

Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака

Е.А.Меньшикова, Е.М.Курбатова, С.О.Водопьянов, С.В.Титова, А.В.Миронова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В статье приведены данные по изучению влияния температуры на межродовую конкуренцию *Vibrio cholerae* и представителя аутохтонной микрофлоры поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону *Aeromonas hydrophila* на хитине речного рака. Большинство исследований посвящено изучению моновидовой биопленки, в то время как в природе, как правило, в биопленках сосуществуют несколько видов микроорганизмов в виде единого сообщества.

Для оценки способности холерных вибрионов преодолевать антагонизм со стороны конкурирующего штамма при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака был разработан доступный метод определения коэффициента ингибции (КИ), основанный на конкурентной активности холерных вибрионов при совместном культивировании с аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов как в планктонной форме, так и в составе биопленок. С помощью этого метода установили, что при 10°C холерные вибрионы не способны конкурировать с гетерологичным штаммом и образовывать биопленку на хитиновом панцире речного рака. В условиях, моделирующих весеннюю температуру в водоемах (15°C), холерные вибрионы преодолевали антагонистическое действие конкурентного штамма при формировании сложной биопленки и в планктонной форме. При температуре 28°C *V. cholerae* способны подавлять штамм-конкурент при формировании биопленки как на поверхности хитина, так и в супернатантах над хитиновыми пластинами. Повышением температуры воды поверхностных водоемов и, как следствие, возрастанием антагонистической активности холерных вибрионов при межродовой конкуренции, вероятно, можно объяснить тот факт, что холерные вибрионы теперь можно обнаружить в тех областях, где они ранее не выделялись.

Ключевые слова: коэффициент ингибции, хитиновый панцирь, биопленка, температура среды культивирования, холерный вибрион

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Титова С.В., Миронова А.В. Межродовая конкуренция при формировании сложной биопленки *Vibrio cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака. Бактериология. 2019; 4(1): 50–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-50-53

Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autochthonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish

E.A.Menshikova, E.M.Kurbatova, S.O.Vodopyanov, S.V.Titova, A.V.Mironova

Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

The article presents data on the effect of temperature on the intergeneric competition of *Vibrio cholerae* and the representative of the autochthonous microflora of surface water bodies of the city of Rostov-on-Don *Aeromonas hydrophila* on chitin of crayfish. Most studies are devoted to the study of monovid biofilms, while in nature, as a rule, several types of microorganisms coexist in biofilms as a single community.

To assess the ability of *Vibrio cholerae* to overcome antagonism from a competing strain in the formation of a complex biofilm on the chitinous shell of a crayfish, an accessible method was developed for determining the competitive activity (inhibition rate) of *Vibrio cholerae* when co-cultivated with surface autochthonous microflora in both planktonic form and in composition biofilms. Using this method, it was established that at 10°C, *Vibrio cholerae* are not able to compete with the heterologous strain and form a biofilm on the chitinous shell of crayfish. Under conditions simulating spring temperature in water bodies (15°C), *Vibrio cholerae* overcame the antagonistic action of a competitive strain in the formation of a complex biofilm and in planktonic form. At a temperature of 28°C, *V. cholerae* is capable of suppressing a competing strain in the formation of a biofilm both on the surface of chitin and in the supernatants above the chitinous plates. The increase in water temperature in surface water bodies

Для корреспонденции:

Меньшикова Елена Аркадьевна, руководитель группы, старший научный сотрудник экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40

Телефон: (863) 240-9108

E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

Статья поступила 17.02.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Elena A. Menshikova, head of the *V. cholerae* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rosпотребнадзор

Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Phone: (863) 240-9108

E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

The article was received 17.02.2019, accepted for publication 25.03.2019

and, as a result, an increase in the antagonistic activity of *Vibrio cholerae* during intergeneric competition, explains the fact that *Vibrio cholerae* can now be found in areas where they have not previously been identified.

Keywords: inhibition coefficient, chitin shell, biofilm, temperature of culture medium, *Vibrio cholerae*

For citation: Menshikova E.A., Kurbatova E.M., Vodopyanov S.O., Titova S.V., Mironova A.V. Intergenous competition in the formation of a complex biofilm of *Vibrio cholerae* and autokhtonic microflora of waters on the chitin panzer of crayfish. Bacteriology. 2019; 4(1): 50–53. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-50-53

На сегодняшний день известно, что большинство бактерий существуют в природе как в виде отдельных клеток, так и в виде специфически организованных комплексов со сложной трехмерной архитектурой и ярко выраженной коммуникацией – биопленок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ в условиях воздействия неблагоприятных факторов внешней среды и организма-хозяина [1, 2].

Способность холерных вибрионов образовывать биопленки привлекает внимание ученых у нас в стране и за рубежом. Однако механизмы, поддерживающие существование эндемичных по холере территорий, пока полностью не определены [3–5]. Одним из важнейших свойств вибрионов является их способность противостоять неблагоприятным факторам окружающей среды, в том числе меж- и внутривидовой конкуренции. Попадая в окружающую среду, вибрионы взаимодействуют прежде всего с микробным сообществом, которое является первичным звеном любых биоценозов и экосистем. Большинство исследований посвящено изучению моновидовой биопленки, в то время как в биопленках естественного происхождения сосуществуют несколько видов микроорганизмов в виде единого сообщества. Установлено, что в биопленке физиологические процессы бактерий (продукция метаболитов и биологически активных веществ) отличаются от таковых в чистых планктонных культурах бактерий [6, 7]. Взаимодействие между микроорганизмами в биопленке может носить как антагонистический (конкуренция за питательные вещества), так и синергический характер [8, 9]. Следует отметить, что влияние абиотических и биотических факторов на формирование холерным вибрионом биопленки и их взаимоотношения с различными представителями водной биоты до настоящего времени изучены недостаточно, так как любое изменение одного из этих факторов может существенно влиять на структуру и динамику сообщества биопленки.

Целью работы явилось изучение влияния температуры на формирование сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака и межродовую конкуренцию *V. cholerae* с представителем аутохтонной микрофлоры поверхностных водоемов.

Материалы и методы

Для изучения влияния температуры на образование сложной биопленки холерными вибрионами и аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону был разработан простой и удобный метод на хитине речного рака *Astacus astacus*. Метод отвечает всем требованиям биологической безопасности [10].

В работе использовали штаммы *V. cholerae* El Tor P-19613 *ctxAB*⁺ (2014 г.), P-20000 *ctxAB*⁻ (2016 г.), *V. cholerae*

nonO1/nonO139 P-30 *ctx*⁻ (2017 г.) и штамм *Aeromonas hydrophila*, изолированные из рек Дон и Темерник г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинговых исследований проб воды.

Суточные культуры холерных вибрионов и *A. hydrophila*, выращенные на агаре Мартена pH 7,4 ± 0,2 при температуре 37°C, суспендировали в физиологическом растворе pH 7,2 и засеивали в равных количествах в 30 мл стерильной речной воды, содержащей фрагменты хитинового панциря речного рака размером 0,5 × 0,5 см и весом 100 ± 0,2 мг до конечной концентрации 104 м.к./мл. В качестве контролей использовали монокультуры в тех же концентрациях и условиях. Опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды (10°C – осень, 15°C – весна и 26–28°C – лето).

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) фрагменты хитина извлекали стерильным пинцетом, промывали физиологическим раствором от несвязавшихся клеток и вносили в стандартные пробирки эппендорф емкостью 1,5 мл с 1,0 мл физраствора. Для подсчета вибрионов в планктонной форме методом ПЦР отбирали по 300 мкл супернатанта над хитиновыми фрагментами. Лизис клеток биопленки проводили путем прогревания в течение 30 мин при 99°C на термостате «Термит». Полученные препараты использовали для постановки ПЦР в формате реального времени со специфическими праймерами к гену *hlyA* [11]. Учет реакции проводили по наличию или исчезновению полосы специфического ампликона, характерного для каждого штамма вибрионов. Наличие/отсутствие роста исследуемых штаммов параллельно подтверждали бактериологическим методом, используя методику истощающих отпечатков хитиновых пластинок на поверхности плотных питательных сред. Высевы проводили ежедневно в течение первой недели, затем один раз в неделю в течение 28 сут (период наблюдения).

Результаты и обсуждение

Для оценки способности холерных вибрионов преодолевать антагонизм со стороны конкурирующего штамма при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака нами был введен показатель «коэффициент ингибиции» (КИ), который рассчитывали как отношение количества копий ДНК исследуемого штамма *V. cholerae* в присутствии гетерологичного штамма-конкурента в составе сложной биопленки к количеству копий ДНК того же штамма холерных вибрионов, культивируемого как монокультура. Аналогично рассчитывали КИ холерных вибрионов в планктоне. В условиях, моделирующих температуру воды осенью в водоемах г. Ростова-на-Дону (10°C), установили, что КИ нетоксигенного штамма холерных вибрионов в био-

Таблица. Коэффициент ингибции при формировании сложной биопленки *V. cholerae* и аутохтонной микрофлоры водоемов на хитиновом панцире речного рака и в планктоне

№ штамма и наличие <i>ctx</i> -гена	t, °C	Время инкубации, сут					
		1	3	6	14	21	28
		Коэффициент ингибции (БП/ПЛ)					
<i>V. cholerae</i> El Tor P-20000 (<i>ctx</i> ⁻) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,5/0,3	0,3/0,41	0,5/0,4	0,5/0,06	0,25/0,05	–
	15	0,6/0,5	0,45/1,6	0,4/4,0	0,9/0,8	1,7/1,4	1,7/0,9
	28	2,3/1,3	1,6/0,3	2,5/2,9	1,7/1,3	1/1,6	1,5/1,1
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 №30 (<i>ctx</i> ⁻) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,2/0,2	0,6/0,41	0,6/0,42	0,1/0,5	0,1/0,02	–
	15	5,4/7,5	3/4,4	3/1,4	3/3,8	3/3,7	5,7/23
	28	1,5/3,5	3/0,5	1,4/3,6	0,7/6	2,3/4,4	1,5/3,5
<i>V. cholerae</i> El Tor P-19613 (<i>ctx</i> ⁺) + <i>A. hydrophila</i>	10	0,08/0,06	0,08/0,58	0,28/0,82	0,28/0,11	0,10/0,06	–
	15	0,03/0,13	0,04/0,06	0,05/0,07	0,09/1,33	0,30/0,01	0,14/0,21
	28	2,3/1,4	1,6/0,03	2,5/3	1,7/1,3	1/1,6	1,5/1,4

«→» ДНК *V. cholerae* не обнаружено. БП – биопленка; ПЛ – планктон.

пленке на 21-е сутки культивирования уменьшился в 2 раза, в планктонной форме – в 6 раз по сравнению с исходной концентрацией в опытных пробах. При высеве на агаровые среды установили, что в супернатантах над хитином штаммы холерных вибрионов перестали высеваться на 8-е, а в отпечатках хитиновых пластин на плотных питательных средах – на 14-е сутки. В то же время, по данным ПЦР, специфическая ДНК в этих пробах сохранялась до 21 дня. Возможным объяснением данного факта является переход вибрионов в этот период в некультивируемое состояние [12]. В контрольной пробе (моновидовая биопленка) единичные колонии в отпечатках хитиновых пластин на плотных питательных средах сохранялись до 17 сут, в планктоне – до 14 сут соответственно.

Концентрация гетерологичного штамма *A. hydrophila* как в контрольной, так и в опытной пробе оставалась на уровне $n \times 10^6$ – 10^7 КОЕ/мл в планктоне и в биопленке соответственно весь срок наблюдения (28 дней).

В условиях, моделирующих температуру воды в водоемах весной (15°C), холерные вибрионы были способны конкурировать с *A. hydrophila* при формировании сложной биопленки. КИ холерных вибрионов к 28-м суткам культивирования в сложной биопленке на хитине речного рака увеличился у *ctxAB*⁺ с 0,03 (1-е сутки) до 0,14 (28-е сутки), *ctxAB*⁻ – с 0,6 до 1,7 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 *ctx*⁻ – с 5,4 до 5,7. В супернатантах над хитином КИ токсигенного штамма был выше, чем в биопленке, и увеличился от 0,13 до 0,21 соответственно; у нетоксигенного штамма был ниже, чем в биопленке: от 0,5 в первые сутки до 0,9 на 28-е сутки. У холерных вибрионов неO1/неO139 КИ в планктонной форме увеличился от 7,5 до 23. Концентрация *A. hydrophila* к 28-м суткам культивирования уменьшилась и составляла 1×10^3 КОЕ/мл в планктоне и в биопленке против 1×10^7 КОЕ/мл в контрольной пробе.

В условиях, моделирующих температуру водоемов в реках Дон и Темерник летом (28°C), на хитиновых пластинах и в супернатанте над хитином холерные вибрионы на 14-е сутки совместного культивирования практически полностью подавили рост *A. hydrophila*. В контрольных пробах (без присутствия холерных вибрионов) концентрация *A. hydrophila* сохранялась на одном уровне с незначительными изменениями в пределах одного порядка (10^6 – 10^7 м.к./мл) весь период наблюдения. КИ штаммов *V. cholerae* O1 как в биопленке, так и в планктоне к концу периода наблюдения или оставался на уровне первоначальных значений, или не-

значительно снижался (таблица). Снижение КИ в обеих формах существования холерных вибрионов, возможно, объясняется отсутствием штамма-конкурента в среде культивирования, что подтверждалась бактериологическими посевами.

Таким образом, разработан доступный метод определения конкурентной способности (КИ) холерных вибрионов при совместном культивировании с аутохтонной микрофлорой поверхностных водоемов как в планктонной форме, так и в составе биопленок. Экспериментально установлено, что температура среды культивирования влияла на конкурентоспособность холерных вибрионов в свободной (планктонной) форме и при формировании сложной биопленки на хитиновом панцире речного рака. При 10°C холерные вибрионы не способны образовывать биопленку на хитиновом панцире речного рака и, соответственно, конкурировать с гетерологичным штаммом. В условиях, моделирующих весеннюю температуру в водоемах (15°C), холерные вибрионы преодолевали антагонистическое действие конкурентного штамма в планктонной форме и при формировании сложной биопленки. При температуре 28°C *V. cholerae* способны подавлять штамм-конкурент при формировании биопленки как на поверхности хитина, так и в супернатантах над хитиновыми пластинами. Долгосрочным повышением температуры воды поверхностных водоемов и, как следствие, возрастанием антагонистической активности холерных вибрионов при межродовой конкуренции объясняется тот факт, что холерные вибрионы теперь можно обнаружить в тех областях, где они ранее не выделялись. Данное наблюдение может объяснить более широкое, глобальное распространение возбудителя холеры за пределы эндемичных регионов.

Полученные нами данные могут быть полезны для прогнозирования эпидемиологической ситуации, так как способность холерных вибрионов колонизировать объекты окружающей среды и преодолевать антагонизм со стороны аутохтонной микрофлоры водоемов может привести к накоплению возбудителя в случае заноса с эндемичных по холере территорий.

Литература

1. Tamayor R, Patimalla B, Camilli A. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. Infect Immun. 2010 Aug;78(8):3560-9. DOI: 10.1128/IAI.00048-10

2. Burmolle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sorensen SJ. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 2014 Feb;22(2):84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004
3. Водопьянов СО, Титова СВ, Водопьянов АС, Олейников ИП, Лысова ЛК. Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках. Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Серия: Естественные Науки. 2016;1(189):49-53.
4. Титова СВ, Веркина ЛМ. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(4):238-41. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241
5. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb 4;10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330
6. Sun S, Xiang, Q, Tay M, Kjelleberg S, Rice SA, McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015 Aug;9(8):1812-20. DOI: 10.1038/ismej.2014.265
7. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Sep;36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
8. Бухарин ОВ, Немцова НВ. Микробиология биоценозов поверхностных водоемов. Екатеринбург, 2008, 151 с.
9. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Sep;36(5):972-89. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
10. Сп 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». 2013, 150 с.
11. Водопьянов СО, Титова СВ, Водопьянов АС, Веркина ЛМ, Олейников ИП, Писанов РВ, и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках. Здоровье населения и среда обитания. 2017;3(288):51-4.
12. Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar RC, Losano L, Ignacio MR, Orta de Velásquez MT. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2018 Aug 1;365(15). DOI: 10.1093/femsle/fny156
6. Sun S, Xiang, Q, Tay M, Kjelleberg S, Rice SA, McDougald D. Quorum sensing-regulated chitin metabolism provides grazing resistance to *Vibrio cholerae* biofilms. *ISME J.* 2015 Aug;9(8):1812-20. DOI: 10.1038/ismej.2014.265
7. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Sep;36(5):990-1004. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00325.x
8. Бухарин ОВ, Немцова НВ. Микробиология биоценозов поверхностных водоемов. Екатеринбург, 2008, 151 с.
9. Rendueles O, Ghigo JM. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. *FEMS Microbiol Rev.* 2012 Sep;36(5):972-89. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00328.x
10. Сп 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)». 2013, 150 с.
11. Водопьянов СО, Титова СВ, Водопьянов АС, Веркина ЛМ, Олейников ИП, Писанов РВ, и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках. Здоровье населения и среда обитания. 2017;3(288):51-4.
12. Casasola-Rodríguez B, Ruiz-Palacios GM, Pilar RC, Losano L, Ignacio MR, Orta de Velásquez MT. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RT-Real Time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiol Lett.* 2018 Aug 1;365(15). DOI: 10.1093/femsle/fny156

References

1. Tamayor R, Patimalla B, Camilli A. Growth in a Biofilm Induces a Hyperinfectious Phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 2010 Aug;78(8):3560-9. DOI: 10.1128/IAI.00048-10
2. Burmolle M, Ren D, Bjarnsholt T, Sorensen SJ. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter? *Trends Microbiol.* 2014 Feb;22(2):84-91. DOI: 10.1016/j.tim.2013.12.004
3. Vodop'yanov SO, Titova SV, Vodop'yanov AS, Oleinikov IP, Lysova LK. Analysis of Intraspecific Competition in *Vibrio Cholerae* Biofilms. *University News. North-Caucasian Region. Natural Sciences Series.* 2016;1(189):49-53. (In Russian).
4. Titova SV, Verkina LM. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics.* 2016;61(4):238-41. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241 (In Russian).
5. Silva AJ, Benitez JA. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016 Feb 4;10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330

Информация об авторах:

Курбатова Екатерина Михайловна, научный сотрудник группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9108

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266
E-mail: serge100v@gmail.com

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, директор ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-7908
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Миронова Анна Витальевна, лаборант группы экологии холерных вибрионов лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9108

Information about authors:

Ekaterina M. Kurbatova, researcher of *V. cholera* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9108

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, head of the laboratory of biochemistry of microbes, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266
E-mail: serge100v@gmail.com

Svetlana V. Titova, MD, PhD, director of Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-7908
E-mail: titova_sv@antiplague.ru

Anna V. Mironova, laboratory assistant of *V. cholera* group, laboratory of microbiology of cholera, Rostov-on-Don Anti-plague Institute of Rospotrebnadzor
Address: 117/40 Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9108