

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID120009>

# Сохранение холерных вибрионов в сложных микрокосмах, содержащих зелёные микроводоросли

С.В. Титова, Е.А. Меньшикова, С.О. Водопьянов, О.В. Бородина, А.А. Герасименко, И.П. Олейников, Н.А. Селянская

Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** В летне-осенний период наступает пик размножения и цветения фитопланктона, вследствие чего в это время отмечают ухудшение показателей качества речной воды. Одновременно регистрируют случаи желудочно-кишечных заболеваний у людей, а на эндемичных территориях возможно возникновение эпидемических осложнений по холере. Образование холерными вибрионами биоплёночных форм на поверхности хитинопокровных гидробионтов и пластиковых компонентов может приводить к распространению холерных вибрионов и, возможно, объясняет аутохтонный механизм их существования в водоёмах.

**Цель** — определить продолжительность сохранения холерных вибрионов на биотических (хитин) и абиотических (пластик) субстратах в присутствии зелёных одноклеточных водорослей при изменении температуры культивирования в условиях эксперимента.

**Материалы и методы.** Для решения поставленной цели использовали бактериологические и молекулярно-генетические методы.

**Результаты.** Показано сохранение токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139 (*ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csh1<sup>-</sup>* и *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csh1<sup>+</sup>*) в течение шести месяцев, в том числе три месяца при пониженной температуре, имитирующей осеннее-зимний период, в составе биоплёнок в микрокосмах, где одним из компонентов являются зелёные микроводоросли. Нами отмечено превышение концентрации на два порядка *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в пробах, где одним из компонентов является хитин, и размножение зелёных микроводорослей в присутствии хитинового субстрата, что, вероятно, является одним из этапов пищевой цепи в экологии водоёмов и, соответственно, может быть резервуаром для биоплёночных форм холерных вибрионов. Сохранение нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor в жизнеспособном состоянии в биоплёночных пробах на пластике при уменьшении температуры до  $8\pm 2^\circ\text{C}$  в течение трёх месяцев, возможно, связано с наличием в его геноме гена холодового шока.

**Заключение.** Без субстрата для адгезии, колонизации и формирования биоплёнок вибрионы не способны к длительной персистенции при пониженной температуре.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*; водоросли; биоплёнки; пластик; хитин.

## Как цитировать

Титова С.В., Меньшикова Е.А., Водопьянов С.О., Бородина О.В., Герасименко А.А., Олейников И.П., Селянская Н.А. Сохранение холерных вибрионов в сложных микрокосмах, содержащих зелёные микроводоросли // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2022. Т. 27, № 5. С. 290–300. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID120009>

DOI: <https://doi.org/10.17816/EID120009>

# Conservation of cholera vibrios in complex microcosm containing green microalgae

Svetlana V. Titova, Elena A. Menshikova, Sergei O. Vodopyanov, Tamara N. Borodina, Artem A. Gerasimenko, Igor P. Oleynikov, Nadezhda A. Selyanskaya

Rostov-on-Don of the Order of the Red Banner of Labor Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** In the summer-autumn period, the peak of phytoplankton reproduction and flowering occurs and results in the deterioration of the quality of river water is noted. At the same time, cases of gastrointestinal diseases in humans are recorded, and epidemic complications of cholera may occur in endemic areas. *V. cholerae* form biofilm on the surface of chitinous hydrobionts and plastic components can lead to the spread of *V. cholerae*, possibly explaining the autochthonous mechanism of their existence in water bodies.

**AIM:** This study determines the duration of *Vibrio cholerae* preservation on biotic (chitin) and abiotic (plastic) substrates in the presence of green unicellular algae with a change in cultivation temperature under experimental conditions.

**MATERIALS AND METHODS:** This study used bacteriological and molecular genetic methods to achieve its goal.

**RESULTS:** The preservation of toxigenic and non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor and *V. cholerae* O139 (*ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csh1<sup>-</sup>* and *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csh1<sup>+</sup>*) for six months, including three months at a low temperature simulating the autumn-winter period, as part of biofilms in microcosms, where one component is green microalgae. We noted an excess of the concentration of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups by two orders of magnitude in samples where one of the components is chitin and the reproduction of green microalgae in the presence of a chitin substrate. This is probably one stage in the food chain in the ecology of water bodies and, accordingly, can be a reservoir for biofilm forms of cholera vibrios. Preservation of *V. cholerae* O1 El Tor non-toxigenic strain in a viable state in biofilm samples on plastic at decreased temperatures  $8\pm 2^{\circ}\text{C}$  for three months is possibly due to the presence of a cold shock gene in its genome.

**CONCLUSION:** Without a substrate for adhesion, colonization, and biofilm formation, vibrios are incapable of long-term persistence at low temperatures.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, algae, biofilms, plastic, chitin.

## To cite this article

Titova SV, Menshikova EA, Vodopyanov SO, Borodina TN, Gerasimenko AA, Oleynikov IP, Selyanskaya NA. Conservation of cholera vibrios in complex microcosm containing green microalgae. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2022;27(5):290–300. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID120009>

Received: 27.12.2022

Accepted: 16.01.2023

Published: 28.01.2023

## ОБОСНОВАНИЕ

Фитопланктон является одним из основных компонентов водной экосистемы. В поверхностных водоёмах средних широт массовое размножение и цветение фитопланктона начинаются в летний период, и это способствует обеспечению питательными веществами зоопланктона и других гидробионтов [1–3]. В летне-осенний период (с июля по ноябрь), численность фитопланктона достигает более 100 000 кл/см<sup>3</sup>, и, как следствие, отмечается ухудшение показателей качества речной воды [4], одновременно регистрируются случаи заболевания людей желудочно-кишечными заболеваниями [5], вплоть до смертельных исходов, и зачастую в это время на эндемичных территориях возникают эпидемии холеры [6, 7].

Холерные вибрионы, как и большинство микроорганизмов, могут существовать в форме биоплёнок, адгезируя на поверхности биотических компонентов хитинового покрова некоторых морских животных, целлюлозного покрова водорослей [8–10] и абиотических (пластик) компонентов [11], что может способствовать их распространению на различные расстояния. Возможно, это является объяснением одного из механизмов аутохтонного существования холерных вибрионов в водоёмах. Научных данных по взаимодействию биоплёночной формы холерных вибрионов с постоянными представителями гидробиоценоза водоёмов средних широт — зелёными одноклеточными водорослями в доступной литературе нами не найдено.

**Цель** — определить длительность сохранения холерных вибрионов на биотических (хитин) и абиотических (пластик) субстратах в присутствии зелёных одноклеточных водорослей при изменении температуры культивирования в условиях эксперимента.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для экспериментального моделирования использовали биоплёночные и планктонные формы холерных вибрионов на биотических и абиотических субстратах и зелёные одноклеточные водоросли (микроводоросли). Штаммы *Vibrio cholerae* различались по происхождению, токсигенности и набору генов: *V. cholerae* O1 El Tor 19 613 (Инаба), 19 667 (Огава) *ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csH1<sup>-</sup>*, 20 000 (Огава), 19 670 (Инаба) *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csH1<sup>+</sup>*; *V. cholerae* O139 17 259 *ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csH1<sup>-</sup>* и 17 918 *ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csH1<sup>-</sup>*. Штаммы водорослей IPAS S-313 *Desmodesmus communis* и A-241 *Ankistrodesmus falcatus*, являющихся обычными обитателями поверхностных водоёмов средних широт, получены из коллекции микроводорослей Института физиологии растений имени К.А. Тимирязева Российской академии наук.

Получение биоплёнок холерных вибрионов проводили запатентованными и описанными ранее способами, где в качестве биотического субстрата использовали хитиновый экзоскелет речного рака *Astacus astacus*, в качестве

абиотического — пластинки из пищевого пластика [12–14]. Совместное культивирование холерных вибрионов в биоплёночной и планктонных формах с зелёными микроводорослями проводили в конических химически чистых колбах по методике, описанной нами ранее [15]. Эксперименты проводили в стерильных условиях на речной автоклавированной воде. Экспериментальные пробы состояли из холерных вибрионов (10<sup>4</sup> м.к./мл), одноклеточных зелёных водорослей (10<sup>4</sup> кл/мл), биотического (хитин) или абиотического (пластик) субстрата и без субстратов. В контрольные пробы входили холерные вибрионы без субстратов.

Условия эксперимента для опытных и контрольных проб были одинаковыми. Первый месяц культивирования проб проходило при комнатной температуре 23±2°C и дневном освещении, со второго месяца эти же пробы помещали в условия температуры 14±2°C и освещённости «день/ночь». Дневная освещённость составляла 1000 люкс. С третьего месяца пробы культивировали при температуре 8±2°C без освещения (имитация зимних условий).

Концентрацию холерных вибрионов в планктонной и биоплёночной форме количественно оценивали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени [16–18] — количество клеток водорослей под микроскопом [15]. Жизнеспособность холерных вибрионов подтверждали бактериологическим способом по росту на агаре Мартена с pH 7,6 [12]. Высевы осуществляли один раз в неделю.

Визуализацию микрокосмов в экспериментальных и контрольных пробах проводили микроскопическими методами с помощью световой и люминесцентной микроскопии [13]. Фиксированные препараты окрашивали конго-красным и фуксином, нативные — акридиновым оранжевым. Исследуемые образцы изучали в световом микроскопе NikonEclipse E200 F с люминесцентным модулем и иммерсионной системой при увеличении 10×100.

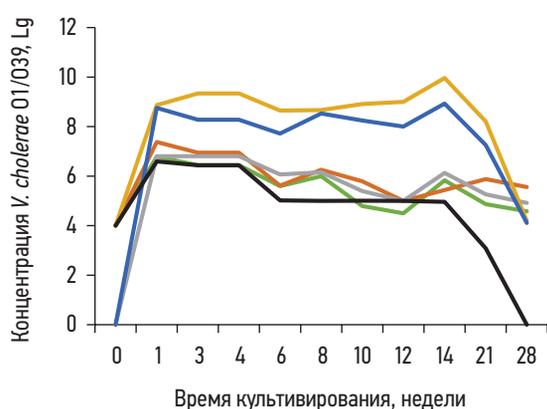
Эксперименты проводили в трёхкратной повторности. Накопление, корректировку, систематизацию исходной информации и визуализацию полученных результатов осуществляли в электронных таблицах Microsoft Office Excel 2016, используя десятичный логарифм. Статистический анализ проводили с использованием программы Medstatistica.ru. Полученные данные объединяли в вариационные ряды, на основании которых проводили расчёт средних арифметических величин (*M*). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (*σ*) и относительное стандартное отклонение (коэффициент вариации — *CV*) [19]. Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента, при уровне *p* ≤ 0,05 достоверность считали значимой. Если концентрация холерных вибрионов была в пределах одного порядка, то эти значения оценивали как идентичные.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

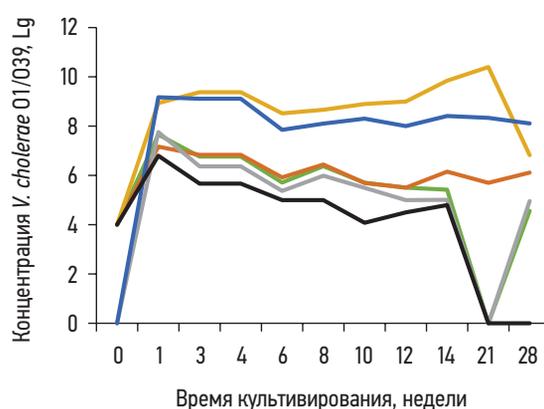
Анализ результатов сохранения *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы в микрокосмах состоял из определения в опытных и контрольных пробах их концентрации в планктонной или биоплёночной форме на разных субстратах и без них в присутствии клеток зелёной водоросли. Таким образом, каждый штамм холерных вибрионов анализировали в шести пробах. Результаты экспериментов представлены на рис. 1a–d.

Культивируя микрокосмы в пробах с хитиновым субстратом при температуре  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , имитирующей летнюю температуру воды водоёмов, концентрация *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы в биоплёночных формах за сутки выросла до 6 Lg, в планктоне над хитином концентрация

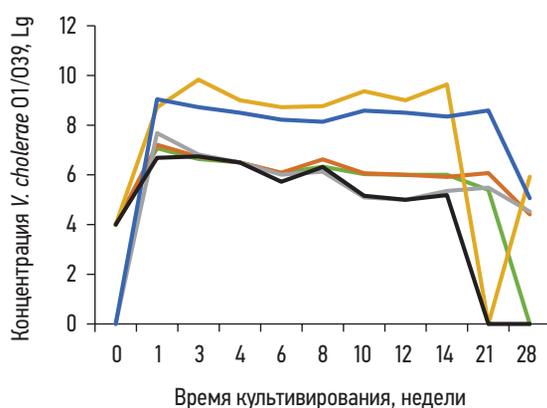
увеличилась на два порядка, т.е. адгезия клеток холерных вибрионов к хитину и их размножение произошли с начала эксперимента. Через неделю в пробах с хитиновым субстратом в биоплёнках концентрация холерных вибрионов всех штаммов достигла значений 9 Lg. На пластиковом субстрате также регистрировали формирование биоплёнки, но концентрация холерных вибрионов в планктонной и биоплёночных формах была на два порядка ниже, чем в микрокосмах с хитином. В течение первых четырёх недель (рис. 1c, 1d) концентрация *V. cholerae* O1 в биоплёночных и планктонных формах в пробах на хитине варьировала на уровне значений 8–9 Lg. В это же время в пробах с пластиковым субстратом концентрация холерных вибрионов всех штаммов



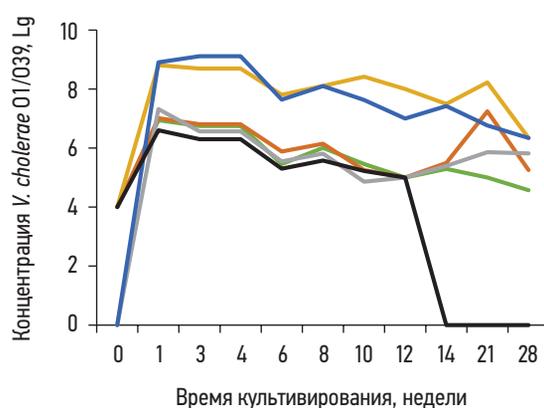
a) *V. cholerae* O139 17 918 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>*csh1*<sup>-</sup>



b) *V. cholerae* O139 17 259 *ctxAB*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>*csh1*<sup>-</sup>



c) *V. cholerae* O1 El Tor 20 000 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>*csh1*<sup>+</sup>



d) *V. cholerae* O1 El Tor 19 613 *ctxAB*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>*csh*<sup>-</sup>

**Рис. 1.** Концентрация *V. cholerae* O1/O39 серогрупп с разной генетической характеристикой, в разных условиях культивирования.

**Примечание.** Обозначения цветowych линий: зелёная — *V. cholerae*+водоросль; оранжевая — *V. cholerae*+водоросль+пластик/планктон; серая — *V. cholerae*+водоросль+пластик/биоплёнка; жёлтая — *V. cholerae*+водоросль+хитин/планктон; синяя — *V. cholerae*+водоросль+хитин/биоплёнка; чёрная — *V. cholerae* контроль (без субстратов).

**Fig. 1.** Concentration of *V. cholerae* O1/O39 serogroups with different genetic characteristics under different cultivation conditions.

**Note:** Designations of color lines: green — *V. cholerae*+algae; orange — *V. cholerae*+algae+plastic/plankton; gray — *V. cholerae*+algae+plastic/biofilm; yellow — *V. cholerae*+algae+chitin/plankton; blue — *V. cholerae*+algae+chitin/biofilm; black — *V. cholerae* control (without substrates).

в биоплёнках и планктоне была на два порядка ниже и колебалась в пределах 6,5–6,8 Lg. Аналогичной была концентрация холерных вибрионов в пробах с зелёными водорослями без субстратов. Через месяц концентрация биоплёночных форм *V. cholerae* O139 17 918 и 17 259 на хитиновом субстрате была 8,2 и 9,1 Lg, а в образцах планктона — 9,3 Lg соответственно (рис. 1а, 1б). Скорость образования биоплёнок *V. cholerae* всех штаммов на пластиковом субстрате была ниже, чем на хитиновом, и через месяц их концентрация в биоплёнках была равна 6,8–6,3 Lg, в планктонной форме — 6,9–6,8 Lg соответственно. Концентрация холерных вибрионов в пробах с водорослями без субстратов равнялась 6,4–6,7 Lg. Во всех опытных пробах произошло увеличение концентрации зелёной микроводоросли *D. communis*, о чём свидетельствовало появление визуально наблюдаемого характерного зеленоватого оттенка в толще воды, через месяц толща воды приобрела насыщенный зелёный цвет. При микроскопическом исследовании в конце первой недели концентрация водоросли составила  $5 \times 10^4$  кл/мл, а к концу первого месяца — до  $10^5$  кл/мл.

В контрольных пробах концентрация холерных вибрионов всех испытуемых штаммов через неделю от начала эксперимента возросла на два порядка и сохранялась в течение месяца при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Как видно на графиках (рис. 1а–д), концентрация холерных вибрионов несколько ниже, чем в экспериментальных пробах или такая же. Культура холерных вибрионов во всех экспериментальных и контрольных пробах была жизнеспособной, колонии имели характерный рост на агаре Мартена.

Для имитации осеннего периода, когда температура в поверхностных водоёмах снижается, пробы всех микроскопов с пятой недели (со второго месяца) поместили в новые условия культивирования: температура  $14 \pm 2^\circ\text{C}$  и освещённость «день/ночь». На рис. 1а–д концентрация клеток холерных вибрионов во всех опытных и контрольных пробах оставалась на прежнем уровне, когда культивирование происходило при  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Через месяц культивирования в условиях, имитирующих осенний период, концентрация клеток штаммов *V. cholerae* O1 El Tor 20 000 и 19 613 в биоплёночных пробах на хитине сохранялась и составляла 8,1 Lg, в планктонных (над хитином) — колебалась в пределах 8,7–8,1 Lg (рис. 1с, 1д). Аналогично в пробах со штаммами O139 серогруппы в биоплёнках на хитине концентрация клеток была в пределах 8,5–8,1 Lg, в планктоне — 8,6 Lg (рис. 1а, 1б). В биоплёночных формах на субстрате из пластика концентрация клеток *V. cholerae* El Tor 20 000 и 19613 также оставалась на прежнем уровне и составляла 6,2–7,5 Lg, при этом штаммы оставались жизнеспособными (рис. 1с, 1д). Концентрация клеток *V. cholerae* O139 серогруппы 17 918 и 17 259 была равна в биоплёнках 6,1–5,9 Lg и в планктоне 6,2–6,4 Lg, в этом же диапазоне была концентрация холерных вибрионов в пробах с водорослями без биотических и абиотических субстратов (рис. 1а, 1б). Концентрация клеток

холерных вибрионов в контрольных пробах оставалась на прежнем уровне у штаммов *V. cholerae* El Tor 20 000 (рис. 1с), у остальных штаммов отмечено снижение на один порядок (рис. 1а, 1б, 1д).

Концентрация зелёной микроводоросли *D. communis* также оставалась на прежнем уровне, придавая насыщенный зелёный оттенок всему объёму воды.

Имитируя дальнейшее снижение температуры в водоёмах, с третьего месяца (десятая неделя) от начала культивирования все экспериментальные и контрольные пробы поместили в условия низкой температуры  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  и без освещения. На протяжении двух месяцев во всех биоплёночных формах с хитиновым субстратом концентрация клеток *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп колебалась в пределах 8,0–8,9 Lg. Исключение составил штамм *V. cholerae* El Tor 19 613: его концентрация была на порядок ниже и колебалась в пределах 7,0–7,6 Lg (рис. 1д). В планктонных пробах над хитином отмечен подъём концентрации на один порядок в пробах у всех штаммов. К этому моменту исходный хитиновый субстрат полностью деградировал до мельчайших хитиновых крупинок, которые распадались под браншами пинцета, поэтому легко попадали с током жидкости в пипетку при манипуляциях для определения концентрации клеток. Возможно, этим объясняется увеличение концентрации *V. cholerae* в планктонной форме над хитиновым субстратом. Через три месяца при температуре  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  концентрация клеток штаммов *V. cholerae* O139 17 918 и 17 259 колебалась в пределах 7,2–8,2 и 8,3–10,3 Lg соответственно (рис. 1а, 1б); *V. cholerae* O1 20 000 и 19 613 была в пределах 8,5 и 6,7–8,2 Lg соответственно (рис. 1с, 1д). При высевах на питательный агар культура холерных вибрионов оставалась жизнеспособной с характерным ростом колоний холерных вибрионов на агаре Мартена. Отмечены разные сроки сохранения штаммов холерных вибрионов в жизнеспособном состоянии: *V. cholerae* O139 17 918 — в течение одного месяца, *V. cholerae* O139 17 259 и *V. cholerae* O1 El Tor 19 613 — один месяц и две недели (срок наблюдения), *V. cholerae* O1 El Tor 20 000 — более трёх месяцев (срок наблюдения).

В биоплёночной форме с пластиковым субстратом и в пробах с водорослями, но без субстратов при снижении температуры до  $8 \pm 2^\circ\text{C}$  отмечалось снижение концентрации клеток *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы. Концентрация *V. cholerae* O139 17 918 колебалась в пределах 4,9–5,5, у *V. cholerae* O139 17 259 — 4,5–6,1, у *V. cholerae* O1 El Tor 20 000 — 4,5, у *V. cholerae* O1 El Tor 19 613 — 4,5–5,8 Lg. При высевах на агар Мартена наблюдали рост штамма *V. cholerae* O139 17 918, находящегося в планктонной форме в течение двух недель, тогда как в биоплёночной форме отмечен рост в течение двух месяцев, у штамма *V. cholerae* O139 17 259 в биоплёночной форме и в пробе с водорослями без субстратов рост отмечен в течение двух месяцев. В пробах со штаммами *V. cholerae* O1 El Tor 20 000 и 19 613 отмечен рост

в течение трёх месяцев в биоплёночной и планктонной форме (срок наблюдения).

В контрольных пробах (без субстратов и водорослей) концентрация холерных вибрионов с уменьшением температуры культивирования до  $8\pm 2^\circ\text{C}$  уменьшилась на 1–2 порядка в течение двух недель и составила  $5,2\text{--}4,0\text{ Lg}$  (рис. 1а–д). После двух недель при низкой температуре жизнеспособных холерных вибрионов не обнаружено, что проявилось в отсутствии роста колоний на агаре Мартена во всех контрольных пробах.

Полученные результаты изменения концентраций холерных вибрионов в опытных и контрольных микрокосмах со штаммами *V. cholerae* O1 El Tor 19 667 *ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csh1<sup>-</sup>*, 19 670 *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csh1<sup>+</sup>*, штаммом водоросли A-241 *Ankistrodesmus falcatus* были идентичны вышеописанным.

В результате экспериментальной работы при изменении температуры культивирования от  $23\pm 2$  до  $8\pm 2^\circ\text{C}$  у исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп наблюдали нарастание, выход на плато и уменьшение концентрации холерных вибрионов в присутствии зелёных микроводорослей в биопленочной и планктонной форме и без них (контрольная проба) в разные сроки. Концентрация *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в контрольных пробах, т.е. без субстратов сохранялась в течение трёх месяцев, включая один месяц при температуре  $8\pm 2^\circ\text{C}$ , с падением до нулевых значений с четвёртой недели. При этом в опытных пробах концентрация холерных вибрионов сохранялась более шести месяцев (срок наблюдения), включая 14 недель при температуре  $8\pm 2^\circ\text{C}$ . Все исследуемые штаммы холерных вибрионов независимо от серогруппы и токсигенности были способны к адгезии и формированию биоплёнок на абиотических и биотических субстратах, а также к размножению в планктонных пробах с микроводорослями без субстратов. Вероятно, некоторые штаммы *V. cholerae* O139 серогруппы в пробах с пластиковым субстратом при температуре  $8\pm 2^\circ\text{C}$  переходят в некультивируемое состояние, находясь в планктонной форме.

При формировании биоплёнки все исследуемые штаммы проходили все стадии её формирования, описанные нами ранее [13]: адгезия клеток, формирование монослоя и зрелой биоплёнки, клетки холерных вибрионов окружали клетки зелёных водорослей со всех сторон, формируя крупные агрегаты, при микроскопии был хорошо виден экзополисахарид розового цвета, клетки холерных вибрионов красного цвета и клетки зелёных водорослей зелёного цвета.

Статистический анализ сравнения значений средней концентрации и стандартного отклонения *V. cholerae* обеих серогрупп в биопленочных и планктонных пробах в динамике при разных температурах культивирования представлен в табл. 1. При сравнении результатов динамики увеличения/уменьшения концентрации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в биопленочных и планктонных пробах при температуре культивирования от  $23\pm 2$

до  $14\pm 2^\circ\text{C}$  и с дальнейшим уменьшением до  $8\pm 2^\circ\text{C}$  (первые две недели) значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным, для проб 1–4 ( $t_{\text{эксп}}=0,31; 0,03; 0,31; 1,03$  соответственно) не превышает табличное значение  $t_{\text{табл}}=2,306$  при уровне значимости  $p=0,05$  и числе степеней свободы  $f=8$ .

При еженедельном сравнении динамики изменения концентрации холерных вибрионов в биопленочном и планктонном состоянии в пробах с хитиновым и пластиковым субстратом и зелёной микроводорослью установлено, что значение критерия Стьюдента  $t_{\text{эксп}}$  превышает табличное значение  $t_{\text{табл}}$  при уровне значимости  $\alpha=0,05$ . Это означает, что в пробах с хитиновым субстратом размножение клеток холерных вибрионов происходит с первых дней, и до конца эксперимента их концентрация выше, чем в пробах с пластиковым субстратом. Результаты представлены в табл. 2.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Из полученных результатов сравнения средней концентрации клеток штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в экспериментальных пробах с субстратами в биоплёнках и контрольных пробах без субстратов следует, что наблюдаемые различия статистически незначимы и концентрация клеток холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп между собой в экспериментальных и контрольных пробах находится в пределах одного порядка. Это означает, что холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп образуют биоплёнки однотипно и способны выживать на биотическом и абиотическом пластиковом субстрате в условиях, моделирующих летнюю и осенне-зимнюю температуру.

Согласно полученным результатам, в пробах в присутствии зелёных микроводорослей и биотического субстрата хитина статистически подтверждено выраженное повышение концентрации клеток холерных вибрионов. При еженедельном сравнении результатов значений концентрации холерных вибрионов в биопленочных и планктонных пробах с зелёной водорослью и хитиновым субстратом с такими же пробами, но с пластиковым субстратом и без субстратов получили статистически значимые различия (от  $p=0,000\ 018$  до  $p=0,054\ 067$ ), при этом значение *t*-критерия Стьюдента, рассчитанное по экспериментальным данным, превышает критическое (табличное) при уровне значимости  $\alpha=0,05$  и числе степеней свободы  $f=6$ .

При сравнении суммарного значения концентрации холерных вибрионов за 12 недель в условиях температурных изменений в биоплёнках на хитиновом субстрате с биоплёнками на пластиковом субстрате и в планктонных формах в присутствии зелёной водоросли получили статистически значимые результаты при  $p=0,000\ 128$  и  $p=0,000\ 004$  соответственно. При сравнении проб только с зелёной водорослью с биопленочными и планктонными пробами с хитиновым субстратом результаты также были статистически значимыми при  $p=0,000\ 039$  и  $p=0,000\ 003$

**Таблица 1.** Результаты средней концентрации клеток в биоплёнках штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в опытных пробах с субстратами и контрольных пробах без субстратов,  $M \pm \sigma$ , м.к./мл; CV, %

**Table 1.** Results of the average concentration of cells in biofilms of strains of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups in experimental samples with substrates and control samples without substrates,  $M \pm \sigma$ , mc/ml; CV, %

Время, нед.	t, °C	Проба 1 (+водоросль)		Проба 2 (+водоросль+пластик)		Проба 3 (+водоросль+хитин)		Проба 4 (контроль)	
		<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139	<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139	<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139	<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139
1		7,01±0,09 1,31%	6,71±0,09 1,37%	7,30±0,28 3,86%	7,27±0,40 5,46%	8,87±0,14 1,58%	8,93±0,18 1,98%	6,64±0,06 0,85%	6,69±0,14 2,11%
3	23±2	6,69±0,08 1,16%	6,60±0,23 3,43%	6,72±0,12 176%	6,73±0,26 3,8%	9,13±0,49 95,41%	9,03±0,52 5,73%	6,52±0,32 4,88%	6,04±0,54 9,01%
4		6,63±0,18 2,77	6,60±0,23 3,43%	6,59±0,08 2,17%	6,73±0,26 3,8%	8,82±0,28 3,18%	9,03±0,52 5,73%	6,39±0,15 2,32%	6,04±0,54 9,01%
6	14±2	5,76±0,44 7,61	5,64±0,08 1,38%	5,88±0,24 4,05%	5,74±0,31 5,40%	8,09±0,48 5,96%	8,18±0,46 5,65%	5,51±0,30 5,39%	5±0,01 0,14%
8		6,17±0,23 3,78%	6,18±0,27 4,35%	6,17±0,33 5,42%	6,21±0,19 3,10%	8,27±0,33 3,93%	8,49±0,27 3,13%	5,94±0,52 8,81%	5
Σ		6,45±0,49 7,59%	6,35±0,44 6,99%	6,53±0,54 8,33%	6,54±0,58 8,90%	8,64±0,44 5,06%	8,73±0,38 4,36%	6,20±0,47 7,55%	5,75±0,74 12,82%
$t_{Cr}$			0,31		0,03		0,31		1,03
$p$			0,767667		0,980570		0,765871		0,336004
10	8±2	5,74±0,40 6,9%	5,25±0,64 12,27%	5,31±0,52 9,88%	5,59±0,18 3,27%	8,49±0,71 8,35%	8,59±0,36 4,25%	5,19±0,05 0,95%	0
12		5,50±0,71 12,86%	5,0±0,71 14,14%	5,25±0,5 9,52%	5,13±0,25 4,88%	8,13±0,85 10,51%	8,5±0,58 6,79%	5	0
Σ		5,62±0,17 3,02%	5,13±0,18 3,45%	5,28±0,04 0,8%	5,36±0,33 6,07%	8,31±0,25 3,06%	8,54±0,06 0,74%	–	0
$t_{Cr}$			1,98		0,24		0,89		–
$p$			0,297852		0,849649		0,535381		–

**Примечание.**  $M \pm \sigma$  — средняя концентрация клеток *V. cholerae* и стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации *V. cholerae* за 8–12 недель; Σ — среднее количество концентрации клеток;  $t_{Cr}$  — t-критерий Стьюдента;  $p$  — уровень значимости.

**Note:**  $M \pm \sigma$  — average *V. cholerae* cell concentration and standard deviation; CV — coefficient of variation *V. cholerae* in 8–12 weeks; Σ — average amount of cell concentration;  $t_{Cr}$  — Student's criterion;  $p$  — significance level.

соответственно, а при сравнении их с пробами с пластиковым субстратом результаты были не значимы —  $p=0,688\ 724$  и  $p=0,895\ 928$  соответственно. Полученные результаты означают, что присутствие хитинового субстрата во всех пробах приводит к размножению клеток холерных вибрионов, как это было установлено ранее [20]. При оценке размножения клеток зелёных микроводорослей на один порядок визуально установлено, что в присутствии хитина вся толща жидкости становится насыщенно зелёного цвета. Данное наблюдение может свидетельствовать о том, что хитин является субстратом для размножения не только вибрионов, но и водорослей.

Нами установлена способность холерных вибрионов находиться в жизнеспособном состоянии в течение длительного времени при низких температурах культивирования в пробах, где одним из компонентов были клетки зелёных микроводорослей. Возможно, способность

холерных вибрионов продуцировать фермент муциназу, разрушающий муциноподобные компоненты клеток водорослей [21], обеспечивает длительное сохранение клеток холерных вибрионов. Отмеченное размножение зелёных микроводорослей в присутствии хитинового субстрата, вероятно, является одним из этапов пищевой цепи в экологии водоёмов и, соответственно, может быть резервуаром для биоплёночных форм холерных вибрионов [10, 22–25].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано, что сохранение токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп (*ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>csh1<sup>-</sup>* и *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csh1<sup>+</sup>* и *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>csh1<sup>-</sup>*) в течение шести месяцев, в том числе три месяца при температуре, имитирующей осенне-зимний период, возможно в составе биоплёнок на биотическом и абиотическом

**Таблица 2.** Результаты средней концентрации клеток *V. cholerae* в опытных пробах с разными субстратами и контрольных пробах без субстратов, при температуре 23±2, 14±2 и 8±2°C,  $M\pm\sigma$ , м.к./мл; CV, %

**Table 2.** The results of the average concentration of *V. cholerae* cells in experimental samples with different substrates and control samples without substrates, at a temperature of 23±2, 14±2, and 8±2°C,  $M\pm\sigma$ , mc/ml; CV, %

Время, нед.	t, °C	V. cholerae+водоросли				Контроль	
		+водоросль	Пластик		Хитин		
			БП	Планктон	БП		Планктон
1		7,11±0,38 5,33%	7,39±0,43 5,88%	7,19±0,15 2,06%	8,96±0,18 2,02%	8,83±0,09 1,06%	6,66±0,09 1,39%
3	23±2	6,64±0,15 2,21%	6,63±0,22 3,29%	6,82±0,09 1,33%	8,80±0,40 4,54%	9,31±0,47 5,04%	6,28±0,45 7,23%
4		6,65±0,15 2,20%	6,59±0,18 2,79%	6,77±0,19 2,78%	8,75±0,43 4,90%	9,10±0,32 3,55%	6,22±0,38 6,16
6	14±2	5,70±0,27 4,66%	5,74±0,34 5,92%	5,87±0,20 3,32%	7,82±0,26 3,36%	8,42±0,42 5,00%	5,26±0,34 6,43%
8		6,17±0,21 3,33%	6,01±0,16 2,58%	6,36±0,21 3,33%	8,21±0,21 2,56%	8,52±0,34 4,05%	5,47±0,62 11,36%
10	8±2	5,49±0,52 9,49%	5,21±0,29 5,60%	5,70±0,34 5,91%	8,19±0,4 4,89%	8,91±0,39 4,37%	0
12		5,25±0,65 12,30%	5	5,38±0,48 8,91%	7,88±0,63 7,99%	8,88±0,25 2,82%	0
Σ		6,14±0,69	6,08±0,85	6,30±0,67	8,37±0,46	8,85±0,31	
CV		11,24	13,96	10,61	5,51%	3,49%	–
m		0,28	0,35	0,27	0,19	0,13	

**Примечание.**  $M\pm\sigma$  — средняя концентрация клеток *V. cholerae* и стандартное отклонение; CV — коэффициент вариации; Σ — среднее количество концентрации клеток; m — средняя ошибка средней арифметической *V. cholerae* за 12 недель.

**Note:**  $M\pm\sigma$  — average *V. cholerae* cell concentration and standard deviation; CV — coefficient of variation; Σ — average amount of cell concentration; m — the average error of the arithmetic mean *V. cholerae* for 12 weeks.

субстрате в микрокосмах, где одним из компонентов являются зелёные микроводоросли. Концентрация холерных вибрионов в пробах с хитиновым субстратом и клетками водорослей на два порядка выше, чем в пробах с пластиковым субстратом и клетками водорослей и сохраняется весь срок наблюдения. Более продолжительное сохранение *V. cholerae* O1 El Tor нетоксигенного штамма с наличием гена *csh1\** [26] в жизнеспособном состоянии в составе биоплёнок на пластике при уменьшении температуры до 8±2°C, возможно, связано с наличием в его геноме гена холодового шока, что требует дальнейших исследований для экспериментальной проверки. Без субстрата для адгезии, колонизации и формирования биоплёнок холерные вибрионы не способны к длительной персистенции при пониженной температуре.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Работа проведена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

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

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: С.В. Титова — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, статистическая обработка материала, написание текста, утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; Е.А. Меньшикова — концепция и дизайн исследования, сбор, обработка материала, редактирование текста, утверждение окончательно варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; С.О. Водопьянов — концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, редактирование текста, утверждение окончательно варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи; О.В. Бородина, А.А. Герасименко, И.П. Олейников, Н.А. Селянская — сбор и обработка материала.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** The study was carried out within the framework of the industry research program of Rosпотребнадзор.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' 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 and agree to be accountable for all aspects of the work. The largest contribution is distributed as follows: S.V. Titova — concept and design of research, collection and processing of material, statistical processing of material, writing of the text, approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article;

E.A. Menshikova — the concept and design of the study, the collection and processing of the material, the editing of the text, the final approval of the version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; S.O. Vodopyanov — the concept and design of the study, the collection and processing of the material, the editing of the text, the final approval of the version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article; A.A. Gerasimenko, O.V. Borodina, I.P. Oleynikov, N.A. Selyanskaya — collection and processing of material.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Colwell R.R., Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera // *Ann N Y Acad Sci*. 1994. Vol. 740. P. 44–54. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb19852.x
2. Lipp E.K., Huq A., Colwell R.R. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model // *Clin Microbiol Rev*. 2002. Vol. 15, N 4. P. 757–770. doi: 10.1128/CMR.15.4.757-770.2002
3. Lutz C., Erken M., Noorian P., et al. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae* // *Front Microbiol*. 2013. Vol. 4. P. 375. doi: 10.3389/fmicb.2013.00375
4. Скрыбин А.Ю., Поповьян Г.В., Тронь И.А. Микроводоросли как фактор, влияющий на органолептические свойства воды реки Дон // *Водоснабжение и санитарная техника*. 2015. № 8. С. 38–43.
5. Мокиенко А.В. Цианобактерии как опасные контаминанты поверхностных водоёмов // *Вода Magazine*. 2017. № 2. С. 20–24.
6. Codd G.A., Lindsay J., Young F.M., et al. Harmful Cyanobacteria. In: Huisman J., Matthijs H.C., Visser P.M., editors. *Harmful Cyanobacteria*. Aquatic Ecology Series, vol. 3. Springer, Dordrecht, 2005. doi: 10.1007/1-4020-3022-3\_1
7. Vezzulli L., Grande C., Reid P.C., et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016. Vol. 113, N 34. P. E5062–5071. doi: 10.1073/pnas.1609157113
8. Alam M., Sultana M., Nair G.B., et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007. Vol. 104, N 45. P. 17801–17806. doi: 10.1073/pnas.0705599104
9. Islam M.S., Islam M.S., Mahmud Z.H., et al. Role of phytoplankton in maintaining endemicity and seasonality of cholera in Bangladesh // *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015. Vol. 109, N 9. P. 572–578. doi: 10.1093/trstmh/trv057
10. Куликалова Е.С. Экологические и микробиологические аспекты эпидемиологического надзора за холерой (по материалам Сибири и Дальнего Востока): автореф. дис. ... канд. мед. наук. Иркутск, 2010. 23 с.
11. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris // *Environ Sci Technol*. 2013. Vol. 47, N 13. P. 7137–7146. doi: 10.1021/es401288x
12. Патент РФ на изобретение № 2559546/ 10.08.2015. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Способ моделирования образования биоплёнок холерных вибрионов в условиях эксперимента и устройство для его осуществления. Режим доступа: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2559546C1\\_20150810](https://yandex.ru/patents/doc/RU2559546C1_20150810).
13. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биоплёнок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах // *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016. Т. 61, № 4. С. 238–241.
14. Патент РФ на изобретение № 2685878/ 30.01.2018. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., и др. Способ моделирования биоплёнок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Режим доступа: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2685878C1\\_20190423](https://yandex.ru/patents/doc/RU2685878C1_20190423).
15. Титова С.В. Культивирование *Vibrio cholerae* с зелёными водорослями в эксперименте // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000. № 2. С. 19–22.
16. Huang J., Zhu Y., Wen H., et al. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential // *Appl Environ Microbiol*. 2009. Vol. 75, N 22. P. 6981–6985. doi: 10.1128/AEM.00517-09
17. 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. Vol. 67, N 10. P. 4685–4693. doi: 10.1128/AEM.67.10.4685-4693.2001
18. Титова С.В., Меньшикова Е.А., Водопьянов С.О., и др. Изучение биоплёночной формы холерных вибрионов методом ПЦР-РВ // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2022. Т. 27, № 1. С. 23–32. doi: 10.17816/EID109894
19. Фадейкина О.В., Касина И.В., Ермолаева Т.Н., и др. Проблемы оценки общей концентрации микробных клеток с применением отраслевого стандартного образца мутности бактериальных взвесей // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016. № 11-2. С. 268–273.
20. Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., и др. Оценка способности холерных вибрионов формировать биоплёнку на поверхности хитинового панциря речного рака // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021. Т. 98, № 4. С. 434–439. doi: 10.36233/0372-9311-99
21. Schneider D.R., Parker C.D. Purification and characterization of the mucinase of *Vibrio cholerae* // *J Infect Dis*. 1982. Vol. 145, N 4. P. 474–482. doi: 10.1093/infdis/145.4.474
22. Constantin de Magny G., Murtugudde R., Sapiano M.R., et al. Environmental signatures associated with cholera epidemics // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. Vol. 105, N 46. P. 17676–17681. doi: 10.1073/pnas.0809654105
23. Vezzulli L., Pruzzo C., Huq A., Colwell R.R. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera // *Environ Microbiol Rep*. 2010. Vol. 2, N 1. P. 27–33. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x

24. Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., и др. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae* (обзор) // Биохимия. 2015. Т. 80, № 9. С. 1334–1343. doi: 10.1134/S0006297915090023
25. Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Сорокин В.М., Титова С.В. Оценка влияния температуры культивирования на активность

- N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы у холерных вибрионов // Здоровье населения и среда обитания — ЗНисО. 2016. № 4. С. 42–44.
26. Бородина О.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., и др. Изучение встречаемости гена холодового шока *csH1* у штаммов *Vibrio cholerae*, циркулирующих на территории Российской Федерации // Бактериология. 2021. Т. 6, № 3. С. 22–23.

## REFERENCES

- Colwell RR, Huq A. Environmental reservoir of *Vibrio cholerae*. The causative agent of cholera. *Ann N Y Acad Sci*. 1994;740:44–54. doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb19852.x
- Lipp EK, Huq A, Colwell RR. Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clin Microbiol Rev*. 2002;15(4):757–770. doi: 10.1128/CMR.15.4.757-770.2002
- Lutz C, Erken M, Noorian P, et al. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*. 2013;4:375. doi: 10.3389/fmicb.2013.00375
- Skryabin AYU, Popovyan GV, Tron IA. Microalgae as a factor influencing the organoleptic properties of the water of the Don River. *Water Supply and Sanitary Engineering*. 2015;(8):38–43. (In Russ).
- Mokienko AV. Cyanobacteria as dangerous contaminants of surface water bodies. *Water Magazine*. 2017;(2):20–24. (In Russ).
- Codd GA, Lindsay J, Young FM, et al. Harmful Cyanobacteria. In: Huisman J, Matthijs HC, Visser PM, editors. *Harmful Cyanobacteria. Aquatic Ecology Series, vol. 3*. Springer, Dordrecht; 2005. doi: 10.1007/1-4020-3022-3\_1
- Vezzulli L, Grande C, Reid PC, et al. Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(34):E5062–5071. doi: 10.1073/pnas.1609157113
- Alam M, Sultana M, Nair GB, et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(45):17801–17806. doi: 10.1073/pnas.0705599104
- Islam MS, Islam MS, Mahmud ZH, et al. Role of phytoplankton in maintaining endemicity and seasonality of cholera in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2015;109(9):572–578. doi: 10.1093/trstmh/trv057
- Kulikalova ES. *Ekologicheskkiye i mikrobiologicheskkiye aspekty epidemiologicheskogo nadzora za kholeroy (po materialam Sibiri i Dal'nego Vostoka)* [dissertation thesis]. Irkutsk; 2010. 23 p. (In Russ).
- Zettler ER, Mincer TJ, Amaral-Zettler LA. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris. *Environ Sci Technol*. 2013;47(13):7137–7146. doi: 10.1021/es401288x
- Patent RUS №2559546/ 10.08.2015. Titova SV, Kushnareva EV. *Sposob modelirovaniya obrazovaniya bioplonok kholernykh vibriinov v usloviyakh eksperimenta i ustroystvo dlya yego osushchestvleniya*. Available from: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2559546C1\\_20150810](https://yandex.ru/patents/doc/RU2559546C1_20150810) (In Russ).
- Titova SV, Verkina LM. Modeling of *Vibrio cholerae* biofilms on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Clinical Laboratory Diagnostics*. 2016;61(4):238–241. (In Russ).
- Patent RUS №2685878/ 30.01.2018. Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, Menshikova EA, et al. *Sposob modelirovaniya bioplonok, formiruyemykh Vibrio cholerae O1 serogruppy na poverkhnosti khitina*. Available from: [https://yandex.ru/patents/doc/RU2685878C1\\_20190423](https://yandex.ru/patents/doc/RU2685878C1_20190423) (In Russ).
- Titova SV. Cultivation of *Vibrio cholerae* with green algae in the experiment. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2000;(2):19–22. (In Russ).
- Huang J, Zhu Y, Wen H, et al. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(22):6981–6985. doi: 10.1128/AEM.00517-09
- Lyon WJ. 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):4685–4693. doi: 10.1128/AEM.67.10.4685-4693.2001
- Titova SV, Menshikova EA, Vodopyanov SO, et al. Study of the biofilm form of *vibrio cholerae* by RT-PCR. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2022;27(1):23–32. (In Russ). doi: 10.17816/EID109894
- Fadeikina OV, Kasina IV, Ermolaeva TN, et al. Problems of assessing the total concentration of microbial cells using an industry standard sample for the turbidity of bacterial suspensions. *International Journal of Applied and Fundamental Research*. 2016;(11-2):268–273. (In Russ).
- Menshikova EA, Kurbatova EM, Vodopyanov SO, 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):434–439. (In Russ). doi: 10.36233/0372-9311-99
- Schneider DR, Parker CD. Purification and characterization of the mucinase of *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*. 1982;145(4):474–482. doi: 10.1093/infdis/145.4.474
- Constantin de Magny G, Murtugudde R, Sapiano MR, et al. Environmental signatures associated with cholera epidemics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(46):17676–17681. doi: 10.1073/pnas.0809654105
- Vezzulli L, Pruzzo C, Huq A, Colwell RR. Environmental reservoirs of *Vibrio cholerae* and their role in cholera. *Environ Microbiol Rep*. 2010;2(1):27–33. doi: 10.1111/j.1758-2229.2009.00128.x
- Markov EYu, Kulikalova ES, Urbanovich LYa, et al. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. *Biochemistry Moscow*. 2015;80(9):1109–1116. (In Russ). doi: 10.1134/S0006297915090023
- Duvanova OV, Mishankin BN, Sorokin VM, Titova SV. Evaluation of the effect of cultivation temperature on the activity of N-acetyl-β-D-glucosaminidase in *V. cholerae*. *Public Health and Habitat — ZNiSO*. 2016;(4):42–44. (In Russ).
- Borodina OV, Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, et al. Study of the occurrence of the *csH1* cold shock gene in *Vibrio cholerae* strains circulating in the Russian Federation. *Bacteriology*. 2021;6(3):22–23. (In Russ).

## ОБ АВТОРАХ

\* **Титова Светлана Викторовна**, к.м.н.;

адрес: Россия, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д. 117/40;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>;

eLibrary SPIN: 5695-2103; e-mail: [titova\\_sv@antiplague.ru](mailto:titova_sv@antiplague.ru)

**Меньшикова Елена Аркадьевна**, к.б.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>;

eLibrary SPIN: 6367-4404; e-mail: [menshikova\\_ea@antiplague.ru](mailto:menshikova_ea@antiplague.ru)

**Водопьянов Сергей Олегович**, д.м.н.;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>;

eLibrary SPIN: 4672-9310; e-mail: [serge100v@gmail.com](mailto:serge100v@gmail.com)

**Бородина Тамара Николаевна**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6222-4331>;

e-mail: [borodina\\_tn@antiplague.ru](mailto:borodina_tn@antiplague.ru)

**Герасименко Артем Александрович**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7700-3483>;

e-mail: [gerasimenko\\_aa@antiplague.ru](mailto:gerasimenko_aa@antiplague.ru)

**Олейников Игорь Павлович**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>;

e-mail: [serge100v@gmail.com](mailto:serge100v@gmail.com)

**Селянская Надежда Александровна**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>;

e-mail: [selyanskaya\\_na@antiplague.ru](mailto:selyanskaya_na@antiplague.ru)

## AUTHORS' INFO

\* **Svetlana V. Titova**, MD, Cand. Sci. (Med.);

address: 117/40, M. Gorky St., Rostov-on-Don, 344002, Russia;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7831-841X>;

eLibrary SPIN: 5695-2103; e-mail: [titova\\_sv@antiplague.ru](mailto:titova_sv@antiplague.ru)

**Elena A. Menshikova**, Cand. Sci. (Biol.);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>;

eLibrary SPIN: 6367-4404; e-mail: [menshikova\\_ea@antiplague.ru](mailto:menshikova_ea@antiplague.ru)

**Sergei O. Vodopyanov**, MD, Dr. Sci. (Med.);

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>;

eLibrary SPIN: 4672-9310; e-mail: [serge100v@gmail.com](mailto:serge100v@gmail.com)

**Tamara N. Borodina**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6222-4331>;

e-mail: [borodina\\_tn@antiplague.ru](mailto:borodina_tn@antiplague.ru)

**Artem A. Gerasimenko**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7700-3483>;

e-mail: [gerasimenko\\_aa@antiplague.ru](mailto:gerasimenko_aa@antiplague.ru)

**Igor P. Oleynikov**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>;

e-mail: [serge100v@gmail.com](mailto:serge100v@gmail.com)

**Nadezhda A. Selyanskaya**;

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>;

e-mail: [selyanskaya\\_na@antiplague.ru](mailto:selyanskaya_na@antiplague.ru)

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author