

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-268>



Антибиотикочувствительность холерных вибрионов в сложных биоплёнках, сформированных на различных субстратах

Селянская Н.А.[✉], Титова С.В., Меньшикова Е.А.

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

Аннотация

Введение. Изучение антибиотикочувствительности биоплёнок холерных вибрионов может помочь в поиске эффективных препаратов для борьбы с холерой.

Цель работы — оценить эффективность антибактериальных препаратов в отношении клеток *Vibrio cholerae* в составе полимикробной биоплёнки, образованной на различных субстратах.

Материалы и методы. Проводили моделирование моно- и полимикробных биоплёнок *in vitro* на хитине и пластике во флаконах с водопроводной автоклавированной водой, контаминированных взвесью 10^4 микробных клеток трёх штаммов *V. cholerae* O1 El Tor отдельно и в сочетании с *Escherichia coli* QD 5003.

Результаты. В составе моно- и полимикробных бактериальных сообществ, образованных изучаемыми штаммами на хитине или на пластике, клетки холерных вибрионов и кишечной палочки оказались менее восприимчивы к действию антибактериальных препаратов.

Заключение. Повышенная антибиотикоустойчивость биоплёнок холерных вибрионов, образованных на биотических и абиотических поверхностях, подчёркивает опасность их распространения и сохранения в окружающей среде, создаёт дополнительные проблемы в отношении использования антибиотиков и требует разработки альтернативных стратегий снижения резистентности.

Ключевые слова: антибиотикорезистентность, биоплёнка, холерный вибрион

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: Селянская Н.А., Титова С.В., Меньшикова Е.А. Антибиотикочувствительность холерных вибрионов в сложных биоплёнках, сформированных на различных субстратах. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(2):188–195.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-268> EDN: <https://www.elibrary.ru/eibqqj>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-268>

Antibiotic sensitivity of cholera vibriions in biofilms formed on various substrates

Nadezhda A. Selyanskaya[✉], Svetlana V. Titova, Elena A. Menshikova

Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia

Abstract

Introduction. Evaluation of antibiotic sensitivity of biofilms formed by *Vibrio cholerae* can help in the search for effective drugs to combat cholera.

The **aim** of the work is to evaluate the effectiveness of antibacterial drugs against *V. cholerae* cells being a part of a polymicrobial biofilm formed on various substrates.

Materials and methods. Mono- and polymicrobial biofilms were simulated *in vitro* on chitin and plastic in flasks containing tap autoclaved water contaminated with a suspension of 10^4 microbial cells of three strains of *V. cholerae* O1 El Tor separately or in combination with *Escherichia coli* QD 5003.

Results. When being a part of mono- or polymicrobial bacterial communities formed by the studied strains on chitin or plastic, the *V. cholerae* and *E. coli* cells were less susceptible to the action of antibacterial drugs.

Conclusion. The increased antibiotic resistance of *V. cholerae* biofilms formed on biotic and abiotic surfaces highlights the danger of their spread and preservation in the environment, creates additional problems regarding the use of antibiotics and requires the development of alternative strategies to reduce resistance.

Keywords: *antibiotic resistance, biofilm, V. cholerae*

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: Selyanskaya N.A., Titova S.V., Menshikova E.A. Antibiotic sensitivity of cholera vibriions in biofilms formed on various substrates. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(2):188–195.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-268> EDN: <https://www.elibrary.ru/eibqqj>

Введение

Биоплёнообразование — важная часть жизненного цикла большинства бактерий. Холерные вибрионы могут образовывать биоплёнки на эпителии кишечника человека, что играет решающую роль в патогенезе и передаче инфекции [1]. Биоплёночные агрегаты, сформированные *Vibrio cholerae* в окружающей среде на биотических и абиотических поверхностях, включая хитин зоопланктона, пластик, стекло, обеспечивают сохранение и выживаемость возбудителя между эпидемическими сезонами и резко увеличивают его инфекционность [2–4].

Последние десятилетия были отмечены значительным увеличением наших знаний о структуре, регуляции и функциях биоплёнок, о влиянии условий их формирования на происходящие в них физиологические и молекулярные процессы [5]. Доказано, что микробные сообщества, окружённые внеклеточным матриксом, по сравнению с планктонными клетками более защищены от неблагоприятных воздействий. В то же время степень этой защиты может зависеть от целого ряда факторов, включая поверхность образования и вид бактерий, формирующих биоплёнку [6, 7]. Сложные микробные взаимодействия, происходящие в смешанных поливидовых биоплёнках, наличие конкурентных взаимодействий способны изменять структурные и функциональные характеристики, химический состав биоплёнок, их подверженность дезинфицирующим средствам и антибиотикам [8]. Понимание механизмов развития сложных биоплёнок и их антибиотикочувствительности может помочь в поиске эффективных препаратов для борьбы с биоплёнообразованием.

Цель работы — оценить эффективность антибактериальных препаратов (АБП) в отношении клеток *V. cholerae* в составе полимикробной биоплёнки, образованной на различных субстратах.

Материалы и методы

Для работы из Коллекции патогенных микроорганизмов Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора были получены штаммы: *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁺tcp⁺) №81, 19667, *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁻tcp⁻) № 20000, *Escherichia coli* QD 5003. Моделирование моно- и полимикробных

биоплёнок *in vitro* проводили на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus* либо пластиковых пластинках, которые помещали во флаконы с водопроводной автоклавированной водой (100 мл), контаминированные взвесью 10⁴ микробных клеток каждого штамма или в сочетании *E. coli* с *V. cholerae* 1 : 1, способом, описанным ранее [9, 10]. Флаконы выдерживали 4 сут при 28°C. На 5-е сутки культивирования пластинки хитина или пластика с образовавшимися биоплёнками после трёхкратного промывания в физиологическом растворе переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения АБП в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера pH 7,7). В контрольный флакон с биоплёнкой АБП не добавляли. Через 24 ч выращивания в термостате (37°C) делали отпечатки биоплёнок и высев по 0,1 мл планктонной культуры на пластинки с агаром Хоттингера (pH 7,7). Результат учитывали через 24 ч по наличию или отсутствию роста бактерий. Отнесение культур к чувствительным/устойчивым проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09, МУК 4.2.3745-22 и рекомендациями EUCAST «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021–01», определяя минимальные подавляющие концентрации (МПК) препаратов [11–13].

В работе использованы препараты первого (доксикалин, триметоприм/сульфаметоксазол, фуразолидон — отечественного производства, налидиксовая кислота (невиграмон, «CHINOIN Pharmaceutical and Chemical Works Private, Co. Ltd.», Венгрия) и второго ряда (тетрацилин, левомицетин (хлорамфеникол), рифампицин, стрептомицин, ампициллин — отечественного производства), рекомендуемые для определения чувствительности/устойчивости *V. cholerae* [11, 12].

Наличие биоплёнок в полученных образцах подтверждали по визуализации экзополисахаридного матрикса в мазках-отпечатках или непосредственно на пластинках в световом микроскопе («Carl Zeiss Microscopу») с использованием окраски конго красным и фуксином («Интерхим»).

Культуры в мазках-отпечатках биоплёнок идентифицировали по морфологии колоний, тесту

на оксидазу и реакции агглютинации на стекле с O1-холерной сывороткой.

Статистическую обработку результатов определения МПК АБП проводили, вычисляя среднее арифметическое значение (M) результатов трёх повторных опытов, ошибку среднего арифметического значения (m). Различия между значениями МПК планктонных и биоплёночных культур оценивали при помощи критерия Стьюдента при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты

Все исследуемые культуры на 5-е сутки культивирования образовывали биоплёнки, что подтверждает полученные ранее данные о способности *V. cholerae* образовывать моновидовые и сложные биоплёнки на хитине и пластике [14–17].

Все планктонные культуры штаммов *V. cholerae* El Tor проявляли устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу и фуразолидону. Токсигенные штаммы (ctx⁺tcp⁺) *V. cholerae* El Tor 19667 и *V. cholerae* El Tor 81 дополнительно были нечувствительны к налидиксовой кислоте. Планктонные клетки *E. coli* были чувствительны ко всем исследуемым АБП (табл. 1).

В составе мономикробных бактериальных сообществ, независимо от субстрата образования, клетки *V. cholerae* и *E. coli* оказались менее восприимчивы к действию АБП, значения МПК которых достоверно увеличились ($p \leq 0,05$) в сравнении со значениями для планктонных культур. До 256 раз возросли значения МПК препаратов, к которым штаммы были резистентны, а величина МПК антибиотиков, сохранявших активность в отношении планктонных культур, достигла показателей устойчивых (табл. 1). При этом уровень антибиотикоустойчивости исследуемых культур в биоплёнках, образованных на хитине и пластике, был одинаков, за исключением устойчивости к тетрациклину и левомицетину штамма *V. cholerae* O1 El Tor 19667, которая достоверно отличалась в 2–8 раз.

Полученные данные согласуются с наблюдениями зарубежных авторов о большей антибиотикоустойчивости штамма *V. cholerae* O139 MO10 (MTCC 3906) в составе биоплёнки в сравнении с его планктонной формой [18].

Антибиотикочувствительность *E. coli* и *V. cholerae* в составе сложных биоплёнок, образованных при их совместном культивировании, достоверно не отличалась от их чувствительности в моновидовых биоплёнках, полученных как на пластике, так и на хитине (табл. 2).

Исключение составил доксициклин, значения МПК которого в отношении штамма *V. cholerae* O1 El Tor 19667 в сложной биоплёнке, образованной на хитине, достоверно превышали (в 2 раза) значе-

ния МПК в сложной биоплёнке, образованной этим штаммом на данном субстрате.

Подсчёт КОЕ методом истошающих мазков-отпечатков показал, что в смешанных биоплёнках преобладали клетки *V. cholerae* (КОЕ было больше на 1–2 порядка). Возможно, это связано с большей скоростью формирования зрелой биоплёнки у *V. cholerae*, чем у *E. coli* [19].

Обсуждение

V. cholerae в составе моно- и полимикробных сообществ, в отличие от планктонных культур, обладали более высокой резистентностью к АБП. Данные литературы свидетельствуют о меньшей чувствительности биоплёнок *V. cholerae*, выращенных на хитине, к воздействию факторов окружающей среды, в частности к действию простейших, в сравнении с биоплёнками, образованными на абиотических поверхностях [20], однако в нашем исследовании повышение антибиотикоустойчивости на хитине показано лишь к тетрациклину и только у одного токсигенного штамма *V. cholerae*. В отношении других исследованных штаммов не выявлено зависимости антибиотикоустойчивости от субстрата, на котором образовалась биоплёнка. Данный факт требует продолжения аналогичных исследований, но, по всей видимости, субстрат не является определяющим в проявлении устойчивости к антибиотикам у бактерий в биоплёночных сообществах, ведь механизмы антибиотикорезистентности в биоплёнках имеют универсальный характер и не зависят от поверхности, на которой они образованы.

Одним из механизмов повышенной устойчивости биоплёнок является трёхмерная структура экзополисахаридного матрикса, ключевыми детерминантами которой служат матричные белки RbmA, RbmC и Var1, регулирующая проникновение различных веществ в биоплёнку [21]. Большинство клеток биоплёнки находятся в стационарном состоянии и представляют собой спящие клетки-персистеры, имеющие фенотип, отличный от планктонных клеток, и являющиеся более устойчивыми к факторам окружающей среды [22]. Экспрессия генов множественной лекарственной устойчивости внутри биоплёнки может приводить к изменению белков внешней мембраны клеток, продукции ферментов, связанных с резистентностью, изменению в деятельности насосов оттока лекарственных препаратов [23]. Другой механизм — это приобретение генов множественной лекарственной устойчивости путём горизонтального переноса, частота которого в биоплёнке выше, чем в планктонном режиме роста [24, 25]. Генетическая адаптация и эволюция, происходящие в биоплёнках, приводят к отбору субпопуляций с большей способностью противостоять текущему и будущему воздействию антибиотиков [26].

Таблица 1. Значения МПК АБП в отношении планктонных и биоплёночных культур, образованных на разных субстратах
Table 1. The values of the MICs of antibacterial drugs against planktonic and biofilm cultures formed on different substrates

АБП Antibacterial drug	Штамм Strain											
	V. cholerae O1 EI Tor 19667			V. cholerae O1 EI Tor 81			V. cholerae O1 EI Tor 20000			E. coli QD 5003		
	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC
	средние значения МПК, мг/л (M ± m) average MIC values, mg/liter (M ± m)											
	S	R										
Доксициклин Doxycycline	≤ 2	≥ 4	0,25***	4*	0,25	32*	32*	0,5	16*	16*	0,5	32*
Тетрациклин Tetracycline	≤ 4	≥ 8	0,5	16*	0,5	16*	16*	0,5	32*	32*	0,5	16*
Левомецетин Chloramphenicol	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	128*	4	128*	128*	4	128*	128*	2	256*
Налидиксовая кислота Nalidixic acid	≤ 4	≥ 16	64	2048*	64	1024*	1024*	1	512*	512*	2	1024*
Стрептомицин Streptomycin	≤ 16	≥ 32	16	128*	64	256*	256*	4	32*	32*	8	256*
Ампициллин Ampicillin	≤ 4	≥ 16	4	1024*	4	128*	128*	4	16*	16*	4	256*
Рифампицин Rifampicin	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	32*	4	128*	128*	2	128*	128*	2	128*
Фуразолидон Furazolidone	≤ 4	≥ 16	16	128*	32	512*	512*	16	64*	64*	4	64*
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	≤ 2/10	≥ 8/40	8/40	2048/10240*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	2/10	1024/5120* 1024/5120*

Примечание. Здесь и в табл. 2: S — чувствительный; R — устойчивый; ПК — планктонная культура; БП — биоплёнки, образованные на пластике; БХ — биоплёнки, образованные на хитине.

*Согласно МУК 4.2.2495-09, МУК 4.2.3745-22.

p ≤ 0,05 по сравнению с ПК; *p ≤ 0,05 по сравнению с БП.

Note. Here and in the Table 2: S — sensitive; R — resistant; PC — plankton cultures on plastic; BP — biofilm cultures on plastic; BC — biofilm cultures on chitin.

#According to Guidelines 4.2.2495-09 and 4.2.3745-22.

*p ≤ 0,05 when compared to PC; **p ≤ 0,05 when compared to BP.

Таблица 2. Значения МПК АБП в отношении сложных биоплёночных культур, образованных на разных субстратах
Table 2. MICs values of antibacterial drugs against complex biofilm cultures formed on different substrates

АБП Antibacterial drug	Штамм Strain																	
	V. cholerae O1 EI Tor 19667 + E. coli QD 5003			V. cholerae O1 EI Tor 81 + E. coli QD 5003			V. cholerae O1 EI Tor 20000 + E. coli QD 5003			E. coli QD 5003								
	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC	ПК PC	БП BP	БХ BC						
	S	R	средние значения МПК, мг/л (M ± m) average MIC values, mg/liter (M ± m)															
Доксициклин Doxycycline	≤ 2	≥ 4	0,25***	4*	8***	32*	32*	0,25	0,5	16*	16*	0,5	0,5	32*	32*	0,5	32*	32*
Тетрациклин Tetracycline	≤ 4	≥ 8	0,5	16*	128***	16*	0,5	0,5	0,5	32*	32*	0,5	0,5	32*	16*	0,5	16*	16*
Левомецитин Chloramphenicol	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	128*	64***	128*	4	4	4	128*	128*	4	4	128*	256*	2	256*	256*
Налидиксовая кислота Nalidixic acid	≤ 4	≥ 16	64	2048*	2048*	1024*	64	64	1	1024*	1024*	1	1	512*	512*	2	1024*	1024*
Стрептомицин Streptomycin	≤ 16	≥ 32	16	128*	256*	256*	64	64	4	256*	256*	4	4	32*	32*	8	256*	256*
Ампициллин Ampicillin	≤ 4	≥ 16	4	1024*	1024*	128*	4	4	4	128*	128*	4	4	16*	16*	4	256*	256*
Рифампицин Rifampicin	≤ 4	≥ 16	1,3 ± 0,3	32*	64*	128*	4	4	2	128*	128*	2	2	128*	128*	2	128*	128*
Фуразолидон Furazolidone	≤ 4	≥ 16	16	128*	256*	512*	32	32	16	512*	512*	16	16	64*	64*	4	64*	64*
Триметоприм/ сульфаметоксазол Trimethoprim/ sulfamethoxazole	≤ 2/10	≥ 8/40	8/40	2048/10240*	2048/10240*	1024/5120*	16/80	16/80	16/80	1024/5120*	1024/5120*	16/80	1024/5120*	1024/5120*	2/10	1024/5120*	1024/5120*	1024/5120*

Примечание. ***p ≤ 0,05 по сравнению с моновидовой биоплёнкой.
Note. ***p ≤ 0.05 when compared to monospecies biofilm.

В нашем исследовании нарастание устойчивости штаммов *V. cholerae* к стрептомицину, триметоприму/сульфаметоксазолу и налидиксовой кислоте в биоплёночной форме при наличии резистентности к данным АБП у планктонной формы подтверждает наличие в биоплёнках наряду с классическими типами устойчивости, характерными для планктонных форм бактерий, специфических вариантов резистентности, возникающих в биоплёнках.

В полимикробных сообществах межвидовые взаимодействия могут оказывать влияние на устойчивость к антимикробным средствам, наблюдаемую в биоплёнках из одного штамма [8, 27]. Присутствие разных партнёров делает структуру и функцию сообщества более сложными. В механизмы защиты включаются межвидовые сигналы, физиология клеток и генетическая пластичность, связанная со структурным пространственным расположением и архитектурной дифференциацией [28]. Из-за конкурентных взаимодействий биологические характеристики и химический состав моновидовых и полимикробных биоплёнок может сильно различаться [29, 30]. Так, присутствие комменсальной *E. coli* увеличивало образование биоплёнок *V. cholerae* на границе раздела воздух–жидкость *in vitro* и образование многоклеточных скоплений, похожих на биоплёнку, в фекалиях мышей [31]. Таким образом, различные виды бактерий, входящих в состав биоплёнки, могут влиять на её архитектуру и функции. В нашем исследовании в полимикробных биоплёнках, образованных *V. cholerae* совместно с *E. coli*, в сравнении с монобиоплёнками, наблюдалось повышение устойчивости одного токсигенного штамма *V. cholerae* к доксициклину, что свидетельствует о том, что эффективность АБП в составе полимикробных сообществ зависит не только от вида бактерий, образующих биоплёнку, но и имеет индивидуальные штаммовые особенности.

Выводы

1. *V. cholerae* в составе биоплёнок, сформированных на биотических и абиотических поверхностях, обладают повышенной антибиотикоустойчивостью в сравнении с планктонной формой.

2. Различия в антибиотикорезистентности *V. cholerae* в составе моновидовых и сложных биоплёнок в меньшей степени зависят от субстрата образования и в большей степени носят индивидуальный характер, связанный с конкретным штаммом, образующим биоплёнку.

Заключение

Способность *V. cholerae* формировать на биотических и абиотических поверхностях биоплёнки, обладающие повышенной антибиотикоустойчивостью, подчеркивает опасность их распространения и сохранения в окружающей среде, создаёт допол-

нительные проблемы в отношении использования антибиотиков и требует разработки альтернативных стратегий снижения резистентности. При этом следует учитывать наличие межвидовых взаимодействий в сложных сообществах, состоящих из бактерий разных видов, которые могут регулировать устойчивость биоплёнок к воздействию внешних факторов, в том числе АБП, а также штаммовые различия.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(2):e0004330. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
2. Laverty A.L., Primpke S., Lorenz C., et al. Bacterial biofilms colonizing plastics in estuarine waters, with an emphasis on *Vibrio* spp. and their antibacterial resistance. *PLoS One.* 2020;15(8):e0237704. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
3. Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я. и др. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae*. Обзор. *Биохимия.* 2015;80(9):1334–43. Markov E.Yu., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya., et al. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. *Biochemistry (Moscow).* 2015;80(9):1109–16. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297915090023> EDN: <https://www.elibrary.ru/uzzknb>
4. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2010;78(8):3560–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00048-10>
5. Sun S., Tay Q.X.M., Kjelleberg S., et al. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015;9(8):1812–20. DOI: <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.265>
6. Rao H., Choo S., Mahalingam S.R.R., et al. Approaches for mitigating microbial biofilm-related resistance: a focus on micro- and nanotechnologies. *Molecules.* 2021;26(7):1870. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26071870>
7. Chavez-Doza A., Gorman C., Erken M., Steinberg P.D., McDougald D., Nishiguchi M.K. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(2):553–58. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02710-12>
8. Chen P., Wang J., Hong B., et al. Characterization of mixed-species biofilm formed by *Vibrio parahaemolyticus* and *Listeria monocytogenes*. *Front. Microbiol.* 2019;10:2543. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02543>
9. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерных вибрионов на твердых поверхностях (стекле и пластике) и их визуализация в световом и люминесцентном микроскопах. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(4):238–41. Titova S.V., Verkina L.M. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Clinical Laboratory Diagnostics.* 2016; 61(4):238–41. DOI: <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241> EDN: <https://www.elibrary.ru/vzgykd>
10. Способ моделирования биоплёнок, формируемых *V. cholerae* O1 серогрупп на поверхности хитина. Патент РФ 2018103604; 2019. A method for modeling biofilms formed by *V. cholerae* O1 serogroup on the chitin surface. Patent RF 2018103604; 2019.
11. Методические указания МУК 4.2.2495–09. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бру-

- целлѐз, сар, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. М.; 2009. Methodological guidelines of MUC 4.2.2495–09. Determination of the sensitivity of pathogens of dangerous bacterial infections (plague, anthrax, cholera, tularemia, brucellosis, sар, melioidosis) to antibacterial drugs. Moscow; 2009.
12. Методические указания МУК 4.2.3745-22. Методы лабораторной диагностики холеры. М.; 2022. Methodical instructions of the FLOUR 4.2.3745-22. Methods of laboratory diagnosis of cholera. Moscow; 2022.
 13. EUCAST «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам. Версия 2021–01». EUCAST «Determination of the sensitivity of microorganisms to antimicrobial drugs. Version 2021–01».
 14. Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С. и др. Анализ внутривидовой конкуренции в биопленке *Vibrio cholerae* классического и элтор биоваров с помощью Indel-маркеров. В кн.: *Молекулярная диагностика – 2017. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием*. М.; 2017;1:300–1. Vodop'yanov S.O., Verkina L.M., Vodop'yanov A.S., et al. Analysis of intraspecific competition in the biofilm of *Vibrio cholerae* of classical and eltor biovars using Indel markers. In: *Molecular Diagnostics – 2017. Proceedings of the IV All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation*. Moscow; 2017;1:300–1.
 15. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О. и др. Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака. *Бактериология*. 2019;4(1):50–3. Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Vodop'yanov S.O., et al. Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autochthonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish. *Bacteriology*. 2019;4(1):50–3. DOI: <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2019-1-50-53> EDN: <https://www.elibrary.ru/rwdhvg>
 16. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О. и др. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(4):434–9. Men'shikova E.A., Kurbatova E.M., Vodop'yanov S.O., et al. 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*. 2021;98(4):434–9. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-99> EDN: <https://www.elibrary.ru/rvujzp>
 17. Lutz C., Erken M., Noorian P., et al. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013;4:375. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
 18. Gupta P., Mankere B., Keloth S.C., et al. Increased antibiotic resistance exhibited by the biofilm of *Vibrio cholerae* O139. *J. Antimicrob. Chemother.* 2018;73(7):1841–7. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky127>
 19. Abriat C., Enriquez K., Virgilio N., et al. Mechanical and microstructural insights of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* dual-species biofilm at the air-liquid interface. *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2020;188:110786. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110786>
 20. Chavez-Dozal A., Gorman C., Erken M., et al. Predation response of *Vibrio fischeri* biofilms to bacterivorous protists. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013;79(2):553–8. DOI: <https://doi.org/10.1128/AEM.02710-12>
 21. Giacomucci S., Cros C.D., Perron X., et al. Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. 2019;14(8):e0221431. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221431>
 22. Zhang K., Li X., Yu C., Wang Y. Promising therapeutic strategies against microbial biofilm challenges. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2020;10:359. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00359>
 23. Kean R., Delaney C., Sherry L., et al. Transcriptome assembly and profiling of *Candida auris* reveals novel insights into biofilm-mediated resistance. *mSphere*. 2018;3(4):00334-18. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00334-18>
 24. Laverty A.L., Primpke S., Lorenz C., et al. Bacterial biofilms colonizing plastics in estuarine waters, with an emphasis on *Vibrio* spp. and their antibacterial resistance. *PLoS One*. 2020;5(8):e0237704. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237704>
 25. Viroille C., Goldlust K., Djermoun S., et al. Plasmid transfer by conjugation in gram-negative bacteria: from the cellular to the community level. *Genes (Basel)*. 2020;11(11):1239. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11111239>
 26. Penesyan A., Paulsen I.T., Gillings M.R., et al. Secondary effects of antibiotics on microbial biofilms. *Front. Microbiol.* 2020;11:2109. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02109>
 27. Sanchez-Vizuetе P., Orgaz B., Aymerich S., et al. Pathogens protection against the action of disinfectants in multispecies biofilms. *Front. Microbiol.* 2015;6:705. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00705>
 28. Giaouris E., Heir E., Desvaux M., et al. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front. Microbiol.* 2015;6:841. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00841>
 29. Liu W. Z., Russel J., Burmolle M., et al. Micro-scale intermixing: a requisite for stable and synergistic co-establishment in a four-species biofilm. *ISME J.* 2018;12(8):1940–51. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0112-2>
 30. Ramirez-Mora T., Retana-Lobo C., Valle-Bourrouet G. Biochemical characterization of extracellular polymeric substances from endodontic biofilms. *PLoS One*. 2018;13(11):e0204081. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204081>
 31. Wang H., Li F., Xu L., et al. Contributions of *Escherichia coli* and its motility to the formation of dual-species biofilms with *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2021;87(18):e0093821. DOI: <https://doi.org/10.1128/aem.00938-21>

Информация об авторах

Селянская Надежда Александровна[✉] — к.м.н., с.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, ppdn@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

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

Меньшикова Елена Аркадьевна — к.б.н., с.н.с. отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

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 20.12.2022;
принята к публикации 15.02.2023;
опубликована 28.04.2023

Information about the authors

Nadezhda A. Selyanskaya[✉] — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, ppdn@inbox.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Svetlana V. Titova — Cand. Sci. (Med.), leading researcher, Department of natural focal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>

Elena A. Menshikova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>

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 20.12.2022;
accepted for publication 15.02.2023;
published 28.04.2023