

УДК 615.468:604.4-7

## ГИДРОЛИТИЧЕСКИЕ ФЕРМЕНТЫ ИЗ МОРСКИХ ОРГАНИЗМОВ КАК ИНГИБИТОРЫ ОБРАЗОВАНИЯ БИОПЛЕНОК

© 2020 г. Н. А. Терентьева<sup>1, \*</sup>, Н. С. Буйновская<sup>1</sup>, Ю. А. Носкова<sup>1</sup>, Л. В. Слепченко<sup>1, 2</sup>,  
О. И. Недашковская<sup>1</sup>, Л. А. Текутьева<sup>2</sup>, Л. А. Балабанова<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН,  
Владивосток 690022, Россия

<sup>2</sup>Дальневосточный федеральный университет, Школа биомедицины,  
Владивосток 690091, Россия

\*e-mail: nattere@mail.ru

Поступила в редакцию 29.11.2019 г.

После доработки 28.01.2020 г.

Принята к публикации 30.01.2020 г.

Изучено влияние гидролитических ферментов из морских источников на образование и разрушение бактериальных биопленок. Установлено, что рост биопленок разных видов морских бактерий стимулировался в присутствии  $\alpha$ -D-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701, тогда как формирование биопленок бактерий *Bacillus subtilis* и *Yersinia pseudotuberculosis* ингибировалось этим ферментом. Обработка зрелых биопленок  $\alpha$ -галактозидазой приводила к разрушению от 5 до 35% биопленки у разных видов бактерий. Фосфодиэстераза и щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 оказывали ингибирующее действие на биопленки морских штаммов *Bacillus licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkeleji*, а также диспергировали уже сформированные биопленки этих бактерий и иерсинии. ДНК-аза гепатопанкреаса краба ингибировала образование биопленки у *Y. pseudotuberculosis* и *B. subtilis*, частично разрушая зрелую биопленку.

**Ключевые слова:** биопленка, ингибиторы, морские микроорганизмы, ферменты

**DOI:** 10.31857/S0134347520040099

Большинство видов бактерий существует в природе в виде специфически организованных биопленок (biofilms). Бактериальная биопленка — это сообщество одного или нескольких видов бактерий, прикрепленных к поверхности или друг к другу и заключенных в матрикс из синтезированных ими внеклеточных полимерных веществ (Costerton et al., 1999; Романова, Гинцбург, 2011). В состав внеклеточного матрикса биопленки входят экзополисахариды, белки, нуклеиновые кислоты и другие вещества (Flemming, Wingender, 2010). Биопленка защищает бактерии от неблагоприятных абиотических факторов внешней среды, а также от факторов специфической и неспецифической защиты иммунной системы хозяина. Бактерии в биопленке могут “общаться” между собой посредством секреторных интермедиаторов, которые служат основой их “социального” поведения, или “quorum sensing” (Lazar, 2011). Исследование биопленок вызывает огромный интерес, поскольку микроорганизмы способны образовывать биопленки на любых биотических и абиотических поверхностях. В медицине проблема связана с образованием биопленок на протезах, катетерах, шунтах и контактных линзах

(Романова, Гинцбург, 2011). Особое внимание уделяется изучению образования биопленки патогенными бактериями, поскольку причиной многих хронических инфекций являются микроорганизмы, растущие в виде биопленок (Römling, Balsalobre, 2012). Устойчивость к антибиотикам у бактерий в биопленке в 1000 раз больше, чем у планктонных форм (Costerton et al., 1999; Романова, Гинцбург, 2011).

Для ингибирования образования бактериальной биопленки и ее разрушения могут быть использованы низкомолекулярные вещества, или ферменты (Fleming, Rumbaugh, 2017). В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение действия некоторых гидролитических ферментов из морских источников на формирование и разрушение биопленки, образованной разными видами микроорганизмов, в том числе обитателями моря.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В работе использовали штаммы *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkeleji* из коллекции ФГБУН ТИБОХ ДВО РАН и клинический

**Таблица 1.** Влияние ферментов на формирование (1) и разрушение (2) биопленки (в %)

Штамм микроорганизма	Фермент					
	фосфодиэстераза (0.1 ед./мл)		щелочная фосфатаза (1.75 ед./мл)		α-галактозидаза (0.5 ед./мл)	
	1	2	1	2	1	2
<i>Bacillus subtilis</i>	100 ± 6	0	100 ± 5	0	78 ± 4	28 ± 1
<i>B. licheniformis</i>	74 ± 4	15 ± 2	57 ± 3	35 ± 2	125 ± 7	35 ± 2
<i>B. aegricola</i>	68 ± 4	14 ± 2	49 ± 3	7 ± 1	128 ± 6	10 ± 1
<i>B. berkelegi</i>	82 ± 5	8 ± 1	66 ± 4	3 ± 1	130 ± 7	5 ± 1
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	85 ± 5	23 ± 3	80 ± 4	27 ± 2	69 ± 4	27 ± 2
Контроль	100 ± 5	0	100 ± 5	0	100 ± 6	0

Примечание. Приведена средняя величина ± стандартное отклонение; 0 – разрушение сформированной биопленки отсутствовало.

штамм *Yersinia pseudotuberculosis* 512pYV+ из коллекции ФГБУ НИИЭМ. Применяли метод, основанный на способности бактерий формировать биопленки на полистероловых 96-луночных планшетах и на окрашивании биопленок кристалл виолетом (O'Toole, 2011), что позволяет быстро определять количество образованных микроорганизмами биопленок в разных условиях культивирования, а также исследовать влияние на этот процесс различных агентов (Nijland et al., 2010).

Изучали действие на биопленки разных концентраций ДНКазы (КФ 3.1.21.1) из гепатопанкреаса краба (Мензорова и др., 1994), α-галактозидазы (КФ 3.2.1.22) морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 (Патент РФ № 2012142209/10), фосфодиэстеразы (КФ 3.1.4.1) морской бактерии *Cobetia amphilecti* КММ 296 (Noskova et al., 2018) и щелочной фосфатазы (КФ 3.1.3.1) морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (ранее *Cobetia marina* КММ 296) (Голотин и др., 2015). Все эксперименты проводили в 4–8 повторностях. Контролем служила среда с микроорганизмами без добавления ферментов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что основную часть внеклеточного матрикса биопленки составляют полисахариды, состав которых у разных бактерий различается (Flemming, Wingender, 2010). Экзополисахариды помогают бактериям выживать в морской среде, а также являются факторами, способствующими их проникновению в организм человека в период сезонных эпидемий. В связи с этим весьма актуальным является изучение влияния гликозидаз на формирование биопленок морских бактерий, участвующих в трансформации углеводов и углеводсодержащих биополимеров.

Мы изучали влияние рекомбинантного белка α-галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. штамма КММ 701 на формирование биопленки разными штаммами микроорганизмов. Этот фермент катализирует гидролиз α-галактозидной связи в олигосахаридах (раффиноза, мелибиоза, стахиоза), в полисахаридах (галактоманнаны), а также в гликоконъюгатах, включая гликопротеины и гликолипиды (Патент РФ № 201214222012).

Исследование роста биопленок морских видов из рода *Bacillus* показало, что в течение трех суток при комнатной температуре α-галактозидаза (0.5 ед./мл) вызывала небольшое увеличение количества биопленок морских бактерий, тогда как формирование биопленки *B. subtilis* ингибировалось на ~20% (табл. 1). Ингибирование наблюдалось и при образовании биопленки *Y. pseudotuberculosis*. Микроорганизмы рода *Yersinia* относятся к возбудителям сапрозоонозов, обладающих сапрофитной и паразитической природой. Они способны существовать как в организме человека и животных, вызывая инфекционный процесс, так и в объектах окружающей среды (Сомов, 2004). Бактерии рода *Yersinia* обнаружены также в морской воде и гидробионтах (морские ежи, голотурии, трепанг) (Кузнецов и др., 2006).

Можно предположить, что α-галактозидаза в природном штамме *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 наряду с другими механизмами может участвовать в процессе формирования биопленки, поскольку данные бактерии часто оказываются в экстремальных условиях выживания. Кроме этого, морские бактерии занимают определенную нишу в симбиотическом сообществе и помогают выживать другим участникам сообщества – бактериям, водорослям и животным. Не исключено, что в определенной мере воздействие фермента на формирование структуры биопленки связано со способностью α-галактозидазы к трансгликози-

лированию – переносу галактозной группы на другие субстраты (олиго- и полисахариды) (Слепченко и др., 2017; Bakunina et al., 2018).

$\alpha$ -Галактозидаза может также разрушать зрелую биопленку. Обработка биопленки ферментом приводила к разрушению от 5 до 35% биопленки у разных видов бактерий. Ранее было установлено, что  $\alpha$ -галактозидаза из морской бактерии *Pseudoalteromonas* sp. КММ 701 способна редуцировать такой важнейший фактор пленкообразования, как адгезия, у патогенного микроорганизма *Corinebacterium diphtheriae*, колонизирующего слизистый эпителий человека (Balabanova et al., 2010), и значительно изменять морфологию внеклеточного матрикса биопленки *Pseudomonas aeruginosa* (см.: Слепченко и др., 2017).

Бифункциональная щелочная фосфодиэстераза морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 (0.1 ед./мл) с активностью щелочной фосфатазы, принадлежащая к структурному семейству фосфатаз/фосфодиэстераз, оказывала небольшое ингибирующее действие на биопленки морских бактерий *B. licheniformis*, *B. aegricola* и *B. berkelegi* (18–32%). Она также диспергировала на 8–15% сформированные биопленки данных бактерий и *Y. pseudotuberculosis* (табл. 1).

Высокоактивная щелочная фосфатаза из этого же штамма морской бактерии *C. amphilecti* КММ 296 в концентрации 1–2 ед./мл ингибировала образование биопленок у исследуемых видов при инкубировании в течение трех суток при температуре 20–22°C на 20–50%. Разрушение зрелых биопленок составило 5–35% (табл. 1). Это согласуется с данными, полученными для штаммов условно-патогенных бактерий *P. aeruginosa*, *B. subtilis* и *Salmonella enteitidis*, выделенных из замороженных пищевых полуфабрикатов (Balabanova et al., 2017). Преимущество фермента из морского источника заключается в его способности с высокой эффективностью катализировать реакции при пониженных температурах. Это актуально для пищевой промышленности и медицины. Дозозависимый эффект ингибирования и разрушения биопленок щелочными фосфатазами морских бактерий может быть результатом их влияния на механизмы межклеточных коммуникаций бактерий.

Одним из важнейших компонентов матрикса является ДНК. Она играет важную роль в развитии биопленки, обеспечивая ее структурную стабильность и защиту от антимикробных агентов (Gilan, Sivan, 2013). Опубликованы сведения о влиянии нуклеаз на формирование и разрушение биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий (Nijland et al., 2010). Нами показано, что во внеклеточном матриксе биопленки *Y. pseudotuberculosis* присутствует ДНК и ее разру-

шение ДНКазой I приводит к уменьшению количества образующейся биопленки (Герентьева и др., 2015). Об этом же свидетельствуют результаты экспериментов по разрушению уже образовавшейся биопленки *Y. pseudotuberculosis* данным ферментом.

ДНКазы гепатопанкреаса краба оказывала аналогичное действие на биопленки *Y. pseudotuberculosis*. При концентрации ДНКазы 20 мкг/мл ингибирование составило 50%. Расщепление внеклеточной ДНК приводит к изменению структуры матрикса биопленки, что позволяет проникать антибиотикам. Таким образом, ДНКазы могут усиливать действие антибиотиков, что приводит к снижению биомассы биопленки и количества КОЕ (Nijland et al., 2010).

Современное представление о биопленках позволяет говорить об изменении подходов к диагностике и лечению инфекций в разных областях медицины и ветеринарии. К настоящему времени разработан ряд перспективных стратегий для борьбы с биопленками. Терапевтическое воздействие на биопленки может быть направлено на механизмы первоначальной адгезии бактерий к поверхности, на нарушение или усиление межклеточного обмена информацией, а также на блокирование синтеза или разрушение полимерного матрикса. Антибиопленочные агенты могут ингибировать формирование биопленок или разрушать зрелые биопленки, действовать отдельно или в сочетании с традиционными антибиотиками. Благодаря способности ферментов морских организмов функционировать с высокой скоростью при пониженных температурах, изученные гидролитические ферменты могут найти применение в борьбе с биопленками в том числе и в медицине. Подобное лечение, действующее на структуру или функции биопленок, может оказаться более эффективным, чем стандартная антибактериальная терапия.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Голотин В.А., Балабанова Л.А., Буйновская Н.С. и др. Щелочная фосфатаза морской бактерии *Cobecia marina* как инструмент в исследовании свойств рекомбинантных белков // Вестн. ДВО РАН. 2015. № 6(184). С. 125–131.

- Кузнецов В.Г., Лаженцева Л.Ю., Елисейкина М.Г. и др. Распространение бактерий рода *Yersinia* в морской воде и гидробионтах // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2006. № 53. С. 117–120.
- Мензорова Н.И., Маркова А.В., Рассказов В.А. Высоко-стабильная Са, Mg-зависимая ДНКазы из гепатопанкреаса камчатского краба // Биохимия. 1994. Т. 59. С. 449–456.
- Патент РФ № 2012142209/10, 03.10.2012. Плазмида 40Gal, определяющая синтез  $\alpha$ -галактозидазы  $\alpha$ -PsGal, штамм *E. coli rosetta* (DE3)/40Gal – продуцент химерного белка, включающего аминокислотную последовательность  $\alpha$ -PsGal, и способ ее получения // Патент России № 2504583. 2014. Бюлл. № 2 / Балабанова Л.А., Голотин В.А., Бакунина И.Ю., Рассказов В.А.
- Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биопленки как естественная форма существования бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журн. микробиол. 2011. № 33. С. 99–109.
- Слепченко Л.В., Балабанова Л.А., Бакунина И.Ю. и др. Свойства и возможная биологическая роль  $\alpha$ -галактозидазы морской бактерии *Pseudoalteromonas* spp. KMM 701 // Вестн. ДВО РАН. 2017. № 2. С. 51–58.
- Сомов Г.П. Современные представления о сапронозах и сапрозоонозах // Ветеринар. патология. 2004. № 3. С. 31–35.
- Терентьева Н.А., Тимченко Н.Ф., Балабанова Л.А. и др. Характеристика образования, ингибирования и разрушения биопленок *Yersinia pseudotuberculosis*, формирующихся на абиотических поверхностях // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. 2015. № 3. С. 72–78.
- Bakunina I., Slepchenko L., Anastuyk S. et al. Characterization of properties and transglycosylation abilities of recombinant  $\alpha$ -galactosidase from cold-adapted marine bacterium *Pseudoalteromonas* KMM 701 and its C494N and D451A mutants // Mar. Drugs. 2018. V. 16. № 10. P. 349.
- Balabanova L.A., Bakunina I.Yu., Nedashkovskaya O.I. et al. Molecular characterization and therapeutic potential of a marine bacterium *Pseudoalteromonas* spp. KMM 701  $\alpha$ -galactosidase // Mar. Biotechnol. 2010. V. 12. P. 111–120.
- Balabanova L., Podvolotskaya A., Slepchenko L. et al. Nucleolytic enzymes from the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 with antibiofilm activity and bio-preservative effect on meat products // Food Control. 2017. V. 78. P. 270–278. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.02.029>
- Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999. V. 284. P. 1318–1322.
- Fleming D., Rumbaugh K.P. Approaches to dispersing medical biofilms // Microorganisms. 2017. V. 5. Art. ID 15. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // Nat. Rev. Microbiol. 2010. V. 8. P. 623–633.
- Gilan I., Sivan A. Extracellular DNA plays an important structural role in the biofilm of the plastic degrading actinomycete *Rhodococcus ruber* // Adv. Microbiol. 2013. V. 3. P. 543–551.
- Lazar V. Quorum sensing in biofilms – How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? // Anaerobe. 2011. V. 17. № 6. P. 280–285.
- Nijland R., Hall M.J., Burgess J.G. Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase // PLoS One. 2010. V. 5. № 12; Art. ID e15668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015668>
- Noskova Y.A., Balabanova L.A., Terentieva N.A. Alkaline phosphatase/phosphodiesterase from marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 // Vestn. Dal'nevost. Otd. Ross. Akad. Nauk. 2018. № 6. Supplement. P. 94–95.
- O'Toole G.A. Microtiter dish biofilm formation assay // J. Visualized Exp. 2011. V. 47. Art. ID e2437. <https://doi.org/10.3791/2437>
- Römling U., Balsalobre C. Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies // J. Intern. Med. 2012. V. 272. P. 541–561.

## Hydrolytic Enzymes from Marine Organisms as Inhibitors of Biofilm Formation

N. A. Terenteva<sup>a</sup>, N. S. Buinovskaya<sup>a</sup>, Yu. A. Noskova<sup>a</sup>, L. V. Slepchenko<sup>a,b</sup>, O. I. Nedashkovskaya<sup>a</sup>, L. A. Tekuteva<sup>b</sup>, and L. A. Balabanova<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok 690022, Russia

<sup>b</sup>School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok 690091, Russia

Effects of some hydrolytic enzymes from marine organisms on the formation and destruction of bacterial biofilms have been studied. As the results show, the presence of  $\alpha$ -D-galactosidase from the marine bacterium *Pseudoalteromonas* sp. KMM 701 stimulates the growth of biofilms formed by various species of marine bacteria, whereas the biofilm formation by *Bacillus subtilis* and *Yersinia pseudotuberculosis* is inhibited by this enzyme. Treatment with  $\alpha$ -galactosidase causes destruction of 5 to 35% of a mature biofilm of different bacterial species. Phosphodiesterase and alkaline phosphatase of the marine bacterium *Cobetia amphilecti* KMM 296 have an inhibitory effect on biofilm formation by marine strains of *B. licheniformis*, *B. aegricola*, and *B. berkelegi*, and also degrade already formed biofilms of these bacilli and *Yersinia*. The crab hepatopancreas DNase inhibits the biofilm formation by *Y. pseudotuberculosis* and *B. subtilis*, partially degrading a mature biofilm.

**Keywords:** biofilm, inhibitors, marine microorganisms, enzymes