

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2012

УДК 579.834.1:615.373.577.1:57

О.А. Татаренко, Л.П. Алексеева, Н.Р. Телесманич, И.С. Шестиалтынова, О.С. Чемисова, О.В. Маркина, Н.Б. Непомнящая, Н.Н. Ускова

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ ТОКСИГЕННЫМИ И АТОКСИГЕННЫМИ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ ЭЛЬТОР

ФКУЗ Ростовский – на-Дону научно исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

*Изучены первые этапы формирования биопленок у 14 штаммов *Vibrio cholerae eltor*, содержащих без исключения гены *vps* – кластера, *mshA*, *hapR*, на поверхности полистирола. Показано, что 13 штаммов *Vibrio cholerae eltor* обладали способностью адсорбироваться на стенках лунок и формировать кольцо на границе двух сред: полистирол - среда. У одного штамма *Vibrio cholerae eltor* такая способность отсутствовала. Применение модифицированной нами среды М9 и 1% пептонной воды не позволило нам установить существенное влияние состава сред культивирования на способность *Vibrio cholerae eltor* формировать монослойную пленку и ее представленность на границе фаз полистирол – среда. Снижение температуры от 37° до 25°С, также не приводило к статистически достоверному усилению формирования монослоев в обеих средах. В результате количественного определения степени формирования биопленки, выраженность этого признака отмечалась только у двух токсигенных и двух атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae eltor*. Сравнение монослоев с использованием иммуноферментного анализа показало, что только два токсигенных и два атоксигенных штамма способны продуцировать экзополисахарид.*

Ключевые слова: биопленка, экзополисахарид, сыворотка, холерный вибрион

O. A. Tatarenko, L. P. Alekseeva, N. R. Telesmanich, I. S. Shestialtynova, O. C. Chemisova, O. V. Markina, N. B. Nepomnyashchaya, N. N. Uskova.

THE INFLUENCE OF SOME FACTORS ON THE FORMATION OF BIOFILM BY TOXIGENIC AND NON-TOXIGENIC VIBRIO CHOLERAE EL TOR STRAINS

Federal Treasury Institution of Healthcare "Rostov-on-Don Research Institute for Plague Control" of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, 117, Ul. M. Gor'kogo, Rostov-on-Don, Russian Federation, 344002

*The early stages of biofilm formation on polystyrene surface were studied in 14 *Vibrio cholerae* El Tor strains, all of which carried genes of *vps* cluster; *mshA*, and *hapR* genes. 13 *Vibrio cholerae* El Tor strains were shown to be capable of adsorption on the walls of microtiter plate wells and of ring formation at the "polystyrene-medium" interface. One of the *Vibrio cholerae* El Tor strains tested was defective in this ability. The use of different media - modified M1 medium and 1 per cent peptone - failed to reveal sufficient influence of culture medium composition on the ability of *Vibrio cholerae* to form multilayer biofilm at the phase boundary "polystyrene-medium". Temperature reduction from 37°C to 25°C also didn't result in statistically significant enhancement of monolayer formation in both media. Quantitative evaluation of biofilm formation showed that this ability was clearly marked only in two toxigenic and two non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* El Tor. Monolayer comparison in ELISA demonstrated that only two toxigenic and two non-toxigenic strains possessed the ability for exopolysaccharide production.*

Key words: biofilm, exopolysaccharide, serum, cholera vibrio (*Vibrio cholerae*).

Исследования последних лет показали, что *Vibrio cholerae eltor* существуют в природных экосистемах не только в виде свободно плавающих планктонных клеток, но и в виде высокоорганизованных и прикрепленных к субстратам биопленок, образование которых представляет собой сложно регулируемый биологический процесс, состоящий из нескольких стадий [10]. Первая стадия – планктонная представлена в виде свободноплавающих клеток. Вторая - стадия монослоя, при образовании которого важную роль играют жгутик, пили IV типа и системы кворум – сенсинг [8, 11, 12]. И заключительный этап – биопленка, где ключевую роль играет экзополисахарид (ЭПС). Синтезируясь на последнем этапе формирования биопленки, экзополисахарид окружает клетки защитным чехлом

и способствует формированию сложной трехмерной структуры с каналами, через которые поступают питательные вещества к бактериям и вымываются продукты их жизнедеятельности. Способность продуцировать экзополисахарид и формировать биопленку имеет решающее значение для выживания *Vibrio cholerae eltor* в водных средах в периоды между эпидемиями и способствует передаче инфекции во время эпидемий. Продукция экзополисахарида кодируется генами *vps*. Биопленка сформированная посредством межклеточного матрикса - экзополисахарида была обозначена как *vps* – зависимая [13].

Наибольшее количество данных о генетической регуляции образования биопленки получено зарубежными исследователями [10, 11]. Работы отечественных ученых немногочисленны и были направлены на изучение условий образования биопленки холерными вибрионами [4, 5], ингибирующей способности сахаров на пленкообразование [2] и участия определенных лектиновых рецепторов в образовании биопленки [3].

Для корреспонденции: Татаренко Ольга Александровна, науч. сотр. группы гибридом лаб. экологии холеры Ростовского-на-Дону противочумного института, e-mail: plague@aanet

Цель данной работы – изучение способности штаммов холерных вибрионов эльтор ctx^+ , ctx^- различного происхождения, формировать монослой, как промежуточный этап биопленки в зависимости от условий культивирования.

Материалы и методы

Для проведения исследований были выбраны штаммы *Vibrio cholerae* eltor, с определенным набором генов: пять штаммов выделенных от человека 18895, 16214, 4696, 18826, 15301, $ctx^+ tcp^+ Hly^-$; три штамма выделенных от человека 17391, 508, 18899 $ctx^- tcp^+ Hly^-$; пять штаммов из объектов окружающей среды 18960, 18843, 18803, 18802, 18896 $ctx^- tcp^- Hly^+$; а также один RO – вариант 16197/1 человеческого происхождения $ctx^+ tcp^+ Hly^-$.

В работе использовали 4 ругозных варианта штаммов *Vibrio cholerae* eltor ctx^+ 18895, 4696 *Vibrio cholerae* eltor ctx^- 18843, 18960 полученные путем селекции в среде М9. Высевы на агаровые среды для получения ругозных колоний проводили ежедневно. Переход в ругозную форму наблюдали на 8 - 12-й день у штаммов *Vibrio cholerae* eltor ctx^+ 18895, выделенного от человека и *Vibrio cholerae* eltor ctx^- 18843 водного происхождения. Штаммы *Vibrio cholerae* eltor человеческого 4696 ctx^+ , и водного *Vibrio cholerae* eltor 18960 ctx^- происхождения образовывали ругозные колонии на 15 – 25-й день выдерживания в среде М9.

Тестирование штаммов *Vibrio cholerae* eltor на способность формировать монослой как промежуточный этап биопленки проводили в плоскостных полистироловых планшетах. Бактериальные культуры вначале выращивали на плотной питательной среде (агаре Мартена, pH 7,6 – 7,8), затем вносили в бульон Мартена (pH 7,6 – 7,8) до конечной концентрации 10^7 мк кл/мл. Далее 18-часовую бульонную культуру разводили в 100 раз свежей порцией модифицированной нами среды М9 (pH 9,0) или 1% пептонной водой (pH 8,4) и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночной панели, культивировали в течение 96 ч при 37° и 25°C. Среда М9 была следующего состава (в г/л): Na_2HPO_4 – 6; KH_2PO_4 – 3; NaCl – 0,5; NH_4Cl – 1; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 0,01, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,49; LiCl – 0,01, казаминовых кислот – 5, глюкозы – 0,1, маннозы – 1; вода дистиллированная, а 1% пептонная вода состояла из (в г/л) пептона – 10; NaCl – 5; KNO_3 – 1; Na_2CO_3 – 2,5; воды дистиллированной. В качестве отрицательного контроля в 4 лунки вносили питательную среду, в которой инкубировали культуры. Плавающие клетки удаляли промыванием лунок дистиллированной водой и вносили 0,1 % раствор кристаллического фиолетового на 30 мин. Затем краситель аккуратно отсасывали и лунки промывали 3 раза дистиллированной водой, после чего экстрагировали окрашенные клетки диметилсульфоксидом (ДМСО) в течение 45 мин при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания в лунках планшет оценивали на фотометре при 540 нм. Анализ биопленок, образованных на полистироле в среде М9 при 25°C проводили с помощью ИФА с применением

антител сыворотки к ЭПС *Vibrio cholerae* eltor. ИФА материала биопленок, формируемых на полистироле, проводили непосредственно в лунках 96 луночных планшетов по окончании культивирования в них вибрионов по методике [6]. Измерение оптической плотности исследуемых проб проводили при длине волны 492 нм.

Экзополисахарид выявляли с помощью сыворотки, полученной к экзополисахариду штамма *Vibrio cholerae* eltor 18895, выделенного методом [1]. Для этого использовали беспородных мышей массой 20–25 г. Иммуноген вводили внутривентриально четырехкратно с интервалом 14 дней в полном адьюванте Фрейнда в количестве 50 мкг препарата экзополисахарида на одно животное. Забор крови и получение сывороток осуществляли через 10 дней после последней иммунизации. В экспериментах применяли МКА, узнающие эпитопы кор – олигосахарида полученные в лаборатории гибридом РостНИПЧИ.

Результаты и обсуждение

Все штаммы, взятые в исследование, были охарактеризованы с помощью ПЦР на наличие или отсутствие генов *ups* – кластера, $hapR^+$, $mshA^+$ и установлено, что независимо от эпидемической значимости их геном содержит эти гены. Исследуемые штаммы были также подвижны.

На процесс формирования монослойной пленки, образованной на разделе фаз: жидкая среда – полистирол в виде ободка, состоящего из прикрепившихся к твердой поверхности клеток, влияют факторы окружающей среды и свойства клеток самого микроорганизма. Наиболее важными внешними факторами являются состав питательной среды клеток и температура. Поэтому мы сравнили способность к образованию монослоя *Vibrio cholerae* eltor при 37°C в 1% пептонной воде, традиционно применяемой для культивирования, и синтетической среде М9 путем количественной и визуальной оценки клеток, прикрепившихся к полистиролу в результате окрашивания их кристаллическим фиолетовым. После обработки последним монослои были видны в виде фиолетовых ободков на границе: жидкая среда – полистирол (см. рисунок). Как видно из табл. 1, штаммы отличались по интенсивности образования монослоя на поверхности полистироловых лунок после культивирования в 1% пептонной воде при 37°C. Наиболее высокие показатели способности к формированию монослоя после экстракции ДМСО выявлены у 2 токсигенных *Vibrio cholerae* eltor 18895, *Vibrio cholerae* eltor 4696, и двух атоксигенных *Vibrio cholerae* eltor 18843, *Vibrio cholerae* eltor 18960, выделенных от человека и из объектов окружающей среды соответственно ОП₅₄₀ ($0,877 \pm 0,2$, $0,730 \pm 0,16$; $0,847 \pm 0,19$, $0,409 \pm 0,08$). В то же время остальные токсигенные и атоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* eltor формировали слабовыраженные кольца на границе двух сред, и соответственно после экстракции клеток ДМСО отличались низкими показателями ОП₅₄₀ в пределах ($0,360 \pm 0,07$ – $0,177 \pm 0,02$). У штамма *Vibrio cholerae* eltor 508 монослой отсутствовал.

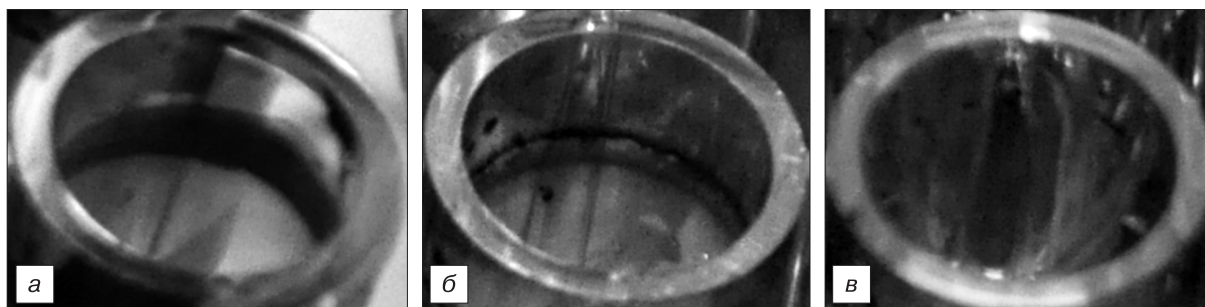


Рис. 1. Биопленки *Vibrio eltor* в среде М9, окрашенные кристаллическим фиолетовым.
 а – *V. eltor* 18895; б – *V. eltor* 18802; в – *V. eltor* 508.

При тестировании *Vibrio cholerae eltor* в среде М9 при 37°C с последующим окрашиванием кристаллическим фиолетовым, как и в 1% пептонной воде, те же два токсигенных и два атоксигенных штамма формировали достаточно плотный монослой, в противоположность этим штаммам менее выраженные ободки по периметру лунки планшета отмечены у остальных изученных культур. Экстракция ДМСО не позволила нам выявить статистически достоверной разницы по влиянию среды культивирования на способность штаммов формировать монослои.

Формирование бактериальных биопленок подчинено некоторым общим закономерностям. Вместе с тем для каждого вида существуют свои особенности роста и развития, в значительной степени зависящие от температуры, определяющей в том числе и адгезию бактерий, и последующее формирование биопленки. В эксперименте по влиянию температурного режима нами использованы вышеописанные штаммы. При 25°C, т. е. при отсутствии интенсивного роста клеток у тех же токсигенных и атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae eltor* 18895, 4696, 18843, 18960 в обеих средах наблюдали хорошо видимые монослои в виде широких, интенсивно окрашенных колец с экстинциями ($1,104 \pm 0,26$, $0,815 \pm 0,19$, $0,981 \pm 0,23$, $0,731 \pm 0,16$), что свидетельствовало о значительном количестве прикрепившихся клеток. У остальных изученных штаммов *Vibrio cholerae eltor* зарегистрированы менее плотные монослои с ОП₅₄₀ ($0,598 \pm 0,13$ – $0,120 \pm 0,01$), что являлось следствием прикрепления меньшего количества клеток. Сравнив полученные показатели ОП с предыдущим опытом, нами не выявлено статистически достоверного увеличения способности образования монослоя при 25°C. Таким образом, изменение условий культивирования *Vibrio cholerae eltor*, а именно снижение температуры, не приводило к усилению образования монослоя.

Учитывая, что ругозные варианты характеризуются повышенной продукцией ЭПС, мы сравнили способность экспериментально полученных ругозных вариантов, двух токсигенных штаммов *Vibrio cholerae eltor* 18895, 4696 и двух атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae eltor* 18843, 18960, формировать при 25°C в среде М9 монослои по сравнению с исходными культурами. В табл. 1 показано, что ругозные варианты *ctx*⁺ штаммов *Vibrio cholerae eltor* 18895,

4696 образовывали более плотные монослои, как показала экстракция ДМСО показатели ОП₅₄₀ ($2,700 \pm 0,7$, $2,400 \pm 0,6$) у них выше по сравнению с их типичными формами ОП₅₄₀ ($1,208 \pm 0,29$, $0,915 \pm 0,21$). У ругозных *ctx*⁺ штаммов *Vibrio cholerae eltor* 18843, 18960 также зарегистрированы высокие значения ОП₅₄₀ ($1,195 \pm 0,2$ – $1,729 \pm 0,4$), а у их типичных вариантов ОП₅₄₀ равняется $0,816 \pm 0,19$ – $0,994 \pm 0,23$, т. е. последние образуют менее плотные монослои.

Известно, что экзополисахарид является основным компонентом и синтезируется на последнем этапе формирования биопленки. Закономерен вопрос, способны ли клетки монослоев *Vibrio cholerae eltor* продуцировать ЭПС. Анализ монослоев, образованных на полистироле при 25°C в среде М9, показал в ИФА (табл. 2), что те же два токсигенных и два атоксигенных штамма *Vibrio cholerae eltor* 18895, 4696, 18843, 18960, продуцируют ЭПС, судя по показателям ОП ($3,00 \pm 0,7$, $2,278 \pm 0,5$, $2,000 \pm 0,4$, $1,683 \pm 0,3$), полученным в результате связывания клеток из монослоя с антителами к ЭПС. В монослоях остальных изученных штаммов ЭПС не выявлен и тому подтверждение, показатели ОП зарегистрированы на уровне отрицательного контроля. Отмечено также, что штаммы, продуцирующие ЭПС на уровне монослойной стадии биопленки, не вступают в реакцию с МКА к R-ЛПС, свидетельствуя о том, что в составе ЭПС нет антигенных детерминантов общих с R-ЛПС. Аналогичные результаты были получены при тестировании монослоев, образованных на полистироле при 25°C в 1% пептонной воде.

Результаты и обсуждение

В работе было исследовано влияние условий культивирования на образование монослоя, как промежуточного этапа биопленки клетками *Vibrio cholerae eltor* различного происхождения. Ранее сообщалось [8, 11, 13], что для формирования монослоя необходим жгут и пили IV типа, а для развития трехмерной структуры биопленки структурные *vpsA* – *vpsL* и регуляторный *hapR* ген.

Из 14 изученных штаммов, содержащих без исключения ген *mshA*⁺, отвечающий за синтез пилей IV типа, гены *vps*-кластера, детерминирующие продукцию ферментов, участвующих в биосинтезе ЭПС, и ген *hapR*⁺, участвующий в регуляции его синтеза, 13 штаммов *Vibrio cholerae eltor* обладали способно-

Интенсивность образования монослойной пленки *V. cholerae* eltor

Штаммы <i>Vibrio cholerae</i> eltor	Источник выделения	Генотипическая характеристика			Фенотипическая характеристика			Пленкообразующая способность штаммов, ед. ОП ₅₄₀ , инкубированных в:				
		ctx	tcp	vpsA-L, mshA, hapR	Mot	Hly	морфология колоний	1% пептонной воде		среде М9		ругозных вариантов в среде М9
								25°C	37°C	25°C	37°C	
18895	Человек	+	+	+	+	-	Типичная	1,104 ± 0,26	0,877 ± 0,2	1,208 ± 0,29	0,887 ± 0,2	2,700 ± 0,7
16214		+	+	+	+	-		0,590 ± 0,13	0,310 ± 0,06	0,422 ± 0,09	0,390 ± 0,08	н. о.
4696		+	+	+	+	-		0,815 ± 0,19	0,730 ± 0,16	0,915 ± 0,21	0,740 ± 0,17	2,400 ± 0,6
18826		+	+	+	+	-		0,550 ± 0,12	0,360 ± 0,07	0,458 ± 0,09	0,361 ± 0,07	н. о.
15301		+	+	+	+	-		0,598 ± 0,13	0,352 ± 0,07	0,437 ± 0,09	0,382 ± 0,08	н. о.
17391		-	+	+	+	+		0,200 ± 0,03	0,203 ± 0,03	0,302 ± 0,06	0,283 ± 0,05	н. о.
508		-	+	+	+	+		0,098 ± 0,01	0,049 ± 0,01	0,098 ± 0,01	0,079 ± 0,01	н. о.
18899		-	+	+	+	+		0,174 ± 0,03	0,177 ± 0,02	0,274 ± 0,05	0,272 ± 0,05	н. о.
16197/1		+	-	+	+	-	Шероховатая	0,120 ± 0,01	0,133 ± 0,01	0,152 ± 0,02	0,120 ± 0,01	н. о.
18960	Окружающая среда	-	-	+	+	+	Типичная	0,731 ± 0,16	0,409 ± 0,08	0,816 ± 0,19	0,448 ± 0,09	1,195 ± 0,2
18843		-	-	+	+	+		0,981 ± 0,23	0,847 ± 0,19	0,994 ± 0,23	0,706 ± 0,16	1,729 ± 0,4
18803		-	-	+	+	+		0,150 ± 0,02	0,178 ± 0,02	0,252 ± 0,05	0,208 ± 0,03	н. о.
18802		-	-	+	+	+		0,168 ± 0,02	0,150 ± 0,01	0,269 ± 0,05	0,214 ± 0,04	н. о.
18896		-	-	+	+	+		0,181 ± 0,03	0,158 ± 0,01	0,281 ± 0,05	0,228 ± 0,04	н. о.
								0,07	0,08	0,06	0,05	0,06

Примечание. К – контроль – среда без вибрионов; (н. о.) – исследования не проводились $p < 0,05$

стью адсорбироваться на стенках лунок и формировать кольцо на границе двух сред: полистирол-среда. У штамма *Vibrio cholerae* eltor 508 такая способность отсутствовала, и это требует отдельного изучения. В 1% пептонной воде традиционно используемой для культивирования и температурном оптимуме 37°C, обеспечивающем максимальную активность ферментов, способность формировать монослой у штаммов *Vibrio cholerae* eltor визуально и количественно различалась. При этом визуальная оценка толщины монослоя у *Vibrio cholerae* eltor коррелировала с результатами количества его биомассы. В результате количественного определения степени формирования биопленки, выраженность этого признака отмечалась только у двух токсигенных и двух атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* eltor. Применение модифицированной нами среды М9, способствующей увеличению частоты образования ругозных колоний, не привело к повышению интенсивности образования монослоя исследованных нами штаммов. Сравнение ОП₅₄₀ исследуемых штаммов в 1% пептонной воде и среде М9 не позволило нам установить существенное влияния состава сред культивирования на способность *Vibrio cholerae* eltor формировать монослойную пленку и ее представленность на границе фаз полистирол-среда. Снижение температуры до 25°C, также не приводило к статистически достоверному усилению формирования монослоев в обоих средах.

По данным А. Ali [7] способность синтезировать ЭПС свойственна в основном токсигенным штаммам. Сравнение монослоев с использованием им-

муноферментного анализа показало, что только два токсигенных и два атоксигенных штамма способны продуцировать ЭПС, что не позволяет установить

Таблица 2

Свойства монослоев, формируемых на границе раздела жидкая среда-полистирол с помощью ТИФА

Штаммы <i>V. cholerae</i> eltor	Генотипическая характеристика			Показатели ОП в реакции с антителами к ЭПС	Показатели ОП в реакции с МКА к R-ЛПС (ДН)
	ctx	tcp	vpsA-L, mshA, hapR		
18895	+	+	+	3,000 ± 0,7	0,238 ± 0,03
16214	+	+	+	0,157 ± 0,01	0,254 ± 0,03
4696	+	+	+	2,278 ± 0,5	0,256 ± 0,03
18826	+	+	+	0,175 ± 0,01	0,272 ± 0,04
15301	+	+	+	0,204 ± 0,02	0,278 ± 0,04
17391	-	+	+	0,202 ± 0,02	0,235 ± 0,03
508	-	+	+	0,205 ± 0,02	0,290 ± 0,04
18899	-	+	+	0,214 ± 0,02	0,287 ± 0,04
16197/1	+	-	+	0,123 ± 0,01	3,365 ± 0,8
18960	-	-	+	1,683 ± 0,3	0,266 ± 0,03
18843	-	-	+	2,000 ± 0,4	0,251 ± 0,03
18803	-	-	+	0,115 ± 0,01	0,271 ± 0,03
18802	-	-	+	0,207 ± 0,02	0,227 ± 0,02
18896	-	-	+	0,134 ± 0,01	0,257 ± 0,03
$p < 0,05$			К (отрицательный)	0,117	0,114

четкой корреляции наличия гена *ctx* у штаммов *Vibrio cholerae* eltor, образующих экзополисахарид. Наши исследования также показали, что ЭПС, продуцируемый клетками из биопленок, не имел общих эпитопов с R-ЛПС.

А. Heydorn [9] с помощью конфокальной сканирующей лазерной микроскопии было показано, что средняя толщина биопленок, сформированных штаммами, продуцирующими ЭПС, несколько выше по сравнению с типичным и составляет 35 и 25 мкм соответственно. Сравнение нами способности типичных культур с их ругозными вариантами образовывать монослои в среде М9 при 25°C показало, что последние формируют более выраженные монослои.

Таким образом, несмотря на наличие генов, детерминирующих образование биопленки, только два токсигенных и два атоксигенных штамма обладали способностью формировать толстый монослой и синтезировать ЭПС, что является предпосылкой для формирования зрелой биопленки при попадании их в стрессовые условия и обеспечивает им высокую конкурентоспособность по сравнению с остальными изученными штаммами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Елинов Н.П. Микробные экзополисахариды. – Киев, 1984.
2. Колякина А.В., Курбатова Е.М., Телесманич Н.Р. и др. Сравнительное изучение углеводной специфичности лектиновых рецепторов холерных вибрионов при образовании биопленки на поверхности жидких питательных сред // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания и проблемной комиссии. – Ростов н/Д., 2008. – Вып. 21. – С. 72–74.
3. Колякина А.В., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов (адгезия, геммаглютинация, образование биопленки) // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания и проблемной комиссии. – Ростов н/Д., 2009. – Вып. 22. – С. 80–84.
4. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Марамович А.С. и др. Способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп к образованию биопленки в эксперименте // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания и проблемной комиссии. – Ростов н/Д., 2009. – Вып. 22. – С. 90–92.
5. Чемисова О.С., Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л. и др. Изучение образования биопленок штаммами *Vibrio cholerae* eltor // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания и проблемной комиссии. – Ростов н/Д., 2008. – Вып. 21. – С. 72–74.
6. Шелудько А.В., Кулибякина О.В., Широков А.А. и др. Влияние мутаций в синтезе липополисахаридов и полисахаридов, связывающих калькофлуор, на формирование биопленок *Azospirillum brasilense* // Микробиология. – 2008, Т. 77, № 3. – С. 358–363.
7. Ali A., Rashid M.H., Karaolis D.K.R. High-Frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. – 2002. – Vol. 68, N 11. – P. 5773–5778.
8. Fong J.C.N., Klose K.E., Yildiz, F.H. Role of *Vibrio* polysaccharide (*vps*) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis // J. Microbiol. – 2010. – Vol. 156, N 9. – P. 2757–2769.
9. Heydorn A., Nielsen, A. T., Hentzer M. et al. Quantification of biofilm structures by the novel computer program COMSTAT // Microbiology. – 2000. – Vol. 146. – P. 2395–2407.
10. Lenz D.H., Bassler B.L. The small nucleoid protein Fis is involved in *Vibrio cholerae* quorum sensing // Mol. Microbiol. – 2007. – Vol. 63, N 3. – P. 859–871.
11. Moorthy S., Watnick P.I. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development // Mol. Microbiol. – 2005. – Vol. 57. – P. 1623–1635.
12. Nadell C.D., Bassler B.L. A fitness trade-off between local competition and dispersal in *Vibrio cholerae* biofilms // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2011. – Vol. 108, N 34. – P. 14181–14185.
13. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm // J. Mol. Microbiol. – 1999. Vol. 34. – P. 586–595.

Поступила 23.04.12

Сведения об авторах:

Людмила Павловна Алексеева, д-р биол. наук, проф, вед. науч. сотр. группы гибридом лаборатории экологии холеры Ростовского-на-Дону противочумного института; **Телесманич Наталья Робертовна**, д-р биол. наук, зам. директора Ростовского-на-Дону противочумного института; **Шестиалтынова Ирина Семеновна**, канд. мед.наук, ст. науч. сотр. лаб. микробиологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института; **Чемисова Ольга Сергеевна**, канд. биол. наук, зав. музеем живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института; **Маркина Ольга Владимировна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы гибридом лаб. экологии холеры Ростовского-на-Дону противочумного института; **Непомнящая Наталья Борисовна**, ст. науч. сотр. лаб. микробиологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института; **Ускова Наталья Николаевна**, мл. науч. сотр. лаб. микробиологии холерных вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института.