

# Ферменты из группы карбогидраз разрушают структуру матрикса биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий

Ю.М. Романова, д.б.н., проф., в.н.с. лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов<sup>1</sup>  
А.В. Тутельян, д.м.н., чл.-корр. РАН, зав. лабораторией инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи<sup>2,6,7</sup>

А.П. Синицын, д.х.н., проф., зав. лабораторией<sup>3</sup>

В.М. Писарев, д.м.н., проф., зав. лабораторией молекулярных механизмов критических состояний<sup>4,6</sup>

Н.В. Алексеева, к.б.н., с.н.с. лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов<sup>1</sup>

Н.И. Филипова, м.н.с. лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов<sup>1</sup>

Э.Р. Толордава, к.б.н., с.н.с. лаборатории генной инженерии патогенных микроорганизмов<sup>1</sup>

О.А. Синицына, к.х.н., с.н.с. лаборатории<sup>3</sup>

О.В. Емшанов, ген. директор<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, г. Москва

<sup>2</sup>ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, г. Москва

<sup>3</sup>Лаборатория физико-химии ферментативной трансформации полимеров кафедры химической энзимологии химического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва

<sup>4</sup>ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии», Московская область, с/п Соколовское, д. Лыткино

<sup>5</sup>ООО «БФР лабораториз», г. Москва

<sup>6</sup>ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Минздрава России, г. Москва

<sup>7</sup>ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет)» Минздрава России, г. Москва

## Enzymes from carbohydrase group destroy biofilm matrix of gram-positive and gram-negative bacteria

Yu.M. Romanova, A.V. Tutelyan, A.P. Sinitsyn, V.M. Pisarev, N.V. Alekseeva, N.I. Filipova, E.R. Tolordava, O.A. Sinitsyna, O.V. Emshanov  
National Research Centre for Epidemiology and Microbiology n.a. Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow; Central Research Institute of Epidemiology, Moscow; Moscow State University n.a. M.V. Lomonosov, Moscow; Federal Scientific and Clinical Centre for Reanimatology and Rehabilitation, Lytkino, Moscow Region; BFR Laboratories Co., Moscow; Federal Research and Clinical Centre for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology n.a. Dmitry Rogachyov, Moscow; First Moscow State Medical University n.a. I.M. Sechenov, Moscow; Russia

### Резюме

Изучено воздействие ферментов класса карбогидраз на полисахариды экзополисахаридного матрикса биологических пленок грамположительных и грамотрицательных бактерий на абиотических поверхностях. Подтверждена способность полиферментных препаратов, содержащих смесь ферментов из группы карбогидраз подкласса гидролаз и лиаз, полностью разрушать матрикс биопленок, сформированных грамположительными и грамотрицательными бактериями, вызывающими инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи. Показано, что оптимальная смесь карбогидраз обладает высокой активностью в отношении биопленок при их использовании в относительно небольших концентрациях и при малой экспозиционной выдержке.

Ключевые слова: биопленка, ферменты, разрушение полисахаридов биопленки, разрушение биопленки, разрушение экзополисахаридного матрикса.

### Summary

The effect of enzymes carbohydrases exopolysaccharide matrix of biofilms formed by gram-positive and gram-negative bacteria on abiotic surfaces was studied. The ability of a mixture of carbohydrase enzymes (hydrolases and lyases) to completely destroy the matrix of biofilms formed by gram-positive and gram-negative bacteria causing health-associated infections has been confirmed. An optimal mixture of carbohydrases possessed high anti-biofilm activity even when employed in relatively small concentrations and at a brief exposure time.

Key words: biofilm, enzymes, destruction of biofilm polysaccharides, destruction of biofilm, destruction of exopolysaccharide matrix.

### Введение

При определенных условиях многие бактерии способны образовывать биологические пленки (биопленки, БП) [1, 2], представляющие собой комплекс сообщества бактерий и продуцируемых ими внеклеточных полимерных веществ, организованных в матрикс БП (МБП) [3–6].

Сформированный МБП эффективно защищает бактерии от антибиотиков, дезинфицирующих средств и компонентов систем врожденного и адаптивного иммунитета. Образование БП, физически препятствующих воздействию биоцидных и бактериостатических веществ, относят к ключевым причинам

неэффективности антибактериальных препаратов [7]. БП нередко сопровождают устойчивые к терапии хронические раны, ортопедические и постхирургические инфекции, остеомиелит и инфекционный эндокардит, внутрибольничные инфекции, в том числе распространяемые на поверхности катетеров, другого

медицинского инструментария [8–12]. Борьба с БП-ассоциированными инфекциями чрезвычайно трудно, поэтому поиск средств, препятствующих образованию БП, предотвращающих их распространение по поверхности или разрушающих их структуру, относится к актуальным прикладным проблемам современной эпидемиологии, медицинской микробиологии и фармакологии [13–15].

МБП, как правило, представляет собой анионный полимер, композиционно представленный на 60–80 % гомо- и гетерополисахаридами, а также молекулами внеклеточной ДНК и связанными с ними белками [16–19]. Экзополисахариды матрикса (ЭПМ) выполняют протективную функцию, защищая бактерии, композиционно входящие в МБП. Структуру МБП, помимо перечисленных компонентов, составляют и молекулы липополисахаридов, лектинов, минералов, необходимых для формирования полноценной биопленки. Интересно, что некоторые компоненты системы врожденного иммунитета, такие как интерлейкин-1 $\beta$ , также способствуют ее формированию [20].

Как анионный полимер, ЭПМ препятствует проникновению катионных антимикробных препаратов внутрь БП и определяет следующие механизмы устойчивости биопленки при воздействии антимикробных средств: 1) замедляет проникновение биоцидов; 2) некоторые микроорганизмы в биопленке снижают метаболическую активность в ответ на антимикробный стресс; 3) матрикс в более глубокой области биопленки изменяется и уплотняется, чтобы противостоять уничтожению; 4) появляются бактериальные клетки-персистеры в высокой концентрации, которые фенотипически устойчивы к действию антибиотиков, поскольку активные молекулярные мишени последних у персистеров не выражены [5].

ЭПМ препятствует выявлению бактерий на поверхностях, что приводит к неоднозначной трактовке результатов выполнения процедур бактериологических смывов. Отрицательные смывы зачастую являются ложноотрицательными, так как зрелый МБП препятствует механическому переносу бактерий на питательные диагностические среды [21].

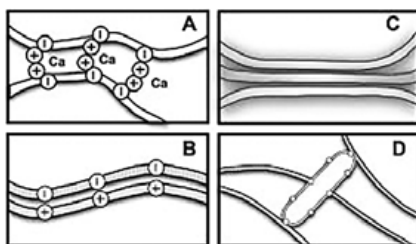


Рисунок 1. Четыре модели взаимодействия полимеров в ЭПМ биопленки. Концептуальная парадигма. Катионы кальция сшивают отрицательно заряженные альгинаты; (Б) адгезия отрицательно и положительно заряженных полимеров; (В) водородные связи или гидрофобное взаимодействие; (Г) частичная сшивка бактерий с компонентами МБП [5].

Одним из перспективных подходов к борьбе с БП-ассоциированной инфекцией является нарушение структурной целостности и дезорганизация МБП с последующим высвобождением бактерий, доступных для антибактериального воздействия (биоцидные препараты, антибиотики). С этой целью применяют ферменты, способные разрушать полисахариды матрикса. Высвобождаемые от протективного барьера бактерии могут быть в последующем уничтожены или идентифицированы в целях диагностики [13, 15].

В последнее время в препаратах бытовой химии и дезинфицирующих средствах в качестве усиления очищающей способности используются такие ферменты, как протеаза, липаза и амилаза. Смесь этих ферментов хорошо растворяет белковые и жировые органические загрязнения, в том числе фиксированные, однако они неэффективны в отношении сложных полисахаридов зрелого матрикса биопленки [22].

Ранее различными исследователями были продемонстрированы возможности группы ферментов карбогидраз (подкласс гликозидаз КФ 3.2.1), расщепляющих О-гликозидные связи, разрушать полисахариды ЭПМ биопленки. При этом различные гидролазы и лиазы имели разную активность в отношении разных полисахаридов [15].

Ферментативные способы предотвращения образования и (или) уменьшения биопленок были описаны и ранее в РСТ-заявках на патенты № WO 06/031554, WO 01/98214, WO 98/26807, WO 04/041988, WO 99/14312 и WO 01/53010. Однако потребность в создании наиболее эффективных препаратов и их композиций, способных контроли-

ровать рост биопленок в клинических условиях, предотвращая тем самым распространение угрожающих жизни инфекций, все еще остается [23].

В результате собственных предварительных исследований и работ специалистов кафедры химической энзимологии МГУ мы пришли к выводу, что для достижения максимальной эффективности разрушения ЭПМ биопленки следует использовать полиферментные смеси, а также применять препараты, содержащие смеси ферментов в сочетании с функциональными технологическими компонентами, увеличивающими специфическую активность ферментов [24, 25].

**Задачей исследования** явилось изучение способности композиций, содержащих смеси ферментов из группы карбогидраз (лиазы и гидролазы — патентованные смеси ферментов), разрушать *in vitro* МБП, образованные патогенными и условно патогенными бактериями — возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи.

## Материалы и методы

В работе использовали клинические изоляты грамположительных (*S. aureus*) и грамотрицательных (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium*) микроорганизмов. Штаммы, используемые в исследовании: *Staphylococcus aureus*, штамм 15; *Escherichia coli*, штамм 717; *Pseudomonas aeruginosa*, штамм 32; *Acinetobacter baumannii*, штамм 503; *Klebsiella pneumoniae*, штамм 1553; *Salmonella typhimurium*, штамм C53.

В качестве препарата, действующего на БП, в работе использована композиция, состоящая из смеси ферментов группы карбогидраз — лиаз и гидролаз, предварительно обозначенная нами ENZYMIХ. Активность композиции по отношению к биопленкам, сформированным бактериями разных видов, исследовалась, как описано ниже.

Формирование зрелых БП тестируемых бактерий осуществляли в течение 24 часов при 37 °C в лунках 24- или 96-луночных планшетах (по четыре повтора каждого варианта) по методике O'Tool [26], использованной нами в модифицированной форме, описанной в предыдущих исследованиях [27].

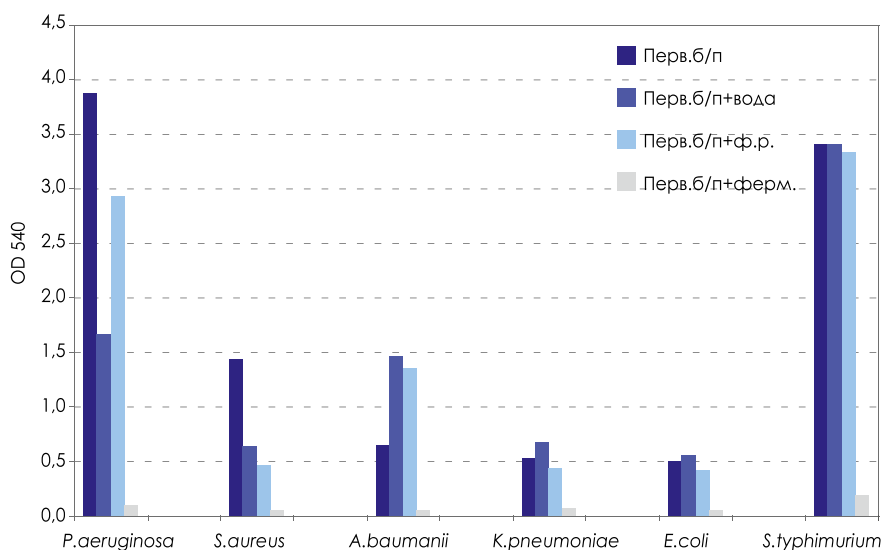


Рисунок 1. Влияние полиферментной композиции ENZYMIХ на биопленки микроорганизмов различных видов (окраска генцианвиолетом).

Примечание: здесь и на рис. 3, 4, 5 цветовые обозначения приведены в правом углу гистограммы. В качестве контроля действия ферментной композиции использовали воду и физиологический раствор. Обозначения: перв. б/п — первичная биопленка; ф.р. — физиологический раствор; ферм. — полиферментная композиция ENZYMIХ. Использованы 96-луночные планшеты.

После удаления планктонных клеток в лунки к сформировавшимся биопленкам добавляли раствор полиферментного комплекса ENZYMIХ и выдерживали в течение 1 часа при 37 °С. Затем раствор удаляли, биопленки окрашивали раствором генцианвиолета (краситель кристаллический фиолетовый, окрашивает в основном бактерии и внеклеточную ДНК в составе МБП) или алциановым синим (окрашивает преимущественно полисахаридные компоненты МБП), а затем отмывали от несвязавшегося красителя. Связавшийся с компонентами БП краситель экстрагировали этанолом в течение 1 часа, после чего оценивали интенсивность окраски с помощью спектрофотометрии при длине волны 540 нм. В качестве контрольных использовали лунки с нативной (первичной) БП, а также лунки с БП, обработанными водой и (или) физиологическим раствором. Интенсивность окраски, выраженной в единицах экстинкции, в лунках, обработанных тестируемыми растворами, сравнивали с окраской исходной первичной БП. Результаты оценивали статистически с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни.

## Результаты и обсуждение

Активность полиферментной композиции ENZYMIХ в отношении биопленок грамположительных

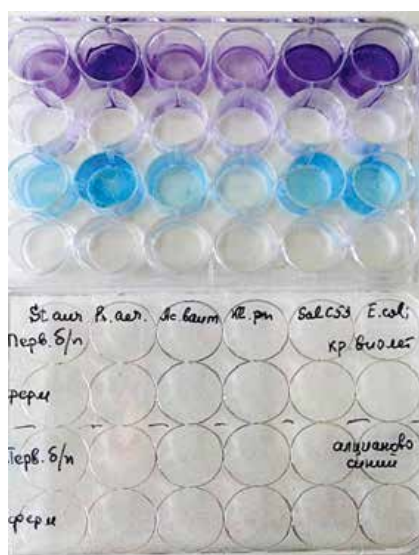


Рисунок 2. Визуализация эффекта ENZYMIХ. На БП бактерии разных видов.

Примечание: виды бактерий — источников БП обозначены горизонтально на крышке платы. Первый и второй ряды сверху — окраска генцианвиолетом. Третий и четвертый ряды сверху — окраска алциановым синим. Первый и третий ряды — контроль (добавлен физиологический раствор). Второй и четвертый ряды лунок — обработка ENZYMIХ.

и грамотрицательных бактерий проверяли на сформированных биопленках *S. aureus* (грамположительная) и *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. typhimurium* (грамотрицательные) (рис. 1).

Как видно из рис. 1, во всех случаях (и для грамотрицательных, и для грамположительных бактерий) интенсивность

окраски экстрагированного красителя из БП после воздействия композиции ENZYMIХ была значимо ниже по сравнению с окраской нативной первичной БП ( $P < 0,05$ ). При этом воздействие воды и физиологического раствора на слабо-сформированные БП также иногда способствовало снижению интенсивности экстрагированной окраски, но в значительно меньшей степени (рис. 1).

Обнаруженное в данных опытах значительное снижение интенсивности окрашивания экстракта БП после воздействия на них ENZYMIХ свидетельствует о существенном нарушении целостности структуры МБП в результате разрушения полисахаридного остова МБП с последующим вымыванием внеклеточной ДНК и бактерий.

В дальнейшем высокая эффективность воздействия композиции ENZYMIХ на полисахаридный МБП была подтверждена и в опытах с БП разных видов бактерий в больших лунках 24-луночных планшетов. Сформированные первичные (нативные) биопленки и биопленки, обработанные раствором субстанции ENZYMIХ, окрашивали двумя красителями — генцианвиолетом, специфичным в отношении бактерий и внеклеточной ДНК, и специфически окрашивающим полисахариды БП алциановым синим.

На рис. 2 представлены результаты таких визуально оцениваемых экспериментов. Лунки с нативной первичной БП разных видов бактерий, не подвергавшихся воздействию ENZYMIХ, характеризуются ярким окрашиванием бактериальных биопленок независимо от использованного красителя.

Это свидетельствовало о том, что нативная биопленка содержит в себе бактериальные клетки и молекулы внеклеточной ДНК, окрашивающиеся раствором генцианвиолета, и полисахаридный остов МБП, окрашивающийся раствором алцианового синего (ряды первый и третий соответственно).

Как видно из рис. 2, после обработки всех проб раствором субстанции ENZYMIХ окраска лунок почти исчезла (второй и четвертый ряды сверху). Это свидетельствует о том, что раствор полиферментной композиции ENZYMIХ разрушил полисахаридный матрикс, и высвободившиеся из ма-



трикса бактериальные клетки и внеклеточная ДНК вышли в раствор и были удалены в ходе промывочных процедур.

С целью дополнительного подтверждения эффекта полиферментного препарата использовали флуоресцентную микроскопию. С этой целью на поверхности небольших кусочков предметного стекла в одинаковых условиях были сформированы БП бактерий *S. aureus* и *P. aeruginosa*. Затем предметные стеклышки разделили на две группы: 1) первичную нативную БП обоих микроорганизмов окрашивали растворами генцианвиолета или алцианового синего; 2) нативную БП обрабатывали раствором ENZYMIХ, как и в предыдущих опытах, а затем также окрашивали. Результаты опыта представлены на рис. 3.

Как видно на рис. 3, при окраске генцианвиолетом биопленка *P. aeruginosa* выглядит значительно интенсивнее, чем биопленка *S. aureus*. При обработке БП раствором ENZYMIХ происходит ее полное разрушение. По-видимому, нарушение полисахаридного остова МБП в результате воздействия ферментного комплекса способствует высвобождению с последующим вымыванием и бактерий, и внеклеточной ДНК, связанной в составе МБП с поверхностью бактерий и положительно заряженными компонентами МБП (возможно, с катионами  $\text{Ca}^{2+}$ ).

Аналогичные результаты получены и при окрашивании алциановым синим: на рис. 3 видно, что раствор ENZYMIХ полностью разрушил полисахаридный матрикс как грамположительных (*S. aureus*), так и грамотрицательных бактерий (*P. aeruginosa*).

Поскольку предполагаемым использованием полиферментной композиции ENZYMIХ является обработка различных поверхностей, на которых могут образовываться БП, было важным оценить ее активность против БП в зависимости от разных температур инкубации (20 и 37 °C). В ходе этих экспериментов было показано отсутствие принципиальной разницы в активности субстанции ENZYMIХ при данных температурах инкубации (данные не представлены).

Целью дальнейших экспериментов было определение оптимальной длительности воздействия ферментной композиции на БП, достаточной для

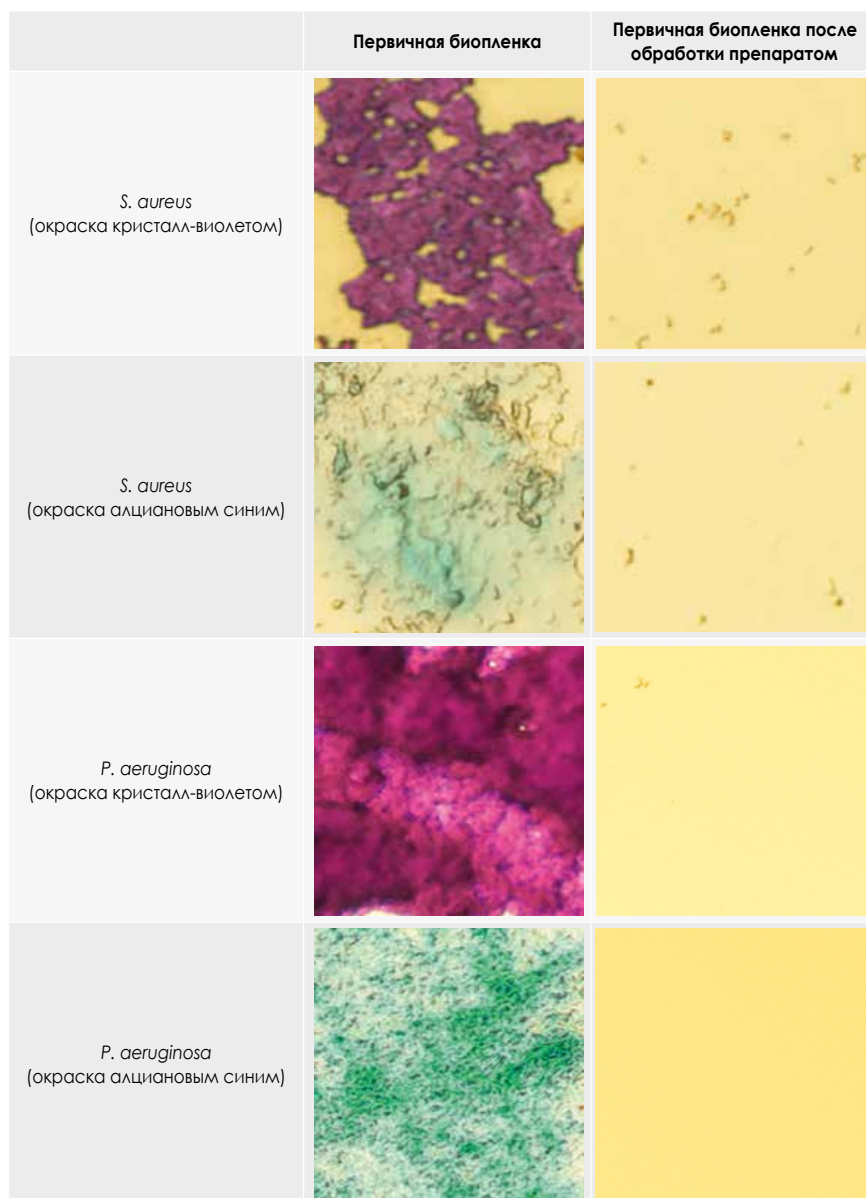


Рисунок 3. Визуализация биопленок, образованных *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

разрушения МБП при комнатной температуре. Для этого в лунки с БП разных видов бактерий вносили раствор ENZYMIХ и выдерживали в течение 10, 20, 30, 40, 50 и 60 минут. Затем смесь ферментов удаляли, обработанные биопленки стандартно окрашивали генцианвиолетом, лунки промывали и экстрагировали связавшийся краситель с помощью этанола. Интенсивность окрашивания обработанных композиций ферментов биопленок сравнивали с окраской исходной первичной биопленки разных видов бактерий (рис. 4).

Как видно на рис. 4, раствор ENZYMIХ практически полностью разрушал БП, образованные бактериями всех шести видов уже после первых 10 минут инкубации. Дальнейшее

увеличение времени инкубации лишь незначительно увеличивало интенсивность разрушения обработанных ферментами БП. Таким образом, обработка БП смесью ферментов ENZYMIХ приводит к быстрому разрушению всей структурной целостности БП.

Представляло интерес выяснить, скажется ли на специфической активности смеси ферментов ENZYMIХ добавление различных технологических и функциональных компонентов (ингибиторов коррозии, стабилизаторов ферментов, поверхностно-активных веществ). Были разработаны две композиции, содержащие указанные дополнительные компоненты в разных соотношениях, — BFR № 1 (1,0%) и BFR № 2 (0,5%).

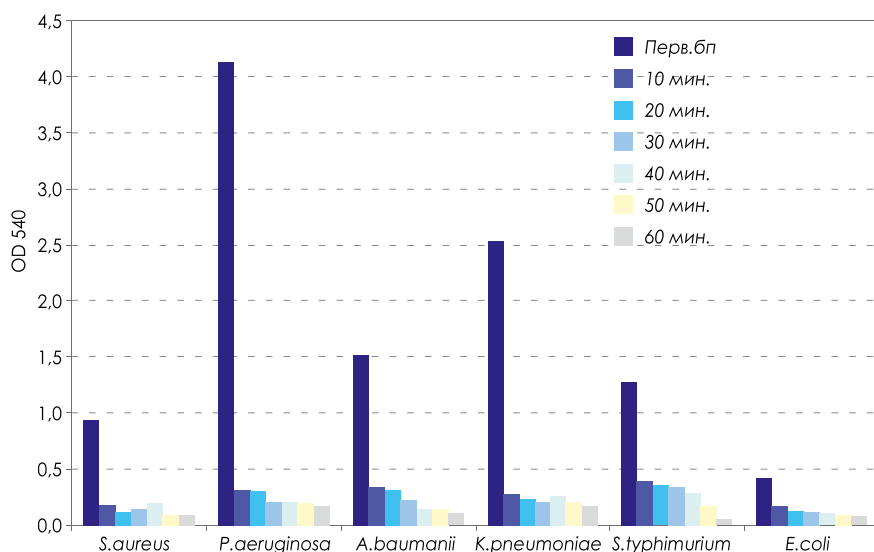


Рисунок 4. Влияние длительности воздействия композиции ферментов ENZYMIK на биопленки микроорганизмов различных видов.

Эффективность их воздействия проверяли на БП, образованных клиническими изолятами — грамположительными бактериями *S. aureus* (St15) и грамотрицательными микроорганизмами *P. aeruginosa* (Ps32), *A. baumannii* (Ac), *K. pneumoniae* (K1), *S. typhimurium* (C53), *E. coli* (E.c.) (рис. 5).

Как видно из рис. 5, лунки с контрольными нативными БП бактерий (верхний ряд) ярко окрашены, что свидетельствует об интенсивном формировании биопленок. После обработки двух нижних рядов лунок тестируемыми растворами препаратов BFR № 1 (1,0 %) и BFR № 2 (0,5 %) окрашивание лунок почти полностью исчезло. Это свидетельствует о том,

что тестируемые растворы полиферментных препаратов с добавками по-прежнему способны эффективно разрушать полисахаридный остов МБП, что приводит к выходу клеток в раствор и их удалению в ходе промывочных процедур. Поскольку эффект полного разрушения БП этими растворами был визуально очевиден, количественного определения результатов с помощью спектрофотометрии не проводили.

В последующих опытах провели динамическое сравнение активности двух вариантов растворов полиферментных препаратов BFR № 1 и BFR № 2 в отношении БП, образованных *S. aureus* и *P. aeruginosa*, оцениваемое в течение 10–60 минут.

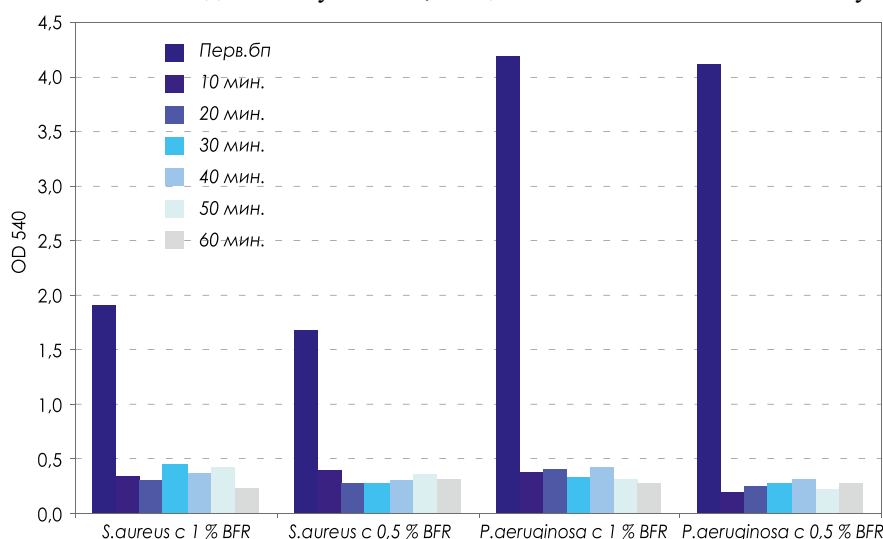


Рисунок 6. Сравнительное динамическое изучение активности опытных растворов полиферментных препаратов BFR № 1 и BFR № 2 на биопленки *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

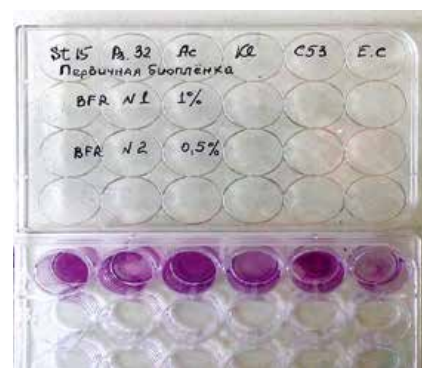


Рисунок 5. Воздействие ферментных композиций с функциональными добавками BFR № 1 и BFR № 2 на биопленки разных видов бактерий.

Примечание: верхний ряд — исходные БП; второй и третий ряды — те же БП, но обработанные растворами BFR № 1 и BFR № 2, содержащими добавки. На верхней части рисунка — обозначения видов бактерий и препаратов. Окраска генцианвиолетом. Пояснения в тексте.

На рис. 6 видно отсутствие различий по активности этих вариантов в отношении БП выбранных грамположительных и грамотрицательных бактерий: оба варианта полиферментных препаратов практически полностью разрушали биопленки *S. aureus* и *P. aeruginosa* уже в течение первых 10 минут.

Учитывая высокий потенциал возможного практического использования разрабатываемых полиферментных препаратов с медицинской целью, представляло интерес выявить активность прототипа препарата BFR № 2, использованного в минимальной концентрации (0,5 %-ный раствор), против давно сформированных, высушенных биопленок. Для этого в лунках 96-луночных планшетов провели формирование биопленок *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. typhimurium* и *E. coli* в течение суток по стандартной методике. Затем из лунок отобрали планктонные клетки, и открытые планшеты оставили подсушиваться в стерильных условиях в термостате при 37 °C на 4 суток. На 5-е сутки часть лунок обработали раствором препарата BFR № 2 (0,5 %) с различным временем инкубации (от 10 до 60 минут), затем покрасили контрольные и обработанные лунки раствором генцианвиолета и экстрагировали связавшийся краситель этанолом. Результаты фотометрии интенсивности окраски представлены на рис. 7.

Как видно на рис. 7, препарат BFR № 2 в минимальной концентрации (0,5%) может быть использован для эффективного и быстрого разрушения не только свежесформированных БП, но и для разрушения давно сформированных (более 5 суток), пересушенных БП разных видов бактерий. Достаточность всего лишь 10-минутного контакта композиции ферментов с функциональными добавками с БП, сформированными разными бактериями, для полного разрушения структурной целостности МБП в условиях комнатной температуры подчеркивает высокий практический потенциал применения разрабатываемого препарата для обработки различных поверхностей в медицинских организациях.

## Выводы

Полиферментные препараты, содержащие смеси ферментов лиаз и гидролаз из группы карбогидраз, в присутствии или без дополнительных функциональных и технологических компонентов эффективно и быстро разрушают экзополисахаридную основу матрикса БП, свежесформированных или давно сформированных на абиотических поверхностях.

Работа выполнена при финансовой поддержке ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» (Фонд содействия инновациям), в рамках темы с номером государственной регистрации № АААА-А19-119072390056-1, (Емшанов О.В.)

Работа выполнена в рамках темы с номером государственной регистрации № АААА-А16-116052010081-5. (Синицын А.П.)

## Список литературы

1. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. // *Nat Rev Microbiol*. 2010 Sep; 8 (9): 623–33. DOI: 10.1038/nrmicro2415.
2. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. / Biofilms: an emergent form of bacterial life. // *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug 11; 14 (9): 563–75. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.94. Review.
3. Смирнова А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. *Микробиология*. 2010, том 79, № 4, с. 435–446.
4. Allison D.G., Ruiz B., SanJose C., Jaspe A., Gilbert P. / Extracellular products as mediators of the formation and detachment of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. // *FEMS Microbiol. Lett*. 1998. 167: 179–84.
5. Тец В.В. Клеточные сообщества. СПб., 1998. 15–73 с. [Teitz V.V. Cell communities. Spb. 1998. 15–73 p.]
6. Cunha M.V., Sousa S.A., Leitao J.H., Moreira L.M., Videira P.A., SaCorreia I. / Studies on the involvement of the exopolysaccharide produced by *cys-*

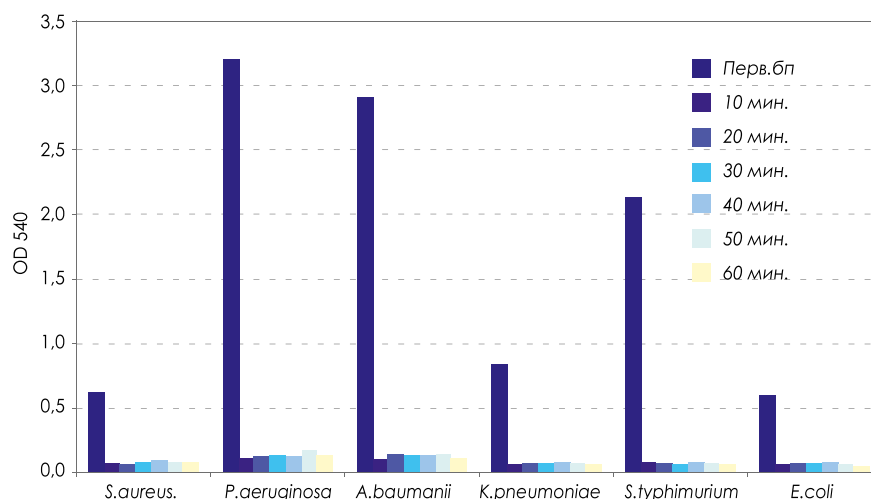


Рисунок 7. Влияние раствора препарата BFR № 2 (0,5%) на давно сформированные и пересушенные биопленки разных видов бактерий.

- tic fibrosis-associated isolated of the *Burkholderia cepacia* complex in biofilm formation and in persistence of respiratory infection // *J. Clin. Microbiol*. 2004. V. 42. P. 3052–3058.
7. de la Fuente-Núñez C, Refruveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. // *Curr Opin Microbiol*. 2013 Oct; 16 (5): 580–9. DOI: 10.1016/j.mib.2013.06.013.
8. Davidson D.J., Spratt D., Liddle A.D. / Implant materials and prosthetic joint infection: the battle with the biofilm. // *EFORT Open Rev*. 2019 Nov 5; 4 (11): 633–639. DOI: 10.1302/2058–5241.4.180095.
9. Müsken M., Klimmek K., Sauer-Heilborn A., Donnerer M., Sedlacek L., Suerbaum S., Häussler S. / Towards individualized diagnostics of biofilm-associated infections: a case study. // *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2017 Sep 28; 3: 22. DOI: 10.1038/s41522–017–0030–5.
10. Malone M., Goeres D.M., Gosbell I., Vickery K., Jensen S., Stoodley P. / Approaches to biofilm-associated infections: the need for standardized and relevant biofilm methods for clinical applications. // *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2017 Feb; 15 (2): 147–156. DOI: 10.1080/14787210.2017.1262257.
11. Di Domenico E.G., Rimoldi S.G., Cavallo L., D'Agostino G., Trento E., Cagnoni G., Palazzini A., Pagani C., Romeri F., De Vecchi E., Schiavini M., Secchi D., Antona C., Rizzardini G., Dichirico R.B., Toma L., Kovacs D., Cardinali G., Gallo M.T., Gismondo M.R., Ensolli F. / Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. // *BMC Microbiol*. 2019 Oct 21; 19 (1): 228. DOI: 10.1186/s12866–019–1596–2.
12. Lynch C., O'Connor JA, O'Brien D, Vaughan C, Bolton D., Coffey A, Lucey B. / First reported detection of biofilm formation by *Campylobacter fetus* during investigation of a case of prosthetic valve endocarditis. // *J Clin Pathol*. 2019 Aug; 72 (8): 554–557. DOI: 10.1136/jclinpath-2018–205677.
13. Yu M., Chua S.L. / Demolishing the great wall of biofilms in Gram-negative bacteria: To disrupt or disperse? // *Med Res Rev*. 2019 Nov 20. DOI: 10.1002/med.21647.
14. Roy R., Tiwari M., Donelli G., Tiwari V. / Strategies for Combating Bacterial Biofilms: A Focus on Anti-Biofilm Agents and Their Mechanisms of Action. // *Virulence*. 2019, 9 (1), 522–554. PMID: 28362216. DOI: 10.1080/215055594.2017.1313372
15. Степанова Т.В., Романова Ю.М., Алексеева Н.В. и др. / Разработка средств борьбы с биопленками: изучение воздействия полисахаридных лиаз на матрикс биопленок, образующих *Pseudomonas aeruginosa* и *Burkholderia cepacia*. Медицинский алфавит. Лаборатория. 1. 2010. С. 47–51.
16. Ravaoli S., Campoccia D., Visai L., Pirini V., Cangini I., Corazzari T., Maso A., Poggio C., Pegreff F., Montanaro L., et al. / Biofilm extracellular-DNA in 55 *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates from implant infections. // *Int J Artif Organs*. 2011 Sep; 34 (9): 840–6.
17. Montanaro L., Poggi A., Visai L., Ravaoli S., Campoccia D., Speziale P., Arciola C.R. / Extracellular DNA in biofilms. // *Int J Artif Organs*. 2011 Sep; 34 (9): 824–31. DOI: 10.5301/ijao.5000051.
18. Speziale P., Pietrocola G., Foster T.J., Geoghegan J.A. / Protein-based biofilm matrices in *Staphylococcus*. // *Front Cell Infect Microbiol*. 2014 Dec 10; 4: 171. DOI: 10.3389/fcimb.2014.00171.
19. Kavanaugh J.S., Flack C.E., Lister J., Ricker E.B., Ibberson C.B., Jenul C., Moormeier D.E., Delmain E.A., Bayles K.W., Horswill A.R. / Identification of Extracellular DNA-Binding Proteins in the Biofilm Matrix. // *MBio*. 2019 Jun 25; 10 (3). pii: e01137–19. DOI: 10.1128/mBio.01137–19.
20. Gutierrez Jauregui R., Fleige H., Bubke A., Rohde M., Weiss S., Förster R. / IL-1β Promotes *Staphylococcus aureus* Biofilms on Implants in vivo. // *Front Immunol*. 2019 May 17; 10: 1082. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01082.
21. Тутельян А.В., Юшина Ю.К., Соколова О.В., Батаева Д.С., Фесюн А.Д., Датий А.В. / Образование биологических пленок микроорганизмов на пищевых производствах. // *Вопросы питания*. 2019. Т. 88, № 3. С. 32–43.
22. Maunders E., Welch M. / Matrix exopolysaccharides: the sticky side of biofilm formation. // *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jul 6; 364 (13). doi: 10.1093/femsle/fnx120.
23. Патент № 216.012.7301. Авторы: Барнетт Кристофер (US), Кумар Маноаж (US), Уайтед Грегори М. (US). Правообладатели: Даниско ЮЖС Инк. (US). Дата охранного документа 10.10.2013.
24. Середина А.С., Великоречная И.А., Осипов Д.О., Матис Т.В., Синицын О.А., Синицын А.П. и др. / Ферментные комплексы для разрушения клеточной стенки миксальных грибов — продуцентов промышленных ферментов. // *Известия Уфимского научного центра РАН*. 2018. № 3 (2). С. 31–35.
25. Алексеева Н.В., Степанова Т.В., Толордава Э.Р., Романова Ю.М. / Разработка средств борьбы с биопленками: влияние препарата «Лапрот» (на основе человеческого лактоферрина) и антибиотика ципрофлоксацина на рост и процесс образования биопленок бактериями *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. // *Медицинский алфавит*. 15/2010. Лаборатория № 3. С. 4–9.
26. O'Toole G.A., Kolter R. / Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. // *Mol. Microbiol*. 1998. V. 30: 295–304.
27. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Смирнова Т.А. и др. / Способность к формированию биопленок в искусственных системах у различных штаммов *Salmonella typhimurium*. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2006. № 4: 38–42.

**Для цитирования.** Романова Ю.М., Тутельян А.В., Синицын А.П., Писарев В.М., Алексеева Н.В., Филипова Н.И., Толордава Э.Р., Емшанов О.В., Синицын О.А. Ферменты из группы карбогидраз разрушают структуру матрикса биопленок грамположительных и грамотрицательных бактерий // *Медицинский алфавит*. Серия «Стоматология». — 2019. — Т. 4. — 34 (409). — С. 40–45.