

## Модель биопленки холерного вибриона как механизм выживания в поверхностных водоемах

Е. С. КУЛИКАЛОВА, С. Г. САППО, Л. Я. УРБАНОВИЧ, Е. Ю. МАРКОВ,  
Л. В. МИРОНОВА, С. В. БАЛАХОНОВ

*Иркутский научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора  
664002, Иркутск, ул. Триллссера, 78  
E-mail: e.kulikalova@yandex.ru*

Статья поступила 13.02.2013

### АННОТАЦИЯ

В эксперимент взяты штаммы холерного вибриона эльтор разной эпидемической значимости, выделенные из речной воды в г. Владивостоке во время вспышки холеры (1999 г.) и в г. Иркутске в благополучный по холере период (2005 г.). С использованием световой и люминесцентной микроскопии представлена структура биопленки, состоящая из периферической части, тяжелой, полисахаридного матрикса, каналов и полиморфных вибрионов. Метахроматическая окраска матрикса в розовый (кристаллвиолет, толуидиновый синий) или флуоресцирующий красновато-оранжевым цвет (акридиновый оранжевый) свидетельствует о содержании в его составе кислых мукополисахаридов (глюкозаминогликанов). Биопленка токсигенного штамма в отличие от нетоксигенного образуется значительно позже, при этом составляющие ее структуру элементы более выражены. Жизнеспособность клеток вибриона на протяжении всего эксперимента (90 сут) с сохранением исходного патогенного потенциала свидетельствует о высоких адаптационных свойствах вибриона эльтор, что при благоприятных экологических условиях (оптимальная температура, наличие хитинсодержащего субстрата и др.) способствует его выживанию и существованию в поверхностных водоемах.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae* eltor, биопленка, структура, генотип, хитин.

Полувековое шествие VII пандемии холеры по всему миру не позволяет усомниться в существовании для ее возбудителя разных экологических ниш – организм человека и водная окружающая среда [Kumar et al., 2010], где *Vibrio cholerae* находится как в свободном состоянии, так и в виде прикрепленных к биотическим и абиотическим поверхностям биопленок – сообществ вибрионов с высоким уровнем организации, представляющим собой своего рода “суперорганизм” [Бухарин, 2006; Davey, O’Toole, 2000]. В биопленке возбудитель существует как в активном состоянии, так и в покоящейся (некультивируемой)

форме, способной при определенных условиях реверсировать в вегетативную с сохранением исходного патогенного потенциала, вызывая заболевание человека, и стать причиной эпидемических осложнений [Faruque et al., 2006; Kamguzzaman et al., 2010]. Полагают, что биопленка – это генетически детерминированный механизм выживания патогена в неблагоприятных условиях [Соколенко, Мухина, 2006], усиливающий его способность к персистенции в окружающей среде в межэпидемический период [Hall-Stoodley, Stoodley, 2005; Alam et al., 2006]. Высокая устойчивость биопленки к кислой среде же-

лудка обеспечивает ей прохождение через этот барьер [Yang et al., 2010] с последующим освобождением из нее вибрионов.

Установлено, что прикрепление (адгезия) является существенным моментом в колонизации вибрионами как энтероцитов тонкого кишечника организма, так и различных поверхностей объектов водной окружающей среды, при этом важную роль играют токсинкорегулируемые пили (ТСП) [Reguera, Kolter, 2005] и пили маннозочувствительного гемагглютинаина (MSHA) [Watnick, Kolter, 1999; Moorthy, Watnick, 2005]. Пили причастны к колонизации вибрионами хитина, широко распространенного среди многочисленных водных организмов (ракообразные, зоопланктон) и служащего для патогенов, в том числе вибрионов, питательным субстратом [Meibom et al., 2005]. Выявлена лучшая усвояемость вибрионами деполимеризованного хитина с участием хитиназ и диацетилаз [Zhao et al., 2010]. Кроме того, хитин защищает холерный вибрион от действия неблагоприятных факторов окружающей среды, что обеспечивает ему длительное существование вне организма человека в экологической нише и, что особенно важно, индуцирует у вибриона состояние генетической компетенции [Meibom et al., 2005].

Научные достижения последних лет в области новых микроскопических и молекулярных технологий внесли определенную ясность в механизм формирования биопленки с ключевой ролью системы “Quorum sensing” [Гинцбург и др., 2003; Соколенко, Мухина, 2006; Huq et al., 2008], последовательность ее образования через стадии разрозненных одиночных клеток и монослоя [Moorthy, Watnick, 2005] с пронизывающим матриксом из полисахаридов и водными каналами [Costerton et al., 1994]. В настоящее время выявление биопленки в эксперименте сводится к определению кольца на границе воздух – питательная среда (пробирка или планшет), выявляемого визуальным окрашиванием кристаллическим фиолетовым, и количественным определением оптической плотности спектрофотометрически [Чемисова и др., 2008; Watnick, Kolter, 1999]. Нами ранее установлено, что образование биопленки холерными вибрионами в экспериментальных условиях на границе воз-

дух – вода начинается уже на вторые сутки, а со второй недели исследования биопленка отрывается и опускается на дно пробирки [Куликалова и др., 2011]. По данным спектрофотометрического исследования также показано, что штаммы холерного вибриона эльтор O1 серогруппы (токсигенные и нетоксигенные), выделенные из поверхностных водоемов, обладают более выраженной способностью к образованию биопленки в сравнении с изолированными от человека.

Сведения о структуре биопленки существенно обогатились применением электронно-микроскопической (трансмиссионной, сканирующей), конфокальной сканирующей лазерной и эпифлуоресцентной микроскопии [Costerton et al., 1994; Davey, O’Toole, 2000; Reguera, Kolter, 2005; Alam et al., 2007]. Несмотря на информативность этих методов, следует отметить недоступность их повседневного использования.

Таким образом, представляется целесообразным моделирование в эксперименте и исследование с помощью более доступной микроскопии (светооптической и люминесцентной) биопленки штаммов холерного вибриона (разной эпидемической значимости) как возможного механизма выживания в поверхностных водоемах.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В эксперименте использовано два штамма холерного вибриона эльтор разной эпидемической значимости: токсигенный (*V. cholerae* eltor И-1330, генотип *ctxAB*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup> *toxR*<sup>+</sup> *wbO1*<sup>+</sup>), выделен во время вспышки холеры в г. Владивостоке (1999 г.) и нетоксигенный (*V. cholerae* eltor 1-05, генотип *ctxAB*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup> *toxR*<sup>+</sup> *wbO1*<sup>+</sup>), выделен в благополучный по холере период в г. Иркутске (2005 г.), оба – из воды поверхностного водоема. Штаммы спектрофотометрически обладают хорошей способностью к образованию биопленки (со значениями  $OD_{540}$   $2,19 \pm 0,3$  и  $0,64 \pm 0,07$  соответственно, культивирование при 22 °С) [Куликалова и др., 2009]. По культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам культуры относятся к *Vibrio cholerae* eltor O1 серогруппы [МУК 4.2.2218-07 “Лабораторная диагностика холеры”]. Их эпи-

демическая значимость оценивалась по наличию генов *ctxAB*, *tcpA*, *toxR* в мультиплексной ПЦР [Водопьянов и др., 1999; Koch, 1993; Baptista et al., 1998]. Детекция гена *wbO1*, генов консервативной части хромосомы *vpsR*, *mbaA1*, *mbaA2* и функционально значимого мобильного генетического элемента EPI (environmental persistence island) *mshQ* – в ПЦР с одной парой праймеров [Mitra et al., 2001; Yildiz et al., 2001; Toma et al., 2002; Bomchil et al., 2003].

Для получения биопленки разведенная (1 : 10) в автоклавированной водопроводной воде 18 ч бульонная культура каждого штамма разливалась в пробирки в трех вариантах: взвесь культуры с добавлением кристаллического (порошкообразного, 1 мг) или коллоидного\* хитина (50,0 мкл суспензии) и без последних. Контроль – автоклавированная вода, вода с добавлением того или другого хитина, а также свежеприготовленная взвесь культуры исследуемого штамма без инкубации. Опытные и контрольные пробирки инкубировались при комнатной температуре (18–22 °C).

В разные сроки (72 ч, 96 ч, 14 сут, 21, 28, 35 и 90 сут) из осевшей на дно пробирки культуры холерного вибриона готовились мазки. Для световой микроскопии – с помощью стеклянной пипетки с тупым концом путем нанесения капли (не растирая) на обезжиренные предметные стекла (на каждый штамм и срок по четыре мазка). Фиксированные (10%-й формалин на этаноле, 30 мин) мазки окрашивались кристаллическим фиолетовым (0,1%-й водный раствор), параллельно – толуидиновым синим (0,5%-й и 0,1%-й раствор на 30%-м этаноле) – 30–60 мин [Пирс, 1962].

Для выявления антигена O1 холерного вибриона ставилась реакция иммунофлуоресценции (РИФ) с препаратами коммерческого иммуноглобулина диагностического флюоресцирующего холерного адсорбированного или конъюгированными с флюоресцеинизотиоцианатом моноклональными антителами ФИТЦ-МКА O1 (F8612) (представлены зав.

\*Коллоидный хитин (с концентрацией 140 мг/мл) приготовлен из порошкообразного хитина путем растворения в концентрированной соляной кислоте с последующим осаждением дистиллированной водой и доведением pH до 7,6.

лабораторией МКА Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института профессором Л. П. Алексеевой). Нефиксированные (высушенные) мазки и препарат “раздавленная капля” окрашивались раствором акридинового оранжевого (АО) на цитратно-фосфатном буфере (ЦФБ), рабочий раствор 1 : 6000.

Просмотр мазков – на микроскопе Аxiоскопе (Karl Zeiss) с фотодокументированием на фотокамере Canon EOS 450D (разрешение 12,2 Мп) и использованием программы EOS Utility 2.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При световой микроскопии мазков нетоксигенного *V. cholerae eltor* 1-05 через 3 сут инкубации в воде по периферии препарата выявляется умеренной толщины кольцевидной формы образование с неровной (волнообразной) поверхностью из плотно прилегающих вибрионов разных форм (типичные, кокковидные, полые). В краевой части образования – розоватого цвета субстанция и отходящие от него внутрь тонкие тяжи (рис. 1, а), вне которых – множество находящихся свободно либо в виде конгломератов вибрионов, местами – участки сплошного их скопления.

При добавлении в воду хитина (кристаллический, коллоидный) – увеличение количества отходящих от поверхностной структуры тяжей, а также свободных вибрионов и их конгломератов. На частицах хитина – многочисленные вибрионы.

При просмотре материала токсигенного штамма *V. cholerae eltor* И-1330 в этот срок выявляется подобное, но несколько уже периферическое образование с неровной (выпячивания, углубления) поверхностью и рыхло располагающимися в нем вышеуказанными формами вибриона, вне – немногочисленные подобной морфологии клетки.

В присутствии коллоидного хитина – утолщение периферической части структуры, вглубь от которой обилие разных форм вибрионов.

При дальнейшем исследовании (через 4–7 сут) нетоксигенного штамма *V. cholerae eltor* периферическое образование значительно

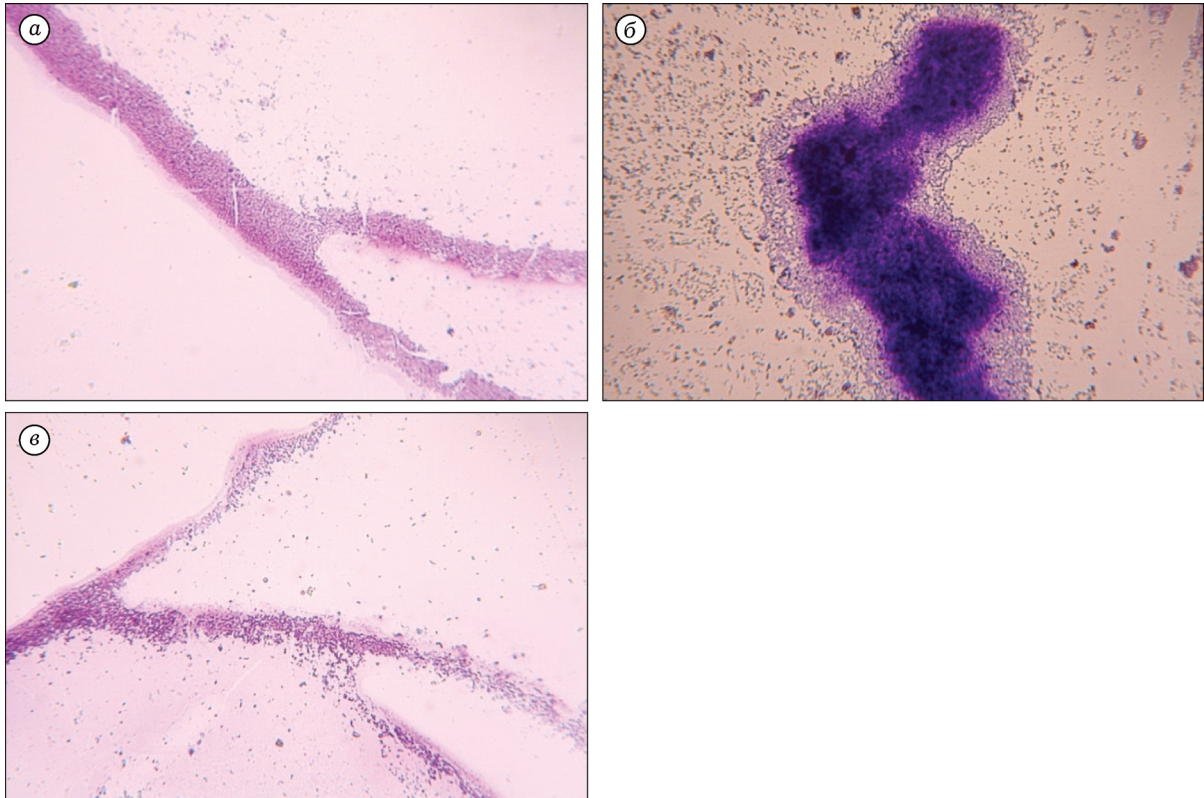


Рис. 1. Микроскопическая картина биоупленки холерного вибриона через 3–4 сут инкубации: а – периферически располагающееся образование через 3 сут инкубации в воде нетоксигенного *V. cholerae*. Кристаллвиолет.  $\times 400$ ; б – вибрионы (нетоксигенный *V. cholerae*) на частицах коллоидного хитина через 4 сут. Толуидиновый синий.  $\times 400$ ; в – периферическая структура (токсигенный *V. cholerae*) с розоватого цвета субстанцией через 4 сут инкубации в воде. Кристаллвиолет.  $\times 400$

утолщается, состоит из трех слоев плотно прилегающих вибрионов, отходящие вглубь многочисленные утолщенные тяжи древовидно разветвляются на более тонкие. В присутствии хитина (коллоидного, кристаллического) отмечается обилие вибрионов преимущественно на частицах коллоидного хитина в виде характерных кружков (рис. 1, б). Многочисленны между тонкими разветвлениями из вибрионов светлые пространства.

У токсигенного штамма *V. cholerae eltor* установлена в общем сходная картина, но по толщине периферическое образование и отходящие тяжи уступают вышеотмеченным (рис. 1, в). Четко сформирована прилегающая изнутри к периферическому образованию и на тяжах субстанция розоватого цвета.

На 14–21 сут и в последующие сроки (28–35 сут) исследования нетоксигенного штамма *V. cholerae eltor* 1-05 наблюдается выраженная периферическая структура и отходящие от нее тяжи с розоватой субстанцией

снаружи и внутри. Вне – множество вибрионов разных форм (кокковидные, типичные, полые). При добавлении хитина (коллоидный или кристаллический) отмечается значительное утолщение периферической структуры (рис. 2). Многочисленны образования с волнистой поверхностью из плотно прилегающих вибрионов, а также групповые скопления в виде сплошных участков. На частицах хитина – вибрионы.

Исследованием токсигенного *V. cholerae eltor* в срок 14 сут обнаруживается отчетливо выраженная на поверхностной структуре, а также примыкающая и пронизывающая внутрь розоватого вида субстанция. Вне последней – многочисленные вибрионы, преимущественно в виде свободных элементов. Позже (с 21 сут) на фоне умеренной толщины периферической структуры представляют интерес отходящие от нее мощные (трехслойные) с волнообразной, слегка розоватой поверхностью тяжи, которые вместе с тон-



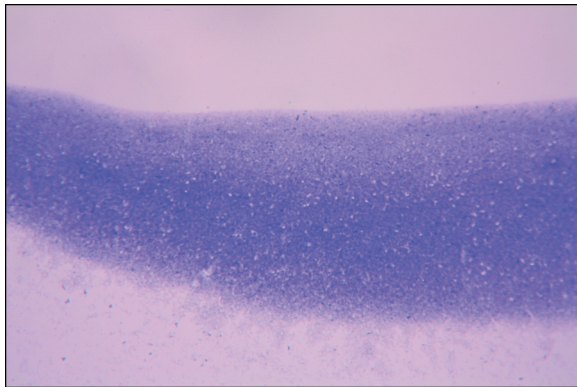


Рис. 2. Микроскопическая картина биопленки холерного вибриона через 14 сут инкубации в присутствии коллоидного хитина: утолщение периферической структуры (нетоксигенный *V. cholerae*). Толуидиновый синий.  $\times 400$

кими многократно ветвящимися тяжами разделяют все поле на сегменты с обилием вибрионов. При добавлении в воду того или другого хитина заметно утолщение периферически располагающейся структуры с неровной внутренней поверхностью и пронизывающими ее крупными и мелкими местами, находящимися под ней и сливающимися между собой полостями. Всюду отмечаются пронизывающие более тонкие тяжи, многократно ветвящиеся, со свободным пространством между ними и немногочисленными в них вибрионами. Местами – участки массивного скопления клеток. На частицах хитина – вибрионы.

На отдаленном сроке (90 сут) исследования нетоксигенного штамма *V. cholerae eltor* на фоне умеренной толщины периферической структуры обращают на себя внимание многочисленные тяжи с волнообразной поверхностью и светлые полости (каналы), что отчетливо выражено при добавлении кристаллического хитина. При микроскопировании материала в этот срок токсигенного штамма *V. cholerae eltor* в глубине от периферической структуры выявляется толстый многослойный тяж волнообразной формы, а также обилие вибрионов в виде густого скопления и разрозненных клеток (рис. 3). При добавлении в воду коллоидного хитина отчетливо видны две структуры. Одна – менее окрашенная, небольшой толщины, из типичных вибрионов, вне которой содержатся клетки обычной и кокковидной формы.

Вторая – более интенсивно окрашенная, с пронизывающими ее каналами и примыкающей розовой субстанцией. В глубине обнаруживаются сплошь вибрионы вышеуказанных форм и светлые пространства с немногочисленными вибрионами.

В окрашенных холерной люминесцирующей сывороткой O1 препаратах – отчетливо выраженная периферическая структура и располагающиеся вглубь от нее изолированные и компактные скопления, состоящие из специфически светящихся кокковидной, утолщенной с полым центром и типичной формы клеток (рис. 4).

В препарате “раздавленная капля” (с окраской АО) на 21 и 35 сут у исследуемых штаммов – обилие вибрионов кокковидной формы, флуоресцирующие зеленым и красным цветами, а также подвижные клетки обычной формы (свечение зеленым) и конгломераты из них на фоне красновато-оранжевой субстанции. Периферическая часть структуры значительной толщины, многослойна, четко отграничена от окружающего ее пространства, вибрионы в слоях неподвижны. В препаратах с кристаллическим хитином найдены немногочисленные прикрепленные к его частицам вибрионы, в то же время частицы коллоидного хитина обильно «облеплены» клетками зеленого цвета.

Высевы из пробирок на всех сроках данного эксперимента дали рост вибрионов. Результаты ПЦР на выявление генов *wbO1* и

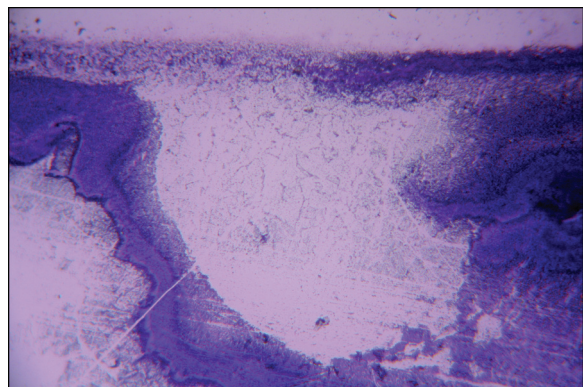


Рис. 3. Микроскопическая картина биопленки холерного вибриона через 90 сут инкубации: толстый многослойный тяж волнообразной формы, отходящий от тонкой периферической структуры токсигенного *V. cholerae* в воде. Кристаллвиолет.  $\times 400$

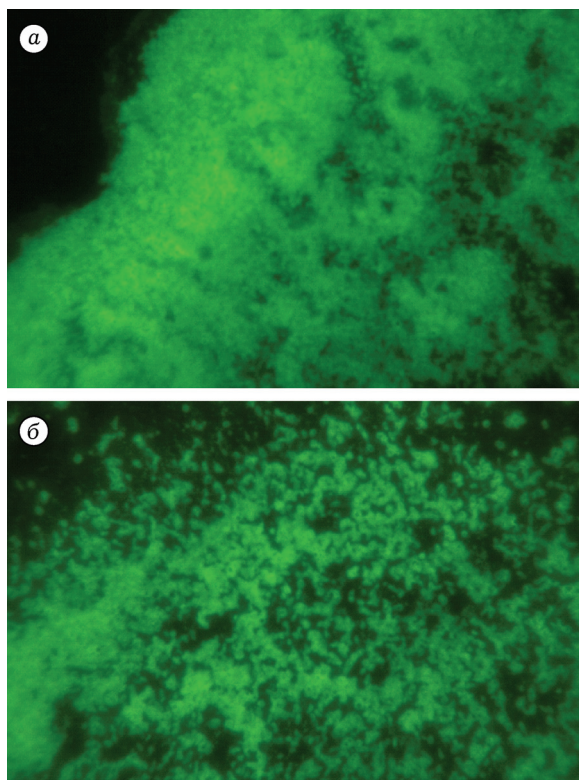


Рис. 4. Микроскопическая картина биопленки холерного вибриона через 90 сут инкубации. Холерная люминесцирующая сыворотка О1.  $\times 1000$ : а – периферическая структура (нетоксигенный *V. cholerae*) через 90 сут инкубации в воде; б – специфически светящиеся изолированные клетки и их компактные скопления (нетоксигенный *V. cholerae*)

*toxR*, а также ответственных за выработку маннозочувствительных пилей адгезии (*mshQ*) из EPI, формирование архитектуры биопленки (*mbaA1*, *mbaA2*) и продукцию экзополисахарида (*vpsR*) генов показали их наличие во всех изученных субкультурах, а гены вирулентности *ctxAB* и *tcpA* обнаружены у всех отобранных колоний токсигенного штамма от начала и до конца эксперимента.

Проведенным исследованием при культивировании в условиях комнатной температуры (22 °C) в голодной среде (автоклавированная водопроводная вода), параллельно – с добавлением в последнюю кристаллического или коллоидного хитина, выявлена способность эпидемического и неэпидемического штаммов холерного вибриона к образованию структурно организованной биопленки с сохранением в ней жизнеспособных клеток и их патогенного потенциала в течение срока наблюдения (90 сут).

С использованием светооптического (в том числе гистохимического, люминесцентного) метода исследования структуры биопленки нетоксигенного и токсигенного вибрионов с ранних сроков эксперимента обнаруживается периферическое образование из прикрепившихся к поверхности пробирки (на границе водной и воздушной среды) плотно прилегающих полиморфных (типичные, кокки, полые) вибрионов. Здесь же отходящие от него вглубь многократно ветвящиеся тяжи из вибрионов пронизывают метакроматически окрашенный розовый (кристаллвиолет, толуидиновый синий) или флуоресцирующий красновато-оранжевым цветом (акридиновый оранжевый) матрикс с включениями разрозненных клеток и разной величины их скоплений (конгломераты). Подобная окраска матрикса свидетельствует о содержании в его составе кислых мукополисахаридов (глюкозаминогликанов). Последние выявляются также снаружи периферической части биопленки, что обуславливает стабилизирующее взаимодействие бактерий с колонизируемой поверхностью на этапе необратимой адгезии [Way et al., 1998; Davey, O’Toole, 2000]. На молекулярно-генетическом уровне выработка экзополисахарида кодируется геном *vpsR*, выявленном в данном исследовании у обоих штаммов холерного вибриона. Кроме того, у них обнаружены фрагменты гена *mshQ* маннозочувствительного гемагглютинина острова персистенции EPI, способствующего колонизации холерным вибрионом абиотической поверхности, а также гены *mbaA1* и *mbaA2*, ответственные за формирование структуры биопленки.

Следует указать на располагающиеся под периферической частью структуры биопленки и между тяжами (в матриксе) светлые полости (каналы), которые, как полагают, являются жизненно важной “примитивной циркуляторной системой” [Davey, O’Toole, 2000].

При культивировании вибрионов в среде с добавлением хитина усиливается способность к формированию биопленки путем увеличения плотности структуры за счет количества и утолщения составляющих элементов (периферическое образование, тяжи, каналы), с множеством вибрионов, прикрепившихся к частицам хитина, а также их обильных скоплений (конгломератов). Это

обеспечивается хитиноподобной способностью вибрионов, причем продукты гидролиза хитина служат для них не только субстратом, способствующим формированию биопленки, но и источником питания (азота и углерода) [Connell et al., 1998; Pruzzo et al., 2008].

Таким образом, полученная в эксперименте микроскопическая картина с составляющими структуру элементами (периферическая часть, тяжи, полисахаридный матрикс, каналы, полиморфные вибрионы) представляет собой отделившуюся от стенок и опустившуюся на дно пробирки биопленку, сохранившую в своем составе при культивировании в голодной среде (автоклавируемая водопроводная вода) на протяжении срока эксперимента (90 сут) живые (окрашивание АО и рост на твердых питательных средах) клетки холерного вибриона.

Установлены некоторые различия в способности взятых в исследование штаммов холерного вибриона к формированию биопленки. Так, в начальные сроки эксперимента элементы биопленки более выражены у нетоксигенного штамма микроорганизма. Дальнейшее культивирование (14–21 сут) обоих штаммов ведет к значительному утолщению периферического образования и внутренних элементов (тяжей), что закономерно проявляется в присутствии кристаллического хитина. Позже (с 28 сут и до конца исследования) преобладает внутренняя структура в виде мощных тяжей и многочисленных светлых пространств (зрелая биопленка) преимущественно у токсигенного вибриона, сохранившего гены вирулентности *ctxAB*, *tcpA*.

Подобное многомесячное пребывание холерного вибриона в условиях дефицита питательных веществ и неоптимальной для его роста и развития температуры с сохранением живых клеток выявляет высокий адаптационный потенциал вибрионов разной эпидемической значимости.

Такая пластичность и лабильность к неблагоприятным факторам окружающей среды позволяют вибриону приспосабливаться к существованию в случае попадания в окружающую среду и даже приводить к длительной персистенции в водных объектах. Так, при осуществлении мониторинга поверхностных водоемов г. Иркутска в 2006 г. установлено присутствие на протяжении 2,5 мес.

холерного вибриона O139 серогруппы из проб воды и ила р. Ангара, взятых на расстоянии не далее 50 м от выпуска правобережных канализационных очистных сооружений (КОС). Выяснение причин многократного обнаружения здесь холерного вибриона показало, что его сохранение возможно либо в аэротенке, либо в одном или нескольких вторичных отстойниках, откуда он (размножаясь и сохраняясь, вероятнее всего, в составе биопленки, неуязвимый для бактерицидного действия хлора) попадает в составе сточных вод в контактные резервуары для обеззараживания методом хлорирования и далее, в р. Ангару. Единственной версией столь длительного выделения холерного вибриона O139 серогруппы (а наряду с этим нескольких штаммов RO-варианта микроба и вибрионов не O1/O139) является его сохранение в иловых отложениях в составе биопленки на этапах очистки сточных вод КОС.

Кроме того, представляет интерес подмеченный в ходе апробации сигнального метода ускоренного обнаружения холерного вибриона O1 и O139 в сезоны 2004–2006 гг. факт, когда при просмотре окрашенных флуоресцирующими иммуноглобулинами препаратов (из сконцентрированных и предварительно подвергнутых культивированию проб из водной окружающей среды г. Иркутска) выявлялись дающие специфическое свечение скопления полиморфных (в виде кокков, утолщенных палочек) клеток *V. cholerae* O1, что свидетельствует о возможности пребывания холерных вибрионов в воде поверхностных водоемов в виде конгломератов [Куликалова и др., 2009], по-видимому, представляющих собой отделившуюся часть биопленки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что способность холерного вибриона разной эпидемической значимости в условиях, приближенных к природным, к формированию биопленки с характерной для нее структурой является одной из его важных биологических характеристик.

Микроскопическая картина биопленки складывается из составляющих структуру элементов (периферическая часть, тяжи, розоватая субстанция, каналы, полиморфные вибрио-



ны). Высокая способность вибриона к адгезии на частицах хитина с образованием колоний и более отчетливо выраженная на этом фоне структура элементов биопленки указывает на значимость этого явления в поддержании жизнеспособности популяции возбудителя в водной среде. Охарактеризованная картина имеет некоторые особенности в зависимости от использованного штамма вибриона. У токсигенного холерного вибриона в сравнении с нетоксигенным более замедленный в ранние сроки характер формирования элементов структуры с дальнейшим их укрупнением и образованием мощной зрелой биопленки с сохранением генотипа исходного штамма. Пребывание холерного вибриона в таком структурно организованном автономном сообществе обеспечивает ему жизнеспособное состояние в близких к природным экологических условиях с сохранением исходного эпидемического потенциала в течение трех месяцев наблюдения.

Все это свидетельствует о высоких адаптационных свойствах возбудителя холеры к неблагоприятным условиям внешней среды со способностью к резервации и, при наличии экологических ниш (с оптимальными для циркуляции микроорганизма экологическими предпосылками – температура, наличие хитинсодержащего субстрата и др.), к выживанию, размножению и возможному распространению в поверхностных водоемах.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Бухарин О. В. Проблемы персистенции патогенов в инфектологии // Журн. микробиол. 2006. № 4. С. 1–8.
- Водопьянов С. О., Мишанькин М. Б., Олейников И. П. Разработка способа выявления гена *tcrA* холерного вибриона биотипа эльтор и сероварианта O139 Бенгал с помощью полимеразной цепной реакции // Биотехнология. 1999. № 6. С. 19–23.
- Гинцбург А. Л., Ильина Т. С., Романова Ю. М. “Quorum sensing” или социальное поведение бактерий // Журн. микробиол. 2003. № 5. С. 86–93.
- Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Марамович А. С., Миронова Л. В., Саппо С. Г. Способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп к образованию биопленки в эксперименте // Холера и патогенные для человека вибрионы: мат-лы проблемной комиссии Координационного науч. совета по сан-эпидемиол. охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону. 2009. № 22. С. 90–93.
- Куликалова Е. С., Урбанович Л. Я., Миронова Л. В., Балахонов С. В., Марамович А. С., Кожевникова А. С., Ганин В. С., Шкаруба Т. Т. Оптимизация методов сигнальной детекции детерминант холерного вибриона в системе эпиднадзора за холерой // Эпидемиол. и инф. болезни. 2009. № 6. С. 24–29.
- Куликалова Е. С., Саппо С. Г., Урбанович Л. Я., Марков Е. Ю., Миронова Л. В., Балахонов С. В. Способность холерного вибриона к образованию биопленки и оценка ее структуры // Деп. в ВИНТИ. 2011. № 467-В 2011. 32 с.
- Методические указания МУК 4.2.2218-07. Лабораторная диагностика холеры. М., 2007.
- Пирс Э. Гистохимия / пер. с англ. М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1962. 950 с.
- Соколенко А. В., Мухина Т. Н. Сравнительная характеристика некоторых форм выживания патогенных бактерий // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2006. № 3. С. 54–58.
- Чемисова О. С., Алексеева Л. П., Мазрухо Б. Л., Шестигалтынова И. С., Татаренко О. А. Изучение формирования биопленок штаммами *Vibrio cholerae* El Tor // Холера и патогенные для человека вибрионы. Мат-лы совещания спец. Роспотребнадзора и проблемной комиссии Координационного науч. совета по сан-эпидемиол. охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону, 2008. № 21. С. 72–74.
- Alam M., Sultana M., Nair G. B., Sack R., Sack D., Siddique A. Toxigenic *Vibrio cholerae* in the Aquatic Environment of Mathbaria, Bangladesh // Appl. Environ. Microbiol. 2006. Vol. 72, N 4. P. 2849–2855.
- Alam M., Sultana M., Nair G. B., Siddique A. K., Nasan N. A., Sack R. B., Sack D. A., Ahmed K. U., Sadique A., Watanabe H., Grim C. J., Huq A., Colwell R. R. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104, N 45. P. 17 801–17 806.
- Baptista M. A. S., Andrade J. R., Vicente A.C. The Amazonia variant of *Vibrio cholerae*: molecular identification and study of virulence genes // Mem. Inst. Oswaldo. Crus. 1998. Vol. 93, N 5. P. 601–607.
- Bomchil N., Watnick P., Kolter R. Identification and characterization of a *Vibrio cholerae* gene, *mbaA*, involved in maintenance of biofilm architecture // J. Bacteriol. 2003. Vol. 185, N 4. P. 1384–1390.
- Connell T. D., Metzger D. J., Lynch J., Folster J. P. Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae* // J. Bacteriol. 1998. N 180. P. 5591–5600.
- Costerton J. W., Lewandowski Z., DeBeer D., Caldwell D., Korber D., James G. Biofilms, the customized microniche // J. Bacteriol. 1994. Vol. 176, N 8. P. 2137–2142.
- Davey M. E., O’Toole G. A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000. Vol. 64, N 4. P. 847–867.
- Faruque S. M., Biswas K., Udden S. M., Ahmad Q. S., Sack D. A., Nair G. B., Mekalanos J. J. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. Vol. 103, N 16. P. 6350–6355.
- Hall-Stoodley L., Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens // Trends Microbiol. 2005. Vol. 13, N 1. P. 7–10.
- Huq A., Whitehouse C. A., Grim C. J., Alam M., Colwell R. R. Biofilms in water, its role and impact in



- human disease transmission // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008. Vol. 19, N 3. P. 244–247.
- Kamruzzaman M., Udden S. M. N., Cameron D. E., Calderwood S. B., Nair G. B., Mekalanos J. J., Faruque S. M. Quorum-regulated biofilms enhance the development of conditionally viable, environmental *Vibrio cholerae* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. Vol. 107, N 4. P. 1588–1593.
- Koch W. H., Payne W. L., Wentz B. A., Cebula T. A. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods // *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. Vol. 59, N 2. P. 556–560.
- Kumar P., Peter W. A., Thomas S. Rapid detection of virulence-associated genes in environmental strains of *Vibrio cholerae* by multiplex PCR // *Curr. Microbiol.* 2010. Vol. 60, N 3. P. 199–202.
- Meibom K. L., Blokesch M., Dolganov N. A. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae* // *Science.* 2005. Vol. 310, N 5755. P. 1824–1827.
- Mitra R. K., Nandy R. K., Ramamurthy T. Molecular characterization of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalized patients with diarrhea // *J. Med. Microbiol.* 2001. N 502. P. 268–276.
- Moorthy S., Watnick P. J. Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development // *Mol. Microbiol.* 2005. Vol. 57, N 6. P. 1623–1635.
- Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin // *Environ. Microbiol.* 2008. Vol. 10, N 6. P. 1400–1410.
- Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin // *J. Bacteriol.* 2005. Vol. 187, N 10. P. 3551–3555.
- Toma C., Kuroki H., Nakasone N., Ehara M., Iwanaga M. Minor pilin subunits are conserved in *Vibrio cholerae* type IV pili // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2002. Vol. 23. P. 35–40.
- Watnick P. I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm // *Mol. Mikrobiol.* 1999. N 34. P. 586–595.
- Way S. N., Mizunoe Y., Takade A., Kawabata S.-I., Yoshida S.-I. *Vibrio cholerae* O1 Strain TSI-4 Produces the Exopolysaccharide Materials That Determine Colony Morphology, Stress Resistance, and Biofilm Formation // *Appl. Environ. Microbiol.* 1998. Vol. 64, N 10. P. 3648–3655.
- Yang M., Frey E. M., Liu Z., Zhu J. The Virulence Transcriptional Activator AphA Enhances Biofilm Formation by *Vibrio cholerae* by Activating Expression of the Biofilm Regulator VpsT // *Infect. Immun.* 2010. Vol. 78, N 2. P. 697–703.
- Yildiz F. H., Dolganov N. A., Schoolnik G. K. VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPSETr-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor // *J. Bacteriol.* 2001. Vol. 183. P. 1716–1726.
- Zhao Y., Park R. D., Muzzarelli R. A. Chitin deacetylases: properties and applications // *Mar. Drugs.* 2010. N 8. P. 24–46.

## Model of the *Vibrio Cholerae* Biofilm as a Mechanism of its Existence in Surface Water Reservoirs

E. S. KULIKALOVA, S. G. SAPPO, L. Ya. URBANOVICH, E. Yu. MARKOV,  
L. V. MIRONOVA, S. V. BALAKHONOV

*Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor*  
664047, Irkutsk, Trilisser str., 78  
E-mail: e.kulikalova@yandex.ru

*Vibrio cholerae* eltor strains with different epidemic importance isolated from river water in Vladivostok during the cholera outbreak (1999) and in Irkutsk during the disease-free period (2005) were used in the experiment. Biofilm structure consisting of a peripheral part, bundles, polysaccharide matrix, channels and polymorphic vibrios is presented using light and luminescent microscopy. Metachromatic pink colouring of the matrix (crystal-violet, toluidine blue) or fluorescent reddish-orange colour (acridine orange) indicate that acid mucopolysaccharides (glucosamineglucans) are present in its structure. Biofilm of a toxigenic strain is formed much later than the non-toxigenic strain biofilm, and the elements making its structure are more apparent. Viability of *V. cholerae* cells during the whole experiment (90 days) and preservation of initial pathogenic potential indicate high adaptive properties of *V. cholerae* eltor that provide its survival and reproduction in surface water reservoirs under favourable ecological conditions (optimum temperature, existence of a chitin-containing substratum, etc.).

**Key words:** *Vibrio cholerae* eltor, biofilm, structure, genotype, chitin.