

# Antimicrobial properties of *Pseudomonas gessardii* M15 rhamnolipids towards multiresistant *Staphylococcus aureus* and potential applications

**Carmine Buonocore <sup>1,2,†</sup>, Rosa Giugliano <sup>3,†</sup>, Gerardo Della Sala <sup>1</sup>, Fortunato Palma Esposito <sup>1</sup>, Pietro Tedesco <sup>1</sup>, Veronica Folliero <sup>3</sup>, Massimiliano Galdiero <sup>3</sup>, Gianluigi Franci <sup>4,\*</sup> and Donatella de Pascale <sup>1,\*</sup>**

<sup>1</sup> Department of Ecosustainable Marine Biotechnology Stazione Zoologica Anton Dohrn, Via Ammiraglio Acton, 55, 80133 Naples, Italy

<sup>2</sup> Institute of Biochemistry and Cell Biology, National Research Council, 80131 Naples, Italy

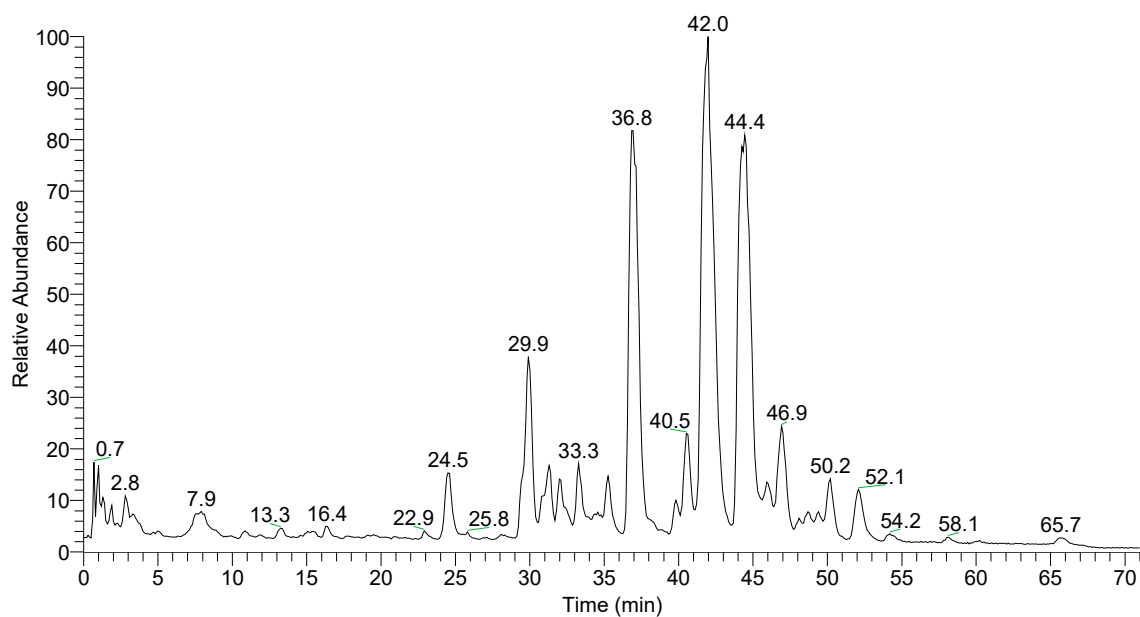
<sup>3</sup> Department of Experimental Medicine, University of Campania “Luigi Vanvitelli”, 80138 Naples, Italy

<sup>4</sup> Department of Medicine, Surgery and Dentistry “Scuola Medica Salernitana”, University of Salerno, 84081 Baronissi, Italy

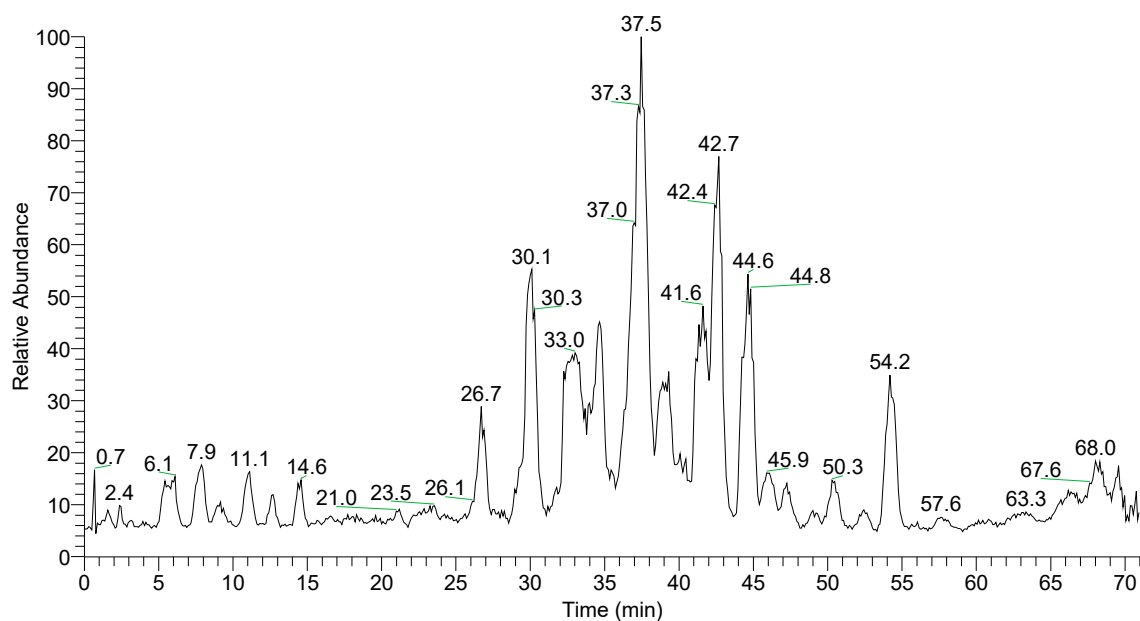
\* Correspondence: gfranci@unisa.it (G.F.); donatella.depascale@szn.it (D.d.P.)

† These authors contributed equally to this work.

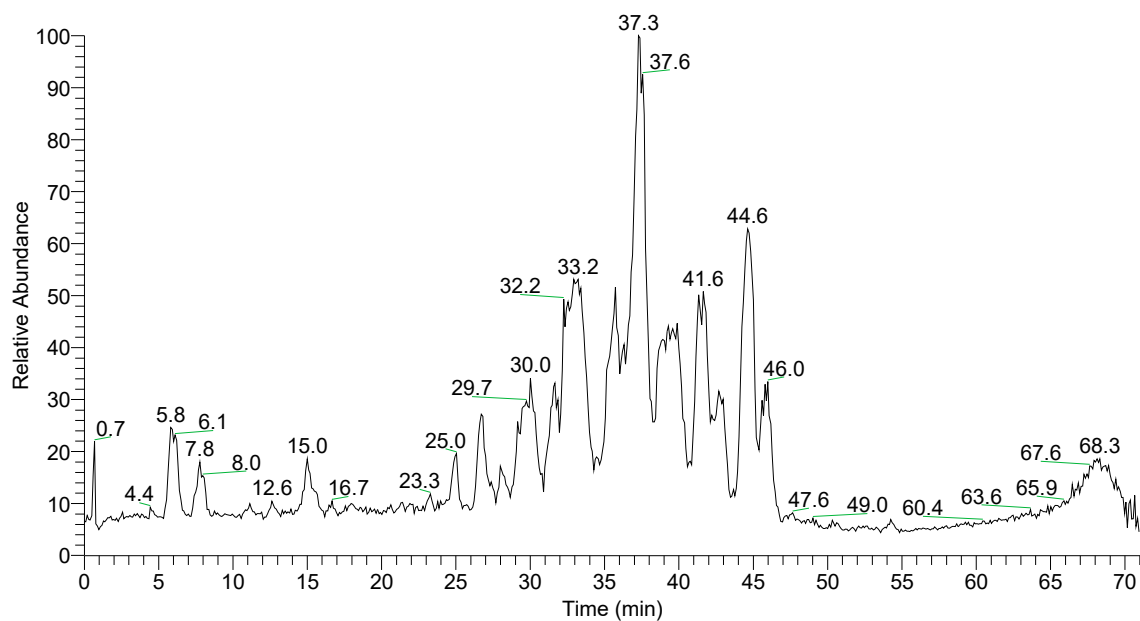
<b>Contents</b>	2
<b>Spectral data of rhamnolipids mixtures</b>	3
Figure S1. Total ion chromatogram of the M15RL mixture	3
Figure S2. Total ion chromatogram of the MDRL mixture	3
Figure S3. Total ion chromatogram of the DDRL mixture	4
Figure S4. HR ESI-MS2 spectrum of Rha-C10-C10	4
<b>Antibiograms of the <i>Staphylococcus aureus</i> strains</b>	5
Figure S5: MRSA antibiogram	5
Figure S6: MSSA antibiogram	6
Figure S7: $\beta$ —LPSA antibiogram	7
Figure S8: QRSA antibiogram	8
Figure S9: VRSA antibiogram	9
Figure S10: MLSB antibiogram	10
<b>M15RL stability to pH</b>	11
Figure S11: M15RL antimicrobial stability to different pH	11



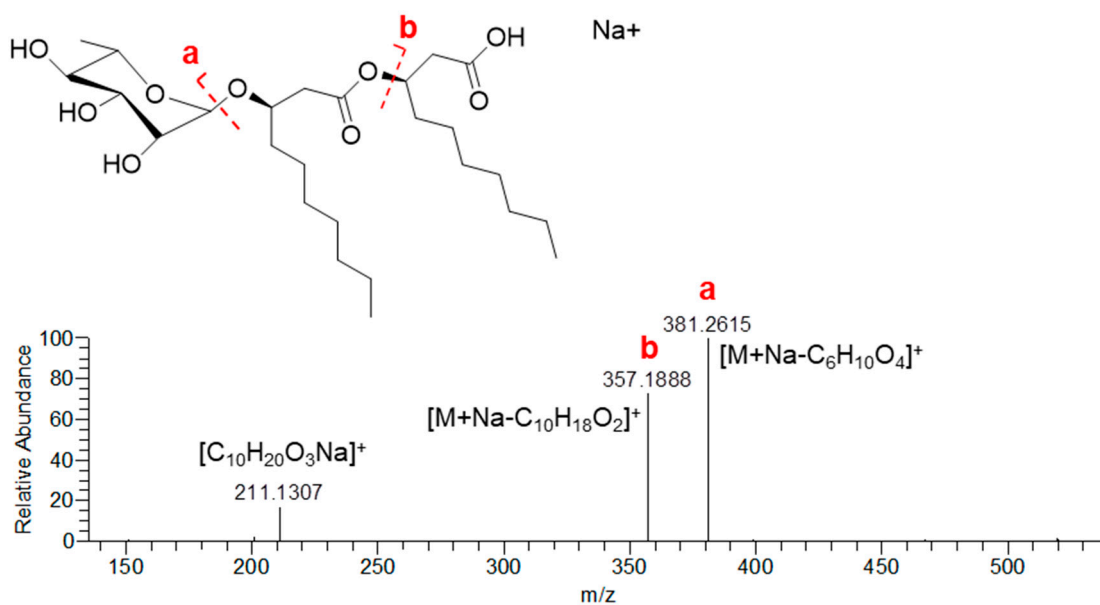
**Figure S1.** Total ion chromatogram of the M15RL mixture.



**Figure S2.** Total ion chromatogram of the MDRL mixture.



**Figure S3.** Total ion chromatogram of the DDRL mixture.



**Figure S4.** HR ESI-MS2 spectrum of the  $[M+Na]^+$  ion of Rha-C10-C10 ( $C_{26}H_{48}O_9Na$ ,  $m/z$  527.3199 –  $\Delta$ ppm 1.6)

## SERVIZIO DI MICROBIOLOGIA

ST. AUKEUS MRSA  
312215Cliente bioMerieux: S U N  
N. sistema: 1498

## Lab report

Stampato 27-nov-2015 11:44 CET  
Stampato da: LabAdmin

Nome paziente: [REDACTED]

\*\*\* Allerta applicato \*\*\*

ID paziente: 52187

Gruppo di isolati: 52187.11-1

Tipo di card: AST-P632 Test dello strumento: 00000B4D4CDB (1498)

Quantità organismo:

Commenti:	ATTENZIONE CEPPO MRSA
	ATTENZIONE CEPPO MRSA

Informazioni sull'identificazione			
Microrganismo selezionato	Staphylococcus aureus		
Immessi:	25-nov-2015 10:33 CET	Da:	labadmin
<b>Messaggi di analisi:</b> Un test ICR positivo indica resistenza inducibile ai macrolidi, lincosamidi e streptogramina tipo B. Tale isolato si presume resistente alla clindamicina che tuttavia potrebbe essere efficace in alcuni casi.  Resistenza a basso livello - una MIC di 2, 4, 32, 64 per la mupirocina rappresenta l'intero range intermedio (2-256).			

Informazioni sull'antibiogramma	Card: AST-P632		Numero di lotto: 732366110		Scade: 22-dic-2016 12:00 CET	
	Completato: 25-nov-2015 20:07 CET		Stato: Finale		Tempo di analisi: 10,00 ore	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione	
Cefoxitina screening	POS	+	Teicoplanina	<= 0,5	S	
Benzilpenicillina	> 0,25	R	Vancomicina	<= 0,5	S	
Oxacillina	> 2	R	Tetraciclina	<= 1	S	
Gentamicina	> 8	R	Tigeciclina	<= 0,12	S	
Levofloxacina	> 4	R	Fosfomicina	> 64	R	
Resistenza inducibile alla Clindamicina	POS	+	Acido fusidico	<= 0,5	S	
Eritromicina	> 4	R	Mupirocina	<= 2	S	
Clindamicina	0,25	*R	Rifampicina	> 2	R	
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	20	S	
Daptomicina	0,25	S				

+= Antibiotici dedotti \* = Modificato AES \*\* = Modificato utente

Versione di VITEK 2 Systems installata: 07.01  
Linea guida interpretazione MIC: EUCAST 2015\_MICETI  
Nome del set di parametri AES: EUCAST\_2015\_MICETILinea guida interpretazione terapeutica: Copia di EUCAST-based\_2015  
Ultima modifica parametri AES: 2-nov-2015 14:13 CET

Pagina 1 di 2

Figure S5. Antibigram of the MRSA strain

Cliente bioMerieux:

Lab report

Stampato 18-nov-2014 11:07 CST

N. sistema:

Stampato da: labadmin

Nome paziente: [REDACTED] 24/3/92

\*\*\* Allerta applicato \*\*\*

ID paziente: 50574

Gruppo di isolati: 50574 11-1

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

Commenti:	ESEGUIRE TEST CEFINASI

Informazioni sull'identificazione	
Microorganismo selezionato	Staphylococcus aureus
Messaggi di analisi:	Imnesso: 7-nov-2014 11:46 CST Da: labadmin

Informazioni sull'antibiogramma	Card:	AST-P632	Numero di lotto:	732323640	Scade:	24-ott-2015 13:00 CDT
	Completato:	7-nov-2014 20:08 CST	Stato:	Finale	Tempo di analisi:	8,50 ore
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione	
Cefoxitina screening	NEG	-	Teicoplanina	<= 0,5	S	
Benzilpenicillina	0,06	S	Vancomicina	<= 0,5	S	
Oxacillina	<= 0,25	S	Tetraciclina	<= 1	S	
* Gentamicina	<= 0,5	S	Tigeciclina	<= 0,12	S	
Levofloxacina	<= 0,12	S	Fosfomicina			
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	<= 0,5	S	
Entromicina	0,5	S	Mupirocina	<= 2		
Clindamicina	0,25	S	Rifampicina	<= 0,03	S	
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	<= 10	S	
Daptomicina	0,5	S				

+= Antibiotici dedotti \*= Modificato AES \*\*= Modificato utente

Conclusioni AES:	Ultima modifica: 8-apr-2014 09:18 CDT	Set di parametri: EUCAST2014+MICETI vers. 5.04
Livello di affidabilità:	Coerente	
Fenotipo:	MACROLIDI/LINCOSAMIDI/STREPTOGRAMINE	RESISTENTE ALLE STREPTOGRAMINE (SGA-SGB)

Azione Revisionato da: Nome (ID utente) (labadmin) Data/Ora 10-nov-2014 09:08 CST Commento

Versione di VITEK 2 Systems installata: 05.04

Linea guida interpretazione MIC: EUCAST\_MOD\_2014

Linea guida interpretazione terapeutica: EUCAST-based\_MOD\_2014

Nome del set di parametri AES: EUCAST2014+MICETI vers. 5.04

Ultima modifica parametri AES: 8-apr-2014 09:18 CDT

Figure S6. Antibigram of the MSSA strain

st. aureus  $\beta$   
31/2/15

Cliente bioMerieux:

Lab report

Stampato 18-nov-2014 11:06 CST

N. sistema:

Stampato da: labadmin

Nome paziente: [REDACTED] 31/3/89

ID paziente: 52279.10

Gruppo di isolati: 52279-1

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

<b>Commenti:</b>	

<b>Informazioni sull'identificazione</b>	
<b>Microrganismo selezionato</b>	Staphylococcus aureus
Imnesso: 23-ott-2014 11:19 CDT Da: labadmin	
<b>Messaggi di analisi:</b>	

Informazioni sull'antibiogramma			Card:	AST-P632	Numero di lotto:	732323640	Scade:	24-ott-2015 13:00 CDT
			Completato:	23-ott-2014 17:48 CDT	Stato:	Finale	Tempo di analisi:	8,25 ore
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione			
Cefoxitina screening	NEG	-	Teicoplanina	<= 0,5	S			
Benzilpenicillina	>= 0,5	R	Vancomicina	1	S			
Oxacillina	0,5	S	Tetraciclina	<= 1	S			
Gentamicina	4	R	Tigeciclina	<= 0,12	S			
Levofloxacina	0,25	S	Fosfomicina					
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	<= 0,5	S			
Eritromicina	>= 8	R	Mupirocina	<= 2				
Clindamicina	0,25	S	Rifampicina	<= 0,03	S			
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	<= 10	S			
Daptomicina	1	S						

+ = Antibiotici dedotti \* = Modificato AES \*\* = Modificato utente

<b>Conclusioni AES:</b>		Ultima modifica: 8-apr-2014 09:18 CDT	Set di parametri: EUCAST2014+MICE Tivers. 5.04
<b>Livello di affidabilità:</b>	Coerente		

Azione	Nome (ID utente)	Data/Ora	Commento
Revisionato da:	(labadmin)	3-nov-2014 12:13 CST	

Versione di VITEK 2 Systems installata: 05.04

Linea guida interpretazione MIC: EUCAST\_MOD\_2014

Linea guida interpretazione terapeutica: EUCAST-based\_MOD\_2014

Nome del set di parametri AES: EUCAST2014+MICETivers. 5.04

Ultima modifica parametri AES: 8-apr-2014 09:18 CDT

Pagina 1 di 1

Figure S7. Antibigram of the  $\beta$ -LPSA strain

REFERTO - FINALE	
Pagina 1/1 26/07/2017 10:08:46	
<b>Nome paziente:</b> <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span> <b>Data di nascita:</b>	<b>ID paziente:</b> 51883.07 <b>Sesso paziente:</b> Non specificato
<b>N accesso:</b> 51883.07 <b>Tipo campione:</b> CATETERE VENOSO CENTRALE <b>Reperto ospedaliero:</b> 7301 TER INTENSIVA NEONATALE <b>Data ricezione:</b> 21/07/2017 09:49:51	

**Nome organismo**

**Commenti**

1 STAAUE Staphylococcus aureus

**Marker di resistenza**

1 STAIML Fenotipo MLSb inducibile di Staphylococcus

Antibiotico	STAAUE	
	MIC/Conc.	SIR
Acido fusidico	<=0,5	S
Ampicillina		R
Ceftaroline	0,5	S
Ciprofloxacina	>4	R
Clindamicina		R
Daptomicina	<=0,5	S
Eritromicina	>2	R
Fosfomicina c/G6P	<=16	S
Gentamicina	2	R
Linezolid	2	S
Moxifloxacina	>1	R
Mupirocina alto livello	<=256	S
Oxacillina	0,5	S
Penicillina G	>0,25	R
Teicoplanina	<=0,5	S
Tetraciclina	<=0,5	S
Tigeciclina	<=0,25	S
Trimetoprim-sulfametoxazolo	<=1/19	S
Vancomicina	1	S

Firma: \_\_\_\_\_

*S. aureus CHIN3*

**Figure S8.** Antibigram of the QRSA strain



SERVIZIO DI MICROBIOLOGIA

NOS R5  
5/12/16

Cliente bioMerieux: S U N  
N. sistema: 1498

Lab report

Stampato 4-dic-2014 10:27 CST  
Stampato da: labadmin

Nome paziente: [REDACTED] 28/02/82

\*\*\* Allerta applicato \*\*\*

ID paziente: 50211

Gruppo di isolati: 50211.12-2

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

Commenti:	Attenzione Stafilococco Teicoplanina Resistente Attenzione Stafilococco Vancomicina Resistente

Informazioni sull'identificazione	
Microrganismo selezionato	Staphylococcus aureus
	Imnesso: 3-dic-2014 10:55 CST Da: labadmin
Messaggi di analisi:	

Informazioni sull'antibiogramma	Card: AST-P632		Numero di lotto: 732323640	Scade: 24-ott-2015 13:00 CDT	
	Completato 3-dic-2014 22:29 CST		Stato: Finale	Tempo di analisi: 12,25 ore	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Cefoxitina screening	NEG	-	Teicoplanina	<= 0,5*	*R
Benzilpenicillina	>= 0,5	R	Vancomicina	>= 32	R
Oxacillina	<= 0,25	S	Tetraciclina	<= 1	S
Gentamicina	>= 16	R	Tigeciclina	<= 0,12	S
Levofloxacina	1	S	Fosfomicina		
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	<= 0,5	S
Eritromicina	1	S	Mupirocina	<= 2	
Clindamicina	>= 4	R	Rifampicina	<= 0,03	S
Linezolid	2	S	Trimetoprim/Sulfametossazolo	<= 10	S
Daptomicina	0,25	S			

+ = Antibiotici dedotti \* = Modificato AES \*\* = Modificato utente

Conclusioni AES:	Ultima modifica: 8-apr-2014 10:22 CDT	Set di parametri: EUCAST2014+MICET lvers. 5.04
Livello di affidabilità:	Coerente con la correzione	
Fenotipo:	GLICOPEPTIDI	VRSA

Versione di VITEK 2 Systems installata: 05.04

Linea guida interpretazione MIC: EUCAST\_MOD\_2014

Nome del set di parametri AES: EUCAST2014+MICET lvers. 5.04

Linea guida interpretazione terapeutica: EUCAST-based\_MOD\_2014

Ultima modifica parametri AES: 8-apr-2014 10:22 CDT

Pagina 1 di 1

Figure S9. Antibigram of the VRSA strain

3/12/15

Ciente brivierex.

Rapporto grando microbiologia

Stampato 20-01-2014 08.43 COT

Nome paziente:

Posizione:

ID lab.: 51119

Organismo selezionato: Staphylococcus aureus

ID paziente:

Medico:

Numero di isolato: 1

Prelevato:

Origine:

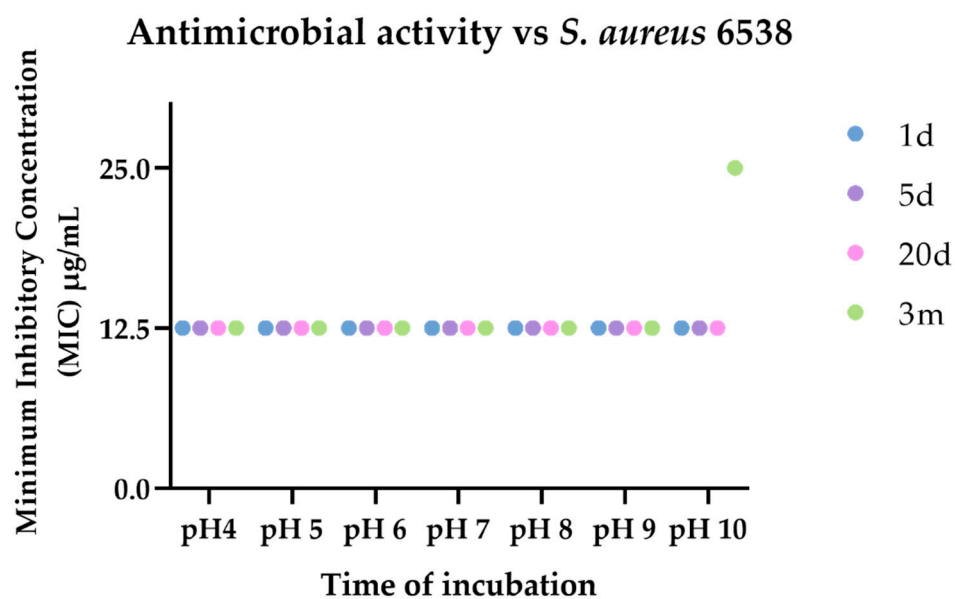
Commenti:

Informazioni sull'antibiogramma			Tempo di analisi: 9,50 ore	Stato Finale	
Antimicrobico	MIC	Interpretazione	Antimicrobico	MIC	Interpretazione
Cefoxitina screening	NEG	-	Daptomicina	1	S
Benzilpenicillina	$\geq 0,5$	R	Teisoplanina	$\leq 0,5$	S
Oxacillina	$\leq 0,25$	S	Vancomicina	$\leq 0,5$	S
Gentamicina	$\leq 0,5$	S	Tetraciclina	$\leq 1$	S
Levofloxacina	0,25	S	Tigeciclina	$\leq 0,12$	S
Resistenza inducibile alla Clindamicina	NEG	-	Acido fusidico	$\leq 0,5$	S
Eritromicina	$\geq 8$	R	Rifampicina	$\leq 0,03$	S
Clindamicina	$\geq 4$	R	Trimetoprim/Sulfametossazolo	$\leq 10$	S
Linezolid	2	S			

+= Antibiotici dedotti \*= Modificato AES \*\*= Modificato utente

Conclusioni di AES		
Affidabilità:	Coerente	
Fenotipo:	MACROLIDI/LINCOSAMIDI/STREPTOGRAMINE	MLSB+SA COSTITUTIVO

Figure S10. Antibigram of the MLSB strain



**Figure S11.** M15RL antimicrobial stability to different pH. M15RL was incubated at different pH for 3 months and tested for antimicrobial activity against *S. aureus* 6538 at different intervals.