

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

## Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака

Меньшикова Е.А.<sup>✉</sup>, Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Титова С.В.

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия

### Аннотация

**Введение.** Большинство бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биоплёнок. Одним из наиболее экологически важных субстратов является хитин. *Vibrio cholerae*, как и большинство представителей семейства *Vibrionaceae*, обладают хитиноподобным комплексом и могут разлагать хитин. Способность *V. cholerae* образовывать биоплёнку на хитиновых субстратах может объяснить механизм формирования экологической ниши для сохранения и переноса возбудителя в новые регионы с вероятностью формирования новых очагов холеры.

**Цель работы** — методом ПЦР в режиме реального времени определить способность *V. cholerae* формировать биоплёнку на хитиновом панцире речного рака (*Astacus astacus*).

**Материалы и методы.** Проведён сравнительный анализ сроков образования биоплёнки *V. cholerae* различных серогрупп и токсигенности.

**Результаты.** Установлено, что *V. cholerae* независимо от серогруппы и токсигенности способны образовывать биоплёнку, однако токсигенные штаммы *tcpA*<sup>+</sup> обладают большей интенсивностью биоплёнкообразования, чем нетоксигенные, у которых ген *tcpA* отсутствует.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, биопленка, хитин, показатель биопленкообразования

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Титова С.В. Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):434–439.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

## Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR

Elena A. Menshikova<sup>✉</sup>, Ekaterina M. Kurbatova, Sergey O. Vodopyanov, Ruslan V. Pisanov, Svetlana V. Titova

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

### Abstract

**Introduction.** Most of the bacteria exist in natural ecosystems not in the form of free floating cells, but in the form of biofilms attached to the substrate. One of the most ecologically important substrates is chitin. *Vibrio cholerae*, like most members of the *Vibrionaceae* family, has a chitinolytic complex and can degrade chitin. The ability of *V. cholerae* to form a biofilm on chitinous substrates can explain the mechanism of the formation of an ecological niche for the preservation and transfer of the pathogen to new regions with the likelihood of the formation of new foci of cholera.

**Aim** — to determine the ability of *V. cholerae* to form a biofilm on the chitinous shell of crayfish (*Astacus astacus*) by means of real-time PCR.

**Materials and methods.** A comparative analysis of the timing of biofilm formation by *V. cholerae* of different serogroups and toxigenicity was carried out.

**Results.** In the course of the study, it was found that cholera vibrios were shown to be capable of forming a biofilm regardless of the serogroup and toxigenicity. However, toxigenic tcpA<sup>+</sup> strains have a higher intensity of biofilm formation than nontoxigenic ones, in which the tcpA gene is absent.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, biofilm, chitin, biofilm formation index

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Vodopyanov S.O., Pisanov R.V., Titova S.V. Evaluation of the ability of cholera vibrios to form a biofilm on the surface of the chitinous shell of a crayfish by real-time PCR. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(4):434–439.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99>

## Введение

В результате накопленных к настоящему времени экспериментальных данных некоторые исследователи стали рассматривать планктонную форму как способ перемещения микробной клетки от одной поверхности к другой, т.е. как кратковременное состояние в жизни бактерий [1]. В настоящее время известно, что большинство бактерий существуют в природных экосистемах не в виде свободно плавающих клеток, а в виде прикрепленных к субстрату биопленок [1]. Формирование биоплёнки — одна из стратегий выживания *Vibrio cholerae*, которая ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам и использованием её в качестве средства для распространения, когда возбудитель холеры прикрепляется к живым мобильным хозяевам [2].

М. Sultana и соавт. (2018), проводя исследования поверхностных водоёмов, пришли к выводу, что биоплёнки являются средством персистенции и неотъемлемой частью годового жизненного цикла *V. cholerae* в Бангладеш. При мониторинге поверхностных водоёмов в течение года авторы установили, что в весенне-летний период *V. cholerae* находятся в планктонной форме, и это совпадает с ежегодными сезонными вспышками холеры в этом регионе [3]. По данным F. Yildiz (2009), D. Srivastava (2012), переход от свободного плавания к прикрепленному образу жизни [4, 5] усиливает природную компетентность и горизонтальный перенос генов [6], а также обеспечивает повышенную защиту от хищников [7].

Особую роль в сохранении *V. cholerae* в водных экосистемах играют хитиновые покрытия членистоногих, некоторых диатомовых водорослей и грибов, на поверхности которых вибрион способен существовать в виде биоплёнки. Хитин — один из наиболее распространённых в природе полисахаридов. Эволюционно хитин для вибрионов служит основным питательным субстратом, а сформированные на его поверхности биоплёнки служат местом их обитания и убежищем от неблагоприят-

ных факторов окружающей среды. Известно, что для человека биоплёнки могут являться средством инфицирования при употреблении загрязнённой планктоном воды или термически необработанных морепродуктов [8–12]. Несмотря на то что в последние десятилетия получены обширные экспериментальные знания о биоплёнках *V. cholerae*, до сих пор нет простых и доступных методов для оценки способности формирования *V. cholerae* на поверхности хитина.

**Цель работы** — оценка способности *V. cholerae* формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака (по показателю биоплёнкообразования — ПБ) методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

## Материалы и методы

Для определения способности *V. cholerae* формировать биоплёнку был разработан метод с использованием хитина широкопалого речного рака *Astacus astacus* в качестве биотического субстрата<sup>1</sup>.

Фрагменты хитинового панциря речного рака размером 0,5 × 0,5 см и массой 100 мг помещали во флаконы (100 мл) с 30 мл речной воды и автоклавировали при 132°C 30 мин. Штаммы *V. cholerae* El Tor ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> № P-19613 (Инаба), № 5879 (Инаба), № 18332 (Огава), № 19241 (Инаба); ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>-</sup> № 19754 (Инаба), № 20000 (Огава), № 17817 (Инаба); *V. cholerae* classical ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup> № 434 (Огава) и *V. cholerae* nonO1/nonO139 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> № 30, выделенные в разные годы от людей и из воды поверхностных водоёмов, добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 10<sup>4</sup> микробных клеток (МК) на 1 мл. Работу проводили в соответствии с требованиями биологической безопасности<sup>2</sup>. Исследуемые штаммы *V. cholerae* культиви-

<sup>1</sup> Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В. Способ моделирования биопленок формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент РФ № 2685878; 2019.

<sup>2</sup> СП 1.3.3118-13. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности). М.; 2014.

ровали при  $15 \pm 2^\circ\text{C}$ , что соответствует весенне-осенней температуре в поверхностных водоёмах в Ростове-на-Дону.

Для постановки ПЦР фрагменты хитина извлекали пинцетом, трижды промывали в физиологическом растворе, несвязавшиеся клетки удаляли на листе фильтровальной бумаге и вносили в стандартные пробирки (Эппендорф) ёмкостью 1,5 мл с 1 мл физиологического раствора. Лизис клеток, включая образцы биоплёнок, проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09<sup>3</sup>. Полученные препараты использовали для постановки ПЦР-РВ. С целью определения количества клеток вибрионов при проведении ПЦР-РВ были использованы образцы с известным количеством искомой ДНК — стандарты, в качестве которых использовали разведения взвесей суточных культур *V. cholerae* с известной концентрацией клеток, которую определяли путём высева на агаровые пластины и последующего подсчёта КОЕ. Количество клеток в исследуемых препаратах рассчитывали автоматически с помощью программного обеспечения амплификатора «DTlite 5S1» (ДНК-технология). В качестве мишени амплификации использовали ген *hlyA* [13, 14]. ПБ рассчитывали как отношение количества МК *V. cholerae* на фрагменте хитинового панциря к их количеству в среде инкубации над хитиновыми пластинами.

Для визуализации экзополисахарида (основного компонента матрикса биоплёнки) и клеток *V. cholerae* фрагменты хитинового панциря с биоплёнкой отпечатывали на предметном стекле с помощью пинцета, после чего фрагменты хитина погружали в дезинфицирующий раствор, а покровное стекло с мазком-отпечатком фиксировали в 96° спирте в течение 20 мин. Препараты окрашивали конго красным и фуксином (оба «Интерхим»). В качестве контроля использовали планктонную форму штаммов. Исследуемые образцы изучали в световом микроскопе «Zeiss Axiostarplus» («Carl Zeiss Microscopy»).

Наличие/отсутствие роста исследуемых штаммов параллельно подтверждали бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биоплёнкой на агаровых пластинах (агар Мартена, pH  $7,4 \pm 0,2$ ).

## Результаты

В ходе исследования установили, что у большинства токсигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных от человека, начало образования биоплёнки происходило со 2-х суток от начала эксперимента. ПБ этих штаммов на 2-е сутки составлял 1,0–1,7.

На 6–7-е сутки от начала эксперимента количество МК на хитиновом панцире превышало их количество в планктоне (2,4–8,1). Исключение составили штаммы *V. cholerae* El Tor № 5879 *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>*, *V. cholerae classical* № 434 *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>*, у которых максимальное количество МК на хитиновом субстрате отмечали на 35-е сутки от начала эксперимента (3,0 и 7,5 соответственно). Интересно, что эти штаммы относятся к разным сероварам (Инаба и Огава). У штаммов *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>* водного происхождения на 2-е сутки от начала эксперимента этот показатель был ниже — 0,5–0,8. К 7-м суткам инкубации ПБ токсигенных штаммов, выделенных из воды, значительно превышал этот показатель штаммов *ctxA<sup>+</sup>*, выделенных от человека (3,5–8,1).

У штаммов *V. cholerae* El Tor *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>* и *V. cholerae nonO1/nonO139* водного происхождения количество МК на хитиновом панцире превышало количество МК в субстрате также на 6–7-е сутки, однако ПБ были значительно ниже, чем у токсигенных штаммов (0,1–1,7). Возможно, данный процесс у этих штаммов остановился на стадии обратимой адгезии. В течение срока наблюдения ПБ изменялся (уменьшался или увеличивался; **таблица**), следовательно, биоплёнокообразование — это динамичный процесс.

При визуализации мазков-отпечатков к 7-м суткам у токсигенных штаммов на всех микропрепаратах отмечали крупное скопление клеток *V. cholerae*, окружённых аморфным веществом (экзопполисахаридом), окрашенным в ярко-розовый цвет, без чёткой формы, т.к., наслаиваясь друг на друга, они образовывали разного размера конгломераты (**рис. 1, а**).

Нетоксигенные *V. cholerae* образовывали скопления разных размеров, окружённые аморфным веществом розового цвета по всему полю зрения, однако размеры скоплений клеток и окраска экзополисахарида были менее интенсивными, чем у токсигенных штаммов (**рис. 1, б**). В контрольных пробах (планктонная форма) в микропрепаратах наблюдали единичные клетки *V. cholerae* (**рис. 2**).

Ранее нами было проведено электронно-микроскопическое исследование образцов биоплёнок *V. cholerae* O1 El Tor Inaba штамм № P-19613 *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>* и *V. cholerae* O1 El Tor Ogava штамм № P-20000 *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>*. Сравнительный анализ электронограмм показал, что образование биоплёнки на поверхности хитина у *V. cholerae* происходит независимо от наличия генов токсин-регулируемых пилей адгезии *tcpA* и холерного токсина *ctxA*, однако интенсивность биоплёнокообразования у данных штаммов различна [15].

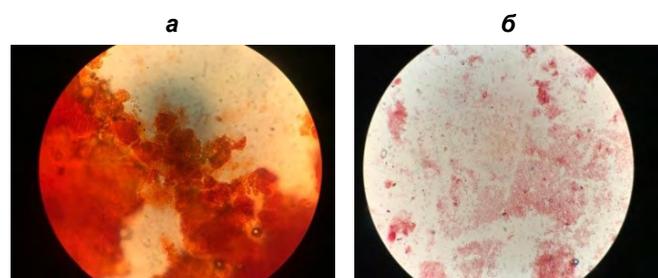
## Обсуждение

Исходя из полученных данных, токсигенный штамм *V. cholerae* O1 *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>* обладает боль-

<sup>3</sup> МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. М.; 2010.

ПБ *V. cholerae* на хитиновом панцире речного рака  
 Biofilm formation index of *V. cholerae* on the chitinous carapace of crayfish

Штамм Strain name	Номер Number	Наличие генов <i>ctx</i> и <i>tcp</i> Presence of <i>ctx</i> and <i>tcp</i> gene	Объект выделения Source of isolation	Срок инкубации, сут Incubation time, days									
				1	2	5	6	7	17	20	25	35	
O1 El Tor	5879	<i>ctxA</i> <sup>+</sup> <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	Человек Human	0,5	1,0	0,9	1,1	0,4	0,8	0,8	0,8	3,0	
O1 El Tor	18332	<i>ctxA</i> <sup>+</sup> <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	Человек Human	0,2	1,7	1,2	0,6	2,4	0,8	0,6	0,5	0,5	
O1 El Tor	19613	<i>ctxA</i> <sup>+</sup> <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	Вода Water	0,3	0,8	0,4	0,5	3,5	1,3	1,0	2,4	1,0	
O1 El Tor	301	<i>ctxA</i> <sup>+</sup> <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	Вода Water	0,4	0,5	1,4	1,7	8,1	3,2	2,7	0,6	0,3	
O1 <i>classical</i>	434	<i>ctxA</i> <sup>+</sup> <i>tcpA</i> <sup>+</sup>	Человек Human	0,2	1,4	0,9	2,5	1,1	3,0	2,5	2,1	7,5	
O1 El Tor	19754	<i>ctxA</i> <sup>-</sup> <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	Вода Water	0,2	0,4	0,4	0,1	0,4	0,2	0,4	0,3	0,2	
O1 El Tor	17817	<i>ctxA</i> <sup>-</sup> <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	Вода Water	0,03	0,1	0,1	0,3	0,1	0,3	0,2	0,2	0,1	
O1 El Tor	20000	<i>ctxA</i> <sup>-</sup> <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	Вода Water	0,1	1,1	1,2	1,2	1,7	0,9	1,0	0,7	0,7	
nonO/nonO139	30	<i>ctxA</i> <sup>-</sup> <i>tcpA</i> <sup>-</sup>	Вода Water	0,3	1,2	0,3	1,7	0,5	0,6	0,2	0,3	0,3	

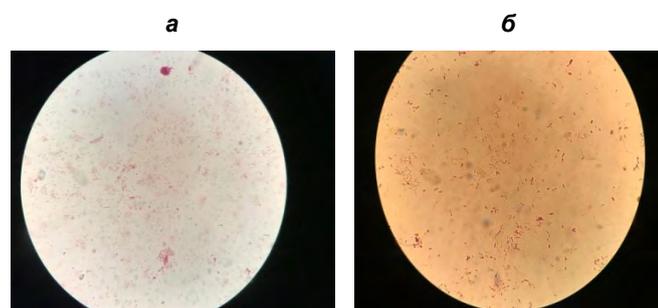


**Рис. 1.** Биоплёнка *V. cholerae* на хитиновом фрагменте, ×1600.

*a* — *V. cholerae* № 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>; *b* — *V. cholerae* № 20000 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>.

**Fig. 1.** *V. cholerae* biofilm on a chitinous fragment, ×1600.

*a* — *V. cholerae* No. 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>; *b* — *V. cholerae* No. 20000 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>.



**Рис. 2.** Планктонная форма *V. cholerae*, ×1600.

*a* — *V. cholerae* № 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>; *b* — *V. cholerae* № 20000 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>.

**Fig. 2.** Planktonic form of *V. cholerae*, ×1600.

*a* — *V. cholerae* No. 19613 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>; *b* — *V. cholerae* No. 20000 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>.

шей интенсивностью биоплёнкообразования, чем штаммы *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>. На это указывают большая толщина биопленки, объём, плотность матрикса и активность их метаболических процессов.

Такая разница в структурных образованиях биоплёнок между токсигенными и нетоксигенными штаммами, выявленная при изучении в световом микроскопе и методом трансмиссионной электронной микроскопии, свидетельствует о том, что их образование зависит в значительной степени от наличия *tcpA* в геноме штаммов *V. cholerae*, взятых в эксперимент. Это согласуется с выводами ряда авторов о большей биоплёнкообразующей способности штаммов *tcpA*<sup>+</sup>, что указывает на эпидемиологическую опасность биоплёнкообразования [15–19].

### Заключение

Таким образом, представленные результаты подтверждают возможность использования методических приёмов, предлагаемых в работе, для оценки способности *V. cholerae* формировать биоплёнку на биотических субстратах. Способность токсигенных штаммов *V. cholerae* колонизировать поверхность хитиновых субстратов может привести к накоплению возбудителя в поверхностных водоёмах в случае завоза с эндемичных по холере территорий. Полученные результаты могут быть использованы как в фундаментальных научных исследованиях, так и в практических целях для дополнительной оценки патогенетического и персистентного потенциала штаммов *V. cholerae*.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Чернявский В.И. Бактериальные биопленки и инфекции (лекция). *Аннали Мечниковского Института*. 2013; (1): 86–90. Available at: [http://www.imiamn.org.ua/journal/1\\_2013/PDF/18.pdf](http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2013/PDF/18.pdf)
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Sultana M., Nusrin S.N., Hasan A., Sadique A., Ahmed K., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholera* in the Bay of Bengal estuary. *mBio*. 2018; 9(2): e00483-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00483-18>
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Srivastava D., Waters C.M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485–93. <https://doi.org/10.1128/jb.00379-12>
- Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>
- Matz C., Kjelleberg S. Off the hook — how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 302–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г., Миронова Л.В., Марков Е.Ю., Мальник В.В. и др. Биопленка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2015; 92(1): 3–11.
- Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Rosemanand S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2524–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1): 44–51. <https://doi.org/10.1128/aem.01412-07>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603–32. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(10): 4685–93. <https://doi.org/10.1128/aem.67.10.4685-4693.2001>
- Симонова И.Р., Головин С.Н., Титова С.В., Половцева В.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М. Трансмиссионная электронная микроскопия биопленок *vibrio cholerae* на хитине. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационно-научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации*. Ростов-на-Дону; 2018: 69–73.
- Shahkarami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates. Diss. 2005. Available at: [https://scholarworks.sjsu.edu/etd\\_theses/2839](https://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/2839)
- Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., Rice S.A., McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015; 9(8): 1812–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
- Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M., et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>
- Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6): 1400–10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>

## REFERENCES

- Chernyavskiy V.I. Bacterial biofilms and infections (lecture). *Annaly Mechnikovskogo Instituta*. 2013; (1): 86–90. Available at: [http://www.imiamn.org.ua/journal/1\\_2013/PDF/18.pdf](http://www.imiamn.org.ua/journal/1_2013/PDF/18.pdf) (in Russian)
- Hall-Stoodley L., Costerton J.W., Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 95–108. <https://doi.org/10.1038/nrmicro821>
- Sultana M., Nusrin S.N., Hasan A., Sadique A., Ahmed K., Islam A., et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholera* in the Bay of Bengal estuary. *mBio*. 2018; 9(2): e00483-18. <https://doi.org/10.1128/mbio.00483-18>
- Yildiz F.H., Visick K.L. *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol.* 2009; 17(3): 109–18. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Srivastava D., Waters C.M. A tangled web: regulatory connections between quorum sensing and cyclic di-GMP. *J. Bacteriol.* 2012; 194(17): 4485–93. <https://doi.org/10.1128/jb.00379-12>
- Lo Scudato M., Blokesch M. The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 2012; 8(6): e1002778. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002778>
- Matz C., Kjelleberg S. Off the hook – how bacteria survive protozoan grazing. *Trends Microbiol.* 2005; 13: 302–7. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2005.05.009>
- Kuliklova E.S., Urbanovich L.Ya., Sappo S.G., Mironova L.V., Markov E.Yu., Mal'nik V.V., et al. Cholera vibrio biofilm: production, characterization and role in reservation of causative agent in water environment. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2015; 92(1): 3–11. (in Russian)
- Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Rosemanand S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004; 101(8): 2524–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308707101>
- Hunt D.E., Gevers D., Vahora N.M., Polz M.F. Conservation of the chitin utilization pathway in the *Vibrionaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008; 74(1): 44–51. <https://doi.org/10.1128/aem.01412-07>
- Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym.* 2006; 31(7): 603–32. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>
- Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio*. *Front. Microbiol.* 2013; 4: 375. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2): e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(10): 4685–93. <https://doi.org/10.1128/aem.67.10.4685-4693.2001>
- Simonova I.R., Golovin S.N., Titova S.V., Polovtseva V.S., Men'shikova E.A., Kurbatova E.M. Transmission electron microscopy of *Vibrio cholerae* biofilms on chitin. In: *Cholera*

- and *Vibrios Pathogenic to Humans. Collection of Articles of the Problem Commission (48.04) of the Coordinating Scientific Council for Sanitary and Epidemiological Protection of the Territory of the Russian Federation [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony. Sbornik statey problemnoy komissii (48.04) Koordinatsionnogo nauchnogo soveta po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii]*. Rostov-na-Donu; 2018: 69–73. (in Russian)
16. Shahkarami M. *Vibrio cholerae* biofilm development on natural and artificial chitin substrates: Diss. 2005. Available at: [https://scholarworks.sjsu.edu/etd\\_theses/2839](https://scholarworks.sjsu.edu/etd_theses/2839)
17. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., Rice S.A., McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015; 9(8): 1812–20. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
18. Nahar S., Sultana M., Naser M.N., Nair G.B., Watanabe H., Ohnishi M., et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. *Front. Microbiol.* 2011; 2: 260. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00260>
19. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin. *Environ. Microbiol.* 2008; 10(6): 1400–10. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01559.x>

#### Информация об авторах

Меньшикова Елена Аркадьевна<sup>✉</sup> — к.б.н., с.н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, super.monika2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

Курбатова Екатерина Михайловна — н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-5268-0499>

Водопьянов Сергей Олегович — д.м.н., г.н.с., исполняющий обязанности заведующего лаб. биохимии микробов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Писанов Руслан Вячеславович — к.б.н., в.н.с., исполняющий обязанности заведующего лаб. диагностики особо опасных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Тимова Светлана Викторовна — к.м.н., в.н.с. лаб. экологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 06.11.2020;  
принята к публикации 10.02.2021;  
опубликована 30.08.2021

#### Information about the authors

Elena A. Menshikova<sup>✉</sup> — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, super.monika2007@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

Ekaterina M. Kurbatova — researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-5268-0499>

Sergey O. Vodopyanov — D. Sci. (Med.), main researcher, Acting Head, Laboratory of biochemistry of microbes, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Ruslan V. Pisanov — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Acting Head, Laboratory for diagnostics of especially dangerous infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

Svetlana V. Titova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Laboratory of *Vibrio cholerae* ecology, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 06.11.2020;  
accepted for publication 10.02.2021;  
published 30.08.2021