

Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние

Е.А.Меньшикова, С.В.Титова, С.О.Водопьянов, М.Г.Мелоян, Н.А.Селянская, В.Д.Кругликов

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

В настоящее время имеются многочисленные сведения о переходе в некультивируемое состояние *Vibrio cholerae*, находящихся в планктонной форме.

Целью работы явилось изучение влияния одного из абиотических факторов (температуры культивирования) на переход *V. cholerae* O1 El Tor в некультивируемое состояние из биопленочной формы этих микроорганизмов в эксперименте.

Материалы и методы. В работе использовали штаммы, выделенные в разные годы из воды поверхностных водоемов: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* и *ctxA tcpA*. Способность холерных вибрионов формировать биопленку изучали, используя в качестве биотического субстрата хитин широкопалого речного рака *Astacus astacus*.

Результаты. Для изучения возможно персистенции холерных вибрионов в поверхностных водоемах в случае заноса с эндемичных территорий опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды в летний и осенне-зимний периоды в г. Ростове-на-Дону ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ и $6 \pm 1^\circ\text{C}$). Экспериментально показано, что, независимо от гена *ctx*, холерные вибрионы в состоянии зрелой биопленки в условиях, моделирующих среднюю температуру в зимний период, способны переходить в некультивируемые формы и сохранять жизнеспособность в течение длительного времени, в то время как в контрольных пробах (планктонная форма) жизнеспособных микроорганизмов не обнаружено.

Ключевые слова: холерные вибрионы, биопленка, планктон, некультивируемые формы, температура

Для цитирования: Меньшикова Е.А., Титова С.В., Водопьянов С.О., Мелоян М.Г., Селянская Н.А., Кругликов В.Д. Влияние температуры на переход *Vibrio cholerae* O1 El Tor из биопленки в некультивируемое состояние. Бактериология. 2024; 9(2): 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13

Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state

E.A.Menshikova, S.V.Titova, S.O.Vodopyanov, M.G.Meloyan, N.A.Selyanskaya, V.D.Kruglikov

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Currently, there is numerous information about the transition of *Vibrio cholerae*, which are in planktonic form, to an uncultivated state.

The purpose of the work was to study the influence of one of the abiotic factors (cultivation temperature) on the transition of *V. cholerae* O1 El Tor to the uncultivable state from the biofilm form of these microorganisms in an experiment.

Materials and methods. The work used strains isolated in different years from the water of surface reservoirs: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* and *ctxA tcpA*. The ability of *V. cholerae* to form a biofilm was studied using chitin from the broad-toed crayfish *Astacus astacus* as a biotic substrate.

Results. To study the possible persistence of cholera vibrios in surface reservoirs in case of drift from endemic territories, experimental and control samples were cultured at a temperature corresponding to environmental conditions in summer and autumn-winter periods in Rostov-on-Don ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ and $6 \pm 10^\circ\text{C}$). It has been experimentally shown that, regardless of the *ctx* gene, cholera vibrios in a mature biofilm state under conditions simulating average temperature in winter are able to transition into uncultivated forms and remain viable for a long time, while no viable microorganisms were found in control samples (planktonic form).

Key words: cholera vibrios, biofilm, plankton, uncultivable forms, temperature.

For citation: Menshikova E.A., Titova S.V., Vodopyanov S.O., Meloyan M.G., Selyanskaya N.A., Kruglikov V.D. Influence of temperature on the transition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from biofilm to the unculturable state. Bacteriology. 2024; 9(2): 8–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-2-8-13

Для корреспонденции:

Меньшикова Елена Аркадьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ 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 22.05.2024, принята к печати 28.06.2024

For correspondence:

Elena A. Menshikova, PhD in Biological Sciences, Senior Researcher department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

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

Phone: (863) 240-9108

E-mail: menshikova_ea@antiplague.ru

The article was received 22.05.2024, accepted for publication 28.06.2024

Холерные вибрионы обладают высокой пластичностью генома и рядом приспособительных реакций, которые позволяют им адаптироваться и сохраняться в окружающей среде, переживать стрессовые факторы, такие как недостаток питательных веществ, колебания солености воды и температуры, защищаться от хищных гетеротрофных протистов и бактериофагов [1–3]. Одна из стратегий выживания холерных вибрионов – это формирование биопленки, что ассоциируется с повышенной стрессоустойчивостью, расширением доступа к питательным веществам [4]. Самым распространенным в окружающей среде и наиболее экологически важным субстратом является хитин. Формирование биопленки холерными вибрионами на хитиновых субстратах ведет к появлению новых экологических ниш для сохранения и переноса возбудителя в новые регионы с вероятностью возникновения новых очагов холеры [1, 5]. M.Sultana et al. (2018), исследуя поверхностные водоемы, пришли к выводу, что биопленки являются средством персистенции и неотъемлемой частью годового жизненного цикла *Vibrio cholerae* в водоемах Бангладеш. Проводя мониторинг поверхностных водоемов в течение года, было установлено, что в весенне-летний период холерные вибрионы находятся в планктонной форме и это совпадает с ежегодными сезонными вспышками холеры в этом регионе. В межэпидемический период холерные вибрионы сохраняются в форме биопленки, прикрепленные к планктону или другим субстратам, а также в некультивируемой форме (НФ) [6]. Феномен некультивируемости приобрел широкую известность благодаря работам R.R.Colwell et al. (1981), когда в пробах воды из Чесапикского залива и эстуариев были обнаружены не выявлявшиеся бактериологически *V. cholerae*. Позже, при обнаружении их на поверхности ракообразных и водорослей в планктоне и бентосе, присоединенными к кладке яиц хирономид, а также взвешенными в бактериопланктоне, было высказано мнение о значимости этой формы холерных вибрионов в выживании возбудителя холеры в окружающей среде [7]. Ряд авторов после многочисленных экспериментов по дифференциации вегетативных клеток микроорганизмов и НФ установили, что в отличие от клеток, испытывающих необходимость в каком-либо компоненте среды, в некультивируемом состоянии клетки не растут на искусственных питательных средах, в электронном микроскопе НФ холерных вибрионов имеют меньшие размеры, округлую форму, утрачивают жгутик, но остаются метаболически активными [8–12].

Следует отметить, что НФ холерных вибрионов сохраняют вирулентность и способность к колонизации [10]. Существует множество условий, которые вызывают переход холерных вибрионов в НФ, однако имеются факторы, благодаря которым происходит полное восстановление функции роста, например, повышение температуры или увеличение количества питательных веществ в среде обитания [13]. Вместе с тем остается актуальным вопрос о переходе холерных вибрионов из биопленки, сформированной на «природном» хитине, в некультивируемое состояние, поскольку все сведения о НФ в основном касаются исключительно планктонной формы.

Целью работы явилось изучение в эксперименте влияния температуры культивирования на переход *V. cholerae* O1 El Tor в некультивируемое состояние из биопленочной формы.

Материалы и методы

В работе использовали штаммы, выделенные в разные годы из воды поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону: *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* P-19613 (река Темерник, 2014 г.) и *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA+tcpA+* P-20000 (река Дон, 2016 г.).

Способность холерных вибрионов формировать биопленку изучали запатентованным способом, используя в качестве биотического субстрата хитин широкопалого речного рака *Astacus astacus* [14]. Фрагменты хитинового панциря речного рака помещали во флаконы с 30,0 мл речной воды и автоклавировали при 132°C 30 мин. Исследуемые штаммы добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 104 м.к./мл. В качестве контролей служили эти же штаммы в тех же условиях, но без биотического субстрата в среде культивирования.

Мониторинг данных температуры поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону за 5 лет (2018–2022 гг.) проводили, используя информацию с сайта <https://pogoda1.ru/water/rekadon2022>. Анализ динамики температуры в поверхностных водоемах г. Ростова-на-Дону за 5 лет (2018–2022 гг.) показал, что значение среднемесячной температуры в зимний период составляет $6,4 \pm 0,39^\circ\text{C}$, в летний – $25,6 \pm 0,35^\circ\text{C}$ [15].

Для изучения возможной персистенции холерных вибрионов в поверхностных водоемах в случае заноса с эндемичных территорий опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды в летний и осенне-зимний периоды в г. Ростове-на-Дону ($25 \pm 1^\circ\text{C}$ и $6 \pm 1^\circ\text{C}$).

Детекцию и количественный учет жизнеспособных холерных вибрионов, находящихся в биопленке, планктоне и НФ, проводили методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) [16]. Полученные значения заносили в электронные таблицы Microsoft Office Excel 2016, используя десятичный логарифм.

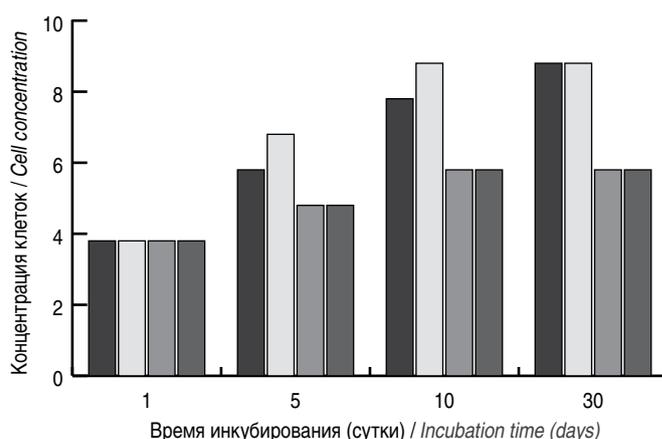


Рис. 1. Концентрация клеток штаммов *V. cholerae* O1 в планктонной форме и биопленке ($25 \pm 1^\circ\text{C}$): ■ – биопленка *V. cholerae* 19613, □ – биопленка *V. cholerae* 20000, ■ – контроль *V. cholerae* 19613, □ – контроль *V. cholerae* 20000. По оси ординат – концентрация клеток в lg (м.к./мл).

Fig. 1. Cell concentration of *V. cholerae* O1 strains in planktonic form and biofilm ($25 \pm 1^\circ\text{C}$): ■ – biofilm of *V. cholerae* 19613, □ – biofilm of *V. cholerae* 20000, ■ – control *V. cholerae* 19613, □ – control *V. cholerae* 20000. The ordinate is the cell concentration in lg (m.c./ml).

Для визуализации биопленок и НФ холерных вибрионов использовали трансмиссионную электронную микроскопию (ТЭМ), выбирая оптимальное увеличение в зависимости от структуры объекта исследования. Препараты для ТЭМ готовили в соответствии с патентом «Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии» [17].

Параллельно результаты экспериментов подтверждали бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биопленкой на поверхности питательной среды (агар Мартена, рН 7,6) [18, 19].

Эксперименты проводили в трех повторностях. Статистический анализ проводили с использованием программы Medstatistica. Полученные данные объединяли в вариационные ряды на основании которых поводили расчет среднеарифметических величин (M). В качестве ошибки среднего представляли стандартное отклонение (σ). Статистическую значимость различий экспериментальных данных оценивали с помощью t-критерия Стьюдента ($t_{Ст}$), при уровне $p \leq 0,05$ достоверности считали значимой.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследуемые пробы холерных вибрионов культивировали в условиях, моделирующих летнюю температуру воды ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), в течение 30 суток. К 5-м суткам инкубации количество клеток холерных вибрионов в биопленке нетоксигенного штамма и токсигенного составляло lg 6 и 7, т.е. примерно $3 \cdot 10^6$ и $6,6 \cdot 10^7$ м.к./мл, соответственно. На 10-е сутки концентрация холерных вибрионов увеличилась на 1-2 порядка и составила lg 8 и 9 соответственно (10^8 – 10^9 м.к./мл), оставаясь на этом высоком уровне весь период наблюдения. В контрольных пробах к этому времени концентрация холерных вибрионов, независимо от наличия гена *ctxA*, составляла lg 6 ($1 \cdot 10^6$ м.к./мл) и не менялась в течение месяца (рис. 1).

На 30-е сутки инкубации количество клеток холерных вибрионов в биопленках и контрольных пробах достоверно различалось ($t_{Ст} = 4,24$, $p = 0,008198$) Концентрация в ПЦР-РВ контрольных штаммов составляла lg 6 (10^6 м.к./мл), опытных – lg 8 ($\geq 10^8$ м.к./мл). Жизнеспособность холерных вибрионов в опытных и контрольных пробах подтверждали типичным ростом культуры на пластинах агара Мартена.

Для изучения влияния температуры на холерные вибрионы в «зрелой биопленке» и планктоне опытные и контрольные пробы поместили в условия низких температур ($6 \pm 1^\circ\text{C}$), что соответствовало среднемесячной температуре поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону в зимний период. В таких условиях исследуемые штаммы культивировали в течение 70 суток [8, 18, 19]. По окончании периода наблюдения жизнеспособность штаммов холерных вибрионов определяли бактериологическим методом, отпечатывая фрагменты хитинового панциря с биопленкой на агаре Мартена, а концентрацию – в ПЦР-РВ. На агаровой среде при высеве из контрольных и опытных проб колоний холерных вибрионов не обнаружено. По результатам исследований методом ПЦР установлено, что концентрация *V. cholerae* опытных штаммов (биопленка) составляла $1 \cdot 10^3$ м.к./мл, в контрольных пробах (планктонная форма) холерных вибрионов не обнаружено.

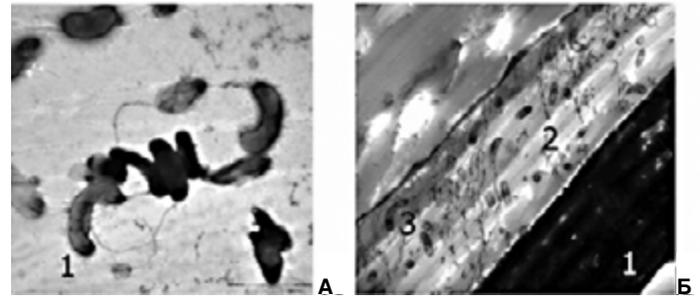


Рис. 2. *V. cholerae* O1 19613, ув. $\times 20\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: 1 – холерные вибрионы в планктонной форме (контроль). Б: биопленка *V. cholerae* 19613 на хитине, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$); 1 – хитин, 2 – матрикс, 3 – холерные вибрионы в составе биопленки.

Fig. 2. *V. cholerae* O1 19613, magnification $\times 20,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium tetroxide (VIII) and lead citrate. A: 1 – cholera vibrios in planktonic form (control). B: biofilm of *V. cholerae* 19613 on chitin, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$); 1 – chitin, 2 – matrix, 3 – vibrios cholerae as part of a biofilm.

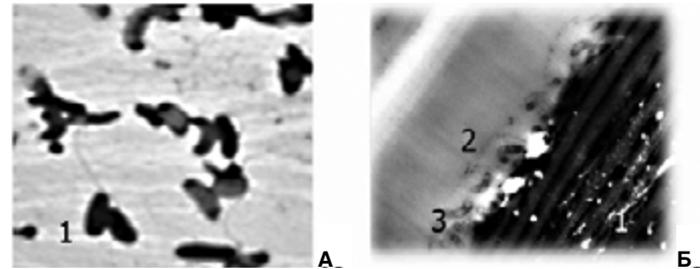


Рис. 3. *V. cholerae* O1 № 20000, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: 1 – холерный вибрион в планктонной форме (контроль). Б: биопленка *V. cholerae* 20000 на хитине, ув. $\times 10\,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – хитин, 2 – матрикс, 3 – холерные вибрионы в составе биопленки.

Fig. 3. *V. cholerae* O1 No 20000, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate. A: 1 – *V. cholerae* in planktonic form (control). B: biofilm of *V. cholerae* 20000 on chitin, magnification $\times 10,000$ ($t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – chitin, 2 – matrix, 3 – cholera vibrios as part of a biofilm.

После 70 суток культивирования при температуре $6 \pm 1^\circ\text{C}$ исследуемые пробы поместили в условия, моделирующие летний период ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), и ежедневно высевали на агаровые пластины в течение 5 суток.

На 3-й день инкубации в отпечатках фрагментов хитина на агаре Мартена, независимо от токсигенности штаммов, отмечали рост типичных по морфологии единичных колоний *V. cholerae* O1. При ежедневном высеве контрольных штаммов на агаровые пластины в течение 5 суток колоний вибрионов не обнаружено. Возможно, что холерные вибрионы в планктонной форме не способны переживать низкую температуру длительное время. Изучая переход холерных вибрионов из НФ в вегетативную стадию, S.Buerger et al. (2012), S.Zhao et al. (2022) установили, что только малая часть популяции пробуждается «от спячки» и при благоприятных условиях может расти на питательных средах, если же экологические факторы не соответствуют благоприятным условиям для размножения клеток холерных вибрионов, то, по мнению авторов, погибает лишь небольшая доля популяции. Однако, если условия благоприятны, происходит переход клеток холерных вибрионов из некультивируемого состояния в вегетативную форму [20, 21].

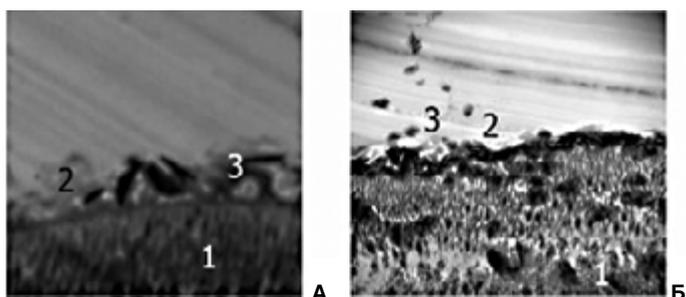


Рис. 4. Фрагменты разрушенных биопленок, ув. $\times 10\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: фрагмент разрушенной биопленки *V. cholerae* O1 20000, 1 – хитин, 2 – разрушенные клетки, 3 – фрагменты биопленки холерных вибрионов. Б: фрагмент разрушенной биопленки *V. cholerae* O1 19613, ув. $\times 10\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$), 1 – хитин, 2 – фрагмент биопленки, 3 – разрушенные клетки холерных вибрионов.

Fig. 4. Fragments of destroyed biofilms, magnification $\times 10,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium tetroxide (VIII) and lead citrate. A: fragment of destroyed biofilm of *V. cholerae* O1 20000, 1 – chitin, 2 – destroyed cells, 3 – fragments of *V. cholerae* biofilm. B: fragment of a destroyed biofilm of *V. cholerae* O1 19613, magnification $\times 10,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$), 1 – chitin, 2 – biofilm fragment, 3 – destroyed *V. cholerae* cells.

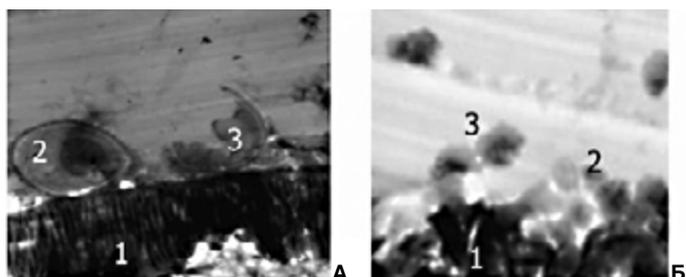


Рис. 5. Некультивируемые клетки *V. cholerae* O1. Увеличение $\times 50\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII) и цитратом свинца. А: некультивируемая клетка *V. cholerae* O1 19613. 1 – хитин, 2 – некультивируемая клетка холерного вибриона, 3 – разрушенная клетка холерного вибриона. Б: некультивируемые и разрушенные клетки *V. cholerae* O1 20000, увеличение $\times 50\,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – хитин, 2 – оболочка разрушенной клетки холерного вибриона, 3 – некультивируемая клетка холерного вибриона.

Fig. 5. Uncultured *V. cholerae* O1 cells. Magnification $\times 50,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). TEM, contrast with osmium (VIII) tetroxide and lead citrate. A: uncultivated cell of *V. cholerae* O1 19613. 1 – chitin, 2 – uncultivated cell of *V. cholerae*, 3 – destroyed cell of *V. cholerae*. B: uncultivated and destroyed *V. cholerae* O1 20000 cells, magnification $\times 50,000$ ($t = 6 \pm 1^\circ\text{C}$). 1 – chitin, 2 – shell of a destroyed *V. cholerae* cell, 3 – uncultivated *V. cholerae* cell.

Для визуализации процессов, происходящих с *ctxA+tcpA+* и *ctxA+tcpA-* холерными вибрионами в биопленке на хитиновом субстрате и в планктоне при воздействии на них различных температур, применили ТЭМ.

На микрофотографиях *V. cholerae* O1 19613 и *V. cholerae* O1 20000 видны изменения в биопленках обоих штаммов после инкубации при температуре воды в летний ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) и в зимний период ($6 \pm 1^\circ\text{C}$).

На микрофотографиях (рис. 2А, 3А) в планктонной форме клетки токсигенного и нетоксигенного штаммов холерных вибрионов имеют вид изогнутых палочек с длинным жгутиком, расположенным на одном конце тела клетки, и не от-

личаются друг от друга. При переходе клеток в биопленочную форму клетка теряет жгутик, и выстраивает биопленку благодаря выработке экзополисахарида, который создает межклеточный матрикс (рис. 2Б, 3Б). Образование биопленки на хитиновом субстрате у штаммов *V. cholerae* O1 *ctxA+tcpA+* и *ctxA+tcpA-* имеет отличия в виде структурных особенностей в толщине и плотности матрикса (рис. 2Б, 3Б).

На микрофотографиях, представленных на рис. 4 (А, Б), видны изменения в структуре биопленок при температуре культивирования $6 \pm 1^\circ\text{C}$, которая способствует переходу в некультивируемое состояние клеток, находящихся в биопленке, при этом высота межклеточного матрикса уменьшается, уже не видно мембраны, отделяющей межклеточный матрикс от среды культивирования, не просматриваются складчатые структуры внутри матрикса. Биопленки обоих штаммов имеют истонченный вид.

На рис. 4 видно, что часть клеток разрушена, на фотографиях визуализируются только их оболочки бледно-серого размытого цвета.

На микрофотографиях, представленных на рис. 5 (А, Б), видна истонченная биопленка обоих исследуемых штаммов, состоящая из мелких клеток сферической формы, утративших жгутик (некультивируемых клеток), и разрушенных клеток холерных вибрионов, содержимое которых выделяется в среду культивирования.

Заключение

Таким образом, экспериментально показано, что, независимо от наличия гена *ctx*, холерные вибрионы в состоянии зрелой биопленки в условиях, моделирующих среднюю температуру воды поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону в зимний период, способны переходить в НФ и сохраняться жизнеспособными в течение длительного времени (70 суток). В результате электронно-микроскопического исследования получены микрофотографии, на которых видны изменения в структуре биопленок, при различных температурах культивирования. Возможность перехода клеток в некультивируемое состояние обеспечивает холерным вибрионам низкий уровень гибели популяции в межэпидемический период и позволяет бактериям восстановиться при благоприятных условиях окружающей среды. Полученные нами данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения экологии холерных вибрионов и механизмов выживания этих микроорганизмов во внешней среде.

Источник финансирования

Работа проведена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the branch research program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. Марков ЕЮ, Куликалова ЕС, Урбанович ЛЯ, Балахонов СВ, Вишняков ВС. Хитин и продукты его гидролиза в экологии холерного вибриона. Биохимия. 2015;80(9):1109-1116. DOI: 10.1134/S0006297915090023
2. Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2013 Dec 16;4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375
3. M Jayakumar J, Balasubramanian D, Reddi G, Almagro-Moreno S. Synergistic role of abiotic factors driving viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol Rep. 2020 Aug;12(4):454-465. DOI: 10.1111/1758-2229.12861
4. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. Vaccine. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
5. Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Водопьянов СО, Писанов РВ, Титова СВ. Оценка способности холерных вибрионов формировать биопленку на поверхности хитинового панциря речного рака. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021;98(4):434-439. DOI: 10.36233/0372-9311-99
6. Sultana M, Nusrin S, Hasan NA, Sadique A, Ahmed KU, Islam A, et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal Estuary. mBio. 2018 Apr 17;9(2):e00483-18. DOI: 10.1128/mBio.00483-18
7. Colwell RR, Seidler RJ, Kaper J, Joseph SW, Garges S, Lockman H, et al. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl Environ Microbiol. 1981 Feb;41(2):555-8. DOI: 10.1128/aem.41.2.555-558.1981
8. Соколенко АВ, Миронов АЮ. Некультивируемые формы *Vibrio cholerae* O1/O39: итоги и перспективы. Национальные приоритеты России. 2014;3(13):86-89.
9. Brenzinger S, van der Aart LT, van Wezel GP, Lacroix JM, Glatter T, Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2019 Apr 17;10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793
10. Wu B, Liang W, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2016 Mar 30;7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404
11. Naser IB, Hoque MM, Faruque SN, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Faruque SM. *Vibrio cholerae* strains with inactivated *cqsS* gene overproduce autoinducer-2 which enhances resuscitation of dormant environmental *V. cholerae*. PLoS One. 2019 Oct 1;14(10):e0223226. DOI: 10.1371/journal.pone.0223226
12. Титова СВ, Соколенко АВ, Ломов ЮМ, Подосинникова ЛС, Меньшикова ЕА, Миронова АВ. Морфологические изменения в популяции холерных вибрионов при переходе в некультивируемое состояние под влиянием отдельных абиотических и биотических факторов в эксперименте. Проблемы особо опасных инфекций. 2004;2(88):45-49.
13. Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. J Appl Microbiol. 2012 May;112(5):945-53. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05255.x
14. Водопьянов СО, Водопьянов АС, Меньшикова ЕА, Курбатова ЕМ, Титова СВ. Способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Патент РФ 20192685878, МПК 51 C12N 11/00. / № 2018103604.
15. Electronic resource. Available at: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2022
16. Титова СВ, Меньшикова ЕА, Водопьянов СО, Олейников ИП, Бородина ТН. Изучение биопленочной формы холерных вибрионов методом ПЦР-РВ. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2022;27(1):23-32. DOI: 10.17816/EID109894
17. Головин СН, Титова СВ, Симонова ИР. Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии. Патент РФ 2 662 938 МПК 51 C12N 11/14. № 201710834614.
18. Николеишвили ЛР, Подосинникова ЛС. Переход холерных вибрионов в некультивируемое состояние под влиянием некоторых абиотических факторов. Фундаментальные исследования. 2004;2:18-21.
19. Титова СВ, Кушнарева ЕВ. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014;10(2):375-379.
20. Buerger S, Spoering A, Gavrish E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. Appl Environ Microbiol. 2012 May;78(9):3221-8. DOI: 10.1128/AEM.07307-11
21. Zhao S, Lu X, Zhang J, Kan B. Absolute quantification of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR with oil-enveloped bacterial cells. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0070422. DOI: 10.1128/spectrum.00704-22

References

1. Markov EYu, Kulikalova ES, Urbanovich LYa, Vishnyakov VS, Balakhonov SV. Chitin and products of its hydrolysis in *Vibrio cholerae* ecology. Biochemistry. 2015;80(9):1109-1125. DOI: 10.1134/S0006297915090023 (In Russian).
2. Lutz C, Erken M, Noorian P, Sun S, McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2013 Dec 16;4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375
3. M Jayakumar J, Balasubramanian D, Reddi G, Almagro-Moreno S. Synergistic role of abiotic factors driving viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Environ Microbiol Rep. 2020 Aug;12(4):454-465. DOI: 10.1111/1758-2229.12861
4. Das B, Verma J, Kumar P, Ghosh A, Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. Vaccine. 2020 Feb 29;38 Suppl 1:A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031
5. Menshikova EA, Kurbatova EM, Vodopyanov SO, Pisanov RV, Titova SV. 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. DOI: 10.36233/0372-9311-99 (In Russian).
6. Sultana M, Nusrin S, Hasan NA, Sadique A, Ahmed KU, Islam A, et al. Biofilms comprise a component of the annual cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal Estuary. mBio. 2018 Apr 17;9(2):e00483-18. DOI: 10.1128/mBio.00483-18
7. Colwell RR, Seidler RJ, Kaper J, Joseph SW, Garges S, Lockman H, et al. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries. Appl Environ Microbiol. 1981 Feb;41(2):555-8. DOI: 10.1128/aem.41.2.555-558.1981
8. Sokolenko AV, Mironov AYu. Uncultivable forms of *Vibrio cholerae* O1/O39: summary and outlook. Natsional'nye priorityty Rossii. 2014;3(13):86-89. (In Russian).
9. Brenzinger S, van der Aart LT, van Wezel GP, Lacroix JM, Glatter T, Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2019 Apr 17;10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793
10. Wu B, Liang W, Kan B. Growth phase, oxygen, temperature, and starvation affect the development of viable but non-culturable state of *Vibrio cholerae*. Front Microbiol. 2016 Mar 30;7:404. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00404
11. Naser IB, Hoque MM, Faruque SN, Kamruzzaman M, Yamasaki S, Faruque SM. *Vibrio cholerae* strains with inactivated *cqsS* gene overproduce autoinducer-2 which enhances resuscitation of dormant environmental *V. cholerae*. PLoS One. 2019 Oct 1;14(10):e0223226. DOI: 10.1371/journal.pone.0223226
12. Titova SV, Sokolenko AV, Lomov YuM, Podosinnikova LS, Menshikova EA, Mironova AV. Morphological changes in a cholera vibrio population during its transition into non-culturing state due to the effects of individual abiotic and biotic factors under experimental conditions. Problemy osobo opasnykh infektsii (Problems of Particularly Dangerous Infections). 2004;2(88):45-49. (In Russian).
13. Mishra A, Taneja N, Sharma M. Viability kinetics, induction, resuscitation and quantitative real-time polymerase chain reaction analyses of viable but

- nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in freshwater microcosm. J Appl Microbiol. 2012 May;112(5):945-53. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2012.05255.x
14. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Men'shikova EA, Kurbatova EM, Titova SV. Sposob modelirovaniya bioplenok, formiruemykh *Vibrio cholerae* O1 serogruppy na poverkhnosti khitina. Patent RF 20192685878, MPK 51 S12N 11/00. / № 201810360. (In Russian).
15. Electronic resource. Available at: <https://pogoda1.ru/water/reka-don> 2022
16. Titova SV, Menshikova EA, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Borodina TN. Study of the biofilm form of vibrio cholera by RT-PCR. Epidemiology and Infectious Diseases. 2022;27(1):23-32. DOI: 10.17816/EID109894 (In Russian).
17. Golovin SN, Titova SV, Simonova IR. Sposob polucheniya obraztsov bioplenok kholerных vibriнов dlya issledovaniya metodom transmissionnoi elektronnoi mikroskopii. Patent RF 2 662 938 MPK 51 C12N 11/14. № 201710834614. (In Russian).
18. Nicoleischvili LR, Podosinnikova LS. Influence abiotic factors on transfor *Vibrio cholerae* to nonculturable form. Fundamental Research. 2004;2:18-21. (In Russian).
19. Titova SV, Kusnaryova EV. Evaluation of *Vibrio cholerae* ability to form biofilms in vitro with the use of the new experimental procedure. Fundamental Research. 2014;10(2):375-379. (In Russian).
20. Buerger S, Spoering A, Gavrish E, Leslin C, Ling L, Epstein SS. Microbial scout hypothesis, stochastic exit from dormancy, and the nature of slow growers. Appl Environ Microbiol. 2012 May;78(9):3221-8. DOI: 10.1128/AEM.07307-11
21. Zhao S, Lu X, Zhang J, Kan B. Absolute quantification of viable but nonculturable *Vibrio cholerae* using droplet digital PCR with oil-enveloped bacterial cells. Microbiol Spectr. 2022 Aug 31;10(4):e0070422. DOI: 10.1128/spectrum.00704-22

Информация о соавторах:

Титова Светлана Викторовна, кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Водопьянов Сергей Олегович, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Мелоян Мисак Геворгович, младший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Селянская Надежда Александровна, старший научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Кругликов Владимир Дмитриевич, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других ОКИ ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Svetlana V. Titova, PhD, MD, leading researcher at the Laboratory of Natural Focal and Zoonotic Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Sergey O. Vodopyanov, MD, PhD, DSc, chief researcher of the of the department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Misak G. Meloyan, junior researcher at the Laboratory of Natura Focal and Zoological Infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Nadezhda A. Selyanskaya, senior researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

Vladimir D. Kruglikov, MD, PhD, DSc, chief researcher, department of microbiology of cholera and other acute intestinal infections, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор

НОВОСТИ НАУКИ

Хронические ушные инфекции связаны с длительными нарушениями работы мозга и языка у детей

Новое исследование ученых из Университета Флориды показывает, что если ушные инфекции становятся хроническими, то повторяющаяся временная потеря слуха может привести к дефициту слухового восприятия и языкового развития у детей спустя годы.

Изучили слуховую обработку информации и языковое развитие 117 детей в возрасте от 5 до 10 лет как с историей хронических ушных инфекций в раннем детстве, так и без них.

В среднем дети, перенесшие несколько ушных инфекций в возрасте до трех лет, имели меньший словарный запас и труднее подбирали схожие по звучанию слова, чем дети с небольшим количеством ушных инфекций или вообще без них. Они также с трудом распознавали изменения в звуках, что свидетельствует о проблемах в центрах слуховой обработки информации в их мозге.

Раннее лечение ушных инфекций может помочь предотвратить скопление жидкости, которое препятствует развитию речи. Если ушные инфекции случаются часто и в ухе скапливается жидкость, трубки, временно установленные в барабанной перепонке, помогут отвести жидкость и восстановить слух, что приведет к снижению риска задержки развития центральных слуховых путей и уменьшению проблем с освоением языка.



Nittrouer S, Lowenstein JH.

Early otitis media puts children at risk for later auditory and language deficits. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2024 Jan;176:111801. DOI: 10.1016/j.ijporl.2023.111801