad (1)$$

where A_{750} is a band intensity of 750 cm^{-1} for I_{α} , and A_{710} is a band intensity of 710 cm^{-1} for I_{β} .

2.4.2. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

X-ray photoelectron spectra were obtained using Mg Ka ($h\nu = 1253.6 \text{ eV}$) radiation with a Prevac system equipped with a Scienta SES 2002 electron energy analyzer operating at a constant transmission energy ($E_p = 50 \text{ eV}$). The samples were attached to a stainless steel holder with the use of carbon conductive double-sided adhesive discs. Charging effects were corrected by assuming that the maximum of the C 1s peak corresponded to the aliphatic carbon bindings of C-OH in cellulose, and its location was set to 286.7 eV [33]. The XPS lines of the other observed elements were shifted correspondingly. The reproducibility of the peak positions thus obtained was $\pm 0.1 \text{ eV}$. The surface compositions of the samples were obtained on the basis of the peak area intensities using the sensitivity factor approach and assuming homogeneous composition of the surface layers.

2.4.3. Scanning Electron Microscopy (SEM)

Prior to SEM analysis, samples of BC membranes, both LPArP-modified and nonmodified, were immersed in 2% glutaraldehyde for 16 h. Then the samples were flushed with 50 mM of phosphate buffer at pH 7.4. Following, BC samples were immersed in increasing concentrations of ethanol (20%, 40%, 60%, 80%, 95% v/v) for 10 min and finally immersed two times in absolute ethanol for 15 min. Then samples were sputtered with Cr using a SEM Quorum Q150T ES, a turbomolecular-pumped coater, and analyzed with using a Hitachi SU3500 (Hitachi, Tokyo, Japan) scanning electron microscope [7,34].

2.5. PelA_h and PslG_h Stability—Differential Scanning Fluorimetry (DSF)

Differential scanning fluorimetry employing the Prometheus NT.48 apparatus (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany) was used to investigate the thermal stability of PelA_h and PslG_h at given time points during storage at 4 °C as protein solutions or lyophilisates. The lyophilisates of PelA_h and PslG_h were resuspended in distilled water at concentrations of 0.3 mg/mL. The PelA_h and PslG_h in the solutions were used at con-

centrations of 0.3 mg/mL. The samples were then loaded into nanoDSF standard-grade capillaries and then heated from 20 °C to 95 °C at a rate of 1 °C per min. Protein unfolding was monitored by measuring the fluorescence intensity at two emission wavelengths of 330 nm and 350 nm. Analysis of the obtained data was performed using PRThermControl software (NanoTemper Technologies GmbH, München, Germany), which allowed calculation of the proteins' melting temperatures (T_m) based on the first derivative of the ratio of fluorescence intensity measured at 350 and 330 nm. Four independent measurements of T_m were performed for each time point.

2.6. Analysis of the Cytotoxicity of PslG_h Hydrolase

The potential cytotoxicity of the recombinant enzyme was analyzed using an L929 mouse fibroblast (ATCC[®] no. CCL-1TM). In vitro dose–response experiments were conducted using the CCK-8 Cell Counting Kit-8 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Firstly, cells (passages 20–25) were maintained in standard cell culture conditions at 37 °C, 5% CO₂, and 95% humidity in T25 flasks (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) in complete DMEM culture medium that was supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria), 2 mM L-glutamine, 50 IU/mL penicillin, and 50 µg/mL streptomycin (Corning Inc., Corning, NY, USA). For the CCK-8 assay, cells were plated into the wells of 96-well plates (at 5×10^3 cells per well for a 24 h observation and 10×10^3 cells per well for a 48 h observation). Secondly, twenty-four hours after cell seeding, 6 different final concentrations (5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, 250.0 µg/mL; 5 replicates of each dose) of the enzyme were prepared in DMEM medium and added to the cells. The effect of the recombinant enzyme on cell viability was calculated using Equation (2), as described elsewhere [35]:

$$\text{Relative viability from CCK-8 assay (\%)} = \left(\frac{\text{sample } A_{450-650 \text{ nm}}}{\text{control } A_{450-650 \text{ nm}}} \right) \times 100 \quad (2)$$

where A is an absorbance at 450 nm and 650 nm.

The morphologies of the L929 cell line exposed to the recombinant enzyme at different concentrations and the control samples were analyzed using a Nikon TS-100 phase-contrast inverted microscope (NIS Elements F Package, camera Nikon DS-Fi1, Nikon, Melville, NY, USA) at 100× magnification [35].

2.7. The Loading of PelA_h and PslG_h on BC and Ar_BC

The solutions of PelA_h and PslG_h proteins (0.5, 0.25, and 1.25 mg/mL) were prepared in 50 mM phosphate buffer at pH 7.4, which corresponded to 2.5, 1.25, and 0.62 µg of protein in 5 µL. The 5 µL of protein was loaded onto Ar treatment and non-treatment BC samples with a diameter of around 6 mm. Next, the samples with loaded protein were frozen using dry ice until the samples were completely frozen. Finally, the samples were freeze dried (Alpha 1–2 LDplus, Christ, Germany) at –60 °C and 0.1 mBar.

2.8. Analysis of In Vitro Release of PelA_h and PslG_h from Ar_BC and BC

The samples of immobilized proteins on LPArP-modified and pristine BC were transferred to Eppendorf tubes with 500 µL of 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, and equilibrated to 25 °C in thermoblock. Next, in one-minute intervals, 2 µL of solution was transferred to a Take3 microvolume plate for the determination of the proteins' concentrations according to protocol described in Section 2.1.

2.9. Antibiofilm Activity

The antibiofilm activity of BC membranes with immobilized PelA_h and PslG_h was conducted according to Amborgi et al., with modifications [36]. The strain of *P. aeruginosa* PAO-1 was grown in TSB medium supplemented overnight at 37 °C. For biofilm analysis, the overnight culture of *P. aeruginosa* PAO-1 was adjusted to 0.5 on the McFarland scale and then diluted to 1:1000 in TSB medium supplemented with 1% glucose. A total of 100 µL

of bacterial suspension was transferred to 96-well flat plates and incubated at 37 °C for 24 h with the presence or in absence of LPArP-modified BC membranes or nonmodified BC. After incubation, the biofilm was washed with 200 µL of distilled water and then dried at 37 °C for 1 h. Next, 100 µL of 0.1% crystal violet was added to each well and incubated for 15 min. Following incubation, the wells were washed with 200 µL of dH₂O until unbound dye was removed. Finally, 100 µL of 96% ethanol was added to each well, incubated for 15 min, and the absorbance of crystal violet was measured at 595 nm using a Tecan Infinite 200 Pro microplate reader.

2.10. Statistical Analysis

Statistical analysis was conducted using OriginPro2021. The statistical significance differences of means were tested by Tukey's multiple comparison test, and statistical significance was considered with $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Influence of LPArP Treatment on BC Membrane Surface Properties

To analyze the changes in the chemical structure of the BC surfaces after treatment with LPArP, the ATR-FTIR and XPS methods were used. Figure 1 presents the regions of 1800–800 cm⁻¹ of the ATR-FTIR spectra of the untreated BC and the BC treated with LPArP, depending on the treatment time. The obtained spectra from all tested BC samples showed the characteristic absorption band profile for BC, with bands at 897 cm⁻¹ assigned to C-O-C bending vibration of (1–4) β linkage, ~1060–1030 cm⁻¹ corresponding to C-O stretching, 1111 cm⁻¹ assigned to the C-C stretching ring in polysaccharides, ~1160 cm⁻¹ indicating C-O-C stretching of the glycosylic bond of the crystalline cellulose, 1370 cm⁻¹ assigned to C-H stretching vibrations, and 1430 cm⁻¹ indicating the symmetric CH₂ bending vibration and referred to as a “crystallinity band”. The next band at 1640 cm⁻¹ marks the H-O-H bending of absorbed water molecules [37–41]. The time-dependent BC surface treatment with LPArP was evident in the spectra through a gradual increase in the intensity of absorption in the band at 1720 cm⁻¹, which is attributed to the carbonyl group (C=O stretching vibrations) [42]. The intensity of this band increased with time and reached a plateau after 480 s of treatment with the LPArP. The appearance of this band can indicate the oxidation of the -OH group of anhydrous D-glucose units in the BC microfibrils or the formation of a carbonyl group after pyranose ring cleavage between C1 and C2 and further oxidation [43]. It is also in accordance with the observed reduction in band intensity at a wavelength range of ~1050 cm⁻¹–~950 cm⁻¹ that can be associated with conformational changes in the pyranose ring and the primary alcohols at the C6 carbon typical for more amorphous bacterial cellulose.

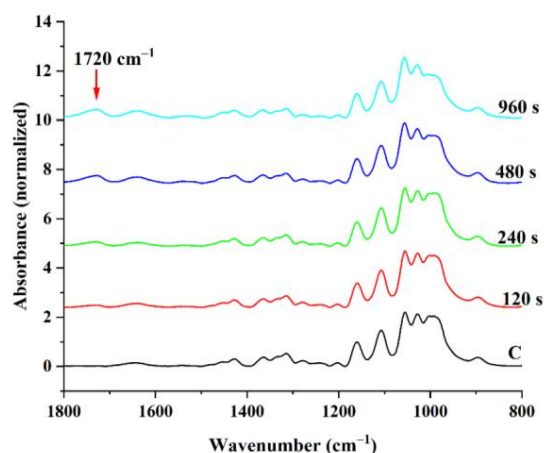


Figure 1. The ATR-FTIR spectra of the control BC (C) and the BC modified with LPArP for various times (120 s, 240 s, 480 s, and 960 s). The red arrow marking the changes in the intensity of the band at 1720 cm⁻¹ is assigned to the C=O group. The spectra were normalized to band area at 1161 cm⁻¹.

The values of the IR crystallinity indices LOI and TCI decreased with the modification time, while the value of the HBI increased (Table 1). The most significant changes in the IR crystallinity indices were noted until 480 s of treatment. The changes in values of TCI and LOI clearly indicated that the structure of LPArP-treated BC is characterized by lower crystallinity and ordered structure as a result of the destructive action of the argon plasma [38,44].

Table 1. The values of the IR crystallinity indices (LOI, TCI), the hydrogen bond index (HBI), and the mass fraction of the crystalline allomorph I_{α} of pristine BC and BC modified by LPArP.

Sample	IR Crystallinity		HBI	Cellulose I_{α} Index
	A1372/A2900 (TCI)	A1429/A897 (LOI)	A3400/A1320	
BC	1.683 ± 0.20 ^a	0.993 ± 0.17 ^a	0.801 ± 0.08 ^a	0.683 ± 0.02 ^a
120 s Ar_BC	1.685 ± 0.04 ^a	0.877 ± 0.10 ^{ab}	0.751 ± 0.03 ^a	0.667 ± 0.01 ^{ab}
240 s Ar_BC	1.673 ± 0.08 ^a	0.849 ± 0.04 ^{ab}	0.899 ± 0.10 ^a	0.650 ± 0.02 ^{bc}
480 s Ar_BC	1.492 ± 0.10 ^b	0.818 ± 0.09 ^b	1.266 ± 0.15 ^b	0.637 ± 0.02 ^c
960 s Ar_BC	1.351 ± 0.07 ^b	0.766 ± 0.04 ^b	1.468 ± 0.16 ^c	0.611 ± 0.006 ^d

The results are presented as means ± S.D. The means with the same superscript are not significantly different, with $p > 0.05$.

3.2. X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS)

X-ray photoelectron spectroscopy was applied to evaluate the surface composition of the LPArP-treated BC. Analysis of the XPS spectra indicated only the presence of oxygen and carbon on the surfaces of the samples. The ratio of oxygen atoms to carbon atoms on the surfaces of the studied materials was determined from the atomic concentration of these elements, which was calculated from the intensity of the XPS signals: O 1s and C 1s (Table 2). The calculations assumed a homogeneous distribution of oxygen and carbon atoms in the surface layer. Considering the formula of cellulose as $(C_6H_{10}O_5)_n$, the theoretical ratio of oxygen atoms to carbon atoms in this material is 0.83. According to the study of the surface composition, it was lower than the theoretical value for all tested materials and ranged from 0.56 to 0.73, with the lowest value of the O/C ratio observed for the sample obtained after 480 s of plasma exposure. The highest O/C ratio was observed not for a pure cellulose sample, but for a sample exposed to plasma for only 120 s. Such relative enrichment of the surface with oxygen atoms can be attributed to the partial etching of the cellulose surface from “adventitious carbon” caused by argon ions.

Table 2. The percentage of Comp (1)–Comp (4) components in the total signal of the XPC C 1s line and the ratio of oxygen atoms to carbon atoms on the surfaces of bacterial cellulose exposed to LPArP depending on the treatment time (s).

Sample	Components of XPS C 1s Signal (Total C 1s Intensity = 100)				
	C-C/C-H (Comp (1))	C-OH (Comp (2))	COC (Comp (3))	O=C-O (Comp (4))	O/C Ratio
BC	14	61	25	0	0.69
120 s Ar_BC	19	53	20	7	0.73
240 s Ar_BC	26	49	17	7	0.62
480 s Ar_BC	34	39	18	8	0.56
960 s Ar_BC	38	33	21	6	0.64

The high-resolution spectra of the XPS C 1s lines acquired for all examined samples are presented Figure 2. A deconvolution model which consists of four basic components of C 1s transition was applied. The component denoted as Comp (1), having a binding energy of 285.0 ± 0.1 eV, essentially corresponds to nonfunctionalized carbon atoms. The component Comp (2), having a binding energy of 286.7 eV, is ascribed to a group of differently bonded

carbon atoms linked to one atom of oxygen, as in hydroxyl group C-OH. Comp (3), located at a binding energy of 288.2 ± 0.1 eV, is ascribed to O-C-O bonding. The component Comp (4), having a binding energy of 289.6 ± 0.1 eV, corresponds to O-C=O bonding. The values of the binding energies used in the present model are based on the deconvolution models applied elsewhere [33]. The percentage of Comp (1)–Comp (4) components in the total signal of the XPS C 1s line is presented in Table 2.

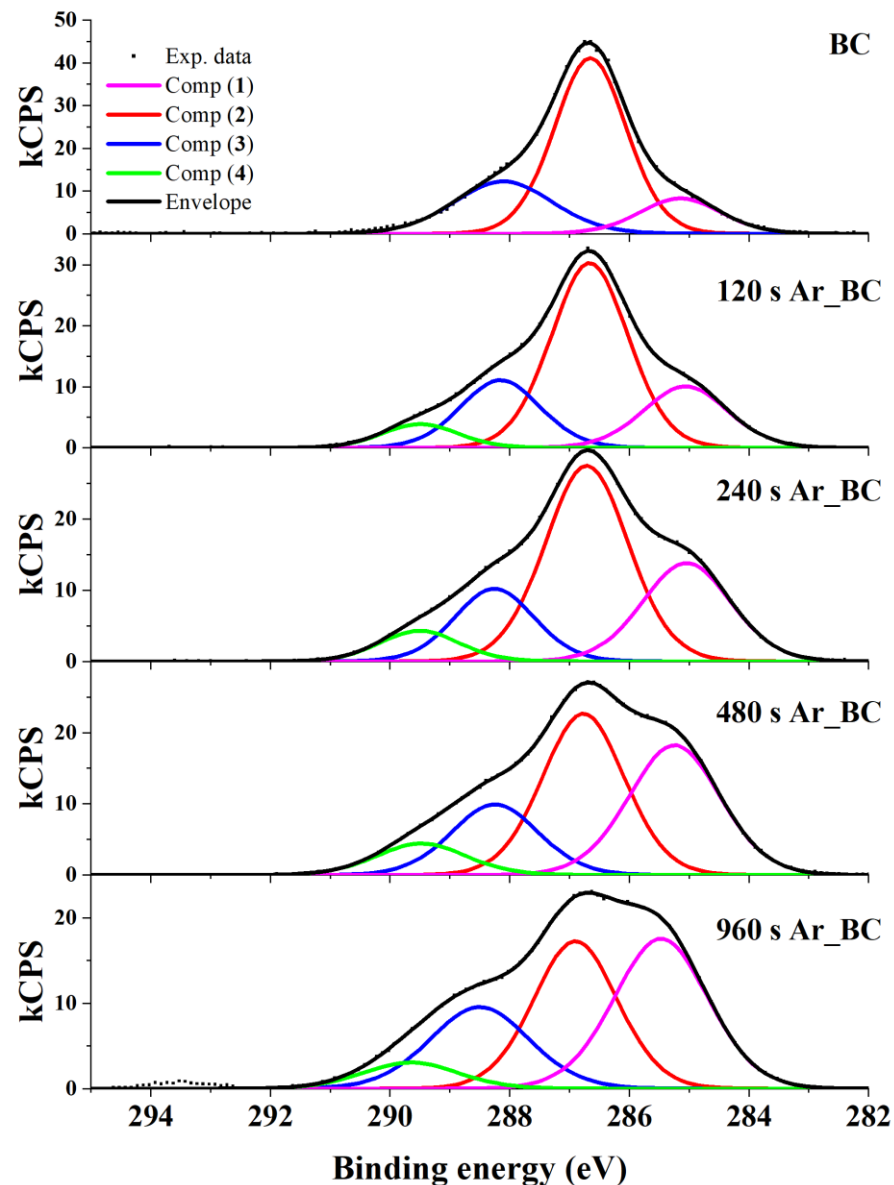


Figure 2. High-resolution XPS C 1s spectra of non-modified BC and bacterial cellulose (Ar_BC) modified by different exposure times to LPArP.

Highly purified bacterial cellulose should contain only carbon–oxygen bonds corresponding to Comp (2) and Comp (3) of the model used to analyze the XPS C 1s spectra. The theoretical ratio of these components should be 80:20, respectively. It is common for real cellulose samples to have Comp (2) accounting for about 60% of the signal from carbon atoms and Comp (3) about 20% of this signal. In actual samples, even of pure cellulose, a component corresponding to Comp (1) is also identified, which accounts for less than 20% of the C 1s signal [43]. The XPS C 1s spectrum of the reference material (BC) used in this study was very close to those reported. Exposure of this material to plasma results in several characteristic changes in the composition of its surface. As the exposure to

plasma increases, the concentration of Comp (2) decreases and the concentration of Comp (1) unequivocally increases. The decrease in Comp (2) is most likely due to the removal of hydroxyl groups from the cellulose surface. The removal of such bonds is accompanied by a simultaneous increase in the concentration of C-C- or C-H-type bonds, i.e., Comp (1). The concentration of Comp (3) is essentially independent of the plasma exposure. This component corresponds to the presence of an O-C-O bond at the C₁ carbon in the pyranose ring. This suggests the stability of the pyranose ring during the plasma action on the cellulose surface. The exposure to argon plasma also induces the appearance of Comp (4), which is directed to the oxidation of D-glucose alcoholic group C-OH without significant effect on the integrity of the pyranose ring. The changes in the BC surface composition demonstrated by the XPS analysis are in good agreement with the ATR-FTIR and showed that BC surfaces can be more negatively charged as a result of the presence of the carboxyl group.

3.3. Influence of LPArP on the BC Surface Morphology

In order to check the morphological changes in the BC structure after LPArP modification, scanning electron microscopy was used. Figure 3 shows the SEM micrograph of BC surface morphology (a) and the Ar_BC after modification with LPArP for 480 s (b). The unmodified BC sample shows a typical reticulated surface of pristine BC with a well-visible ultra-fine network of microfibrils and pores [45,46]. After modification with LPArP, the surface morphology of the BC changed significantly and presented a heterogeneous structure typical for amorphous BC. These results are consistent with the studies by Tang et al. and Vasil'kov et al., where they reported that the oxygen plasma treatment of BC can cause a burn of the surface which results in an increase in the surface roughness and heterogeneity due to the destruction of the BC fibril structure [47,48].

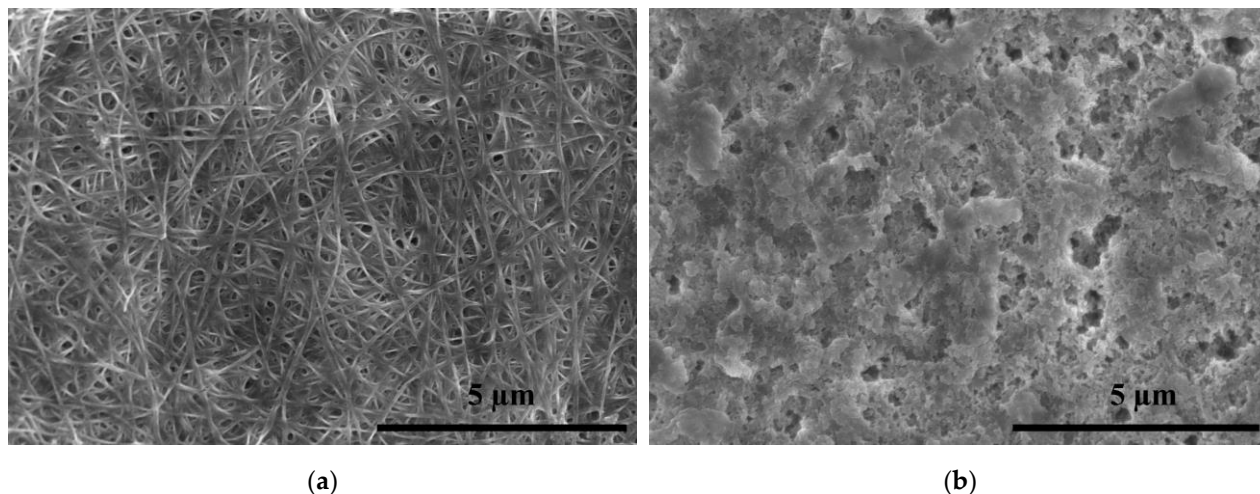


Figure 3. SEM images of the surface morphology the BC (a) and Ar_BC after 480 s LPArP treatment (b).

3.4. Differential Scanning Fluorimetry

In recent years, the importance of protein preparations in medicine has increased significantly; however, most of the preparations available on the market are in liquid form, which requires storage at low temperatures. This is associated with difficulties with high transport costs, among others. Moreover, during long-term storage of proteins in solutions, the activity of proteases shortens their activity time and also causes reactions such as oxidation, leading to protein unfolding that may also occur [49,50]. One method to overcome these obstacles is to store proteins in lyophilized form. In order to determine the usefulness of the PelA_h and PslG_h enzymes in freeze-dried and soluble form, their stability was tested after 30 days using the DSF method, which is a biophysical technique widely used to study the thermal stability of a protein [51]. Figure 4 shows the plot of the

first derivative of the fluorescence melting curves of PelA_h and PslG_h in freeze-dried and soluble form at the beginning and after 30 days of storage at 4 °C. The T_m values of the PelA_h in the soluble form were 52.7 °C and 52.8 °C at days 0 and 30 of storage, respectively, while upshifting of the freeze-dried form by ~1.3 °C was observed after 30 days, suggesting the acquisition of a slight thermal structural stability. In the case of the soluble form of PslG_h, there was no significant difference in the T_m value during the storage conditions (T_m equal to ~53.1 °C), and the same observations were made with the freeze-dried form (T_m equal to ~53.7 °C).

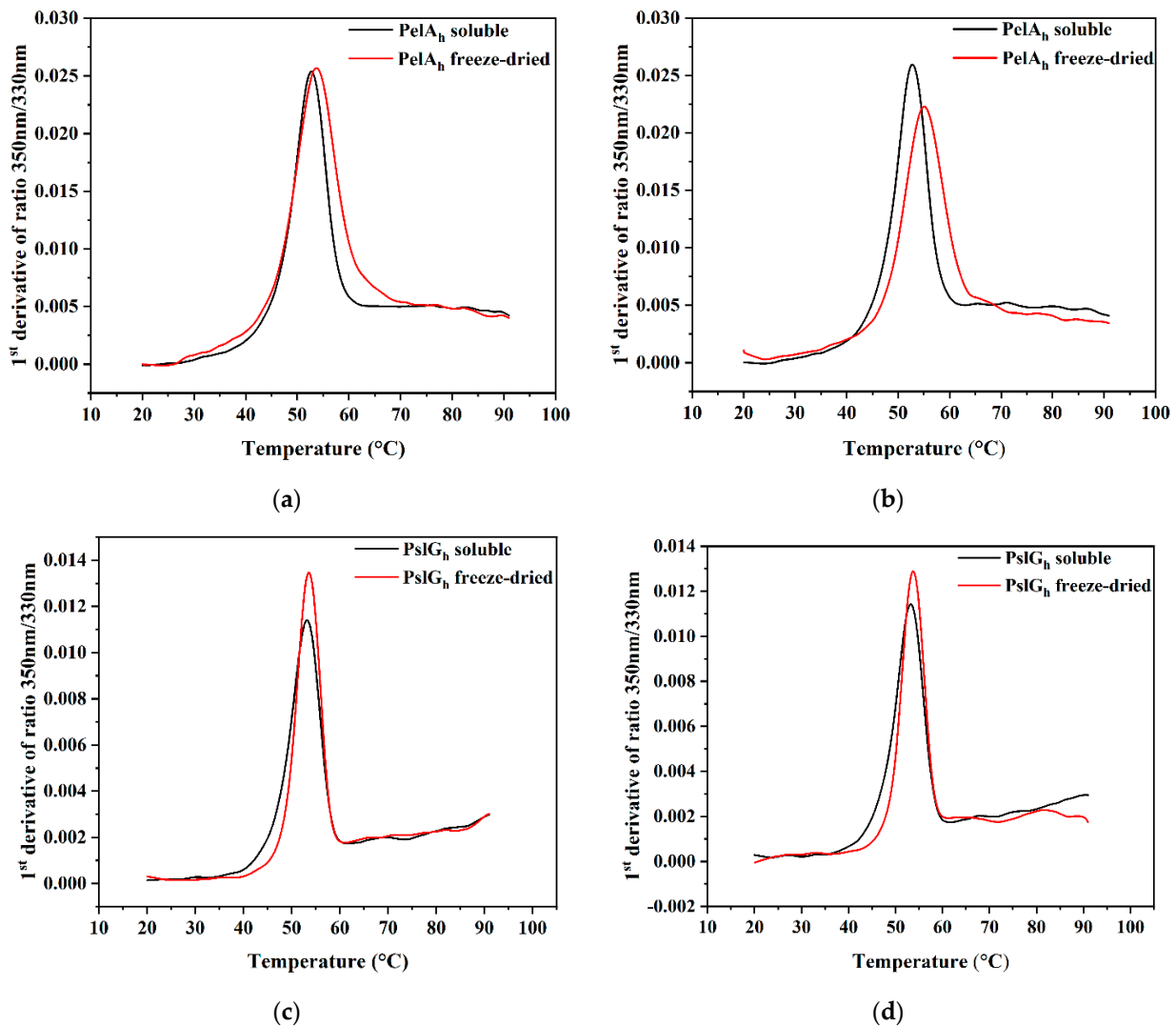


Figure 4. The thermal stability profile of soluble and freeze-dried forms of PelA_h and PslG_h stored at 4 °C on day 0 (a,c) and after 30 days of storage (b,d).

3.5. Cytotoxicity of the PslG_h

To enable the use of recombinant enzymes in biomedicine, among other things, as elements of wound-dressing materials, it is important to assess their cytotoxicity against eukaryotic cells. The cytotoxicity of PelA_h was investigated in our previous research, and we concluded that there is no cytotoxicity effect of the enzyme on murine fibroblast (L929) cultures [26]. Therefore, the PslG_h enzyme obtained in this study was also tested to determine its potential cytotoxicity towards murine fibroblast (L929) cultures. Six different enzyme concentrations (5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0, and 250.0 µg/mL) were used for 24 h and 48 h observations of cell viability and morphology. After 24 h, no reduction in cell viability (Figure 5a) and cell morphology (Figure 6) was observed. After 48 h, the cell morphology

for the experimental cultures did not demonstrate changes in comparison to the control culture. In the case of cell viability, a ~29% reduction was found for the 250.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ enzyme concentration (Figure 5b). These results are consistent with earlier studies on the cytotoxicity of PelA_h and PslG_h against eukaryotic cells from line IMR-90 of human lung fibroblasts and red blood cells [27,28].

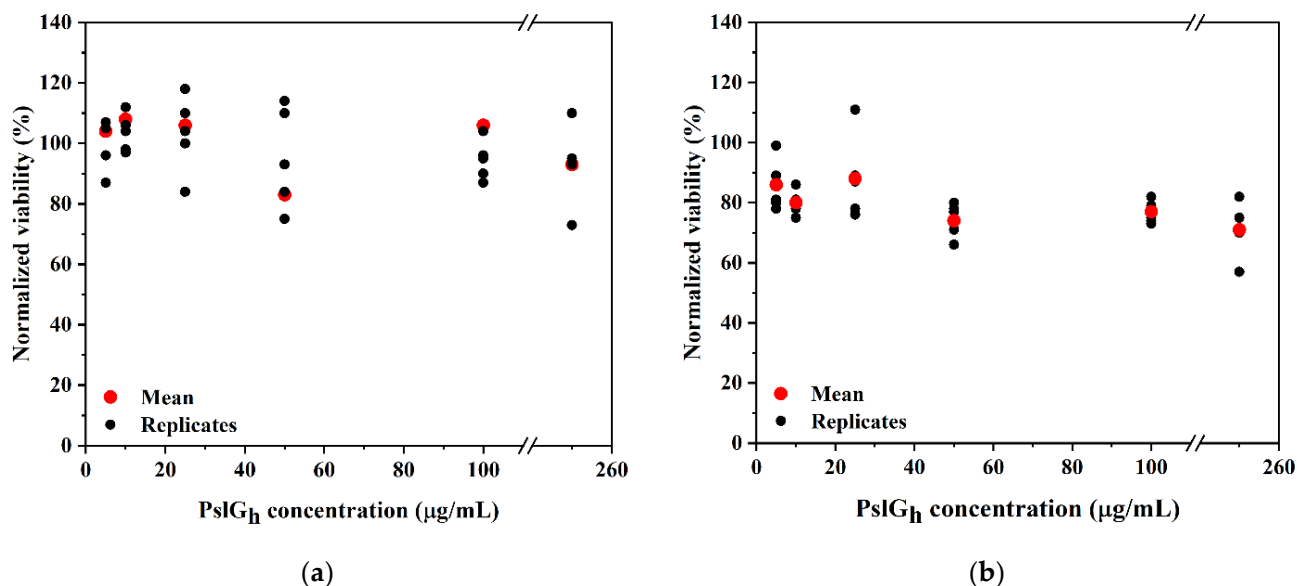


Figure 5. L929 cell viability after 24 h (a) and 48 h (b) incubation with the recombinant PslG_h.

3.6. *In Vitro* Release Study of PelA_h and PslG_h from Pristine and LPARP-Modified BC

The immobilization of proteins on different kinds of surfaces is used in many areas of industry, including the biomedical and pharmaceutical industries in drug delivery systems [49]. To evaluate the PelA_h and PslG_h from the BC and LPARP-modified BC, the release behavior was monitored in 50 mM of phosphate buffer at pH 7.4. The release profiles of PelA_h and PslG_h are shown in Figure 8. The release profiles of PelA_h from the BC and Ar_BC membranes did not differ and were characterized by sustained diffusion. The same release profile was observed for the PslG_h from nonmodified BC, while the PslG_h released from Ar_BC was characterized by an initial burst release for 2 min. In both cases, higher amounts of enzyme were retained on the BC matrix, and the maximum releases of PslG_h were 58% and 63% after 10 min for BC and Ar_BC, respectively. For PelA_h, the % of release from the carrier was faster compared to PslG_h, and the maximum release at the same time was around 80% for both unmodified and modified BC. The observed PelA_h release profile did not differ between the unmodified and LPARP-modified BC, but it showed a significantly faster release of this protein compared to PslG_h. The charge distributions on the molecular surfaces of the analyzed enzymes at pH 7.4 showed the occurrence of large negatively charged patches. The calculated charges of the protein molecules did not differ significantly between PelA_h and PslG_h and were -8.24 and -6.94 , respectively (Figure 7). In contrast to PelA_h the structure of PslG_h consist of large catalytic N- terminal domain and significantly smaller C-terminal domain recognized as possible carbohydrate binding domain (Figure 7). Occurrence of this domain in PslG structure was reported as reason of higher binding to dextran and may be reason of different releasing profile. Furthermore, the differences in release profile of PslG_h from native and LPARP-modified BC suggest that the CBM occur in PslG_h molecular structure belongs to Type B CBMs, which has affinity to amorphous form of BC.

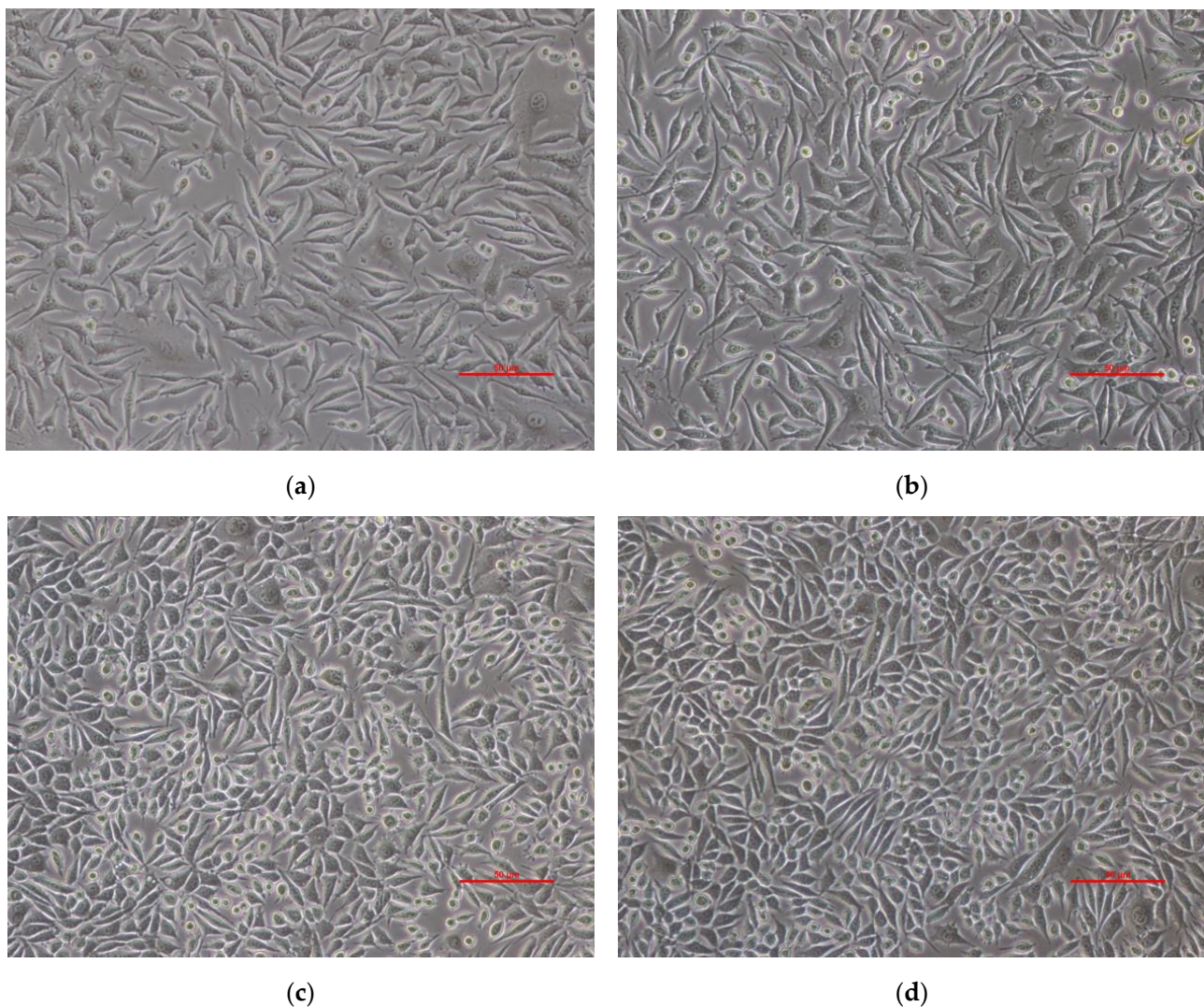


Figure 6. Morphology of L929 cells of 24 h (a) and 48 h controls (c) and exposed to the recombinant PslG_h (250 µg/mL) for 24 h (b) and 48 h (d).

To explain the enzymes' release mechanisms from the BC and Ar_BC, pharmacokinetic models were used, including zero-order, first-order, Higuchi, and Korsmeyer-Peppas models. The fitting results are summarized in Table 3. For the PslG_h loaded on the nonmodified BC, the release of the protein was fitted to the Higuchi and Korsmeyer-Peppas models for both types of BC, which indicated that the release of PslG_h is controlled by diffusion. The *n* exponents of the Korsmeyer-Peppas model were around 0.25 and 0.22 for the LPARP-modified and native BC, respectively. This demonstrated that PslG_h was released through Fickian diffusion. In the case of PelA_h, it was observed that the release profile for the Ar_BC fit well with the first order, with a correlation coefficient of R^2 equal to 0.98, which indicates that the PelA_h release is dependent on the differential concentration [54]. Moreover, the PelA_h release mechanism also fit the Higuchi and Korsmeyer-Peppas models, with a correlation coefficient of $R^2 > 0.9$. The value of exponent *n* for the PelA_h release was >0.5 and followed non-Fickian diffusion [54,55].

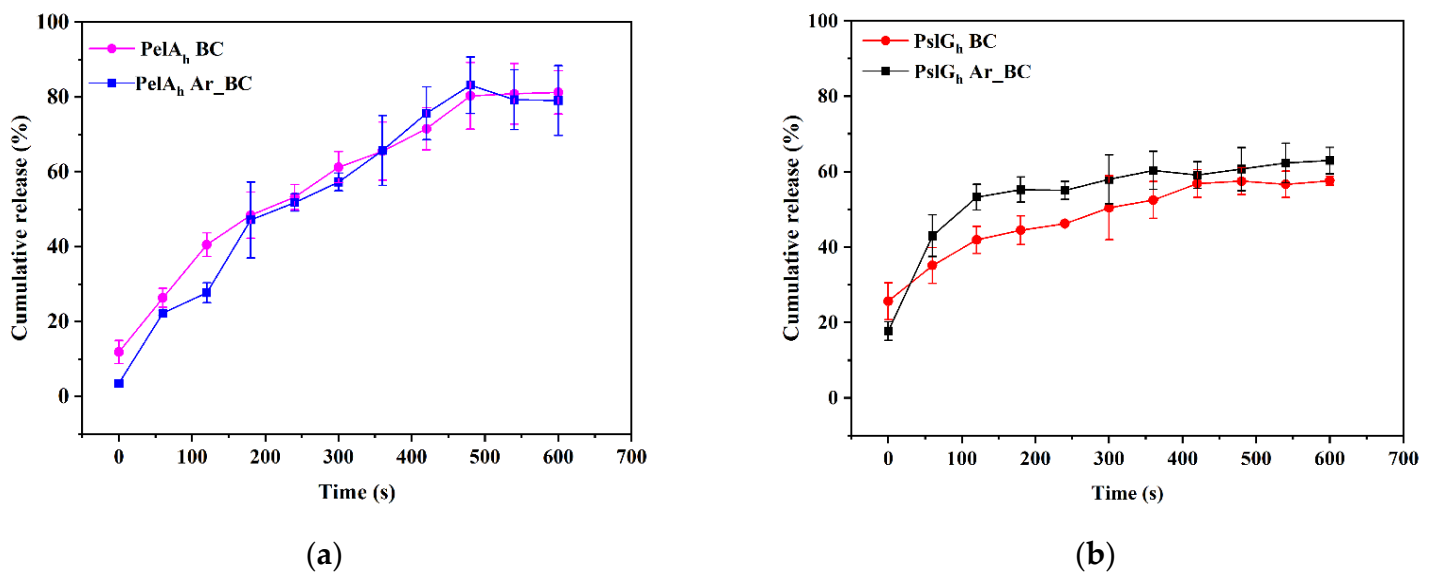


Figure 7. The 3D crystal structure models of PeIA_h (PDB:5TCB) and PslG_h (PDB:5BX9) proteins with highlighted elements of secondary structure and distribution of the electrostatic potential of their molecular surfaces. The electrostatic potential of the protein molecules' molecular surfaces at pH 7.4 was computed according to predictions of the pK_a value by the PROPKA server and the APBS solver via the PDB2PQR server. The final analysis was performed with UCSF Chimera 1.17.1rc package [52,53].

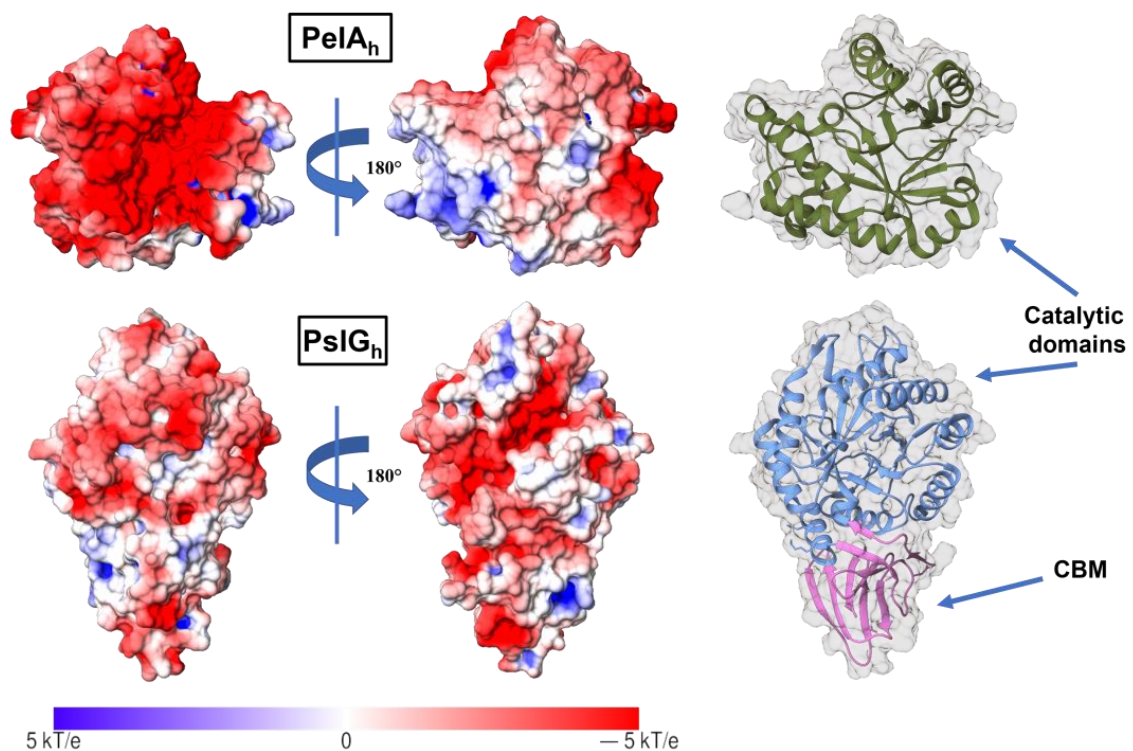


Figure 8. Experimental in vitro PeIA_h (a) and PslG_h (b) release profiles from BC and Ar_BC (in 50 mM phosphate buffer at pH 7.4).

Table 3. Release constants and correlation coefficients of the model equation applied to PelA_h and PslG_h release from native BC and LPArP-modified BC.

Sample	Mathematical Model								
	Zero-Order		First-Order		Higuchi		Korsmeyer-Peppas		
	K ₀	R ₀ ²	K ₁	R ₁ ²	K _H	R _H ²	K _{K-P}	R _{K-P} ²	n
PelA _h —Ar_BC	1.24 × 10 ⁻³	0.92	-2.7 × 10 ⁻³	0.98	0.034	0.97	0.016	0.93	0.63
PelA _h —BC	1.13 × 10 ⁻³	0.94	-2.7 × 10 ⁻³	0.98	0.031	0.98	0.033	0.98	0.51
PslG _h —Ar_BC	5.1 × 10 ⁻⁴	0.60	-9.8 × 10 ⁻⁴	0.71	0.016	0.85	0.15	0.90	0.25
PslG _h —BC	4.9 × 10 ⁻⁴	0.88	-9.1 × 10 ⁻⁴	0.92	0.014	0.98	0.14	0.98	0.22

3.7. Influence of the Immobilization of PelA_h and PslG_h on *P. aeruginosa* PAO-1 Biofilm Eradication

The effect of PelA_h and PslG_h in soluble and immobilized forms on the ability of *P. aeruginosa* PAO-1 to form biofilm was measured in a microplate model using crystal violet staining. The results for the biofilm inhibition assay are presented in Figure 9. For the soluble form of PslG_h, around 70% of the biofilm inhibition was observed when 2.5 and 1.25 µg of enzyme were applied, while for 0.62 µg, the inhibition was slightly lower, amounting to around 50% (Figure 9a). When PelA_h in the same concentration was added to the culture medium, the biofilm inhibition rate was lower compared to PslG_h and was around 50% for 2.5 and 1.25 µg of enzyme and 30% for 0.62 µg (Figure 9d). The composition of the *P. aeruginosa* biofilm matrix is strain dependent. The tested strain of *P. aeruginosa* PAO-1 produces mainly Psl as a dominant exopolysaccharide of the biofilm matrix, which may be the reason for the more effective inhibition of biofilm formation after the use of the PslG_h enzyme [56,57]. In the case of the immobilized enzymes on native BC, it was observed that the biofilm inhibition rate was slightly lower compared to the soluble forms of PelA_h and PslG_h due to lowering release rate of the proteins into the culture medium (Figure 9b,e). The biofilm inhibition rate for the PelA_h released from the Ar_BC (Figure 9f) was similar to the native enzyme released from the BC. The PslG_h released from the Ar_BC exhibited significantly higher inhibiting activity against biofilm development compared to the enzyme released from the unmodified BC, which is consistent with the obtained protein release results. As shown in Figure 9b, for 2.5 µg and 1.25 µg of PslG_h loaded on Ar_BC, the biofilm inhibition rates were 63% and 55%, whereas for protein released from the nonmodified BC, the biofilm inhibition rates were 57% and 53%, respectively. The highest influence of BC modification by LPArP was observed for the concentration of PslG_h equal to 0.62 µg, whereas for nonmodified CB, the biofilm inhibition rate was 12%, while for Ar_BC it was 43%.

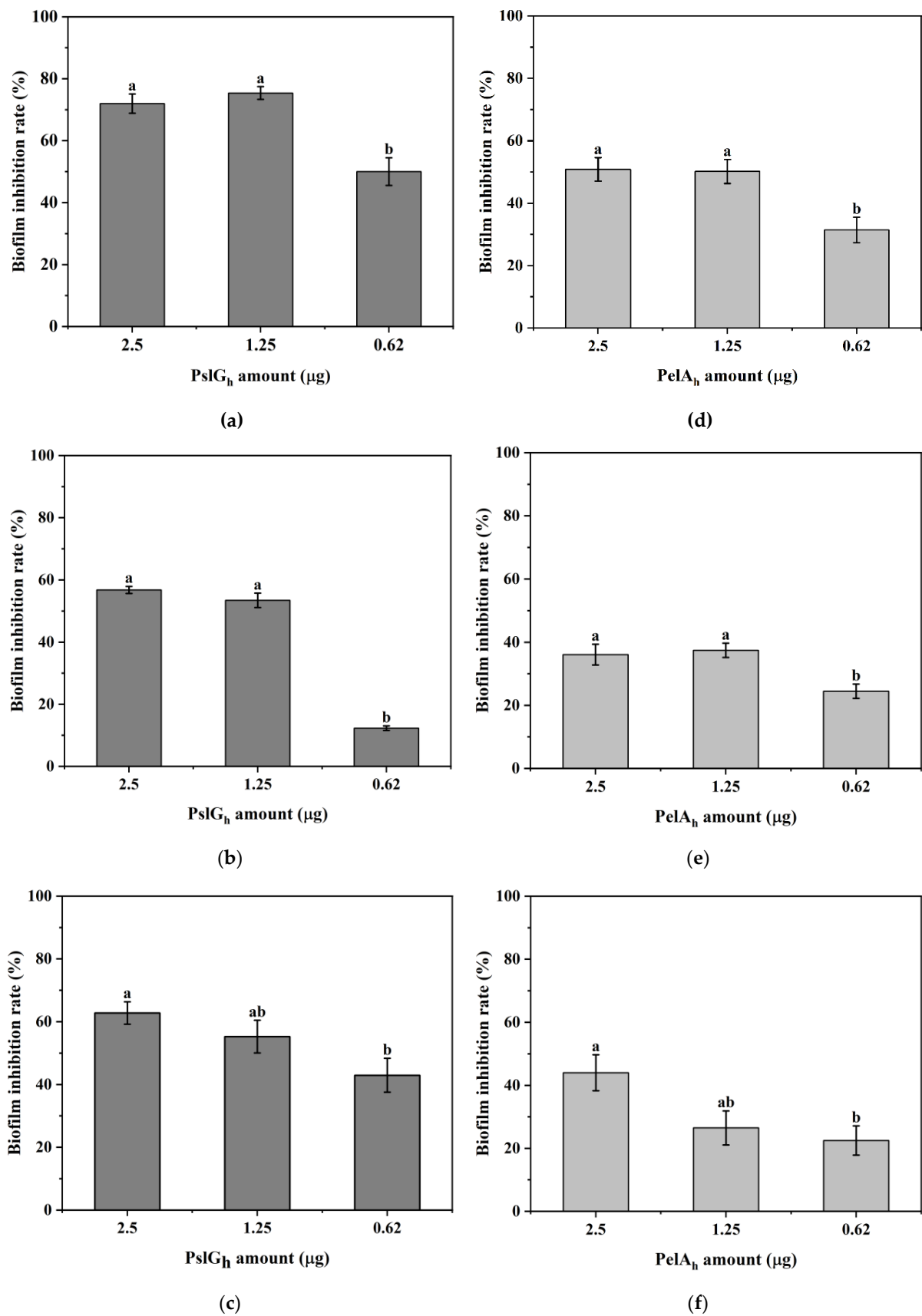


Figure 9. The antibiofilm activity of PelA_h and PslG_h against *P. aeruginosa* PAO-1 biofilm in soluble form (a,d), immobilized on BC (b,e), and immobilized on Ar_BC (c,f). The means with the same superscript are not significantly different, with $p > 0.05$. Error bars represent standard deviation.

4. Conclusions

Bacterial cellulose (BC) is a highly promising biopolymer with a wide range of applications in biomedicine. In this study, we investigated the modification of bacterial cellulose using low-pressure argon plasma to assess its suitability as a carrier for delivering PelA_h and PslG_h proteins, aiming to inhibit the formation of *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1 biofilms. Exposure to LPArP strongly influences the structure of bacterial cellulose, converting the surface into a more amorphous form. XPS and ATR-FTIR analyses revealed a significant change in the chemical composition of the BC surfaces, with a reduction in oxygen content and an increase in carbon components. The introduction of a significant number of charged carboxyl groups did not affect the analyzed enzyme's ability to destabilize biofilms. However, the observed structural differences between PelA_h and PslG_h were assumed to be the main reason for the different profiles of their release from modified and nonmodified BC, although the observed differences did not have a significant effect on their antibiofilm activity. Bacterial cellulose modified through exposure to LPArP shows potential for further development as a versatile carrier for delivery systems based on BC. It possesses varying crystallinity and can accommodate proteins with diverse molecular structures, allowing for effective combat against infections caused by biofilm-forming bacteria.

Author Contributions: Conceptualization, M.C. and R.D.; methodology, M.C., E.E., D.M., M.M., M.J.-S. and R.D.; validation, R.D.; formal analysis, R.D.; investigation, M.C., E.E., D.M., M.M. and M.J.-S.; data curation, M.C.; writing—original draft preparation, M.C. and R.D.; writing—review and editing, D.M., M.J.-S. and R.D.; visualization, M.C. and D.M.; supervision, R.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data will be available from the corresponding author on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Hu, S.; Cai, X.; Qu, X.; Yu, B.; Yan, C.; Yang, J.; Li, F.; Zheng, Y.; Shi, X. Preparation of biocompatible wound dressings with long-term antimicrobial activity through covalent bonding of antibiotic agents to natural polymers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *123*, 1320–1330. [[CrossRef](#)]
2. Talikowska, M.; Fu, X.; Lisak, G. Application of conducting polymers to wound care and skin tissue engineering: A review. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *135*, 50–63. [[CrossRef](#)]
3. Vivcharenko, V.; Przekora, A. Modifications of Wound Dressings with Bioactive Agents to Achieve Improved Pro-Healing Properties. *Appl. Sci.* **2021**, *11*, 4114. [[CrossRef](#)]
4. Sulaeva, I.; Henniges, U.; Rosenau, T.; Potthast, A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modifications. A review. *Biotechnol. Adv.* **2015**, *33*, 1547–1571. [[CrossRef](#)]
5. Cazón, P.; Vázquez, M. Improving bacterial cellulose films by ex-situ and in-situ modifications: A review. *Food Hydrocoll.* **2021**, *113*, 106514. [[CrossRef](#)]
6. Wu, S.; Liu, X.; Yeung, A.; Yeung, K.W.K.; Kao, R.Y.T.; Wu, G.; Hu, T.; Xu, Z.; Chu, P.K. Plasma-modified biomaterials for self-antimicrobial applications. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 2851–2860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Stumpf, T.R.; Yang, X.; Zhang, J.; Cao, X. In situ and ex situ modifications of bacterial cellulose for applications in tissue engineering. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *82*, 372–383. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Szymańska, M.; Hoppe, J.; Dutkiewicz, M.; Sobolewski, P.; Palacz, M.; Janus, E.; Zielińska, B.; Drozd, R. Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *208*, 642–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Farber, R.; Dabush-Busheri, I.; Chaniel, G.; Rozenfeld, S.; Bormashenko, E.; Multanen, V.; Cahan, R. Biofilm grown on wood waste pretreated with cold low-pressure nitrogen plasma: Utilization for toluene remediation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2019**, *139*, 62–69. [[CrossRef](#)]
10. Pertile, R.A.; Andrade, F.K.; Alves, C.; Gama, M. Surface modification of bacterial cellulose by nitrogen-containing plasma for improved interaction with cells. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 692–698. [[CrossRef](#)]

11. Żywicka, A.; Ciecholewska-Juško, D.; Szymańska, M.; Drozd, R.; Sobolewski, P.; Junka, A.; Gorgieva, S.; El Fray, M.; Fijałkowski, K. Argon plasma-modified bacterial cellulose filters for protection against respiratory pathogens. *Carbohydr. Polym.* **2023**, *302*, 120322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bhanthumnavin, W.; Wanichapichart, P.; Taweepreeda, W.; Sirijarukula, S.; Paosawatyanong, B. Surface modification of bacterial cellulose membrane by oxygen plasma treatment. *Surf. Coat. Technol.* **2016**, *306*, 272–278. [[CrossRef](#)]
13. Mai-Prochnow, A.; Murphy, A.B.; McLean, K.M.; Kong, M.G.; Ostrikov, K.K. Atmospheric pressure plasmas: Infection control and bacterial responses. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2014**, *43*, 508–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Hagiwara, K.; Hasebe, T.; Hotta, A. Effects of plasma treatments on the controlled drug release from poly(ethylene-co-vinyl acetate). *Surf. Coat. Technol.* **2013**, *216*, 318–323. [[CrossRef](#)]
15. Canal, C.; Modic, M.; Cvelbar, U.; Ginebra, M.-P. Regulating the antibiotic drug release from β -tricalcium phosphate ceramics by atmospheric plasma surface engineering. *Biomater. Sci.* **2016**, *4*, 1454–1461. [[CrossRef](#)]
16. Kasza, K.; Gurnani, P.; Hardie, K.R.; Cámara, M.; Alexander, C. Challenges and solutions in polymer drug delivery for bacterial biofilm treatment: A tissue-by-tissue account. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2021**, *178*, 113973. [[CrossRef](#)]
17. Serra, R.; Grande, R.; Butrico, L.; Rossi, A.; Settimio, U.F.; Caroleo, B.; Amato, B.; Gallelli, L.; de Franciscis, S. Chronic wound infections: The role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2015**, *13*, 605–613. [[CrossRef](#)]
18. Vanderwoude, J.; Fleming, D.; Azimi, S.; Trivedi, U.; Rumbaugh, K.P.; Diggle, S.P. The evolution of virulence in *Pseudomonas aeruginosa* during chronic wound infection. *Proc. Biol. Sci.* **2020**, *287*, 20202272.
19. Reichhardt, C.; Parsek, M.R. Confocal Laser Scanning Microscopy for Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Architecture and Matrix Localization. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 677. [[CrossRef](#)]
20. Azam, M.W.; Khan, A.U. Updates on the pathogenicity status of *Pseudomonas aeruginosa*. *Drug Discov. Today* **2019**, *24*, 350–359. [[CrossRef](#)]
21. Al-Wrafy, F.; Brzozowska, E.; Górska, S.; Gamian, A. Pathogenic factors of *Pseudomonas aeruginosa*—The role of biofilm in pathogenicity and as a target for phage therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2017**, *71*, 78–91. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Da Passos Silva, D.; Matwichuk, M.L.; Townsend, D.O.; Reichhardt, C.; Lamba, D.; Wozniak, D.J.; Parsek, M.R. The *Pseudomonas aeruginosa* lectin LecB binds to the exopolysaccharide Psl and stabilizes the biofilm matrix. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 2183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Baker, P.; Whitfield, G.B.; Hill, P.J.; Little, D.J.; Pestrak, M.J.; Robinson, H.; Wozniak, D.J.; Howell, P.L. Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Glycoside Hydrolase PslG Reveals That Its Levels Are Critical for Psl Polysaccharide Biosynthesis and Biofilm Formation. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 28374–28387. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Vandana; Das, S. Genetic regulation, biosynthesis and applications of extracellular polysaccharides of the biofilm matrix of bacteria. *Carbohydr. Polym.* **2022**, *291*, 119536. [[CrossRef](#)]
25. Le Mauff, F.; Razvi, E.; Reichhardt, C.; Sivarajah, P.; Parsek, M.R.; Howell, P.L.; Sheppard, D.C. The Pel polysaccharide is predominantly composed of a dimeric repeat of α -1,4 linked galactosamine and N-acetylgalactosamine. *Commun. Biol.* **2022**, *5*, 502. [[CrossRef](#)]
26. Szymańska, M.; Karakulska, J.; Sobolewski, P.; Kowalska, U.; Grygorcewicz, B.; Böttcher, D.; Bornscheuer, U.T.; Drozd, R. Glycoside hydrolase (PelA_H) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *246*, 116625. [[CrossRef](#)]
27. Baker, P.; Hill, P.J.; Snarr, B.D.; Alnabelseya, N.; Pestrak, M.J.; Lee, M.J.; Jennings, L.K.; Tam, J.; Melnyk, R.A.; Parsek, M.R.; et al. Exopolysaccharide biosynthetic glycoside hydrolases can be utilized to disrupt and prevent *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Sci. Adv.* **2016**, *2*, e1501632. [[CrossRef](#)]
28. Pestrak, M.J.; Baker, P.; Dellos-Nolan, S.; Hill, P.J.; Da Passos Silva, D.; Silver, H.; Lacdao, I.; Raju, D.; Parsek, M.R.; Wozniak, D.J.; et al. Treatment with the *Pseudomonas aeruginosa* Glycoside Hydrolase PslG Combats Wound Infection by Improving Antibiotic Efficacy and Host Innate Immune Activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*, e00234-19. [[CrossRef](#)]
29. Snarr, B.D.; Baker, P.; Bamford, N.C.; Sato, Y.; Liu, H.; Lehoux, M.; Gravelat, F.N.; Ostapska, H.; Baistrocchi, S.R.; Cerone, R.P.; et al. Microbial glycoside hydrolases as antibiofilm agents with cross-kingdom activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 7124–7129. [[CrossRef](#)]
30. Asker, D.; Awad, T.S.; Raju, D.; Sanchez, H.; Lacdao, I.; Gilbert, S.; Sivarajah, P.; Andes, D.R.; Sheppard, D.C.; Howell, P.L.; et al. Preventing *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms on Indwelling Catheters by Surface-Bound Enzymes. *ACS Appl. Bio Mater.* **2021**, *4*, 8248–8258. [[CrossRef](#)]
31. Asker, D.; Awad, T.S.; Baker, P.; Howell, P.L.; Hatton, B.D. Non-eluting, surface-bound enzymes disrupt surface attachment of bacteria by continuous biofilm polysaccharide degradation. *Biomaterials* **2018**, *167*, 168–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Chareza, M.; Przygodzka, K.; Żywicka, A.; Grygorcewicz, B.; Sobolewski, P.; Mozia, S.; Śmiglak, M.; Drozd, R. Enhancement of Inhibition of the *Pseudomonas* sp. Biofilm Formation on Bacterial Cellulose-Based Wound Dressing by the Combined Action of Alginate Lyase and Gentamicin. *Int. J. Mol. Sci.* **2023**, *24*, 4740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Beamson, G.; Briggs, D. *High Resolution XPS of Organic Polymers: The Scienta ESCA300 Database*; Wiley: Chichester, UK, 1992; ISBN 0471935921.
34. Przygodzka, K.; Chareza, M.; Banaszek, A.; Zielińska, B.; Ekiert, E.; Drozd, R. Bacterial Cellulose Production by *Komagataibacter xylinus* with the Use of Enzyme-Degraded Oligo- and Polysaccharides as the Substrates. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12673. [[CrossRef](#)]

35. Jedrzejczak-Silicka, M.; Kordas, M.; Konopacki, M.; Rakoczy, R. Modulation of Cellular Response to Different Parameters of the Rotating Magnetic Field (RMF)-An In Vitro Wound Healing Study. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 5785. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Ambrogi, V.; Pietrella, D.; Donnadio, A.; Latterini, L.; Di Michele, A.; Luffarelli, I.; Ricci, M. Biocompatible alginate silica supported silver nanoparticles composite films for wound dressing with antibiofilm activity. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2020**, *112*, 110863. [[CrossRef](#)]
37. Drozd, R.; Szymańska, M.; Żywicka, A.; Kowalska, U.; Rakoczy, R.; Kordas, M.; Konopacki, M.; Junka, A.F.; Fijałkowski, K. Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus*. *Biochem. Eng. J.* **2021**, *166*, 107855. [[CrossRef](#)]
38. Khan, H.; Kadam, A.; Dutt, D. Studies on bacterial cellulose produced by a novel strain of *Lactobacillus* genus. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *229*, 115513. [[CrossRef](#)]
39. Abrial, H.; Chairani, M.K.; Rizki, M.D.; Mahardika, M.; Handayani, D.; Sugiarti, E.; Muslimin, A.N.; Sapuan, S.M.; Ilyas, R.A. Characterization of compressed bacterial cellulose nanopaper film after exposure to dry and humid conditions. *J. Mater. Res. Technol.* **2021**, *11*, 896–904. [[CrossRef](#)]
40. Dayal, M.S.; Goswami, N.; Sahai, A.; Jain, V.; Mathur, G.; Mathur, A. Effect of media components on cell growth and bacterial cellulose production from *Acetobacter acetii* MTCC 2623. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *94*, 12–16. [[CrossRef](#)]
41. Srikandace, Y.; Apriyana, A.Y.; Zahrad, S.A.; Ramdhani, W.; Asri, P.P.P.; Andriani, D.; Abdullah, A.H.D.; Syampurwadi, A.; Satoto, R.; Karina, M. Bacterial Cellulose Production by *Komagataeibacter xylinus* Using Rice-washed Water and Tofu Processing Wastewater with the Addition of Sodium Glutamate. *Fibers Polym.* **2022**, *23*, 1190–1196. [[CrossRef](#)]
42. Chashmehjahanbin, M.R.; Salimi, A.; Ershad Langroudi, A. The study of the coating adhesion on PP surface modified in different plasma/acrylic acid solution. *Int. J. Adhes. Adhes.* **2014**, *49*, 44–50. [[CrossRef](#)]
43. Hua, Z.Q.; Sitaru, R.; Denes, F.; Young, R.A. Mechanisms of oxygen- and argon-RF-plasma-induced surface chemistry of cellulose. *Plasma Polym.* **1997**, *2*, 199–224. [[CrossRef](#)]
44. Kumar, A.; Singh Negi, Y.; Choudhary, V.; Kant Bhardwaj, N. Characterization of Cellulose Nanocrystals Produced by Acid-Hydrolysis from Sugarcane Bagasse as Agro-Waste. *JMPC* **2020**, *2*, 1–8. [[CrossRef](#)]
45. Brassolatti, P.; Kido, H.W.; Bossini, P.S.; Gabbai-Armelin, P.R.; Otterço, A.N.; Almeida-Lopes, L.; Zanardi, L.M.; Napolitano, M.A.; de Da Avó, L.R.S.; Forato, L.A.; et al. Bacterial cellulose membrane used as biological dressings on third-degree burns in rats. *Biomed. Mater. Eng.* **2018**, *29*, 29–42. [[CrossRef](#)]
46. Arias, S.L.; Cheng, M.K.; Civantos, A.; Devorkin, J.; Jaramillo, C.; Allain, J.P. Ion-Induced Nanopatterning of Bacterial Cellulose Hydrogels for Biosensing and Anti-Biofouling Interfaces. *ACS Appl. Nano Mater.* **2020**, *3*, 6719–6728. [[CrossRef](#)]
47. Tang, S.; Lu, N.; Wang, J.K.; Ryu, S.-K.; Choi, H.-S. Novel Effects of Surface Modification on Activated Carbon Fibers Using a Low Pressure Plasma Treatment. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 1820–1829. [[CrossRef](#)]
48. Vasil'kov, A.; Budnikov, A.; Gromovykh, T.; Pigaleva, M.; Sadykova, V.; Arkharova, N.; Naumkin, A. Effect of Bacterial Cellulose Plasma Treatment on the Biological Activity of Ag Nanoparticles Deposited Using Magnetron Deposition. *Polymers* **2022**, *14*, 3907. [[CrossRef](#)]
49. Nosworthy, N.J.; McKenzie, D.R.; Bilek, M.M. A new surface for immobilizing and maintaining the function of enzymes in a freeze-dried state. *Biomacromolecules* **2009**, *10*, 2577–2583. [[CrossRef](#)]
50. Mensink, M.A.; Frijlink, H.W.; van der Voort Maarschalk, K.; Hinrichs, W.L.J. How sugars protect proteins in the solid state and during drying (review): Mechanisms of stabilization in relation to stress conditions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *114*, 288–295. [[CrossRef](#)]
51. Gao, K.; Oerlemans, R.; Groves, M.R. Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery. *Biophys. Rev.* **2020**, *12*, 85–104. [[CrossRef](#)]
52. Pettersen, E.F.; Goddard, T.D.; Huang, C.C.; Couch, G.S.; Greenblatt, D.M.; Meng, E.C.; Ferrin, T.E. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605–1612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Olsson, M.H.M.; Søndergaard, C.R.; Rostkowski, M.; Jensen, J.H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theory Comput.* **2011**, *7*, 525–537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Adepu, S.; Khandelwal, M. Ex-situ modification of bacterial cellulose for immediate and sustained drug release with insights into release mechanism. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *249*, 116816. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Jantarat, C.; Muenraya, P.; Srivaro, S.; Nawakitransan, A.; Promsornpason, K. Comparison of drug release behavior of bacterial cellulose loaded with ibuprofen and propranolol hydrochloride. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 37354–37365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Colvin, K.M.; Irie, Y.; Tart, C.S.; Urbano, R.; Whitney, J.C.; Ryder, C.; Howell, P.L.; Wozniak, D.J.; Parsek, M.R. The Pel and Psl polysaccharides provide *Pseudomonas aeruginosa* structural redundancy within the biofilm matrix. *Environ. Microbiol.* **2012**, *14*, 1913–1928. [[CrossRef](#)]
57. Thi, M.T.T.; Wibowo, D.; Rehm, B.H.A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 8671. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.



Zachodniopomorski
Uniwersytet Technologiczny
w Szczecinie



Wydział
Biotechnologii
i Hodowli Zwierząt

Załącznik 2

Oświadczenia współautorów publikacji naukowych
wchodzących w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską
wraz z określeniem ich indywidualnego udziału

Rozprawa doktorska

mgr inż. Magdalena Charęza

„Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”

Szczecin, 2023

Szczecin, 20.07.2023

Dr inż. Radosław Drozd

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Aleja Piastów 45

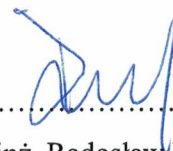
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.
- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.
- Charęza, M., Przygrodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.
- Charęza M., Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Applied Sciences*, 13(13), 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>.

Mój wkład w przygotowanie tych publikacji polegał na współudziale w opracowaniu koncepcji i zakresu metodycznego badań, nadzorowaniu wykonywanych przez doktorantkę badań, udziale w analizach i dyskusji wyników, udziale w przygotowaniu i końcowej edycji manuskryptu. Autor korespondencyjny.



.....
Dr inż. Radosław Drozd

Szczecin, 29.06.2023 r.


Dr hab. Jolanta Kochel-Karakulska, prof. ZUT
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii
Aleja Piastów 45
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na edycji oraz przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

Szczecin, 29.06.2023r. 

Dr hab. Jolanta Kochel-Karakulska, prof. ZUT

Greifswald, 08.02.2023

Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer
Institute of Biochemistry
Dept. of Biotechnology and Enzyme Catalysis
University of Greifswald

Co – authorship statement

I hereby declare that I am the co – author of the publication included in the doctoral thesis of M. Sc. Magdalena Charęza:

- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.

I contributed to supervising of preparation of gene construct and careful reviewing of the paper and approved the final version of the manuscript.



.....
Prof. Dr. Uwe T. Bornscheuer

Greifswald, 08.02.2023

Dr. Dominique Böttcher
Institute of Biochemistry
Dept. of Biotechnology and Enzyme Catalysis
University of Greifswald

Co – authorship statement

I hereby declare that I am the co – author of the publication included in the doctoral thesis of M. Sc. Magdalena Charęza:

- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.

I contributed to supervising of preparation of gene construct and careful reviewing of the paper and approved the final version of the manuscript.



Dr. Dominique Böttcher

Szczecin, 29.06.2023

Dr inż. Piotr Sobolewski

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Inżynierii Polimerów i Biomateriałów

Aleja Piastów 45

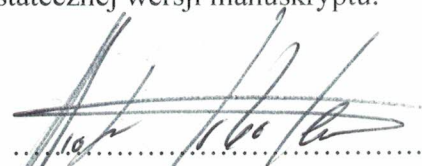
70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzących w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.
- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.
- Charęza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tych publikacji polegał na opracowaniu i przeprowadzeniu analiz cytotoksyczności, interpretacji wyników oraz przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Dr inż. Piotr Sobolewski

Szczecin, 27.06.2023

Dr hab. inż. Beata Zielińska prof. ZUT

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Fizykochemii Nanomateriałów

ul. Aleja Piastów 42

70-065 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu analizy rentgenostrukturalnej (XRD) celulozy bakteryjnej.



Dr hab. inż. Beata Zielińska prof. ZUT

Szczecin, 17.05.2023

Dr n. med. n. zdr. Bartłomiej Grygorcewicz
Pomorski Uniwersytet Medyczny w Szczecinie
Wydział Medycyny i Stomatologii
Zakład Medycyny Laboratoryjnej
ul. Powstańców Wielkopolskich 72
70-111 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.
- Charęza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiślak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na koordynowaniu badań z wykorzystaniem cytometru przepływowego oraz przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.

ASYSTENT
Zakładu Medycyny Laboratoryjnej
.....
dr n. med. Bartłomiej Grygorcewicz
Dr n. med. n. zdr. Bartłomiej Grygorcewicz

Szczecin, 28.05.2023

prof. dr hab. inż. Sylwia Mozia

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska

ul. Pułaskiego 10

70-322 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorką publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Charęza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu analizy potencjału zeta celulozy bakteryjnej.



.....
prof. dr hab. inż. Sylwia Mozia

Poznań, 19.05.2023

Dr Michał Dutkiewicz

Fundacja Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Poznański Park Naukowo – Technologiczny
ul. Rubież 46, 61-612 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szumańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na syntezie polimeru silikonowego, analizie jego struktury oraz opisie wyników.



.....
Dr Michał Dutkiewicz

Szczecin, 28.06.2023

Dr inż. Urszula Kowalska

Centrum Bioimmobilizacji i Innowacyjnych Materiałów Opakowaniowych

Wydział Nauk o Żywności i Rybactwa

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

ul. Klemensa Janickiego 35

71-270 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

Szymańska, M., Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer, U.T. & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116625>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu zdjęć za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.



Dr inż. Urszula Kowalska

Poznań, 01.06.2023

dr Magdalena Palacz

Poznański Park Naukowo - Technologiczny

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Chareża o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu zdjęć za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.


.....

dr Magdalena Palacz

Szczecin, 13.06.2023

Dr inż. Anna Żywicka

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Aleja Piastów 45

70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Charęza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na przeprowadzeniu analiz z wykorzystaniem cystometrii przepływowej.

.....Anna Żywicka.....

Dr inż. Anna Żywicka

Szczecin, 12.06.2023

Dr hab. inż. Ewa Janus prof. ZUT

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Materiałów Polimerowych

ul. Puławskiego 10

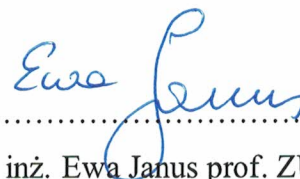
70-322 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu analiz napięcia powierzchniowego medium hodowlanego.



.....
Dr hab. inż. Ewa Janus prof. ZUT

Szczecin, 28.06.2023

mgr inż. Katarzyna Przygrodzka

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt

Katedra Mikrobiologii i Biotechnologii

Aleja Piastów 45

70-311 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Charęza, M., Przygrodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na udziale w oznaczeniu aktywności liazы alginianowej.



mgr inż. Katarzyna Przygrodzka

Szczecin, 03.07.2023

dr hab. inż. Dariusz Moszyński, prof. ZUT

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska

ul. Pułaskiego 10

70-322 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- **Charęza M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Applied Sciences*, 13(13), 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na przeprowadzeniu analiz techniką XPS oraz na interpretacji i opisie wyników.


.....
dr hab. inż. Dariusz Moszyński, prof. ZUT

Szczecin, 03.07.2023

Dr inż. Ewa Ekiert

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Wydział Technologii i Inżynierii Chemicznej

Katedra Technologii Chemicznej Nieorganicznej i Inżynierii Środowiska

ul. Pułaskiego 10

70-322 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- **Charęza M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Applied Sciences*, 13(13), 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu zdjęć za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego.

.....


Dr inż. Ewa Ekiert

Poznań, 26.06.2023

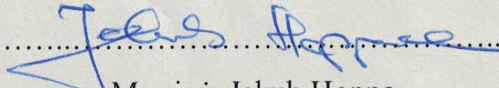
Mgr inż. Jakub Hoppe
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Chemii
Zakład Chemii i Technologii Związków Krzemu
ul. Umultowska 89 b
61-614 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Szymańska, M., Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B. & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.03.124>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na wykonaniu skaningowej kalorymetrii różnicowej i analizie termogravimetrycznej oraz opisie uzyskanych wyników.


Mgr inż. Jakub Hoppe

Szczecin, 03.07.2023

Dr inż. Magdalena Jędrzejczak-Silicka
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
Wydział Biotechnologii i Hodowli Zwierząt
Katedra Nauk o Zwierzętach Przeżuwających
Pracownia Cytogenetyki Molekularnej
ul. Klemensa Janickiego 29
70-322 Szczecin

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Chareża o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- **Chareża M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Applied Sciences*, 13(13), 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na opracowaniu i przeprowadzeniu analiz cytotoksyczności oraz interpretacji wyników.

Magdalena Jędrzejczak-Silicka

Dr inż. Magdalena Jędrzejczak-Silicka

Kraków, 03.07.2023

dr inż. Mariusz Madej

Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii

Zakład Mikrobiologii

ul. Gronostajowa 7

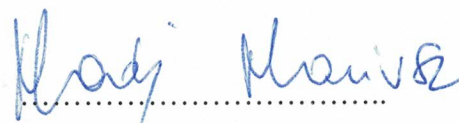
30-387 Kraków

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- **Charęza M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak-Silicka M., Drozd R. (2023). An Evaluation of the Usability of Argon Plasma-Treated Bacterial Cellulose as a Carrier for Controlled Releases of Glycoside Hydrolases PelA_h and PslG_h, Which Are Able to Eradicate Biofilm. *Applied Sciences*, 13(13), 7797. <https://doi.org/10.3390/app13137797>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na opracowaniu i przeprowadzeniu analiz techniką DSF.



dr inż. Mariusz Madej

Poznań, 12.07.2023

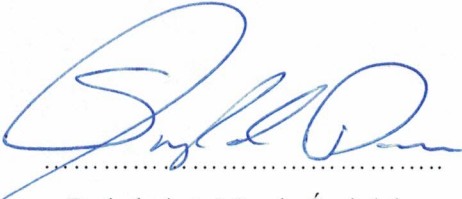
Dr hab. inż. Marcin Śmiglak
Fundacja Uniwersytetu im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Poznański Park Naukowo – Technologiczny
ul. Rubież 46
61-612 Poznań

OŚWIADCZENIE

W związku z ubieganiem się mgr inż. Magdaleny Charęza o stopień naukowy doktora oświadczam, że jestem współautorem publikacji wchodzącej w skład cyklu rozprawy doktorskiej:

- Charęza, M., Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M. & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (5), 4740. <https://doi.org/10.3390/ijms24054740>.

Mój udział w przygotowaniu tej publikacji polegał na współudziale w edycji oraz przygotowaniu ostatecznej wersji manuskryptu.



Dr hab. inż. Marcin Śmiglak

Załącznik 3

Sumaryczne zestawienie dorobku naukowego

Rozprawa doktorska

mgr inż. Magdalena Charęza

„Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”

Szczecin, 2023

I. Imię i nazwisko

Magdalena Chareża

II. Wykształcenie

10.2017 – obecnie

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Studia doktoranckie na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Praca realizowana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii pt.: „Wpływ immobilizacji enzymów mających zdolność do degradacji biofilmów na ich aktywność katalityczną z wykorzystaniem celulozy bakteryjnej jako nośnika”

Promotor: dr hab. Jolanta Kochel-Karakulska, prof. ZUT

Promotor pomocniczy: dr inż. Radosław Drozd

02.2015 – 06.2017

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Studia magisterskie na Wydziale Nauk o Żywności i Rybactwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Kierunek: mikrobiologia stosowana

Praca magisterska napisana w Katedrze Mikrobiologii i Biotechnologii pt.: „Czułe na pole magnetyczne, modyfikowane polietylenoiminą sfery celulozy bakteryjnej jako nośnik do immobilizacji esteraz pochodzenia mikrobiologicznego”

Promotor: dr inż. Radosław Drozd

09.2015 – 06.2016

Uniwersytet Rolniczy w Pławdiw

Studia magisterskie w ramach programu Erasmus +

02.2015 – 06.2016

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Studia magisterskie na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Kierunek: biotechnologia

Praca magisterska napisana w Katedrze Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki pt.: „Identyfikacja wybranych białek osocza emu zwyczajnego (*Dromaius novaehollandiae*) na podstawie map peptydowych z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI TOF”

Promotor: dr hab. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

10.2011 – 02.2015

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Studia inżynierskie na Wydziale Biotechnologii i Hodowli Zwierząt Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

Kierunek: biotechnologia

Praca magisterska napisana w Katedrze Fizjologii, Cytobiologii i Proteomiki pt., „Rejestracja widm masowych oraz identyfikacja wybranych białek wątroby rosnących prosiąt z wykorzystaniem spektrometru masowego typu MALDI-TOF”

Promotor: dr hab. Małgorzata Ożgo, prof. ZUT

III. Publikacje naukowe wchodzące w skład cyklu stanowiącego rozprawę doktorską

1. **Szymańska, M.**, Karakulska, J., Sobolewski, P., Kowalska, U., Grygorcewicz, B., Böttcher, D., Bornscheuer U.T., & Drozd, R. (2020). Glycoside hydrolase (PelA_h) immobilization prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on cellulose-based wound dressing. *Carbohydrate polymers*, 246, 116625.

IF₂₀₂₀ – 9,381, 140 p. MEiN₂₀₂₀

2. **Szymańska, M.**, Hoppe, J., Dutkiewicz, M., Sobolewski, P., Palacz, M., Janus, E., Zielińska, B., & Drozd, R. (2022). Silicone polyether surfactant enhances bacterial cellulose synthesis and water holding capacity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 208, 642-653.

IF₂₀₂₂ – 6,953, 100 p. MEiN₂₀₂₂

3. **Chareża, M.**, Przygodzka, K., Żywicka, A., Grygorcewicz, B., Sobolewski, P., Mozia, S., Śmiglak, M., & Drozd, R. (2023). Enhancement of inhibition of the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and gentamicin. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4740.

IF₂₀₂₃ – 6,208, 140 p. MEiN₂₀₂₃

4. **Chareża M.**, Ekiert E., Moszyński D., Madej M., Jędrzejczak – Silicka M., & Drozd R. (2023). Evaluation of argon plasma treated bacterial cellulose usability as carrier for controlled releases enzymes PelA_h and PslG_h able to biofilm eradication. *Applied Sciences*, 13

IF₂₀₂₃ – 2,838; 100 p. MEiN₂₀₂₃

5. Pozostałe publikacje naukowe

1. Drozd, R., **Szymańska, M.**, Rakoczy, R., Junka, A., Szymczyk, P., & Fijałkowski, K. (2019). Functionalized magnetic bacterial cellulose beads as carrier for Lecitase® Ultra immobilization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 187(1), 176-193.
IF₂₀₁₉ – 2,442, 70 p. MEiN₂₀₁₉
(20 kt MNiSW₂₀₁₉)
2. Leśniarek, A., Chojnacka, A., Drozd, R., **Szymańska, M.**, & Gładkowski, W. (2020). Free and immobilized lecitase™ ultra as the biocatalyst in the kinetic resolution of (E)-4-arylbut-3-en-2-yl esters. *Molecules*, 25(5), 1067.
IF₂₀₂₀ – 4,411, 100 p. MEiN₂₀₂₀
3. Leśniarek, A., Chojnacka, A., Drozd, R., **Szymańska, M.**, & Gładkowski, W. (2020). Enantioselective transesterification of allyl alcohols with (E)-4-arylbut-3-en-2-ol motif by immobilized Lecitase™ Ultra. *Catalysts*, 10(7), 798.
IF₂₀₂₀ – 4,146, 100 p. MEiN₂₀₂₀
4. Drozd, R., **Szymańska, M.**, Przygodzka, K., Hoppe, J., Leniec, G., & Kowalska, U. (2021). The simple method of preparation of highly carboxylated bacterial cellulose with Ni-and Mg-ferrite-based versatile magnetic carrier for enzyme immobilization. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8563.
IF₂₀₂₁ – 6,208, 140 p. MEiN₂₀₂₁
5. Drozd, R., **Szymańska, M.**, Żywicka, A., Kowalska, U., Rakoczy, R., Kordas, M., Junka, A.F., & Fijałkowski, K. (2021). Exposure to non-continuous rotating magnetic field induces metabolic strain-specific response of *Komagataeibacter xylinus*. *Biochemical Engineering Journal*, 166, 107855.
IF₂₀₂₁ – 2,768, 100 p. MEiN₂₀₂₁
6. Hoppe, J., Byzia, E., **Szymańska, M.**, Drozd, R., & Smiglak, M. (2022). Acceleration of lactose hydrolysis using beta-galactosidase and deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 384, 132498.
IF₂₀₂₂ – 9,231, 200 p. MEiN₂₀₂₂
7. Hoppe, J., Byzia, E., Drozd, R., **Szymańska, M.**, Bielecki, P., & Smiglak, M. (2022). An effect of choline lactate based low transition temperature mixtures on the lipase catalytic properties. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 216, 112518.
IF₂₀₂₂ – 5,999, 100 p. MEiN

8. Przygodzka, K., **Chareża, M.**, Banaszek, A., Zielińska, B., Ekiert, E., & Drozd, R. (2022). Bacterial cellulose production by *Komagateibacter xylinus* with the use of enzyme-degraded oligo-and polysaccharides as the substrates. *Applied Sciences*, 12(24), 12673.

IF₂₀₂₂ – 2,838, 100 p. MEiN₂₀₂₂

9. Żywicka, A., Ciecholewska-Juśko, D., **Chareża, M.**, Drozd, R., Sobolewski, P., Junka, A., Gorgieva, S., El Fray, M., & Fijałkowski, K. (2023). Argon plasma-modified bacterial cellulose filters for protection against respiratory pathogens. *Carbohydrate Polymers*, 302, 120322.

IF₂₀₂₃ – 10,723, 140 p. MEiN₂₀₂₃

10. Roman, B. H., **Chareża, M.**, Janus, E., & Drozd, R. (2023). Evaluation of new L-amino acids triethanolammonium salts usability for controlling protease activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, 123218.

IF₂₀₂₂ – 8,025, 100 p. MEiN₂₀₂₂

6. Patenty

1. Patent: Leśniarek A., Gładkowski W., Drozd R., **Szymańska M.** Sposób kinetycznego rozdziału racemicznego (E)-4-fenylobut-3-en-2-olu, numer zgłoszenia P.430758, numer prawa wyłącznego Pat.240592, 2019.
2. Patent: Leśniarek A., Gładkowski W., Drozd R., **Szymańska M.**, Sposób kinetycznego rozdziału racemicznego octanu (E)-4-fenylobut-3-en-2-ylu, numer zgłoszenia: P.430751, numer prawa wyłącznego: Pat.239852, 2019.
3. Patent: Fijałkowski, K., El Fray, M., Drozd, R., Żywicka, A., Sobolewski, P., **Ciecholewska-Juśko, D.**, Szymańska, M. Sposób wytwarzania modyfikowanej celulozy bakteryjnej o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych, numer zgłoszenia: P.430149, 2021.
4. Patent: Fijałkowski, K., El Fray, M., Drozd, R., Żywicka, A., Sobolewski, P., **Ciecholewska-Juśko, D.**, Szymańska, M. Sposób wytwarzania biodegradowalnych materiałów filtracyjnych na bazie bionanocelulozy, numer zgłoszenia: P.430150, 2021.

7. Udział w projektach badawczych

1. 08.2020 – 10.2020 – Udział w grantie dofinansowanym w ramach projektu własnego przez Urząd Marszałkowski województwa zachodniopomorskiego pn. „Biodegradowalne, przeciwbakteryjne i przeciwwirusowe filtry na bazie bionanocelulozy do zastosowania w maseczkach ochronnych”, nr Proto_lab/K2/2021/U/7.
2. 12.2020 – 12.2021 – Udział w grantie pn. „Analiza mechanizmów zwiększonej efektywności substancji przeciwdrobnoustrojowych względem biofilmów w obecności wirującego pola magnetycznego”, w ramach grantu OPUS 14 finansowanego ze źródeł Narodowego Centrum Nauki, nr 2017/27/B/NZ6/02103.
3. 04.2021 – 10.2021 – Udział w grantie dofinansowanym w ramach projektu własnego przez Urząd Marszałkowski województwa zachodniopomorskiego pn. „Testowanie w warunkach rzeczywistych innowacyjnych maseczek ochronnych (NanoBioCell) z bionanocelulozy”, nr Proto_lab/K1/2020/U/11.

8. Aktywny udział w konferencjach naukowych

1. Bhvasar P., **Szymańska M.**, Jankowska P., 2016, „Cukier krzepi? Analiza wpływu wybranych sacharydów na aktywność katalazy”, II Ogólnopolska Sesja Studenckich Kół Naukowych, Szczecin (referat).
2. **Szymańska M.**, Paczkowski W., Wasak A., 2017, „Zastosowanie celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji esteraz bakteryjnych”, XXI Międzynarodowa Konferencja Studenckich Kół Naukowych, Wrocław (referat).
3. **Szymańska M.**, Drozd R., Wasak A., Rakoczy R., Fijałkowski K., 2017, „Funkcjonalizowana celuloza bakteryjna jako uniwersalny nośnik do immobilizacji enzymów”, Badania i Rozwój Młodych Naukowców w Polsce, Wrocław (referat).
4. **Szymańska M.**, Drozd R., Wasak A., Rakoczy R., Fijałkowski K., 2017, „Zastosowanie celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji enzymów”, BioOrg II Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań (referat).
5. **Szymańska M.**, Drozd R., Karakulska J., Grygorcewicz B., 2018, „Rola enzymów w syntezie i eradykacji biofilmów”, Ogólnopolska Konferencja Młodych Biologów „Biologus”, Szczecin (referat).

6. **Szymańska M.**, Drozd R., Karakulska J., Grygorcewicz B., 2018, „Zastosowanie enzymów jako narzędzia do eradykacji biofilmów”, III Ogólnopolska Konferencja Nowe Horyzonty w Naukach Przyrodniczych „BIOT”, Poznań (referat).
7. **Szymańska M.**, Drozd R., Karakulska J., 2019, „Biopolimery pochodzenia mikrobiologicznego jako nośnik enzymów wspierających eradykację biofilmów tworzonych przez *Pseudomonas aeruginosa*”, IV Szczecińskie Sympozjum Młodych Chemików, Szczecin (poster).
8. **Szymańska M.**, Drozd R., Karakulska J., 2019, „Immobilization of recombinant hydrolytic domain of PelA from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biofilm formation on bacterial biopolymer as a carrier”, 8th Intercollegiate Biotechnology Symposium „Symbioza”, Warszawa (poster).
9. **Szymańska M.**, Drozd R., Karakulska J., 2019, „Zastosowanie celulozy bakteryjnej jako nośnika do immobilizacji domeny o aktywności hydrolitycznej enzymu PelA”, IV Interdyscyplinarna Konferencja Nano(&)BioMateriały od teorii do aplikacji, Toruń (referat).
10. **Szymańska M.**, Karakulska J., Drozd R., 2019, „Immobilizacja rekombinowanej domeny hydrolitycznej białka PelA na membranach z celulozy pochodzenia mikrobiologicznego”, III Ogólnopolskie Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Poznań (referat).
11. **Szymańska M.**, Karakulska J., Grygorcewicz B., Kowalska U., Sobolewski P., Fijałkowski K., Drozd R., 2020, „Influence of immobilized glycoside hydrolase PelA_h on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1”, FEMS Online Conference on Microbiology (referat).
12. **Szymańska M.**, Hoppe J., Drozd R., 2021, „Wpływ związków powierzchniowo czynnych na proces produkcji celulozy bakteryjnej”, XIV Kopernikańskie Seminarium Doktoranckie, Toruń (referat).
13. **Chareża M.**, Ciecholewska-Juśko D., Żywicka A., Drozd R., Sobolewski P., El Fray M., Fijałkowski K., 2022, „Highly effective protective face masks with argon plasma modified BC filter to control spread of the SARS-CoV-2 virus”, 1st Baltic Symposium on Polymer and (Bio)Materials Science, Szczecin (poster).

14. **Chareża M.**, Przygodzka K., Żywicka A., Ekiert E., Sobolewski P., Moszyński D., Drozd R., 2022, “Enhancement of inhibition the *Pseudomonas* sp. biofilm formation on bacterial cellulose-based wound dressing by the combined action of alginate lyase and antibiotics”, “The last word belongs to microbes” Celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur, Warszawa (poster).

9. Wybrane doniesienia konferencyjne

1. Drozd R., **Szymańska M.**, Felix Galvao I., Rakoczy R., Fijałkowski K., Wasak A., 2017, „Aminated magnetic bacterial cellulose beads as versatile carrier for enzyme immobilization”, MIKROBIOT, Łódź.
2. Drozd R., Szymańska M., Rakoczy R., Konopacki M., Fijałkowski K., 2017, „Assessment the rotating magnetic field as a tool for determining the biochemical parameters of the cultures of *Komagataeibacter* sp.”, MIKROBIOT, Łódź.
3. Drozd R., **Szymańska M.**, Rakoczy R., Fijałkowski K., 2018, „Bacterial nanocellulose as a promising biopolymer for green chemistry – application and modification methods”, 2nd Advances in Green Chemistry Conference, Poznań.
4. Przygodzka K., Molpeceres J., **Szymańska M.**, Drozd R., 2019, „Synthesis and analysis of operational parameters the Nickel Ferrite – Cross – Linked Enzyme Aggregates (NiFe-CLEAs) of glucoamylase and lipase”, 8th Intercollegiate Biotechnology Symposium „Symbioza”, Warszawa.
5. Drozd R., **Szymańska M.**, Fijałkowski K., Rezende T., Przygodzka K., 2019, „Modyfikowana celuloza jako wszechstronny nośnik do immobilizacji enzymów”, IV Interdyscyplinarna Konferencja Nano(&)BioMateriały od teorii do aplikacji, Toruń.
6. Drozd R., **Szymańska M.**, Hoppe J., Junka A., Fijałkowski K., 2020, „Influence of the rotating magnetic field on bacterial biofilm extracellular matrix composition”, FEMS Online Conference on Microbiology.
7. Roman B.H., **Szymańska M.**, Ossowicz-Rupniewska P., Janus E., Drozd R., 2022, „Synteza i zastosowanie aminokwasowych cieczy jonowych w kontroli aktywności wybranych enzymów”, Kongres Technologii Chemicznej, Wrocław.
8. Woroszyło M., **Chareża M.**, Żywicka A., Ciecholewska-Juśko D., Drozd R., Sobolewski P., Fijałkowski K., El Fray M., 2022, „Testing of innovative, biodegradable masks based

on a modified bacterial cellulose based filter in health care units”, 1st Baltic Symposium on Polymer and (Bio)Materials Science, Szczecin.

9. Żywicka A., Ciecholewska-Juśko D., **Chareża M.**, Drozd R., Sobolewski P., Junka A., Gorgieva S., El Fray M., Fijałkowski K., 2022, „Bacterial cellulose-based filters modified with low-pressure argon as highly efficient protection from biological, air pollutants during COVID-19 pandemic”, 1st Baltic Symposium on Polymer and (Bio)Materials Science, Szczecin.
10. Przygodzka K., **Chareża M.**, Banaszek A., Zielińska B., Ekiert E., Drozd R., 2022, „Synthesis of bacterial cellulose employing enzymatically degraded oligo- and polysaccharides”, Celebrating the 200th anniversary of the birth of Louis Pasteur, Warszawa.

10. Szkolenia i staże

1. 07.2015 – 08.2015 – Staż naukowy na Uniwersytecie Stanowym São Paulo – UNESP, Botucatu, Brazylia.
2. 10.2017 – Szkolenie AKTA User Day 2017 „Drug Discovery and Development Edition” poświęcone tematyce chromatograficznej (w szerokim zakresie analiz białkowych) oraz technikom obrazowania.
3. 05.2018 – 06.2018 – Staż naukowy na Pomorskim Uniwersytecie Medycznym w Szczecinie, Zakład Biochemii i Żywienia Człowieka.
4. 07.2018 – Staż naukowy na Uniwersytecie Ekonomicznym we Wrocławiu, Katedra Żywności Pochodzenia Zwierzęcego.
5. 10.2018 – 12.2018 – Staż naukowy na Uniwersytecie w Greifswaldzie, Wydział Matematyczno-Przyrodniczy, Instytut Biochemii.
6. 12.2018 – Szkolenie „Audytor wewnętrzny Systemu Zarządzania wg normy PN – EN ISO/IEC17025:2018”.
1. 02.2019 – Szkolenie „Audytor wewnętrzny systemu zarządzania jakością wg. normy ISO 9001:2015”.
2. 10.2019 – Szkolenie AKTA User Day 2019 „Trends in protein purification”.

3. 12.2019 – Szkolenie pt.: „Mikroskop ramanowski” organizowane przez firmę MEDSON, w ramach III Ogólnopolskiego Sympozjum Chemii Bioorganicznej, Organicznej i Biomateriałów, Politechnika Poznańska.
4. 12.2019 – Szkolenie pt.: „Mikroskop FTIR” organizowane przez firmę MEDSON.
5. 12.2019 – Szkolenie pt.: „Najnowsze rozwiązania w dziedzinie badań topografii powierzchni metodami optycznymi”.
6. 01.2021 – Szkolenie w zakresie obsługi cytometru przepływowego wraz z oprzyrządowaniem i oprogramowaniem (BC Accuri™ C6 Plus, BD CSampler™ Plus, BD Accuri C6 Plus Software, BD CSampler Plus Software).
7. 10.2022 – Szkolenie operatorskie w zakresie obsługi termocyklera (LightCycler 96).

11. Inne

1. Członek studenckiego Koła Naukowego Enzymologów (od 2015 do chwili obecnej).
2. Członek Polskiego Towarzystwa Mikrobiologów (od 2021 do chwili obecnej).
3. Współautorstwo jednego rozdziału w skrypcie pt.: „Nanobioinżynieria w praktyce – wybrane zagadnienia”, rozdział 12: „Metody inżynierii enzymowej w nanobioinżynierii”. Autorzy: Drozd R. Szymańska M. Wydawnictwo Uczelniane Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. ISBN: 978-83-7663-321-3.
4. Stypendium Naukowe Prezydenta Miasta Szczecin dla doktorantów w roku 2021.

DANE NAUKOMETRYCZNE

- Sumaryczna liczba punktów za publikacje wg wykazu czasopism naukowych MNiE, zgodna z rokiem ukazania się prac – 1630
- Sumaryczny Impact Factor (IF) za wszystkie publikacje zgodny z rokiem ukazania się prac – 82,171 (Journal Citation Reports)
- Liczba cytowań (bez autocytowań) – 61
- Indeks *Hirsha* – 5 (Web of Science)