

## МИКРОБИОЛОГИЯ

© ТИТОВА С.В., ВЕРКИНА Л.М., 2016

УДК: 579.843.1:579.26:033.51/52:036.5:57.086.3

Титова С.В., Веркина Л.М.

### МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОПЛЕНОК ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА НА ТВЕРДЫХ ПОВЕРХНОСТЯХ (СТЕКЛО И ПЛАСТИК) И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ИХ В СВЕТОВОМ И ЛЮМИНЕСЦЕНТНОМ МИКРОСКОПАХ

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 340002, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

*Появляется необходимость в моделировании неких экологических процессов, реально возникающих в различных биотопах, и поэтапном исследовании формирования биопленок (БП) на твердых поверхностях (стекло и пластик). Для выполнения такого рода исследований наиболее доступными и достаточно информативными являются световая и люминесцентная микроскопии. В работе использовали штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп с различными генетическими характеристиками. БП формировали на покровных стеклах и/или пластиковых пластинках, которые помещали в вертикальном положении в специальное устройство во флаконы с водопроводной автоклавированной водой. Прижизненную визуализацию стадий образования биопленки осуществляли с помощью люминесцентной микроскопии, окрашивая БП раствором акридинового оранжевого (АО). С помощью световой микроскопии изучали БП, окрашенные конго красным и фуксином. Световая и люминесцентная микроскопии позволяют исследовать БП в динамике на различных стадиях формирования, оценить состояние ее физиологической жизнедеятельности в количественном и качественном измерениях, проследить синтез экзополисахаридов у различных серогрупп вибрионов, что имеет значение в прогнозировании скорости возникновения БП на абиотических объектах.*

**Ключевые слова:** формирование биопленок на покровных стеклах и пластиковых пластинках; световая и люминесцентная микроскопии; прижизненная и фиксированная окраска биопленок.

**Для цитирования:** Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биопленок холерного вибриона на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах. Клиническая лабораторная диагностика. 2016; 61 (4): 238-241. DOI 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241

Titova S.V., Verkina L.M.

#### THE MODELING OF BIOFILMS OF COMMA BACILLUS ON SOLID SURFACES (GLASS AND PLASTIC) AND THEIR VISUALIZATION IN LIGHT AND LUMINESCENT MICROSCOPES

The Rostov-on-Don anti-plague institute of Rospotrebnadzor, 340002 Rostov-on-Don, Russia

*Nowadays, necessity is shown up concerning modeling of certain ecological processes actually emerging in various biotops and hence step-by-step study of development of biofilms on solid surfaces (glass and plastic). To implement such kind of studies the light and luminescent microscopy are the most available and rather informative tools. The study used strains *V. cholerae* O1 and O139 serogroups with different genetic characteristics. The biofilms were developed on cover glass and/or plastic plates which were placed in bottles with tap autoclave water in vertical position in special device. The lifetime visualization of stages of development of biofilm was implemented using luminescent microscopy by coloring biofilm with solution of acridine yellow. The biofilms colored with Congo red and fuchsin were analyzed using light microscopy. The light and luminescent microscopy permit investigating biofilms in dynamics at various stages of development, to evaluate condition of its physiological functioning in quantitative and qualitative dimensions and to trace synthesis of exopolysaccharides in different serogroups of vibrios that has significance in prognosis of velocity of occurrence of biofilms on abiotic objects.*

**Keywords:** development of biofilms on cover glass and plastic plate; light and luminescent microscopy; lifetime and fixed coloring of biofilms

**For citation:** Titova S.V., Verkina L.M. The modeling of biofilms of comma bacillus on solid surfaces (glass and plastic) and their visualization in light and luminescent microscopes. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2016; 61 (4): 238-241. (in Russ.)

DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-238-241

**For correspondence:** Titova S.V., candidate of medical sciences, director of the Rostov-on-Don anti-plague institute. e-mail: svetatitova@bk.ru

**Conflict of interests.** The authors declare absence of conflict of interests.

**Financing.** The study had no sponsor support

Received 17.08.2015  
Accepted 15.12.2016

Любая твердая поверхность, погруженная в водную среду, покрывается слизистой биопленкой (БП), образованной колониями микроорганизмов, защищенных полисахаридным матриксом [1, 2]. Бактерии, находящиеся в составе БП, становятся менее доступными для действия различных внешних факторов, включая антибиотики, пестициды, металлы и др. [3], что усугубляет развитие инфекционного процесса вследствие колонизации бактериями имплантатов, катетеров, другого медицинского оборудования, а также создает биоинфекцию трубопроводов в системе коммуникаций. В последние десятилетия нарастает поток сообщений о роли БП в природных процессах и распространении с их помощью возбудителей опасных инфекционных заболеваний [4].

Появляется информация о загрязнении вод Мирового океана полиэтиленом и пластиковым мусором. В Атлантическом, Тихом, Индийском океанах находятся огромные «мусорные пятна» — мелкие, равномерно распределенные в воде, практически невидимые фрагменты, уменьшение которых постоянно происходит в природе и, достигнув размера в 5 мм, они вместе с пищей попадают в организм рыб и млекопитающих [5]. На пластиковом мусоре часто встречаются колонии бактерий, относящихся к роду вибрионов, патогенные для рыб, ракообразных, головоногих моллюсков, а также человека. Есть предположение, что они способствуют распространению морских инфекционных заболеваний [6], в том числе холеры.

До настоящего времени недостаточно изучены факторы, раскрывающие микробиологическую составляющую пластисферы, по-прежнему требуют изучения условия, влияющие на образование БП на пластике, особенности формирования ее матрикса и жизненного цикла. В связи с этим появляется необходимость в моделировании некоторых экологических процессов, реально возникающих в различных биотопах и поэтапное исследование образования биополимера в многообразных проявлениях внешних факторов. Для выполнения такого рода исследований наиболее доступными и достаточно информативными являются световая и люминесцентная микроскопии.

Цель исследования — моделирование БП холерными вибрионами на твердых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах.

**Материал и методы.** В работе использовали штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогруппы, выделенные в разные годы от людей и из внешней среды, эпидемически опасные с генотипами *ctxAB<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>toxR<sup>+</sup>* и эпидемически неопасные с генотипом *ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>toxR<sup>+</sup>*. Штаммы получены из музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Моделирование БП и исследование способности холерных вибрионов к их формированию проводили способом, описанным в наших предыдущих работах и подтвержденным патентом [7]. Для изучения процесса формирования биополимера использовали покровные стекла и/или пластинки, которые вырезали из пищевого пластика, размером 20 × 20 мм помещали по 9 штук вертикально в специальное устройство во флаконы с водопроводной автоклавированной водой. Предварительно покровные стекла стерилизовали сухим жаром, а пластик обрабатывали 70% спиртом. Далее добавляли суспензии холерных вибрионов, приготовленные из 18-часовой агаровой культуры по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО-42-25-59—86 П), в конечной концентрации  $n \cdot 10^1$ — $10^4$  масса клеток на 1 мк. Эксперименты проводили при комнатной температуре. Процесс адгезии клеток к поверхности покровных стекол и формирования БП наблюдали в динамике. Для этого через определенные промежутки времени из каждого флакона стерильным пинцетом извлекали покровные стекла, трижды промывали их от не прикрепившихся вибрионов в забуференном фосфата-

ми физиологическом растворе (PBS) методом погружения и в вертикальном положении помещали на листы фильтровальной бумаги для стекания с их поверхности оставшейся жидкости. После этого стекло прикладывали к поверхности агара Мартена (pH 7,7) и через 15 мин переворачивали на другую сторону (отпечатывали). В этот же фиксированный период делали высевы из планктонной культуры на пластинки агара Мартена (pH 7,7). Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм холерных вибрионов учитывали по наличию их роста на агаре Мартена после подрашивания при 37°C в течение суток в колониеобразующих единицах (КОЕ/мл).

Прижизненную визуализацию стадий формирования БП осуществляли с помощью люминесцентной микроскопии, окрашивая ее раствором акридинового оранжевого (АО) в концентрации 20 мкг/мл. Окрашенные мазки просматривали под микроскопом *Nikon Eclipse E 200 F* с люминесцентным модулем при увеличении 10×100 в иммерсионной системе и фотографировали цифровой камерой *Nikon Coolpix L 830*.

С помощью световой микроскопии изучали БП от стадии адгезии вибрионов на поверхностях до появления матрикса, образованного экзополисахаридом. Для оценки стадий развития биополимера с помощью световой микроскопии использовали метод, описанный Титовым Л.П. с соавтором [8] в нашей модификации. Окраску БП проводили следующим образом. Покровные стекла/пластик извлекали из флакона, отмывали, как описано выше, высушивали на воздухе, фиксировали 30 мин в 96% этаноле, после удаления спирта смазывали прозрачным ацетонсодержащим лаком по краям и помещали на предметное стекло. Для окраски матрикса использовали 1% водный раствор Конго красного, который при этом связывается с целлюлозой матрикса. Окрашивали препарат в течение 15 мин, промывали водопроводной водой и высушивали. Для визуализации вибрионов мазки докрашивали карболовым фуксином (10 мл насыщенного спиртового раствора фуксина, 90 мл 5% карболовой кислоты) в течение 5—6 мин, повторно промывали и высушивали. При просмотре и фотографировании использовали упомянутый микроскоп с иммерсионной системой при увеличении 10×100 и ту же цифровую камеру. Наблюдения проводили один раз в сутки в течение одной недели, затем раз в неделю и столько же в месяц. Общий срок наблюдения составлял два месяца. Работы с БП проводили согласно СП 1.3.3118—13 «Безопасность работы с микроорганизмами I—II группы патогенности (опасности)».

**Результаты и обсуждение.** Моделирование в эксперименте образования БП холерных вибрионов является важным аспектом изучения экологии этой бактерии. Наблюдение за поэтапным формированием матрикса дает возможность оценить патогенный потенциал штаммов и их устойчивость к различным внешним воздействиям. Возможность использования покровных стекол как поверхностей, на которых формируется БП с дальнейшими исследованиями в микроскопии ранее продемонстрирована с нативными препаратами при окрашивании акридиновым оранжевым (АО) [9]. Моделирование БП на пластике потребовало дополнительных экспериментов по подбору такого полимерного материала, который был бы устойчив к обработке 70% этанолом и ацетону. Этим требованием отвечал пластик, используемый в пищевой промышленности. Для наблюдения методом световой микроскопии за 1—2-й стадиями образования БП достаточно окрашивания препаратов простыми красками, например, фуксином или генциановым фиолетовым. Адгезированные вибрионы окрашиваются в красный или синий цвета соответственно и предстают на поверхности покровных стекол/пластике в виде отдельных клеток, цепочек и небольших скоплений (рис. 1, см. обложку). К 4—5-м суткам скопления клеток занимают

почти всю поверхность и по данным литературы [10] формируется матрикс — основной компонент БП. Экзополисахаридный матрикс хорошо воспринимает краситель Конго красный и при окрашивании приобретает розово-красный оттенок, интенсивнее субстанции БП проявляются на стеклянной поверхности, однако клетки холерных вибрионов этим красителем не окрашиваются. Для визуализации в БП, матриксе и бактериальных клетках мы использовали двойное окрашивание. Начиная с 3-х суток пластинки окрашивали Конго красным, а затем воздействовали карболовым фуксином (см. рис. 1).

Установлено, что адгезия клеток холерных вибрионов как *ctx-*, так и *ctx+* штаммов происходит как к покровным стеклам, так и к пластику. К 6-м суткам во всех микропрепаратах отмечаются группы клеток без четкой формы палочек, так как наложенные друг на друга они образуют разного размера конгломераты, клетки окрашены в красный цвет, между которыми находится розовая субстанция. Такая окраска матрикса свидетельствует о наличии в его составе специфического белково-полисахаридного комплекса. Так же в микропрепаратах присутствуют отдельно лежащие клетки четкой формы палочек красного цвета (рис. 2, см. обложку).

Наблюдения в световой микроскоп за формированием БП показали, что скорость их образования и структурная выраженность в значительной степени зависят от вибрионов, взятых в эксперимент. Нетоксигенные штаммы формировали биополимеры несколько раньше, в окрашенных препаратах в большей степени присутствовали конгломераты клеток, внедренные в матрикс. Данный факт подтверждали и результаты учета КОЕ в отпечатках на агаре Маргена.

Для оценки стадий развития биопленки с помощью люминесцентной микроскопии стекло или пластик после изъятия и промывания помещали на предметное стекло, а на нативный препарат наносили одну каплю АО в рабочем разведении 1:20 000, сверху накрывали покровным стеклом большего размера, чем экспериментальные (24 × 24) и просматривали препараты в микроскопе под иммерсией (рис. 3, см. обложку).

Из рис. 3 следует, что при окраске АО клетки холерных вибрионов визуализировались и в течение первых четырех дней адгезировались на поверхности покровных стекол в виде отдельных клеток, их скоплений или цепочек, расположенных в один слой разного размера. Определенную роль играет двигательная активность холерных вибрионов, клетки сохраняют подвижность на поверхностях и перемещаются, сближаясь друг с другом. Начиная с пятых суток исследования, клетки холерных вибрионов наслаивались друг на друга и образовывали многослойную/многомерную структуру, которая определялась при изменении положения микровинта. Четкие очертания клеток видны в каждом отдельном слое, тогда как в остальных они выглядели «размытыми». Клетки окружены аморфным веществом, окрашенным в мутно-оранжевые и мутно-зеленые цвета. Между скоплениями просматривались пустые места в виде дорожек. Изучая микропрепараты с помощью люминесцентной микроскопии в нативном состоянии, в динамике можно наблюдать за подвижностью клеток и сближением их друг с другом с дальнейшим формированием разных структур в виде скоплений клеток, конгломератов.

Результаты сопоставления исследований световой и люминесцентной микроскопии дают возможность исследовать БП на различных стадиях формирования и оценить состояние ее физиологической жизнедеятельности в количественном и качественном измерениях. В I—II стадиях клетки холерных вибрионов обратимо прикрепляются к твердой поверхности, покрывая ее первичной пленкой, далее насту-

пает собственно микробная адгезия, когда микроорганизмы обратимо прикрепляются к твердой поверхности. На ней между молекулами и структурами действуют неспецифические физико-химические силы [10]. Во всех нативных препаратах на этих стадиях мы наблюдали подвижность клеток по поверхности. Что, по мнению исследователей, [11] является непременным условием для формирования БП. Подвижные клетки активно перемещаются по направлению к поверхностям и окончательно удерживаются притягивающими силами, действующими вблизи поверхности [12]. Возможно, из-за более агрессивного воздействия на БП при исследовании с помощью световой микроскопии количество адгезированных клеток в фиксированных микропрепаратах меньше. Это наблюдение подтверждается тем, что между фиксированными и нативными препаратами есть количественное различие. При исследовании люминесцентным методом к 5—6-м суткам на покровных стеклах наблюдаются скопления из клеток с сохраненной подвижностью, а также скопления из слитых друг с другом клеток, между которыми находится аморфное вещество, окрашенное в мутно-оранжевые и мутно-зеленые цвета, такие структуры располагаются зонально по поверхности, разного размера. К шестым суткам в фиксированных препаратах между клетками содержится вещество, окрашенное в розовый цвет, скопления клеток разных размеров расположены зонально по поверхностям. Описанная картина, согласно литературным данным, характеризует 3-ю стадию, состоящую из нескольких этапов и по времени занимающую от нескольких часов до пяти—шести суток [13—15]. Клетки сохраняют способность к передвижению по поверхности стекла и формируют внеклеточный матрикс. Затем они склеиваются друг с другом, образуя скопления разных размеров, расположенные в один слой. В этот период обратной адгезии клеток не происходит, этому свидетельствует уменьшение свободных мест на покровных стеклах. Клетки наслаиваются друг на друга, образуя объемные фигуры. В фиксированных мазках в световом микроскопе эти образования выглядят как конгломераты, между которыми просматривается метакроматическая окраска матрикса. Нативные исследования позволяют при помощи микровинта увидеть многослойную/многомерную структуру этих образований. Изменением положения микровинта можно фиксировать четкие очертания клеток в каждом отдельном слое и «размытые» в остальных. Клетки окружены аморфным веществом, окрашенным в мутно-оранжевые и мутно-зеленые цвета, представляющим матрикс, который состоит из полисахаридов, белков, липополисахаридов, гликопротеинов или полипептидов, которыми обеспечивается прочность связи бактериальными клетками с поверхностями благодаря увеличению числа точек контакта [16—18]. Между скоплениями просматриваются пустые места в виде дорожек. Аналогичное описание приводится в литературе как IV стадия вторичных колонизаторов. Микроорганизмы прикрепляются к тем, которые уже сформировали БП, в этой же стадии формируются специфические структуры — полости, каналы, выросты, поры [19].

*Закключение.* Световая и люминесцентная микроскопии дают возможность исследовать БП на различных стадиях формирования и оценить состояние ее физиологической жизнедеятельности в количественном и качественном измерениях. Опираясь этими двумя методами можно оценить адгезивную активность вибрионов, способность к пленкообразованию, с которым связывают способность колонизации холерными вибрионами поверхностей [20], а также оценить синтез экзополисахаридов у различных серогрупп вибрионов, что имеет значение в прогнозировании скорости возникновения БП на абиотических объектах.

*Исследование не имело спонсорской поддержки.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 4—6, 12—15, 17—20)  
см. REFERENCES)

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? *Микробиология*. 2007; 76 (2): 149—63.
3. Заславская Н.В., Артеменко Н.К., Чижевская М.М., Тец В.В. Особенности выживаемости бактерий в микробных сообществах. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2000; 2 (2 Прил. 1): 19—20.
7. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок in vitro с помощью нового методического подхода. *Фундаментальные исследования*. 2014; (10): 375—9.
8. Горбунов В.А., Титов Л.П., Ермакова Т.С. Многоцентровое исследование анти-биотикорезистентности нозокомиальных штаммов *Pseudomonas aeruginosa* в Республике Беларусь. *Здравоохранение*. 2007; (1): 28—31.
9. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Использование нового метода изучения динамики образования биопленок холерными вибрионами в условиях, приближенных к естественным. *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2014; (5): 73—7.
10. Гостев В.В., Сидоренко С.В. Бактериальные биопленки и инфекции. *Журнал инфектологии*. 2010; 2 (3): 4—15.
11. Раилкин А.И. *Процессы колонизации и защита от биообрастания*. СПб.: Издательство Санкт-Петербургского Университета; 1998.
16. Смирнова Т.А., Диденко Л.В., Азизбекян Р.Р., Романова Ю.М. Структурно-функциональная характеристика бактериальных биопленок. *Микробиология*. 2010; 79 (4): 435—46.

Поступила 17.08.15

REFERENCES

1. Nikolaev Yu.A., Plakunov V.K. Biomembrane — the «city of germs» or equivalent multicellular organism? *Mikrobiologiya*. 2007; 76 (2): 149—63. (in Russian)
2. Wong G.C., O'Toole G.A. All together now: Integrating biofilm research across disciplines. *MRS Bull.* 2011; 36 (15): 339—42.
3. Zaslavskaya N.V., Artemenko N.K., Chizhevskaya M.M., Tets V.V. Features of survival of bacteria in microbial communities. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2000; 2 (2 Suppl. 1): 19—20. (in Russian)
4. Aparna M.S., Yadav S. Biofilms: microbes and disease. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008; 12 (6): 526—30.
5. Hirai H., Takada H., Ogata Y., Yamashita R., Mizukawa K., Saha M. et al. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. *Mar. Pollut. Bull.* 2011; 62 (8): 1683—92.

6. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «Plastisphere»: Microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47 (13): 7137—46.
7. Titova S.V., Kushnareva E.V. Evaluation of *V. cholerae* in the formation of biofilms in vitro using a novel technique. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; (10): 375—9. (in Russian)
8. Gorbunov V.A., Titov L.P., Ermakova T.S. A multicenter study of antibiotic resistance of nosocomial strains of *Pseudomonas aeruginosa* in the Republic of Belarus. *Zdravookhranenie (Belarus)*. 2007; (1): 28—31. (in Russian)
9. Titova S.V., Kushnareva E.V. Using a new method for studying the dynamics of biofilm formation in *V. cholerae* conditions, approximate to the natural one. *Izvestiya vuzov. Severo-Kavkazskiy region. Estestvennyye nauki*. 2014; (5): 73—7. (in Russian)
10. Gostev V.V., Sidorenko S.V. Bacterial biofilm formation and infections. *Zhurnal infektologii*. 2010; 2 (3): 4—15. (in Russian)
11. Railkin A.I. *The Processes of Colonization and Protection Against Fouling [Protsessy kolonizatsii i zashchita ot bioobrastaniya]*. St. Petersburg: Izdatel'stvo Sankt-Peterburgskogo Universiteta; 1998. (in Russian)
12. Marschall K.C., Savage D.C., Fletcher M., eds. *Mechanisms of Bacterial Adhesion at Solid-Water Interfaces. Bacterial Adhesion (Mechanisms and physiological Significance)*. New York: Plenum Press; 1985: 133—55.
13. O'Toole G.A., Kolter R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol. Microbiol.* 1998; 30 (2): 295—304.
14. Pratt L.A., Kolter R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol. Microbiol.* 1998; 30 (2): 285—93.
15. Watnick P.I., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholera* biofilm. *Mol. Microbiol.* 1999; 34 (3): 586—95.
16. Smirnova T.A., Didenko L.V., Azizbekyan R.R., Romanova Yu.M. Structural and functional characterization of bacterial biofilms. *Mikrobiologiya*. 2010; 79 (4): 435—46. (in Russian)
17. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284 (5418): 1318—22.
18. Davies D.G., Parsek M.R., Pearson J.P., Iglewski B.H., Costerton J.W., Greenberg E.P. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*. 1998; 280 (5361): 295—8.
19. Watnick P.I., Lauriano C.M., Klose K.E., Kolter R. The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholera* O139. *Mol. Microbiol.* 2001; 39 (2): 223—35.
20. Zettler E.R., Tracy M.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the «plastisphere»: microbial communities on plastic marine debris. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47 (13): 7137—46.

Received 17.08.15

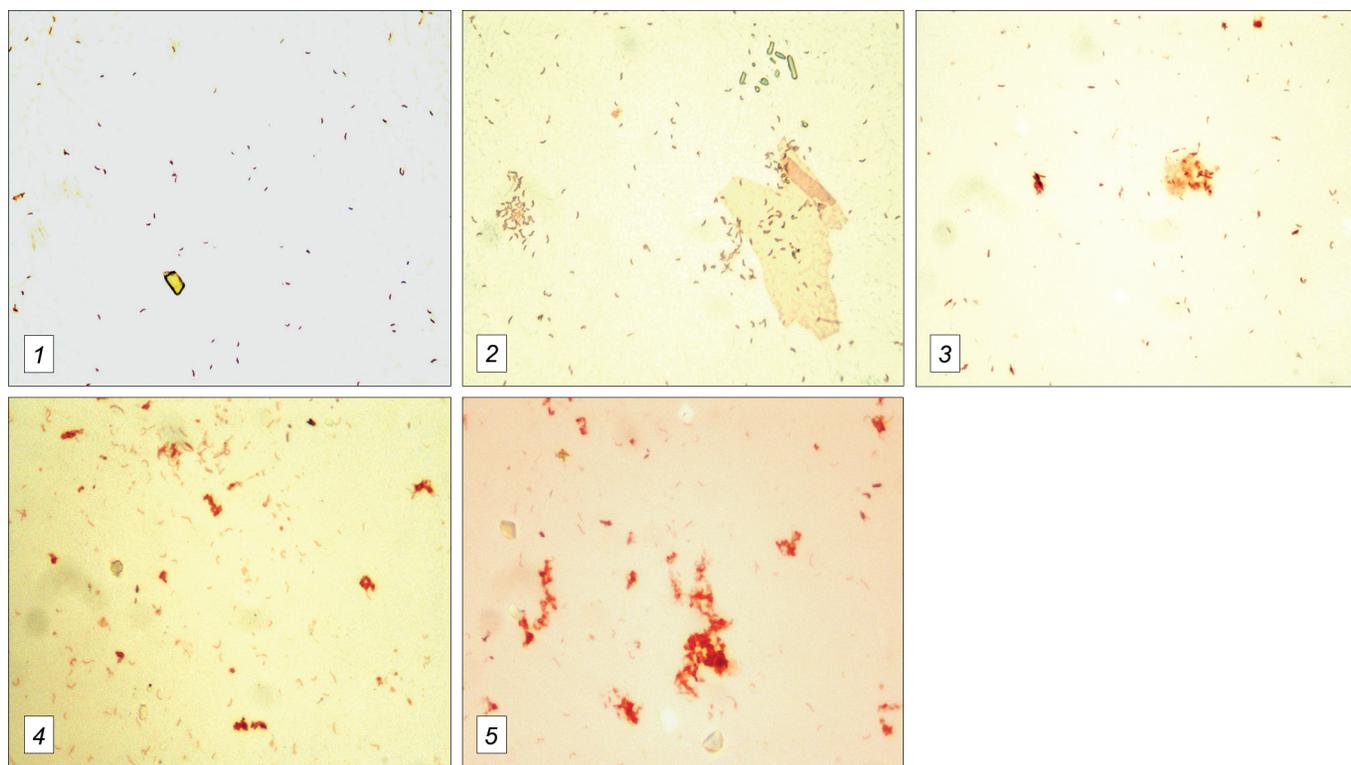


Рис. 1. Био пленки под световым микроскопом.

1 — *V. El Tor* 5879 на 1-е сутки (стекло); 2 — *V. El Tor* 55 на 2-е сутки (пластик); 3 — *V. El Tor* 19613 на 3-и сутки (пластик); 4 — *V. El Tor* 18904 на 4-е сутки (пластик); 5 — *V. El Tor* 5879 на 5-е сутки (стекло).  
Окраска конго красным и фуксином (1—5-е сутки). Ув.  $10 \times 100$ .

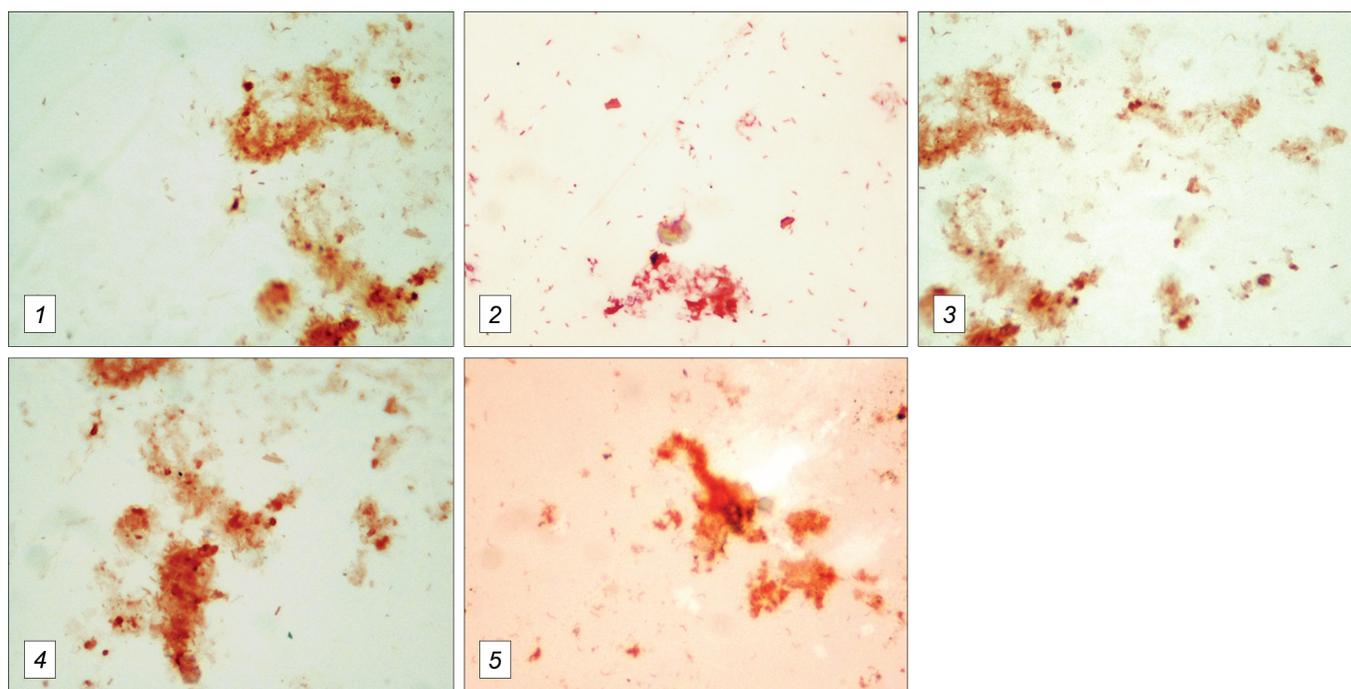


Рис. 2. Био пленки под световым микроскопом.

1 — *V. El Tor* 5879 на 6-е сутки (стекло); 2 — *V. El Tor* 19613 на 6-е сутки (пластик); 3 — *V. El Tor* 55 на 7-е сутки (пластик); 4 — *V. El Tor* 5879 на 8-е сутки (пластик); 5 — *V. El Tor* 55 на 9-е сутки (стекло).  
Окраска конго красным и фуксином (6—9-е сутки). Ув.  $10 \times 100$ .

К ст. *Титовой С.В.* и соавт.

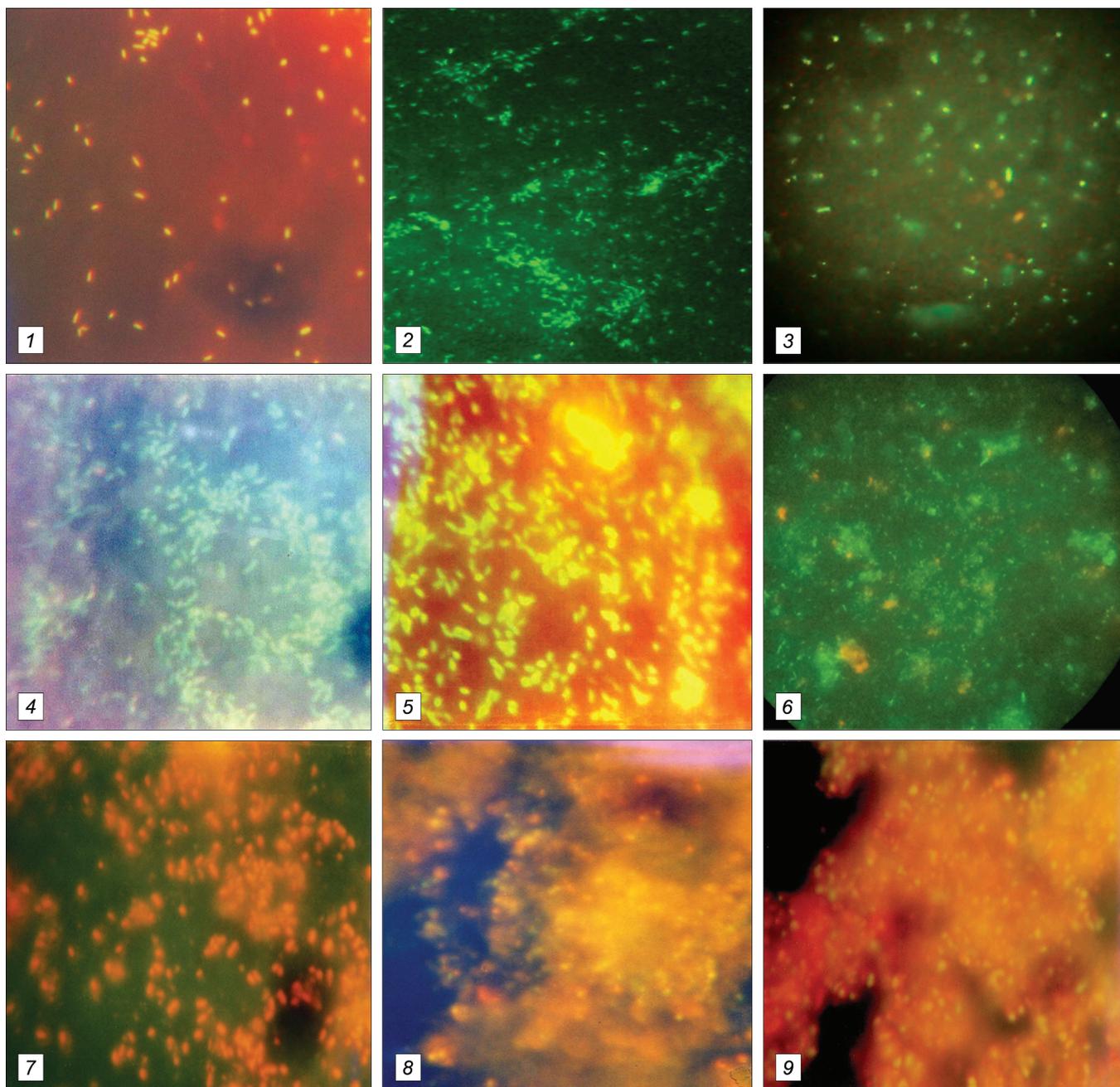


Рис. 3. Био пленки под люминесцентным микроскопом.

1—3 — *V. El Tor* P-5392 на 1, 2, 3-и сутки; 4 — *V. El Tor* P-5392 на 4-е сутки; 5 — *V. El Tor* P-5392 на 5-е сутки; 6 — *V. El Tor* P-5392 на 7-е сутки; 7 — *V. El Tor* P-5392 на 14-е сутки; 8 — *V. El Tor* P-5392 на 30-е сутки; 9 — *V. El Tor* P-5392 на 60-е сут.  
Окраска акридиновым оранжевым (1—60-е сутки). Ув.  $10 \times 100$ .