

Санкт-Петербургский государственный университет

Шакирова Айгуль Ильдусовна

**Выявление представителей рода *Mycobacterium* в
аквариумной воде, находящейся в замкнутой системе очистки**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Работа выполнена на кафедре
микробиологии СПбГУ

Научный руководитель - доцент
каф. микробиологии СПбГУ,
к.б.н. Е.Ю.Дмитриева

Санкт-Петербург

2016 г.

Оглавление

	Стр
1. Список сокращений	2
2. Введение	4
3. Обзор научной литературы «Водные микобактерии, потенциально опасные для здоровья людей и гидробионтов»	6
3.1. Нетуберкулезные микобактерии водопроводной воды, вызывающие заболевания у людей.....	6
3.2. Нетуберкулезные микобактерии и проблемы профессиональной аквариумистики.....	12
3.2.1. Санация воды, используемой в профессиональной аквариумистике, и ее особенности, влияющие на микробиологический состав	12
3.2.2. Нетуберкулезные микобактерии, вызывающие заболевания у рыб.....	13
3.2.3. Профессиональные заболевания работников аквариумистики, вызванные нетуберкулезными микобактериями.....	15
3.3. Биологические свойства микобактерий	17
3.3.1. Таксономическое положение и классификация.....	17
3.3.2. Структура оболочки нетуберкулезных микобактерий	18
3.3.3. Физиологические особенности нетуберкулезных микобактерий.....	19
4. Материалы и методы исследования	22
4.1. Объект исследования.....	22
4.2. Питательные среды для выделения и культивирования микобактерий.....	22
4.3. Окраска бактериальных мазков на кислото-спиртоустойчивость.....	24
4.4. Методики проведения идентификационных тестов.....	24
5. Результаты и их обсуждение	26
5.1. Подбор твердой питательной среды для выявления микобактерий из аквариумной воды методом прямого высева.....	26
5.2. Выявление кислото-спиртоустойчивых клонов бактерий на неселективных питательных средах.....	30
5.3. Идентификация выделенных бактериальных штаммов.....	31
5.3.1. Внешний вид колоний, особенности роста, отношение к свету.....	31
5.3.2. Кислото- спиртоустойчивость, морфология клеток.....	31
5.3.3. Идентификация штаммов 14, 40 и 48 по последовательностям гена 16s рРНК.....	31
5.3.4. Фенотипические свойства штаммов 14, 40 и 48, постановка заключительного идентификационного диагноза.....	39
5.3.5. Заключение.....	41
6. Выводы	41
7. Список литературы	42
8. Приложение	46

1. Список сокращений

MAC (*Mycobacterium avium complex*) – группа *M. avium*

MAIS (*Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*) – группа, объединяющая *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*

MFG (*Mycobacterium fortuitum group*) – группа *Mycobacterium fortuitum*

MTC (*Mycobacterium terrae complex*) – группа *Mycobacterium terrae*

NTM (*Nontuberculosis mycobacteria*) – нетуберкулезные микобактерии

МАПГ - Миколил-арабиногалактан-пептидогликан

КОЕ – Колониеобразующие единицы

2. Введение.

Проблема микробиологической безопасности воды является актуальной как для слаборазвитых, так и для индустриальных стран. Особенно остро эта проблема стоит в крупных городах, где распределение воды осуществляется посредством централизованной системы водоснабжения. Вода центральной системы водоснабжения используется в бытовых целях, для приготовления пищи, доставляется в медицинские и общеобразовательные учреждения.

В профессиональной аквариумистике вода центральной системы водоснабжения используется для приготовления аквариумной воды. Патогенные и условно-патогенные микроорганизмы, содержащиеся в воде, могут стать причиной заболеваний гидробионтов и персонала, обслуживающего работу аквариумов.

Особое внимание при рассмотрении проблем безопасности воды уделяется микобактериям. В настоящее время описан ряд условно-патогенных микобактерий, относящихся к группе нетуберкулезных, способных вызывать заболевания у человека и животных. Статистические данные регистрируют ежегодный рост количества случаев заболеваний кожи, лимфатических сосудов, легочных и генерализованных инфекций, вызванных у людей нетуберкулезными микобактериями. Сельское хозяйство, рыбная промышленность, владельцы животных и держатели аквариумов терпят убытки в связи с высокой заболеваемостью животных нетуберкулезными микобактериями.

В крупнотоннажной аквариумистике используется система замкнутой очистки воды, которая обеспечивает рециркуляцию и может стать источником накопления патогенных и условно-патогенных микроорганизмов. Широкому распространению и накоплению микобактерий в системах очистки воды способствует специфическое строение оболочки микобактерий. В ней содержатся гидрофобные миколовые кислоты, снижающие чувствительность микобактерий к дезинфекции, облегчающие их прикрепление к твердым поверхностям и образование биопленок.

В научной литературе практически отсутствуют данные о выявлении микобактерий в воде крупнотоннажных аквариумов, оснащенных системой замкнутой очистки воды. Данная работа явилась одним из этапов сотрудничества кафедры микробиологии с Санкт-Петербургским океанариумом. Изучение разнообразия микобактерий, содержащихся в воде аквариумов необходимо для оценки рисков заражения нетуберкулезными микобактериями гидробионтов и персонала океанариума, а также постоянного совершенствования методов очистки аквариумной воды, проводимого Санкт-Петербургским океанариумом.

В связи с этим целью данного исследования стало выявление микобактерий в аквариумной воде, находящейся в замкнутой системе очистки, на примере аквариума № 19 Санкт-Петербургского океанариума.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Подобрать питательную среду для выделения микобактерий из аквариумной воды.
2. Разработать алгоритм выделения микобактерий из аквариумной воды.
3. Выделить и очистить изоляты микобактерий, оценить их численность в исследуемой воде.
4. Провести идентификацию выделенных штаммов микобактерий.

3. Обзор литературы

«Водные микобактерии, потенциально опасные для здоровья людей и гидробионтов»

3.1. Нетуберкулезные микобактерии водопроводной воды, вызывающие заболевания у людей

В настоящий момент описано 170 видов микобактерий (Euzebu, 2016), из которых патогенными для людей и животных признано 73 вида (Goodfellow et al., 2012).

Источниками заражения людей и животных патогенными микобактериями являются вода и почва. Из водопроводной воды центральной системы городского водоснабжения выявлены патогенные нетуберкулезные микобактерии, относящиеся к следующим видам: *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. kansasii*, *M. abscessus*, *M. flavescens*, *M. gadium*, *M. gilvum*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. terrae* (Thomson, 2013; Falkinham, 2011; Covert, 1999; Le Dantec, 2002; Vaerewijck, 2005). Все вышеперечисленные виды микобактерий вызывают заболевания у людей.

Следующие виды микобактерий из водопроводной воды способны вызывать заболевания у животных: *M. lentiflavum*, *M. interjectum*, *M. gordonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. poriferae*, *M. scrofulaceum*, *M. farcinogenes*, *M. avium*, *M. senegalense*, *M. intracellulare*, *M. gadium*, *M. malmoense*, *M. nonchromogenicum*, *M. simiae*, *M. duvalii*, *M. chelonae*, *M. kansasii*, *M. palustre*, *M. fortuitum*, *M. szulgai* (Goodfellow et al., 2012; Akbari et al., 2014; Jacobs et al., 2009).

Впервые кислотоустойчивые бактерии (микобактерии) были выделены из водопроводной воды Галли-Валерио и Борнардом в 1912 году и названы *M. aquae* (Kazda, 2000). После дальнейших исследований они были отнесены к виду *M. gordonae* (Runyon, 1974). В 1959 году Швабахер сделал вывод о том, что изоляты микобактерий, выделенные из поражений кожи у аквариумных хладнокровных животных и у людей, имеют одинаковое водное происхождение. Но долгое время водопроводная вода не рассматривалась как источник заражения людей нетуберкулезными микобактериями. В 1970 году появились работы, доказывающие причастность микобактерий водопроводной воды к патогенезу у людей (Bullin et al, 1970; Bailey, 1970).

По данным ВОЗ питьевая вода центральной системы водоснабжения является одним из основных источников заражения людей нетуберкулезными микобактериями (Nichols et al., 2004).

Во всех странах мира, перед поступлением в центральную распределительную сеть, вода подвергается процедурам санации (озонирование, обработка активным хлором, ультрафиолетовое облучение). Это приводит к снижению общей численности бактерий в питьевой воде. Тем не менее, остаточная концентрация устойчивых нетуберкулезных микобактерий остается существенной и составляет несколько десятков КОЕ/мл (Le Dantec et al., 2002a, Eun Sook Lee, 2009, Falkinham III, 1996; Taylor et al., 2000; Le Dantec et al., 2002; Falkinham III 2003; Hilborn et al., 2006).

В США и Австралии в 2005 году заболеваемость нетуберкулезными микобактериями составила 3,2 - 8,6 случаев на каждые 100 тысяч населения (Van Ingen et al., 2011; Thomson et al., 2010). Ежегодно данный показатель возрастает на 2,6% (Prevots et al., 2010). В РФ такая статистика пока отсутствует.

За период 1999-2010 гг. в США зарегистрировано 2990 случаев смертности в результате заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, что составляет 0,01% от общего количества смертей за этот период (Mirsaedi et al., 2014).

Заражение нетуберкулезными микобактериями чаще всего происходит при приеме зараженной питьевой воды центральной системы водоснабжения, особенно в лечебных учреждениях (Le Dantec, 2002; Ulmann, 2015).

Нетуберкулезные микобактерии, встречающиеся в водопроводной воде, вызывают заболевания у всех групп населения. Тем не менее, наиболее подверженными заражению нетуберкулезными микобактериями являются пациенты больничных учреждений, лица с иммунодефицитами, болезнями легких, раком крови, пациенты, подвергшиеся хирургическим вмешательствам (Mirsaedi et al., 2014).

В 1980-90е годы количество заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, резко возросло, что связано с ростом количества случаев заражения ВИЧ. На сегодняшний день заболевания, вызываемые нетуберкулезными микобактериями, стоят на втором месте в списке причин, вызывающих смерть у людей с иммунодефицитами (Nichols et al., 2004).

В настоящий момент особую озабоченность вызывает ряд нетуберкулезных микобактерий (*M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. gordonae*), вызывающих заболевания у конкретных профессиональных групп людей и гидробионтов - объектов разведения в океанариумах, на предприятиях аквакультуры, в профессиональной аквариумистике. Показана их способность заражать персонал этих учреждений (Nichols et al., 2004; Decostere et al., 2004; Novotny et al., 2010; Akbari et al., 2014). Этот вопрос более подробно будет изложен в следующей главе.

Нетуберкулезные микобактерии объединены в ряд групп для эффективной и быстрой идентификации в медицинской практике. Основой для объединения микобактерий служило сходство морфологических и физиолого-биохимических свойств.

В настоящий момент описаны следующие группы: МАС, *M.chelonae\abscessus group*, MFG, МТС (Kothavade, 2012).

Ниже мы приводим характеристики этих групп микобактерий и характер вызываемых ими патологических процессов в организме человека.

1. Группа МАС (*Mycobacterium avium complex*). В эту группу входят следующие виды: *M. avium subsp. avium*, *M. avium subsp. silvaticum*, *M. avium subsp. paratuberculosis*, *M. intracellulare*. В 1933 году Барксдэйл и Ким показали способность *M. avium* вызывать заболевания у людей (Barksdale et al, 1977). С 1956 года в группу МАС введен вид *M. scrofulaceum* и группа МАС переименована в MAIS (*Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*) (Turenne et al., 2004). В настоящий момент в литературе авторы оперируют названиями обеих групп (Turenne, 2007; Nichols et al, 2004).

Микобактерии группы МАС вызывают заболевания легких (псевдотуберкулез, аллергический альвеолит, пневмонии), заболевания костей (остеомиелиты), заболевания кожи (вздутие, болезненность), затылочные лимфадениты у детей с режущимися зубами, генерализованные инфекции (бактериемии) (De Groote, WHO, 2004; Falkinham, 2001).

Возбудители группы МАС (особенно *M. avium* и *M. intracellulare*) ответственны за 72% всех инфекций, вызываемых нетуберкулезными микобактериями (ЕРА, 2009). Частота заболеваемости от всех зарегистрированных случаев заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, составляет от 64 до 85% по Северной Америке и от 19,8 до 82% в Европе (Prevots et al., 2015).

Микобактерии группы МАС вызывают первичные инфекции по типу псевдотуберкулеза и в форме аллергического альвеолита.

Микобактерии группы МАС вызывают вторичные инфекции по типу псевдотуберкулеза у пациентов с ВИЧ, эмфиземой, бронхоэктазией (очаговое расширение бронхов), кистозным фиброзом, туберкулезом, гистоплазмозом, силикозом, пневмонией, раком легких. Микобактерии группы МАС вызывают осложнения у 40% больных СПИД (Nightingale et al, 1992). В 20% случаев инфекция, вызванная МАС, осложняется комбинированной инфекцией с *M. kansasii*.

M. scrofulaceum вызывает затылочные лимфадениты у детей с режущимися зубами (Wayne et al., 1992).

2. Группа *M.chelonae/abscessus* group. В состав группы входят *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, и *M. salmoniphilum* (Simmon et al., 2011).

До 1974 года вид *M. abscessus* считался подвидом *M. chelonae*, затем была доказана их принадлежность к разным видам и создана группа *M. chelonae/abscessus* group (Brown-Elliot et al., 2002). С 2001 года в состав группы включены еще 4 вида (*M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. bolletii*, and *M. salmoniphilum*). За исключением *M. salmoniphilum* все представители являются возбудителями заболеваний человека (Simmon et al., 2012).

В США и Бразилии заболевания, вызванные представителями группы *M. chelonae/abscessus* составляет от 4 до 13% всех зарегистрированных микобактериальных заболеваний. В Европе этот показатель составляет от 5 до 8,6%, а в Тайване 30,2% (Prevots, 2015).

Представители группы *M. chelonae/abscessus* вызывают заболевания кожи (гранулемы) и мягких тканей (гиподермиты), лимфадениты, пневмонии, инфекции кровотока (бактериемии), генерализованные инфекции (Griffith et al, 1993; Wallace, 1983, Kothavade, 2012).

3. Группа MFG (*Mycobacterium fortuitum* group).

В состав группы входят следующие виды *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense*, и *M. bonickei* (Brown-Elliot et al., 2002).

Из водопроводной воды наиболее часто выделяют *M. fortuitum*, *M. peregrinum* и *M. septicum*, которые могут также являться возбудителями заболеваний человека. Они вызывают поражения легких, кожи, генерализованные инфекции.

Члены группы MFG были изолированы из аэрозоля воздуха в домах больных с нетуберкулезными микобактериальными поражениями легких (Thomson et al., 2013a).

Представители группы MFG были выделены из водопроводной воды Парижа, Мехико и некоторых городов Южной Африки (Dubrou et al., 2013; Le Dantec et al., 2002; Castillo-Rodal et al., 2012; September et al., 2004).

M. fortuitum впервые описан как патоген человека Да Коста Крузом в 1938 году (Runyon, 1972). Он является возбудителем поражений кожи (волдыри, язвы, фурункулез) и подлежащих тканей, вызывает болезни легких, кровеносных сосудов (полиартериты, лейкоцитокластический васкулит), костей и суставов (остеомиелит), кератит и затылочный лимфаденит (Kothavade et al., 2013).

M. septicum впервые был описан как причина сепсиса у детей с метастазирующей гепатобластомой (Brown-Elliot et al., 2002). Описаны случаи возникновения фиброзно-

кавернозного туберкулеза, вызванного *M. septicum*, сопровождающегося потерей в весе и сильным кашлем (Lulu Lian et al., 2013).

M. peregrinum вызывает гранулематозные поражения кожи (Kamijoa et al., 2012). Описаны случаи поражения легких с образованием каверн, в которых локализовался возбудитель (Todorova et al., 2015).

Частота заболеваемости MFG от всех зарегистрированных случаев заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, составляет от 3 до 8% по Северной Америке, от 3,4 до 16% по Южной Америке, от 5 до 62,5% по Европе (Prevots, 2015).

4. Группа МТС (*Mycobacterium terrae* complex). Включает виды *M. terrae*, *M. triviale*, *M. nonchromogenicum*, *M. hibberinae*.

Представители группы изначально считались сапрофитами, лишь в последние годы появились сведения об их патогенных свойствах (Smith et al., 2000). В 1983 году появилось сообщение о шести случаях заболеваний человека, вызванных *M. nonchromogenicum*. В 1983 и 1988 году появились сообщения о случаях заражения *M. terrae*, ставших причиной легочных заболеваний (Wayne et al., 1992).

В Шотландии за 1992-2010 годы заболеваемость составила 6,3% от всех зарегистрированных микобактериальных заболеваний за этот период (Prevots et al., 2015).

Представители этой группы вызывают остеоартриты, тендовагиниты (воспаление синовиальной оболочки сухожильного влагалища), гранулемы, болезни легких, кишечника и генерализованные инфекции.

Ниже описаны свойства патогенных нетуберкулезных микобактерий, не объединенных в группы.

1. *M. kansasii*

Был описан как возбудитель инфекций в 1953 году Бухлером и Поллаком (De Lima et al., 2014). Выделен из водопроводной воды в 1967 году (Bailey et al., 1970).

M. kansasii занимает второе место по частоте встречаемости среди нетуберкулезных микобактерий - возбудителей заболеваний легких. Частота заболеваемости 0,5-1/100 тысяч населения. (De Groote, 2004).

В Бразилии и Италии заболеваемость превышает 30%, а в Англии составляет 70% от всех зарегистрированных заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, и превышает данный показатель по MAC (Prevots et al., 2015).

M. kansasii вызывает заболевания легких (псевдотуберкулез и пневмония), поражения кожи, генерализованные инфекции.

2. *M. szulgai*

Впервые описан в 1972 году и был выделен из клинических образцов по всему миру (Falkinham, 1996). Частота заболеваемости составляет 7,6% от всех выделенных образцов нетуберкулезных микобактерий по данным за 1999–2005 год в Нидерландах (Prevots, 2015).

Данный вид вызывает заболевания легких по типу псевдотуберкулеза (Wayne et al., 1992).

Поражения могут затрагивать суставы и кости (бурситы и остеомиелиты), лимфатические узлы (шейные лимфадениты), кожу (фурункулезы). У больных СПИД зафиксированы случаи генерализованных инфекций (Falkinham, 1996).

3. *M. xenopi*

Патогенность для человека установлена в 1967 году, из водопроводной воды был выделен в 1970 году (Bullin et al., 1970).

Частота заболеваемости от всех зарегистрированных случаев заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, составляет от 1 до 23% по Северной Америке и от 6 до 28,1% по Европе (Prevots, 2015).

Вызывает заболевания легких по типу псевдотуберкулеза у больных с иммунодефицитами и генерализованные инфекции у иммунокомпетентных пациентов (Mirza et al., 2013)

4. *M. simiae*

Патогенность для человека установлена в 1971 году (Woods et al., 1987).

Частота заболеваемости от всех зарегистрированных случаев заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями, составляет 3% в США по данным за 1994–2006 годы и от 14,3 до 22% по Средней Азии по данным за 2005–2008 годы (Prevots et al, 2005).

Данный вид вызывает хронические заболевания легких, генерализованные инфекции и поражения почек (Woods et al., 1987).

5. *M. porcinum*

Впервые описан в 1973 как возбудитель лимфаденитов у свиней.

В 2004 году был впервые охарактеризован как патоген человека.

Данный вид вызывает поражения кожи, кровеносных сосудов, перитониты и остеомиелиты. Был изолирован из водопроводной воды, может являться причиной внутрибольничных инфекций (Brown-Elliott et al., 2011).

3.2. Нетуберкулезные микобактерии и проблемы профессиональной аквариумистики

3.2.1. Санация воды, используемой в профессиональной аквариумистике, и ее особенности, влияющие на микробиологический состав аквариумной воды

В профессиональной аквариумистике используется вода центральной системы водоснабжения, которая содержит всех патогенных нетуберкулезных микобактерий, охарактеризованных в главе 2.1.

В крупнотоннажной аквариумистике вода находится в замкнутой системе очистки, которая включает очистку от механических примесей, флотацию, очистку от органических примесей на биофилтре, озонирование, облучение ультрафиолетом. При лечении гидробионтов в замкнутую систему вводят фармацевтические препараты (малахитовый зеленый, фиолетовый К, антибиотики). В результате таких обработок микробиота воды обогащается устойчивыми видами бактерий, в первую очередь бактериями, содержащими миколовые кислоты. Их клеточная стенка характеризуется сниженной проницаемостью к saniрующим агентам.

Действительно, имеется много литературных данных, что микобактерии обладают устойчивостью к обработкам воды. Так Ле Дантеком с коллегами была показана устойчивость *M. fortuitum*, *M. chelonae* и *M. gordoniae* к обработкам воды на водоочистных сооружениях (Le Dantec et al., 2002). Фалкинхам с коллегами показал, что *M. avium* и *M. intracellulare* могут быть выделены из воды, прошедшей обработку, перед поступлением в распределительную сеть (Falkinham et al., 2001). Как было упомянуто выше, микобактерии способны задерживаться на механических фильтрах благодаря способности образовывать биопленки.

Показано, что устойчивость микобактерий к облучению ультрафиолетом превышает этот показатель у *E. coli* и неодинакова для разных видов. Среди микобактерий, обнаруженных в воде, наибольшую устойчивость проявляет *M. fortuitum* (Eun-Sook Lee et al., 2010 a,b).

Тэйлором показано (Taylor et al., 2000), что *M. avium* устойчива к дезинфекции озоном, и что размножающиеся в неочищенной воде клетки микобактерий в 10 раз более устойчивы к озону, чем выращенные в питательной среде. Микобактерии способны переживать озонирование, так как имеют гидрофобную поверхность и способны формировать агрегированные структуры (биопленки), защищающие их. Кроме того органические молекулы после озонирования переходят из биологически устойчивых форм в биоразлагаемые, которые затем легко усваиваются микобактериями.

3.2.2. Нетуберкулезные микобактерии, вызывающие заболевания у рыб

В аквариумной воде могут находиться микобактерии, которые содержались в водопроводной воде и микобактерии, которые находились непосредственно на самих гидробионтах и поступили из природных водоемов. Можно предположить, что обе группы микобактерий в системе замкнутой очистки аквариумов будут иметь тенденцию к накоплению. Показано, что видовой состав нетуберкулезных микобактерий воды, корма и декоративного окружения отличается от видового состава микобактерий, выделенных с аквариумных рыб (Beran et al., 2006).

Ряд нетуберкулезных микобактерий, встречающихся в водопроводной воде (гл 2.1.) описаны как возбудители заболеваний объектов профессиональной аквариумистики – случаи заболеваний зафиксированы для амфибий и рыб. Впервые патогенность у рыб описана Баталионом и коллегами на сазанах (*Cyprinus carpio*) в 1897 году (Aronson, 1926). Возбудителями заболеваний рыб, вызванных нетуберкулезными микобактериями, являются *M. marinum*, *M. chelonae/abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. haemophilum*, *M. montefiorensis*, *M. peregrinum/septicum*, *M. scrofulaceum*, *M. triviale*, *M. triplex*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum*, *M. avium*.

Считается, что к микобактериозам восприимчивы более 167 видов рыб (Jacobs et al, 2009). Заболевания, вызываемые нетуберкулезными микобактериями, у рыб являются одними из самых распространенных – в некоторых популяциях заболеваемость достигает 15% (Akbari et.al, 2014). Зарегистрированы случаи заражения в пресных и в соленых, искусственных и естественных местообитаниях (Novotny et al., 2010). Восприимчивость к микобактериальным инфекциям у разных видов рыб неодинакова.

M. marinum является причиной генерализованной инфекции у лаврака (*Dicentrarchus labrax*) (Ucko et al., 2002) и вызывает поражения печени у полосатого окуня (*Morone saxatilis*) (Lansdell et al., 1993).

У скалярии (*Pterophyllum scalare*) зафиксированы поражения селезенки в виде серовато-белых узелковых вкраплений, содержащие *M. marinum* (Zanoni et al., 2008).

Возбудитель выделен из тканей кишечника у анциструса (*Ancistrus lineolatus*), голубого неона (*Paracheirodon innesi*), скалярии (*Pterophyllum scalare*), пятнистого гурами (*Trichogaster trichopterus*), пецилии пятнистой (*Xiphophorus maculatus*), коридораса пятнистохвостого (*Corydoras caudimaculatus*), красного неона (*Paracheirodon axelrodi*), гуппи (*Poecilia reticulata*), малоплавниковой моллинезии (*Poecilia sphenops*) (Slany et al., 2014). *M. marinum* была выделена из жабр коридораса пятнистохвостого (*Corydoras caudimaculatus*), красного неона (*Paracheirodon axelrodi*), гуппи (*Poecilia reticulata*),

малоплавниковой моллинезии (*Poecilia sphenops*) и хелостомы (*Helostoma temminckii*) (Slany et al., 2014).

M. chelonae/abscessus. Микобактериоз, вызванный этими бактериями, был исследован Чангом и коллегами у молочных рыб (*Chanos chanos*), смертность при этом достигала 66,7%. Было отмечено появление красновато и серовато-белых узелков на поверхности брюшины, селезенки, почек, печени и желудочно-кишечного тракта типа ретикулоэндотелиальных эпителиоидных гранулем (Chang et al., 2006).

Ланделлом и коллегами было показано поражение печени, почек и селезенки у цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum* и *Cichlasoma rneeki*) (Lansdell et al., 1993).

Зафиксирован случай заражения *M. chelonae/abscessus* данио рерио (*Danio rerio*), у которых отмечалась эрозия кожи, изъязвления оснований хвостовых и грудных плавников. В некротических участках показано наличие гранулем. Заражение затрагивало гонады, печень и ткани брюшины (Astrofsky et al., 2000).

У японской оризии (*Oryzias latipes*) *M. chelonae/abscessus* вызывают гранулематозные повреждения кожи и опухоли в районе головы и анального отверстия, что является частой причиной смерти данных рыб (Teska et al., 1997).

Данные микобактерии выделены из тканей желудочно-кишечного тракта и селезенки серой кефали (*Mugil curema*) (Perez et al., 2001).

M. fortuitum вызывает поражения кожи и плавников у данио рерио (*Danio rerio*). Инфекция сопровождается увеличением жабр с кровоизлияниями, эмболией сосудов жаберных дуг. Характерно вспучивание брюха, некроз печени и истощение (Astrofsky et al., 2000).

Сандерсом и коллегами показано заражение *M. fortuitum* у японской оризии (*Oryzias latipes*). Симптомами являются изменение цвета тела, побледнение спинного плавника, гранулемы на покровах, истощение, истирания плавников, нарушение равновесия (Sanders, 2001).

M. fortuitum выделен из органов брюшной полости у здоровых обыкновенных усачей (*Barbus barbus*) (Mrlik et al., 2012), из тканей печени, почек и селезенки цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum*) (Lansdell et al., 1993), органов желудочно-кишечного тракта кефали (*Mugil curema*) (Perez et al., 2001)

M. triplex может являться причиной заболевания у мурен (*Gymnothorax funebris* и *Gymnothorax moringa*). Вызывает образование гранулем на коже вокруг головы и туловища, в пределах дермы и подкожной фасции (Herbst et al., 2001).

Возбудитель выделен из тканей жабр речного окуня (*Perca Fluviatilis*) (Slany et al., 2014; Mrlik et al., 2012).

M. gordonae поражает печень и селезенку, может являться причиной смерти гуппи (*Poecilia reticulata*) (Sakai et al., 2005). Возбудитель выделен из тканей жабр и кишечника сазана (*Cyprinus carpio*) (Mrlik et al., 2012; Slany et al., 2014).

M. peregrinum выделен из покровов здоровых рыб золотого карася (*Carassius carassius*) и жабр американского сомика (*Ictalurus nebulosus*) (Mrlik et al., 2012), а также из тканей кишечника речного окуня (*Perca Fluviatilis*), где обнаружен в серозной оболочке и мезентеральной жировой ткани (Slany et al., 2014).

M. scrofulaceum может являться причиной поражения печени у бычка-рогача (*Leptocottus armatus*) (Lansdell et al., 1993). Возбудитель выделен из тканей желудочно-кишечного тракта кефали (*Mugil curema*) (Perez et al., 2001).

M. montefiorensis вызывает поражения кожи мурен (*Gymnothorax funebris* и *Gymnothorax moringa*) (Levi et al., 2003).

M. haemophilum является причиной множественных гранулем в тканях данео рерио (*Danio rerio*) (Whipps et al., 2007b).

M. simiae вызывает поражения печени, почек и селезенки у цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum*) (Lansdell et al., 1993).

M. avium выделен из тканей жабр у линей (*Tinca tinca*) (Slany et al., 2014).

Заражение рыб происходит при заглатывании, поедании зараженной пищи, трансвариально (у живородящих рыб) и непосредственно через воду (Lescenko et al., 2003). Бактерии обладают большей вирулентностью, если поедаются вместе с одноклеточным хозяином (амебы, жгутиковые), внутри которого могут находиться (Rowe et al., 2014).

Установлено, что гидробионты могут быть носителями микобактерий, в том числе и патогенных, не имея симптомов заболевания (Rowe et al., 2014).

3.2.3. Профессиональные заболевания работников аквариумистики, вызванные нетуберкулезными микобактериями

Деятельность работников профессиональной аквариумистики подразумевает постоянный контакт с водой, содержащей микобактерий, что повышает риск заражения микобактериозами. Согласно литературным данным, наиболее часто у данной группы людей регистрируются заболевания, вызванные *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. gordonae* (Decostere et al., 2004; Novotny et al., 2010; Akbari et al., 2014). Заболевания, вызываемые *M. fortuitum*, *M. chelonae* и *M. gordonae* мы рассмотрели в главе 2.1.

В 1951 году Норденом и Линнелом был описан возбудитель гранулематозных поражений кожи человека («гранулемы бассейнов») *M. balnei*. Позже он был признан

представителем вида *M. marinum*, описанного Аронсоном как возбудителя болезней рыб в 1926 году. В 1962 году Свифт и Кохен сообщили о случае заражения человека *M. marinum* в результате инфицирования раны аквариумной водой (Caputo et al., 2010).

M. marinum является возбудителем гранулематозных поражений кожи у человека, которые могут распространяться в глубоколежащие ткани, становясь причиной тендосиновитов, артритов и остеомиелитов (Broutin et al., 2012). Инфекция часто связана с развитием лимфангитов (или споротрихоидных инфекций), затрагивающих подкожные лимфоузлы (Wolinsky et al. 1972). *M. marinum* является причиной генерализованных инфекций у пациентов с иммунодефицитами (Falkinham, 1996).

M. marinum является причиной 81,8% случаев поражений кожи, вызванных нетуберкулезными микобактериями, по статистике с 1981 по 1990 годы в Тайланде (Kuilavanijaya et al., 1993).

Представители этого вида распространены по всему миру и часто становятся причиной зооантропозов. В исследовании, проведенном в Сингапуре, участвовало 38 пациентов, из которых 34% имели домашние аквариумы, 11% имели профессии, связанные с рыбой. В исследовании, проведенном во Франции, участвовало 63 пациента, из которых 84% имели контакт с гидробионтами. В исследовании, проведенном в Гонконге, участвовало 24 больных, из которых 67% были рыбаками, и в 67% случаев раны были инфицированы морской водой (Cheung et al., 2010).

3.3. Биологические свойства микобактерий

Микобактерии имеют вид слегка изогнутых или прямых палочек (1,0-10×0,2-0,6 мкм). Может встречаться редуцированное ветвление и нитевидные или мицелиальные структуры, которые, при любом воздействии, рассыпаются на короткие палочки или кокки. Микобактерии не образуют спор, капсул и конидий. Большинство микобактерий не окрашиваются по Граму или демонстрируют неоднородность окрашивания, но считаются грам-положительными (Magee and Ward, 2012).

3.3.1. Таксономическое положение и классификация.

По филогенетической классификации, основанной на сходстве генов 16S-рРНК, микобактерии отнесены к филе VXXVI *Actinobacteria*, класс *Actinobacteria*, подкласс *Actinobacteridae*, порядок *Actinomycetales*, подпорядок *Corynebacterineae*, семейство *Mycobacteriaceae*, род *Mycobacterium* (Euzebu, 2016).

В Определителе бактерий Берджи микобактерии выделены в отдельную группу 21. Ключевым свойством, позволяющим выделить микобактерий в отдельный род, является кислото-спиртоустойчивость хотя бы на одной из стадий жизненного цикла (Хоулт и др., 1997). Кислото-спиртоустойчивость – это свойство бактерий сохранять окраску при обработке смесью кислота-спирт после окрашивания горячим раствором карболфуксина. Это свойство микобактерий обуславливается присутствием восков (высокомолекулярных липидов) в клеточной стенке.

Риньоном была предложена классификация микобактерий на основе их скорости роста и способности продуцировать пигмент каротиноидной природы (Runyon, 1959). Были выделены три группы медленнорастущих микобактерий (Slow growers) и одна группа быстрорастущих (Rapid growers)

1. Photochromogens - культуры на свету приобретают лимонно-желтую окраску.
2. Scotochromogens - в темноте образуют оранжево-желтый пигмент
3. Nonphototrophogenic - не пигментируются или имеют слабую желто-розовую окраску
4. Rapid Growers - колонии становятся видимыми без увеличения за время не более 48 часов, пигментация слабая или отсутствует.

Медленно- и быстрорастущие виды микобактерий имеют различия в структуре рРНК и организации генов, кодирующих рРНК. Показано, что медленнорастущие виды микобактерий имеют всего одну копию генов 5S, 16S и 23S рРНК, в то время как геном быстрорастущих микобактерий содержит 2 копии соответствующих генов. Кроме того

рРНК медленнорастущих видов содержит более длинную шпильку между 451 и 482 нуклеотидами, чем рРНК быстрорастущих видов микобактерий (Stahl and Urbance, 1990).

Одна копия генов рРНК у медленнорастущих микобактерий приводит к ограничению синтеза белка, что замедляет процесс роста (Falkinham, 1996). С другой стороны, это дает преимущества, например легкость накопления мутаций, позволяющих противостоять действию антибиотиков, направленных на рибосомы. Так же увеличивается время для адаптации к стрессам окружающей среды (Primm et al., 2004). Энергетические затраты на синтез длинноцепочечных жирных кислот, липидов и восков и непроницаемость богатой липидами клеточной стенки также замедляют рост.

Дифференциация видов рода *Mycobacterium* основывается на биохимических тестах, температуре роста, образовании пигмента и дифференциации генов 16S-рРНК, *groB*, *hsp65*, *secA* (Goodfellow, 2012; Хоулт и др, 1997; Zelazny et al., 2009).

В настоящее время описано 170 видов микобактерий (Ezeubi, 2016). Тем не менее, значительное количество новых изолятов микобактерий не соответствуют описанным ранее видам. Так Тортоли с коллегами (Tortoli et al., 2001) показали, что 30% микобактерий, выделенных из воды, почвы, воздуха и клинических образцов, не принадлежат ни к одному официально признанному виду микобактерий. Это свидетельствует о том, что таксономия рода *Mycobacterium* еще не до конца разработана и возможно открытие новых видов.

3.3.2 Структура оболочки нетуберкулезных микобактерий.

Микобактерии способны расти и размножаться при условиях, губительных для других бактерий. Устойчивость к широкому диапазону антибактериальных агентов, включая антибиотики и дезинфицирующие средства (соединения хлора), обеспечивается оболочкой с низкой проницаемостью. Поверхность микобактерий является гидрофобной, что позволяет им жить на поверхности раздела сред вода-воздух и осуществлять свойственный им аэробный метаболизм (Falkinham, 2008).

Над клеточной мембраной микобактерий находится толстый слой пептидогликана, ковалентно связанного с арабиногалактаном, который в свою очередь связан с миколовыми кислотами, имеющими длинные разветвленные цепи. Эта структура получила название кора клеточной стенки или миколил-арабиногалактан-пептидогликанового комплекса (МАГП). Над кором располагается квазинаружная мембрана, внутренний листок которой составляют миколовые кислоты (Brennan, 2003).

Миколовые кислоты, входящие в состав квазинаружной мембраны обладают низкой текучестью и придают оболочке непроницаемость для липофильных антибиотиков. В

состав миколовых кислот могут входить функциональные группы, различные для разных видов. Это объясняет разную устойчивость отдельных видов микобактерий к хлору. Так *M. scrofulaceum* в 5 раз более чувствителен к хлору, чем *M. avium* (Falkinham, 2003).

Толстую клеточную оболочку микобактерий пронизывают порыны, которые служат для поступления небольших гидрофильных молекул в клетку микобактерий. Длина главного порина MspA у *M. smegmatis* достигает 10 нм при диаметре 2,5 нм (Engelhardt et al., 2002). Такая протяженность поринов замедляет поступление веществ в клетку микобактерий.

Плотность каналов на поверхности клетки микобактерий в 50 раз меньше, чем на наружной мембране *E. coli*. Это снижает проницаемость оболочки микобактерий. Показано, что проницаемость поринов *M. smegmatis* ниже проницаемости поринов *E. coli* в 1000 раз (Engelhardt et al., 2002). Число поринов на поверхности микобактерий определяет не только различия в чувствительности к агрессивным воздействиям внешней среды, но и различия в скорости поступления в клетку питательных веществ и скорости роста отдельных видов.

Отмечается повышенная устойчивость микобактерий к анилиновым красителям. Это свойство определяется высоким содержанием липидов в клеточной стенке микобактерий. Низкая проницаемость оболочки микобактерий определяет их высокую устойчивость к присутствию в питательной среде анилиновых красителей - кристаллического фиолетового и малахитового зеленого - до 5 мкг/мл жидкой питательной среды (Jones, 2003). Формирование колоний тормозится этими красителями в концентрации 15 мкг/мл и 60 мкг/мл, соответственно. Это свойство используется для селективного выделения микобактерий.

3.3.3. Физиологические особенности нетуберкулезных микобактерий

Микобактерии могут использовать в качестве питательных субстратов широкий спектр углеводов: ацетон, алканы, бензол, гуминовые и фульво-кислоты, ди- и трихлорфенолы, керосин, морфолин, мочевины, нитроперен, пентохлорфенол, пирен, пиридины, полициклические ароматические углеводороды, пропан, стерины, тринитротолуол, трихлорэтилен, фенантрен, хлорид винила, хлор-фенольные соединения, этен (Falkinham, 1996).

Микобактерии живут в широком диапазоне температур. Выделяют термофильные виды, такие как *M. avium*, *M. chelonae* и *M. xenopi*, которые выживают при температуре более 55°C. Термофильность увеличивается в ряду: *M. kansasii* > *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. marinum* > *M. avium*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*

(Schulze-Robbecke, 1992). Микобактерии могут переживать условия замораживания (минус 75°C в питательной среде) в течение длительного времени, число клеток при этом увеличивается, по-видимому в результате дробления клеток (Iivanainen et al., 1995).

Микобактерии - аэробные бактерии, но способны расти при пониженном содержании кислорода. Так, *M. avium* и *M. intracellulare* размножаются, начиная с 6% кислорода в газовой среде. Эта способность позволяет микобактериям достигать наибольшей численности в средах с низким содержанием кислорода – воде и почве.

Микобактерии предпочитают для роста слабокислую среду, оптимальный диапазон для роста - pH 4,5-6. При значении pH свыше 6 рост микобактерий останавливается (Carson et al., 1978)

Нетуберкулезные микобактерии относительно устойчивы к действию тяжелых металлов и оксианионов. Показано, что *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum* проявляют устойчивость к кадмию, ртути, серебру и теллуриду (Falkinham et al., 1984). Эти микобактерии могут расти при концентрации хлорида ртути 10^{-4} М, что свидетельствует о способности микобактерий выживать при загрязнении окружающей среды тяжелыми металлами. Устойчивость *M. avium* к цинку, возможно, является причиной распространения этих микобактерий в гальванизированных (покрытых цинком) трубах (Falkinham et al., 1984).

Микобактерии – галотолерантные бактерии, отдельные виды микобактерий выдерживают концентрацию NaCl в питательной среде до 5%. Галотолерантность видоспецифична для микобактерий, способность к росту при 5% NaCl является идентификационным признаком (Magee and Ward, 2012).

Таким образом, микобактерии растут при широких диапазонах температуры, pH, солености, в аэробных и микроаэрофильных условиях. Это способствует их широкому распространению во многих экологических нишах (Falkinham, 1996).

Микобактерии способны формировать биопленки, которые защищают их от агрессивных факторов окружающей среды и служат для расселения и размножения (Falkinham, 2008). Микобактерии не обладают специальными структурами для прикрепления, такими как фимбрии и пили, но гидрофобная поверхность и наличие гликопептидолипидов в наружной оболочке обеспечивают возможность прикрепления. Мартинезом было показано, что существует прямая корреляция между способностью к движению и возможностью формировать биопленки благодаря наличию гликопептидолипидов в оболочке. Микобактерии формируют гидрофобную пленку над гидрофильной поверхностью агара, что позволяет им перемещаться скользящим движением (Martinez et al., 1999).

Возможность формировать биопленки связана с чувством кворума, то есть со способностью микроорганизмов посылать сигналы другим членам популяции. Показано, что *M. avium* эффективнее формирует биопленки в воде, чем в питательном бульоне за счет усиления секреции в воде гена *secA* (Limia et al., 2001).

M. avium формирует наиболее устойчивые биопленки в присутствии глюкозы и пептона в качестве источника углерода. Присутствие в среде катионов Ca^{2+} , Mg^{2+} и Zn^{2+} вне зависимости от концентрации увеличивает скорость формирования биопленок (Carter et al., 2003). Гуминовые кислоты подавляют формирование биопленок за счет своей хелатирующей активности и снижения доступности катионов (Carter et al., 2003).

Скорость формирования биопленок относительно высокая. Показано, что *M. fortuitum* формирует плотные биопленки в первые 48 часов роста на твердой поверхности (Hall-Stoodley et al., 1998).

Микобактерии способны быстро формировать биопленки и в проточной воде, имитирующей распределительную водопроводную сеть в лабораторных условиях. *M. xenopi* при инокуляции в водный поток быстро переходит в прикрепленное состояние и через 20 дней численность клеток в биопленках становится в 10 раз выше, чем в проточной воде (Dailloux et al., 2003).

Склонность микобактерий к существованию в прикрепленном состоянии подтверждается многочисленными фактами выделения биопленок микобактерий из водопроводной сети в разных странах. В исследовании, проведенном в Южной Африке, в биопленках водопроводной системы были найдены *M. gordonae*, *M. glivum*, *M. abscessus*, *M. fortuitum* и *M. septicum* (September et al., 2004). В исследовании Фалкинхема и коллег из биопленок водопроводной сети были выделены *M. shimoidei*, *M. haemophilium*, *M. marinum*, *M. intracellulare*, *M. terrae*, *M. gordonae* и *M. aurum*. Для *M. avium* и *M. intracellulare* было показано их присутствие в биопленках распределительной сети при одновременном их отсутствии в проточной воде (Falkinham et al., 2001).

4. Объекты и методы исследования

4.1. Объект исследования

Выделение бактерий рода *Mycobacterium* проводили из воды пресноводного аквариума №19 Санкт-Петербургского Океанариума (ТРК «Планета Нептун»).

Вместимость аквариума 21,8 тонн. Поддерживается температура воды 25 градусов Цельсия.

В аквариуме содержится преимущественно крупная рыба (от 60 до 120 см):

- Астронотус – 2 шт.
- Псевдоплатистома – 3 шт.
- Пирания паку – 1 шт.
- Сом оринокский – 1 шт.
- Аравана – 4 шт.
- Скот хвостокол – 2 шт.
- Пангасиус – 1 шт.
- Арапаима – 4 шт.

Кормление осуществляется треской и креветками (2,6 кг в неделю). Обслуживание аквариума проводится с участием водолазной службы.

Очистка воды производится при помощи озонирования и обработки ультрафиолетом. Режим озонирования постоянный. Производительность озонатора 1,5 гр., редокс-потенциал 350-380. Обработка УФ постоянная. Мощность УФ-стерилизатора 1755 Вт.

Аквариум является открытым, его водная поверхность не изолирована от экспозиционных помещений, таким образом, он является потенциальным источником аэроббиологической опасности не только для сотрудников, но и посетителей Океанариума, поскольку возможен контакт с водой в виде брызг и водного аэрозоля, который образуется при испарении.

4.2. Питательные среды для выделения и культивирования микобактерий.

Среда Löwenstein-Jensen (пропись фирмы Merck, Германия):

В 600 мл дистиллированной воды растворяли: KH_2PO_4 -2,5г, MgSO_4 -0,24 г, магния лимоннокислого – 0,6 г, l-аспарагина - 3,6 г, картофельной муки – 30,0 г, глицерина– 12 мл, малахитового зеленого – 0,4 г, среду автоклавировали при 1 атм 15 минут. Среду охлаждали до 50°C и добавляли 1л гомогената свежих куриных яиц с соблюдением мер

стерильности. Готовую среду разливали в стерильные емкости и пастеризовали при 85°C 45 минут. pH среды до добавления яиц - $4,8 \pm 0,2$.

Среда Löwenstein-Jensen с цельными яйцами (модификация):

В 200 мл дистиллированной воды растворяли K_2HPO_4 - 0,6 г, цитрата натрия – 0,15 г, растворимого крахмала – 4 г, дрожжевого экстракта – 0,9 г, малахитового зеленого – 0,1 г, добавляли – агар-агар – 6,0 г. После стерилизации при 1 атм 30 минут к среде добавляли 1 мл 0,2% стерильного раствора MgSO_4 , 3 мл глицерина и 200 мл гомогената куриных яиц, разведенных 1:1 стерильной дистиллированной водой. Готовую среду проваривали в кипящей водяной бане 10 минут и разливали по чашкам Петри.

Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией (модификация):

В 500 мл дистиллированной воды растворяли 0,9 г K_2HPO_4 , цитрата натрия – 0,25 г, растворимого крахмала – 11,3 г, дрожжевого экстракта – 1,35 г, Whitley Impedance Broth (Великобритания) – 18,0 г, добавляли агар-агар – 9,0 г. После стерилизации при 1 атм 30 минут добавляли 1 мл 0,3% стерильного раствора MgSO_4 , 4,5 мл глицерина и 100 мл желточной эмульсии (1 желток среднего по размеру куриного яйца на 100 мл стерильной дистиллированной воды).

Среда яичная Ogawa (Portaels, 1988).

В 100 мл воды растворяли 1 г глутамата натрия, 1г K_2HPO_4 , 6 мл 2% малахитового зеленого, 6 мл глицерина, добавляли ага-агар – 4,5 г. После стерилизации в среду вносили 200 мл гомогената цельных куриных яиц.

Среда Middlebrook 7H11 (фирмы HiMedia Индия) (состав г/л):

Гидролизат казеина -1 г, сульфат аммония -0,5 г, L-глутаминовая кислота – 0,5 г, калий дигидрофосфат – 1,5 г, натрий гидрофосфат 1,5 г, цитрат натрия – 0,4, железа аммонийного цитрат – 0,04 г, сульфат магния – 0,05 г, пиридоксин – 0,001 г, биотин – 0,0005 г, малахитовый зеленый – 0,001 г, агар-агар – 15,0 г, глицерин – 5,0 мл, pH $6,6 \pm 0,2$ (25°C). После автоклавирования в 450 мл готовой среды, охлажденной до 50°C, вносили 50 мл ростовой добавки (FD018) следующего состава (г/50 мл): бычий альбумин (фракция V) – 2,5 г, глюкоза – 1 г, каталаза – 0,002 г, олеиновая кислота – 0,025 г, хлорид натрия – 0,425 г.

4.3. Окраска бактериальных мазков на кислото-спиртоустойчивость.

Мазки готовили на 5-7 и 14 сутки культивирования посевов. Мазки высушивали на воздухе и фиксировали в пламени спиртовки. Для окраски мазков готовили краситель – 1 г основного фуксина растворяли в 10 мл этанола. К красителю добавляли раствор L.O.C. фирмы Amway (многофункциональное чистящее средство, содержит от 5% до 15% анионные ПАВ, менее 5% неионогенные ПАВ) – 0,6 мл L.O.C. в 100 мл дистиллированной воды. Готовую смесь фильтровали, заливали в стаканчики для окраски и прогревали для стабилизации температуры в течение 15 мин при температуре 75°C.

Окраску мазков проводили при 75°C в течение 10 минут. Стекла охлаждали, промывали водой, подсушивали.

Дифференциальное обесцвечивание проводили 3% раствором HCl в этаноле – 15-20 сек (до прекращения потока смываемой краски). Стекла промывали водой и подсушивали.

Дополнительное окрашивание проводили 0,25% метиленовой синью в 1% уксусной кислоте в течение 5 минут. Стекла промывали и подсушивали.

Спирто-кислотоустойчивые бактерии оставались красными, чувствительные к обесцвечиванию бактерии имели синюю окраску (Ellis, Zabrowany, 1993).

4.4. Методики проведения идентификационных тестов

Хромогенность. Для оценки способности выделенных штаммов реагировать на освещение образованием каротиноидных пигментов проводили посев каждого штамма на 2 чашки со средой Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией. Культивирование проводили в темноте при комнатной температуре в течение 7 суток. Далее одну из чашек доставали и экспонировали несколько дней под лампой 60вт на расстоянии 25 см. По истечении 7 суток обе чашки сравнивали между собой. Штаммы, не синтезирующие пигменты при освещении, считали нехромогенными. Штаммы, синтезирующие пигмент при световой стимуляции, относили к хромогенным.

Скорость роста. Для отнесения выделенных штаммов к быстро растущим или к медленно растущим видам микобактерий их высевали на среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией методом истощающего мазка для получения единичных колоний. Штамм считали быстро растущим, если в течение 7 дней появлялись хорошо различимые колонии с индивидуальными свойствами. Если такие колонии формировались позже, штамм считали медленно растущим.

Способность к росту при различных температурах. Культивирование проводили на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией при 28°, 37°, 42° и 45°C. Засев

проводили истощающим мазком. Результаты теста считали положительными, если на 7-14 сутки появлялись колонии типичной формы.

Арилсульфатазный тест. Положительный ответ в этом тесте характерен практически для всех представителей рода *Mycobacterium*. Тест ставили на 3 и 14 сутки культивирования при 28°C. Для постановки теста в среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией вводили субстрат – фенолфталеин дисульфат до конечной концентрации – 0,001 М. Питательную среду разливали столбиками, засев исследуемых штаммов проводили суспензией на поверхность столбика. По истечении времени культивирования на поверхность тестируемых посевов вносили по 6 капель 2N раствора Na₂CO₃. Регистрацию проводили в первые 30 минут. В случае положительной реакции на поверхности питательной среды появлялась розово-красная полоска.

Рост в присутствии 5% NaCl. Тест проводили на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией и 5%NaCl при 28°C. Засев осуществляли истощающим мазком. Тест считали положительным, если через 7-14 (28) дней формировались типичные колонии.

Способность использовать различные источники углерода (инозит, маннит и цитрат) в присутствии аммонийного азота. Для данного теста готовили минеральную среду следующего состава (г/л): (NH₄)₂SO₄ – 2,4 г, KH₂PO₄ – 0,5 г, MgSO₄ – 0,5 г, агар-агар – 20,0 г. Источники углерода (5-7 г/л) растворяли в стерильной дистиллированной воде, пастеризовали и добавляли в среду. Засев проводили на поверхность питательной среды в чашки Петри истощающим штрихом. Культивирование проводили при 28°C в течение 14 дней.

Каталазный тест (полуколичественный).

Для постановки теста штаммы выращивали на поверхности столбиков среды Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией при 28°C 14 дней. Для проверки наличия каталазы и ее активности на поверхность столбиков приливали 1 мл реагента – смесь 1:1 - 10% Твин 80 и 30% перекиси водорода (3таблетки гидроперита в 5 мл воды). Реакцию регистрировали в первые 5 минут. Возможны следующие варианты реакции: 1) отсутствие вспенивания (микобактерии не образуют каталазу), 2) вспенивание интенсивное, столбик пены более 45 мм, 3) вспенивание слабое, столбик пены менее 45 мм.

5. Результаты и их обсуждение

5.1. Подбор твердой питательной среды для выявления микобактерий из аквариумной воды методом прямого высева.

Многочисленные методы выделения микобактерий из воды и других объектов внешней среды традиционно начинают со стадий концентрирования и деконтаминации с целью подавить жизнедеятельность сопутствующих бактерий. Для этого используют 2-4% NaOH, антибиотики, цетримид, цетавлон, H₂SO₄ и другие saniрующие агенты, агрессивные в отношении бактерий. Эти воздействия, безусловно, снижают жизнеспособность всех бактерий, включая и выделяемых микобактерий. Процедуры контаминации и концентрирования включают центрифугирование бактериальной массы. Микобактерии имеют гидрофобные оболочки, поэтому центрифугирование приводит к слипанию, агрегации и в конечном итоге потере микобактерий, особенно если они находятся в низкой концентрации. По этим причинам мы решили не проводить процедуры деконтаминации и центрифугирования при выделении микобактерий из аквариумной воды, то есть сразу осуществить прямой высеv воды на питательные среды, рекомендованные для выявления микобактерий.

Основная питательная среда для выделения микобактерий из различных по типу образцов, рекомендуемая во всех руководствах и основных обзорах (Le Dantec, 2002; Thomson et al., 2013) – это среда Löwenstein-Jensen с малахитовым зеленым, подавляющим рост сопутствующих бактерий и грибов-микромикетов. Классическая пропись этой среды содержит малахитовый зеленый в концентрации 250 мкг/мл. В то же время по данным Джонса и Фалкинхама (Johnes, Falkinham, 2003) изоляты микобактерий из неклинических образцов проявляют различную, зачастую низкую устойчивость к этому красителю – от 6 мкг/мл до 120 мкг/мл.

Таким образом, становится очевидным, что классическая среда Löwenstein-Jensen вероятнее всего, предназначена для выделения наиболее устойчивых к красителям, медленно растущих патогенных микобактерий (*M. tuberculosis* и *M. avis*). Применение малахитового зеленого для выделения микобактерий из аквариумной воды, может привести к закономерной их потере.

Действительно, наши первые попытки высева аквариумной воды на классическую среду Löwenstein-Jensen с малахитовым зеленым по стандартной прописи дали хороший рост разноцветных бактериальных клонов (рис. 1А). Большинство колоний были в большей или меньшей степени слизепобразующими. Тем не менее, при их расcеве с целью очистки и получения чистых клонов было установлено, что большинство колоний

смешанные, а отсеянные клоны оказались нежизнеспособными и погибали на 2-3 пассаже. То есть выделение микобактерий из аквариумной воды на среде Löwenstein-Jensen с малахитовым зеленым оказалось невозможным. Поэтому было решено попытаться исключить малахитовый зеленый из состава питательной среды для первичного посева.

Анализируя прописи питательных сред для микобактерий, мы предположили, что цельный гомогенат куриных яиц, предложенный к использованию в среде Löwenstein-Jensen в начале XX века, можно заменить питательным бульоном и желточной эмульсией. Это сделало бы среду более однородной, что важно при поверхностном посеве шпателем, и более воспроизводимой при ее изготовлении в лабораторных условиях.

Для проверки нашей модификации среды Löwenstein-Jensen мы провели серию высевок аквариумной воды на среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого в сравнении с классической питательной средой для микобактерий – агаром MiddleBrook (в оригинальной прописи имеется малахитовый зеленый в минимальной концентрации - 1 мкг/мл) (Middlebrook, Cohn, 1958). В этом же эксперименте аквариумную воду высевали на среду Löwenstein-Jensen без малахитового зеленого с желтками с добавлением Твина 80 для диспергирования клеточных комков с целью получения большего количества чистых клонов. В качестве дополнительных контролей высевок проводили также на стандартный питательный агар (Оболенск) и среду Löwenstein-Jensen с малахитовым зеленым в разной концентрации. Полученные данные по численности выявленных микроорганизмов представлены в табл. 1. Внешний вид посевов представлен на рис. 1.

Из представленных данных видно, что среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого дает численность и разнообразие морфотипов колоний, соизмеримые с агаром Middlebrook, рекомендованным для выделения микобактерий. Добавление в среду Твина 80 не увеличивает выявляемую численность и разнообразие морфотипов колоний. Введение в состав среды малахитового зеленого уже с 5 мкг/мл резко снижает численность и разнообразие колоний, увеличивает проблемы очистки клонов за счет образования слизи и увеличения доли смешанных колоний.

Питательный агар дает практически ту же численность колоний, что и среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого, но при этом колонии более мелкие и менее выразительные по морфологии. Можно предположить, что на этой среде медленно растущие микобактерии будут не выявлены.

На основании всего вышеизложенного для выделения микобактерий из аквариумной воды мы остановились на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией

без малахитового зеленого, по качеству и селективности не уступающей коммерческой среде Middlebrook.

Таблица 1

Численность микроорганизмов, выявленных в воде аквариума № 19, при высеве на различные по составу питательные среды *

№	Питательная среда	Концентрация малахитового зеленого, мкг/мл	Численность, КОЕ/мл	Морфология колоний
1	Питательный агар	0	$5,6 \times 10^2$	10 морфотипов, колоний
2	Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого	0	$6,3 \times 10^2$	15 морфотипов
3	То же с Твином 80 (0,1%)	0	$6,9 \times 10^2$	Морфотипы те же
4	Агар Middlebrook	1	$6,4 \times 10^2$	Морфотипы те же
5	Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией с малахитовым зеленым	5	$3,2 \times 10^2$	Морфотипы те же
6	Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией с малахитовым зеленым	50	$1,2 \times 10^2$	Резкое снижение численности морфотипов колоний, увеличение доли слизистых колоний
7	Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией с малахитовым зеленым	100	$1,2 \times 10^2$	Снижение численности морфотипов, колонии слизистые, смешанные
8	Среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией с малахитовым зеленым	250	$7,4 \times 10^1$	То же, все колонии смешанные.

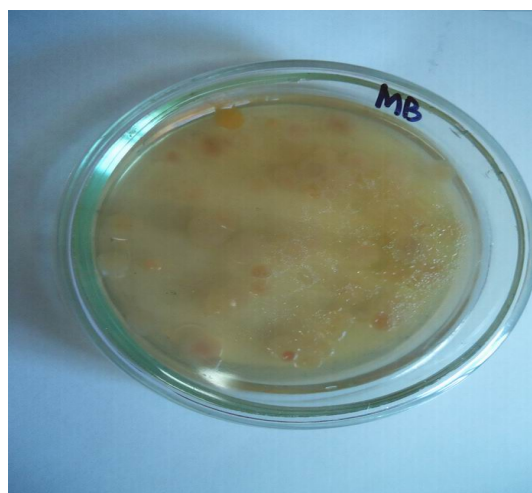
*- Высев был произведен 26.01.2016, на следующий день после очистки аквариума.



А



Б



В

Рис. 1. Внешний вид посевов аквариумной воды на питательную среду Löwenstein-Jensen с цельными куриными яйцами (А), на ту же среду в нашей модификации с желточной эмульсией без малахитового зеленого (Б) и на Middelbrook агар (В).

5.2. Выявление кислото-спиртоустойчивых клонов бактерий на неселективных питательных средах.

Как было показано на предыдущем этапе работы среда Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого и Middlebrook агар являются слабо селективными питательными средами. Поэтому выявленные клоны перед очисткой необходимо было проверить на принадлежность к роду *Mycobacterium*.

В соответствии с современными представлениями микобактерии характеризуются кислото-спиртоустойчивостью хотя бы на одной из стадий роста (Хоулт и др., 1997) и этим отличаются от близких к ним нокардий и родококков. Данный тест предполагает устойчивость микобактерий к обесцвечиванию окрашенных мазков смесью соляной кислоты и этанола. В научных публикациях этот тест часто называют сокращенно «тест на кислотоустойчивость» (“acid fast”), что не совсем правомерно. Вторым тестом на принадлежность изолятов к роду *Mycobacterium* является тест на арилсульфатазу (Хоулт и др., 1997).

Таким образом, алгоритм выявления микобактерий из аквариумной воды состоял из следующих этапов: 1) высев воды на выбранную питательную среду; 2) проверка колоний в тесте на кислото-спиртоустойчивость; 3) очистка отобранных клонов; 4) проверка штаммов в тесте на арилсульфатазу; 5) идентификация штаммов микобактерий.

В соответствии с выбранным алгоритмом 46 изолятов, выросших на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого и Middlebrook агаре были проверены на кислото-спиртоустойчивость на 7 и 14 сутки роста при 28°C. Оказалось, что кислото-спиртоустойчивостью обладают лишь единичные клоны. Для расширения круга поиска дополнительно были протестированы еще 14 изолятов, выросших на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией и с разными концентрациями малахитового зеленого.

В итоге было выявлено 8 кислото-спиртоустойчивых изолятов, которые можно было отнести к микобактериям. Они были подвергнуты очистке клонированием. За период выполнения данной работы удалось очистить 4 изолята – это штаммы 14, 31, 40 и 48. Их свойства приведены в следующих разделах работы. Общая численность микобактерий в исследованной воде – не менее 10 КОЕ/мл.

5.3. Идентификация выделенных бактериальных штаммов

5.3.1. Внешний вид колоний, особенности роста, отношение к свету.

Внешний вид колоний штаммов 14, 31, 40 и 48 представлен на рис. 2 и 3.

Колонии штаммов 14, 40 и 48 на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого при 28°C появляются на 3-5 сутки и полностью формируются до истечения 7 суток. Это позволяет считать их быстрорастущими кислото-спиртоустойчивыми бактериями.

Колонии штаммов 14, 40 и 48 внешне сходны – это выпуклые, непигментированные блестящие колонии размером 3-4 мм, с возрастом подсыхающие и приобретающие морщинистость. Консистенция колоний – различная, так штамм 14 – очень вязкий, тянущийся. Штаммы 40 и 48 - маслянистые, мажущиеся.

Штамм 31 (рис. 3) растет на всех средах медленнее остальных и только при посеве густым штрихом. Поэтому очистка этого штамма и клонирование были затруднены. При 28°C рост штамма лишь слегка заметен на 3-5 сутки, посева окончательно формируются (выходят в стационарную фазу роста) после 10 суток культивирования. Штамм 31 был признан медленно растущим.

Все 4 штамма не пигментированы. Стимуляция образования каротиноидных пигментов дополнительным освещением оказалась безрезультатной. Все 4 штамма были признаны нехромогенными.

5.3.2. Кислото- спиртоустойчивость, морфология клеток

Морфология клеток всех четырех выделенных штаммов соответствует описанию микобактерий в Определителе бактерий Берджи (Хоулт и др., 1997).

Для всех штаммов, выращенных на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией, характерна кислото-спиртоустойчивость на 7-14 сутки культивирования при 28°C (рис.4).

5.3.3. Идентификация штаммов 14, 40 и 48 по последовательностям гена 16s рРНК

Для подтверждения систематической принадлежности выделенных штаммов к роду *Mycobacterium* по нашей просьбе сотрудниками лаборатории микробиологического мониторинга и биоремедиации почв ФБГНУ ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии был проведен анализ генов 16 s рРНК у трех выделенных нами быстрорастущих штаммов – 14, 40 и 48.

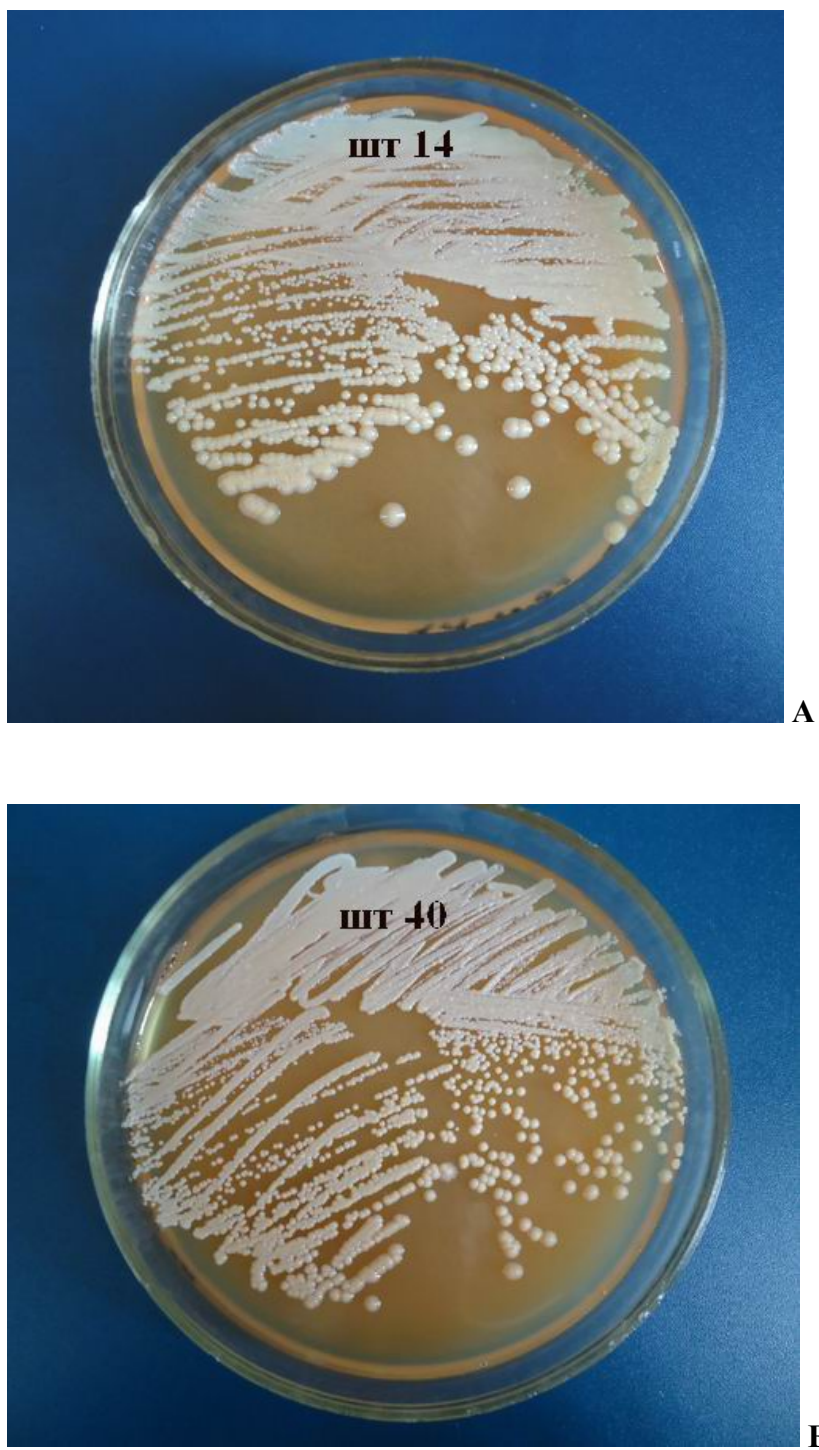


Рис. 2. Внешний вид колоний кислото-спиртоустойчивых штаммов 14 (А) и 40 (Б) на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого при 28°C.

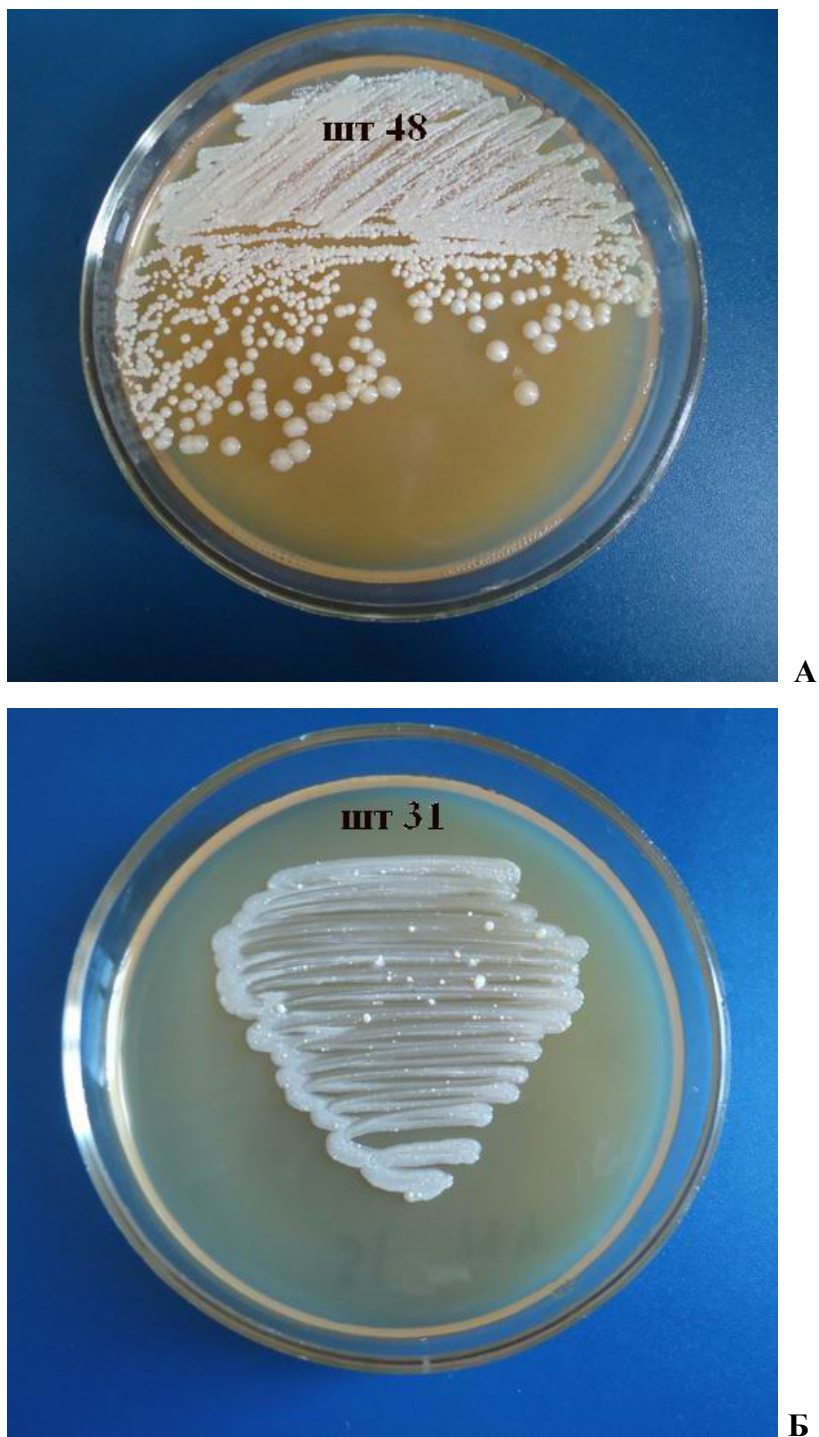


Рис. 3. Внешний вид колоний кислото-спиртоустойчивых штаммов 48 (А) и 31 (Б) на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией без малахитового зеленого при 28°C.

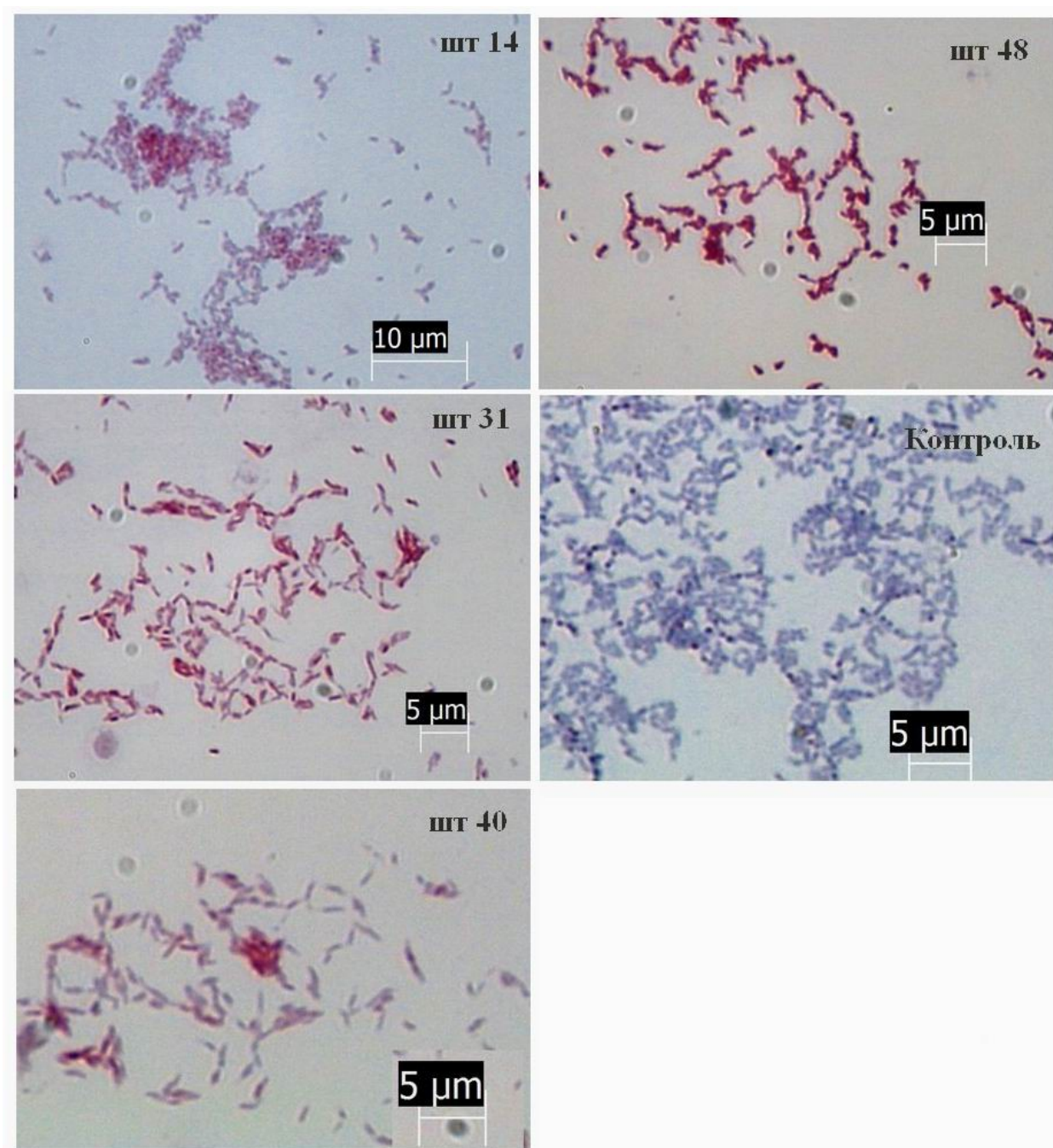


Рис. 4. Внешний вид выделенных бактериальных штаммов в тесте на кислото-спиртоустойчивость. Контроль – бактерии, не обладающие кислото-спиртоустойчивостью (синие).

Для амплификации выделенной ДНК использовали праймеры для гена 16S рРНК: FD1 27f agagtttgatcatggctcag, RD1 1525r aaggaggtgatccaacc и полимеразу Taq (Evrogene). Реакцию проводили в автоматическом амплификаторе BioRad в следующем режиме: 34 цикла: 95° 15 секунд 52° 15 секунд, 72° 30 секунд. После амплификации проводили электрофорез фрагментов ДНК в 1% агарозном геле, агарозный блок, содержащий фрагмент нужной длины вырезали из геля и очищали. Полученный фрагмент ДНК секвенировали с праймерами FD1 27f и RD1 1525r на генетическом анализаторе AB 3500xl по методике, рекомендованной производителем.

Последовательности гена 16s рРНК, полученные в ходе секвенирования (прямая, обратная и сконструированные на их основе конкатемеры), представлены в Приложении 1. Их сравнивали с последовательностями, имеющимися на сайте NCBI (National Center for Biotechnology Information), используя программу BLAST.

Оказалось, что полученные последовательности 16s рРНК для штаммов 14, 40 и 48 (более 1000 нуклеотидов) имеют высокий уровень сходства (99-100%) с несколькими десятками последовательностей гена 16s рРНК различных видов рода *Mycobacterium*. Для повышения вероятности видовой идентификации мы исключили из рассмотрения виды, не депонированные в мировых коллекциях и не являющиеся типовыми для рода *Mycobacterium*, предполагая, что некоторые последовательности базы данных NCBI могут иметь недостоверные видовые названия. Результаты видовой идентификации штаммов 14, 40 и 48 по сходству последовательностей гена 16s рРНК представлены в табл. 2–4.

Из результатов табл. 2 видно, что выделенный нами штамм 14 может относиться к видам: *M. porcinum*, *M. neworleansense*, *M. senegalense*, *M. houstonense* и *M. fortuitum*. Штаммы 40 и 48 могут относиться к видам: *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. salmonifilum*.

Для окончательной идентификации были исследованы фенотипические свойства данных штаммов микобактерий, результаты представлены в следующей главе.

Потенциальные видовые диагнозы для штамма 14, установленные на основании сходства последовательности гена 16s рРНК (конкатемеров)

№	Потенциальные видовые диагнозы для штамма 14 ¹	Число последовательностей гена 16s рРНК в NCBI (сходство 99-100%)		
		Общее число	От коллекционных штаммов ²	От типовых штаммов ³
1	<i>Mycobacterium porcinum</i>	10	1 <i>ATCC 33776</i>	1 <i>ATCC 33776</i>
2	<i>Mycobacterium neworleansense</i>	2	1 <i>ATCC 49404</i>	1 <i>ATCC 49404</i>
3	<i>Mycobacterium senegalense</i>	2	1 <i>ATCC 35796</i>	1 <i>ATCC 35796</i>
4	<i>Mycobacterium houstonense</i>	1	1 <i>ATCC 49403</i>	1 <i>ATCC 49403</i>
5	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	15	1 <i>ATCC 49404</i>	0
6	<i>Mycobacterium septicum</i>	7	0	0
7	<i>Mycobacterium peregrinum</i>	6	0	0
8	<i>Mycobacterium conceptionense</i>	3	0	0
9	<i>Mycobacterium gilvum</i>	1	0	0
10	<i>Mycobacterium boenickei</i>	1	0	0

¹ - виды, отсутствующие в Руководстве по систематике бактерий Берги (2 изд.), не рассматривались.

² - штаммы в коллекциях: ATCC, CCUG, CIP, DSMZ, JCM, NCTCZ.

³ – типовые штаммы вида в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (2 изд.).

Таблица 3.

Потенциальные видовые диагнозы для штамма 40, установленные на основании сходства последовательности гена 16s рРНК (конкатемеров)

№	Вид ¹	Число последовательностей в NCBI (сходство 99-100%)		
		Общее число	От коллекционных штаммов ²	От типовых штаммов ³
1	<i>Mycobacterium chelonae</i>	32	6 ATCC 19237 ATCC 35752, JCM 6388, CCUG 47445, CCUG 47286, CIP 106684	3 ATCC 357526 CCUG 47445, JCM 6388,
2	<i>Mycobacterium abscessus</i>	26	3 ATCC 19977, DSM 44196, JCM 13569	3 ATCC 19977, DSM 44196, JCM 13569
3	<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	10	1 ATCC 13758	1 ATCC 13758
4	<i>Mycobacterium massiliense</i>	3	0	0

¹ - виды, отсутствующие в Руководстве по систематике бактерий Берги (2 изд.), не рассматривались.

² - штаммы в коллекциях: ATCC, CCUG, CIP, DSMZ, JCM, NCTCZ.

³ – типовые штаммы вида в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (2 изд.).

Таблица 4.

Потенциальные видовые диагнозы для штамма 48, установленные на основании сходства последовательности гена 16s рРНК (конкатемеров)

№	Вид ¹	Число последовательностей в NCBI (сходство 99-100%)		
		Общее число	От коллекционных	От типовых штаммов ³

			штаммов ²	
1	<i>Mycobacterium abscessus</i>	26	5 JCM 13569 ATCC 19977 ATCC 19977 DSM 44196 CCUG 47286	3 ATCC 19977 DSM 44196 JCM 13569
2	<i>Mycobacterium chelonae</i>	26	4 ATCC 19237 CCUG 47445 JCM 388 ATCC 35752	3 CCUG 47445 JCM 6388 ATCC 35752
3	<i>Mycobacterium salmoniphilum</i>	13	2 ATCC 13758 ATCC 13758	1 ATCC 13758
4	<i>Mycobacterium immunogenum</i>	4	0	0
5	<i>Mycobacterium massiliense</i>	2	0	0

¹ - виды, отсутствующие в Руководстве по систематике бактерий Берги (2 изд.), не рассматривались.

² - штаммы в коллекциях: ATCC, CCUG, CIP, DSMZ, JCM, NCTCZ.

³ – типовые штаммы вида в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (2 изд.).

5.3.4. Фенотипические свойства штаммов 14, 40 и 48, постановка заключительного идентификационного диагноза

На основании рекомендаций Руководства по систематике бактерий Берги для идентификации быстро растущих микобактерий мы определили ключевые родовые и видовые фенотипические признаки выделенных штаммов. Полученные результаты представлены в табл. 5 и 6. Для сравнения в эти таблицы включены признаки видов микобактерий, наиболее близких по последовательностям генов 16s рРНК (см. гл. 3.5).

Штамм 14 по совокупности установленных фенотипических признаков более всего сходен с *M. porcinum*, хотя имеются и различия (например, слабый рост в присутствии 5% NaCl).

Таблица 5.

Фенотипические признаки штамма 14 в сравнении с аналогичными признаками типовых штаммов микобактерий

№	Признаки	Микобактерии					шт. 14
		<i>M.porcinum</i>	<i>M.neworleansense</i>	<i>M.senegalense</i>	<i>M.houstonense</i>	<i>M.fortuitum</i>	
1	Рост при 42°C	+	-	nd	+	V	+
2	Рост при 45°C	-	-	-	nd	-	-
3	Пигментация	N	N	N	N	N	N
4	Рост на среде McConkey без кристалвиолета	nd	+	-	+	+	+
5	Рост на 5% NaCl (w/v)	+	+	+	+	+/	-
6	Нитратредукция	-	+	+	+	+	nd
7	Арилсульфатаза на 3 день	+	+	+	+	+	+
8	Каталаза	+	nd	+	nd	Nd	+
	Рост на единственном источнике углерода:						
10	- цитрат	+	-	+	-	-	+
11	- маннит	+	nd	nd	nd	D	+
12	- инозитол	+	nd	nd	nd	Nd	+

«+» - 90% и более штаммов положительные;

«- » - 90» и более штаммов – негативные;

«d» - 11-89% штаммов положительные;

«v» - вариабильная реакция у исследованных штаммов;

«N» - нехромогенные;

«nd» - данные отсутствуют.

Таблица 6.

Фенотипические признаки штаммов 40 и 48а в сравнении с аналогичными признаками типовых штаммов микобактерий

№	Признаки	Микобактерии			шт. 40	шт. 48
		<i>M.chelonae</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.salmoniphilum</i>		
	Рост при 42°C	-	-	-	-	-
	Рост при 45°C	-	-	-	-	-
	Пигментация	N	N	N	N	N

Рост на среде McConkey	+	+	+	+	+
Рост на 5% NaCl (w/v)	-	+	?	-	+
Нитратредукция	-	-	-	nd	nd
Арилсульфатаза на 3 день	+	+	+	+	+
Каталаза	d	nd	nd	+	+
Рост на единственном источнике углерода:					
- цитрат	+	-	nd	-	+
- маннит	-	-	nd	-	-
- инозитол	-	-	nd	-	-

Штаммы 40 и 48 по фенотипическим признакам могут быть отнесены к близким видам *M. abscessus* и *M. chelonae* соответственно. Не исключена видовая принадлежность этих штаммов и к виду *M. salmoniphilum*, пока еще недостаточно хорошо описанному фенотипически и трудно отличимому от *M. chelonae*. Вид *M. salmoniphilum* получил статус самостоятельного вида в 1960 г., до этого штаммы *M. chelonae*, выделенные от больных лососевых рыб, относили к подвиду *Mycobacterium chelonae subsp. piscarium* (Whipps et al., 2007).

5.3.5. Заключение

Таким образом, алгоритм выявления микобактерий из аквариумной воды с помощью прямого посева на неселективную среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией и скрининг клонов на кислото-спиртоустойчивость оказался успешным.

В воде аквариума № 19 установлено присутствие микобактерий в количестве не менее 10 КОЕ/мл. Реальное содержание микобактерий с учетом их присутствия в ассоциациях и биопленках (смешанных колониях) может быть на порядок выше. Важно отметить, что это высокая численность микобактерий в аквариумной воде, если учесть, что общее микробное число исследованной воды – $6,3 \times 10^2$ КОЕ/мл. По-видимому, причиной этого является жесткая обработка воды в замкнутой системе очистки с целью ее санации.

Выделенные микобактерии (быстрорастущая группа) представлены следующими видами: *M. porcinum*, *M. abscessus* и *M. chelonae*. Представители вида *M. chelonae*, наряду с *M. marinum*, *M. fortuitum* являются этиологическими агентами микобактериозов более 150 видов рыб (Decostere et al., 2004; Passantino et al., 2008; Gauthier and Rhodes, 2009; Shukla et al., 2013). Бактерии вида *M. abscessus* описаны как возбудители болезней пресноводных и морских декоративных рыб (Watrall and Kent, 2007; Zanoni et al., 2008; Jacobs et al., 2009).

Данные виды микобактерий представляют определенную опасность для персонала океанариума. Микобактерии, обнаруженные нами в аквариумной воде, являются условно-

патогенными и способны вызывать поражения у аквариумистов и работников аквакультуры (Decostere et al., 2004).

6. Выводы

1. В воде океанариума, находящейся в замкнутой системе очистки с использованием озонирования и облучения УФ, присутствуют условно-патогенные микобактерии видов *M.chelonae* *M.abscessus* *M.porcinum*.
2. Малахитовый зеленый в составе питательных сред снижает эффективность выявления микобактерий из аквариумной воды.

7. Список литературы

1. Akbari S., Mosavari N., Tadayon K., Rahmati-Holasoo H. Isolation of *Mycobacterium fortuitum* from fish tanks in Alborz, Iran// Iran. J. Microbiol. – 2014 – Vol. 6 – P.234 - 239.
2. Aronson J.D. Spontaneous tuberculosis in salt water fish// J. Infect. Dis. – 1926 - Vol. 39 - P. 315-320
3. Astrofsky K.M., Schrenzel M.D., Bullis R.A. et al. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium spp.* infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rerio*) facilities// Comparative Medicine – 2000 - Vol 50 – P. 666-672.
4. Bailey R.K., Wyles S., Dingley M. et al. The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water//Am. Rev. Respir. Dis. – 1970 – Vol. 101 – P. 430 - 1.
5. Barksdale L., Kim K.S. *Mycobacterium*// Bacteriol. Rev. – 1977 – Vol.41 – P. 217-372.
6. Beran V., MatlovaL., Dvorska L. et al. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment//J. Fish Dis. – 2006 – Vol. 29 - P. 383–393
7. Brennan P.J. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*// Tuberculosis – 2003 – Vol. 83 – P. 91–97
8. Broutin V., Bañuls A.L., Aubry A. et al. Genetic diversity and population structure of *Mycobacterium marinum*: new insights into host and environmental specificities// Journal of Clinical Microbiology - 2012 – Vol. 50 - P. 3627–3634.

9. Brown-Elliott B. A., Wallace R. J. et al. Five-year outbreak of community- and hospital-acquired *Mycobacterium porcinum* infections related to public water supplies// J. Clin. Microbiol. – 2011 - Vol. 49 - P. 4231–4238.
10. Brown-Elliott B.A., Wallace R.J. Jr. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria//Clin. Microbiol. Rev. – 2002 –Vol. 15 – P. 716-46.
11. Bullin C.H., Tanner E.I., Collins C.H. Isolation of *Mycobacterium xenopei* from water taps//J. Hyg. (Lond) – 1970 – Vol. 68 – P. 97-100.
12. Caputo V., Fiorella S., Orlando E. Sporotrichoid cases of *Mycobacterium marinum* skin infection// Clinical Medicine Insights: Dermatology – 2010 – Vol.3 – P.25–29.
13. Carson L.A., Petersen N.J., Faero M.S., Aguero S.M. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants// Appl. Environm. Microbiol. – 1978 – Vol.36 - P. 839-846
14. Carter G., Wu M., Drummond D.C. et al. Characterization of biofilm formation by clinical isolates of *Mycobacterium avium* // J. of Med. Microbiol. - 2003 - Vol. 52 - P.747–752.
15. Castillo-Rodal A.L., Mazari-Hiriart M., Lloret-Sánchez L.T. et al. Potentially pathogenic nontuberculous mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City// Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2012 – Vol. 31 – P. 683-94.
16. Chang T.C., Hsieh C.Y., Chang C.D. et al. Pathological and molecular studies on mycobacteriosis of milkfish *Chanos chanos* in Taiwan// Dis. Aquat. Org.- 2006- Vol. 72 – P. 147–151.
17. Cheung J.P., Fung B.K., Ip W.Y. *Mycobacterium marinum* infection of the deep structures of the hand and wrist: 25 years of experience// Hand Surg. – 2010 – Vol. 15- P. 211-6.
18. Covert T.C., Rodgers M.R., Reyes A.L., Stelma G.N. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples//Appl. Environ. Microbiol. – 1999 - Vol. 65 - P. 2492 – 2496.
19. Dailloux M., Albert M., Laurain C., et al. *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms//Appl. Environ. Microbiol. - 2003 - Vol.69 - P.6946–6948
20. De Groote M.A. Pulmonary infection in non-HIV infected individuals. World Health Organization. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management//IWA Publishing, 2004.
21. De Lima C.T., Magalhães V., Abscess resulting from *Mycobacterium kansasii* in the left thigh of AIDS patient// An Bras. Dermatol. - 2014 – Vol. 89 – P. 478–480.

22. Decostere A., Hermans K., Haesebrouck F. Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans// *Vet. Microbiol.* – 2004 – Vol. 99 – P. 159-66.
23. Dubrou S., Konjek J., Macheras E. et al. Diversity, Community Composition, and Dynamics of Nonpigmented and Late-Pigmenting Rapidly Growing Mycobacteria in an Urban Tap Water Production and Distribution System// *Appl. Environ. Microbiol.* – Vol. 79 - P. 5498 –5508.
24. Ellis R.C., Zabrowarny L.A. Safer staining method for acid fast bacilli// *J. Clin. Pathol.* – 1993 – Vol 46 – P.559-60.
25. Engelhardt H., Heinz C., Niederweis M. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis* // *J. Biol. Chem.* – 2002 - Vol. 277 - P. 37567–37572.
26. EPA (United States Environmental Protection Agency). Mycobacteria: drinking water fact sheet – 2002.
27. Eun-Sook Lee, Tae-Ho Yoon, Mok-Young Lee et al. Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV// *Water research* - 2010 - Vol.44 - P.1329–1334
28. Euzebu J.P., <http://www.bacterio.net/>
29. Falkinham J.O. 3rd, Iseman M.D., de Haas P., van Soolingen D. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease// *J. Water. Health.* – 2008 - Vol 6 – P. 209-13
30. Falkinham J.O. 3rd, Norton C.D., LeChevallier M.W. Factors Influencing Numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems// *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001 – Vol. 67 – P. 1225-1231
31. Falkinham J.O. 3rd, Surrounded by mycobacteria// *J. App. Microbiol.* – 2009 – Vol. 107 – P. 356–367
32. Falkinham J.O. 3rd. Mycobacterial aerosols and respiratory disease// *Emerg. Infect. Dis.* – 2003 – Vol. 9 – P.763-7
33. Falkinham J.O. 3rd. Nontuberculous mycobacteria from household plumbing of patients with nontuberculous mycobacteria disease// *Emerg. Infect. Dis.* – 2011 – Vol. 17 - P. 419 - 24.
34. Falkinham JO 3rd, George KL, Parker BC, Gruft H. In vitro susceptibility of human and environmental isolates of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum* to heavy-metal salts and oxyanions.// *Antimicrob. Agents. Chemother.* - 1984 – Vol.25 – P.137-9
35. Falkinham J.O. 3rd. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria// [Clin. Microbiol. Rev.](#) – 1996 - Vol. 9 - P.177 - 215.

36. Fuminao Kamijoa, Hisashi Uharaa, Hitomi Kubo et al. A case of mycobacterial skin disease caused by *Mycobacterium peregrinum*, and a review of cutaneous Infection// Case Rep. Dermatol. – 2012 – Vol. 4 – P. 76–79.
37. Gauthier D.T, Rhodes M.W. Mycobacteriosis in fishes: A review// The Veterinary Journal – 2009 - Vol. 180 - P.33–47.
38. Goodfellow M., Kampf P., Busse H.J. et al. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume Five. The Actinobacteria. Part A. – Springer, 2012 – P 312-375.
39. Griffith D.E., Girard W.M., Wallace R.J. Jr. Clinical features of pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria. An analysis of 154 patients// Am. Rev. Respir. Dis. – 1993 – Vol. 147 – P. 1271-8.
40. Hall-Stoodley L., Lappin-Scott H.M. Biofilm formation by the rapidly growing mycobacterial species *Mycobacterium fortuitum*//FEMS Microbiol. Lett. - 1998 - Vol 168 - P.77-84.
41. Herbst L.H., Costa S.F., Weiss L.M. et al. Granulomatous skin lesions in *Moray Eels* caused by a novel *Mycobacterium* species related to *Mycobacterium triplex* //Inf. and immun. – 2001 – Vol. 69 - P. 4639–4646.
42. Hilborn E.D., Covert T.C., Yakrus M.A. et al. Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment// Appl. Environ. Microbiol. – 2006 - Vol. 72 - P. 5864–5869
43. Iivanainen E.K., Martikainen P. J., Katila M.L. Effect of freezing of water samples on viable counts of environmental mycobacteria //Lett. Appl. Microbiol – 1995 - Vol. 21 - P.257-260.
44. Jacobs J., Rhodes M., Sturgis B., Wood B. Influence of environmental gradients on the abundance and distribution of *Mycobacterium spp.* in a coastal lagoon estuary//Appl. Environ. Microbiol.- 2009 – Vol. 75 – P. 7378-84.
45. Jones J. J., Falkinham III J. O. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic *Mycobacteria* //Antimicrob. Agents. Chemother. – 2003 - Vol. 47 - P. 2323–2326.
46. Jones J.J., Falkinham J.O. 3rd. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria//Antimicrob. Agents. Chemother. - 2003 – Vol. 47 – P. 2323-6.
47. Kazda J. The Ecology of Mycobacteria, 1st edn. - Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.2000
48. Kothavade R.J., Dhurat R.S., Mishra S.N., Kothavade U.R. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by

- rapidly growing mycobacteria//Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2013 – Vol.32 – P. 161-88.
49. Kullavanijaya P., Sirimachan S., Bhuddhavudhikrai P. *Mycobacterium marinum* cutaneous infections acquired from occupations and hobbies// Int. J. Dermatol. - 1993 – Vol. 32 – P.504-7.
 50. Lansdell W., Dixon B., Smith N., Benjamin L. Communications: isolation of several *Mycobacterium* species from fish// Journal of Aquatic Animal Health – 1993 – Vol. 5 – P. 73-76.
 51. Le Dantec C., Duguet J.P., Montiel A. et al Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems//Appl. Environ. Microbiol. – 2002 – Vol. 68 - P. 5318 – 5325.
 52. Le Dantec C., Duguet J.P., Montiel A. et al. Chlorine disinfection of atypical mycobacteria isolated from a water distribution system// Appl. Environ. Microbiol. – 2002 - Vol.68 - P.1025-1032.
 53. Lescenko P. Maltova L., Dvorska L. Mycobacterial infection in aquarium fish// Vet. Med. – 2003 – Vol. 48 – P.71–78.
 54. Levi M.H., Bartell J., Gandolfo L. et al. Characterization of *Mycobacterium montefiorensis* sp. nov., a novel pathogenic *Mycobacterium* from *Moray Eels* that is related to *Mycobacterium triplex*// J. Clin. Microbiol. – 2003 - Vol. 41 - P. 2147–2152.
 55. Limia A., Sangari F. J., Wagner D., Bermudez L. E. Characterization and expression of *secA* in *Mycobacterium avium* // FEMS Microbiol Lett. – 2001 - Vol. 197 - P. 151–157.
 56. Lulu Lian, Jianping Deng, Xiuqin Zhao et al. The first case of pulmonary disease caused by *Mycobacterium septicum* in China// Internat. J. Infect. Dis. – 2013 – Vol. 17 – P. e352–e354
 57. Magee J.G. and Ward A.C. Bergey's manual of systematic bacteriology. Second edition. Volume Five. The Actinobacteria. Part A. Family iii. *Mycobacteriaceae* - Springer, 2012 – P 312-375.
 58. Martinez A., Torello S., Kolter R. Sliding motility in mycobacteria // J. Bacteriol. – 1999 - Vol.181 - P. 7331–7338.
 59. Middlebrook G., Cohn M.L. Bacteriology of tuberculosis: laboratory methods// Tuberculosis treatment – 1958 – Vol. 48 – P. 844 – 853.
 60. Mirsaeidi M., [Machado R.F.](#), [Garcia J.G.](#), [Schraufnagel D.E.](#) Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study//[PLoS One](#). – 2014 - Vol9. – P. e91879 - e91879.

61. Mirza S., Farrell D.J., Marras T.K. et al. Sequence-based typing of clinical isolates of *Mycobacterium xenopi* isolated from Ontario, Canada// J. Undergrad. Life Sci. – 2013 – Vol. 7 – P.41–45.
62. Mrlik V., Slany M., Kubecka L. et al. A low prevalence of mycobacteria in freshwater fish from water reservoirs, ponds and farms// Journal of Fish Diseases -2012 – Vol. 35 – P. 497–504.
63. Nichols G., Ford T., Bartram J. et al. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. Introduction. 2004 World Health Organization. - IWA Publishing, London, UK.
64. Nightingale S.D., Byrd L.T., Southern P.M. et al. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients// J. Infect. Dis. – 1992 – Vol. 165 – P. 1082-5.
65. Novotny L., Halouzka R., Matlova L. et al. Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria// J. Fish. Dis. – 2010 - Vol. 33 – P. 947-55.
66. Passantino A., Macri D., Coluccio P., Fotia F., Marino F. 2008. Importation of mycobacteriosis with ornamental fish: Medico-legal implications// Travel Medicine and Infectious Disease - Vol. 6 - P.240–244.
67. Perez A.T., Conroy D.A., Quiñones L. Presence of acid-fast bacteria in wild and cultured silver mullets (*Mugil curema* Val., 1836) from Margarita island, Venezuela// Interciencia – 2001 - Vol. 26 – P. 252-256
68. Prevots D.R., Marras T.K. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review// Clin. Chest. Med. – 2015 – Vol. 36 P. 13-34.
69. Prevots D.R., Shaw P.A., Strickland D. et al. Nontuberculous mycobacterial lung disease prevalence at four integrated health care delivery systems// Am. J. Respir. Crit. Care Med. - 2010 – Vol. 182 – P. 970-6.
70. Primm T.P., Lucero C.A., Falkinham J.O III. Health Impacts of Environmental Mycobacteria// Clin. Microbial. Rev – 2004 - Vol. 17 - P. 98–106.
71. Rowe H.M., Withey J.H., Neely M.N. Zebrafish as a model for zoonotic aquatic pathogens// Developmental and Comparative Immunology – 2014 – Vol.46 – P. 96–107.
72. Runyon E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease//The Medical clinics of North America - 1959 – Vol.43 – P. 273–90
73. Runyon E.H. Conservation of the specific epithet fortuitum in the name of the organism known as *Mycobacterium fortuitum* da Costa Cruz. Int Jf Syst Bacteriol 1972; 22:50-1

74. Runyon E.H. Rejection of *Mycobacterium aquae*//Int. J. Of Syst. Bact. – 1974 – Vol. 24 - P. 532 - 533.
75. Sakai M., Kono T., Ponpornpisit A. et al. Characterization of a *Mycobacterium sp.* isolated from guppy *Poecilia reticulata*, using 16S ribosomal RNA and its internal transcribed spacer sequences// Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. – 2005 - Vol. 25 – P. 64-69.
76. Sanders G.E., Swaim L. E. Atypical piscine mycobacteriosis in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*)// Comparative Medicine – 2001 - Vol 51- P. 171-175.
77. Schulze-Robbecke R., Buchholtz k. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria //Appl. Environ.Microbiol – 1992 - Vol. 58 - P.1869-1873.
78. September S. M., Brozel V. S., Venter S. N. Diversity of Nontuberculoïd Mycobacterium species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems// App. Environ. Microbiol. – 2004 – Vol. 70 - P. 7571–7573
79. Shukla S., Sharma R., Shukla S.K. 2013. Detection and identification of globally distributed mycobacterial fish pathogens in some ornamental fish in India// Folia Microbiol. - Vol. 58 - P. 429–436.
80. Simmon K. E., Brown-Elliott B. A., Ridge P.G. et al. *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex associated with sinopulmonary disease, Northeastern USA// Emerg. Infect. Dis. – 2011 – Vol. 17 – P. 1692 - 1700
81. Slany M., Makovcova J., Jezek P. et al. Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe// Journal of Fish Diseases – 2014 – Vol. 37 – P.527–533
82. Smith D.S., Lindholm-Levy P., Huitt G.A., Heifets L.B., Cook J.L. *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing// Clin. Infect. Dis. - 2000 – Vol. 30 – P. 444-53.
83. Stahl D.A., Urbance J.W. The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural relationships among the Mycobacteria// J. of bacteriology – 1990 - Vol. 172 - P. 116-124 .
84. [Taylor R.H.](#), [Falkinham III J.O.](#), [Norton C.D.](#), [LeChevallier M.W.](#) Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*// Appl. Environ. Microbiol. – 2000 - Vol.66 - P.1702-1705.
85. Teska J.D., Twerdok L.E., Beaman J. et al. Isolation of *Mycobacterium abscessus* from Japanese Medaka// Journal of Aquatic Animal Health – 1997 - Vol.9 – P. 234-238.
86. Thomson R., Tolson C., Carter R., et al. Isolation of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) from Household Water and Shower Aerosols in Patients with Pulmonary Disease Caused by NTM//Journal of Clinical Microbiology – 2013 – Vol. 51 - P. 3006 – 3011.

87. Thomson R.M. NTM working group at Queensland TB Control Centre and Queensland Mycobacterial Reference Laboratory. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections//Emerg. Infect. Dis. – 2010 – Vol.16 – P. 1576-83.
88. Todorova T. T., Kaludova V., Tsankova G., Ermenlieva N. A pulmonary infection caused by *Mycobacterium peregrinum* – a case report// J. of IMAB – 2015 - Vol. 21 – P. 1000-1002
89. Tortoli E., Bartoloni A., Böttger E. et al. Burden of unidentifiable Mycobacteria in a reference laboratory // J.Clin. Microbiol – 2001 - Vol. 39 - P.4058-4065.
90. Turenne C.Y., Wallace R.Jr., Behr M.A. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era// Clin. Microbiol. Rev. - 2007 – Vol. 20 – P. 205-29.
91. Ucko M., Colomi A., Kvitt H. Strain Variation in *Mycobacterium marinum* fish Isolates// Appl. Env. Microbiol. – 2002 -Vol. 68 - P. 5281–5287.
92. Ulmann V., Kracalikova A., Dziedzinska R. Mycobacteria in water used for personal hygiene in heavy industry and collieries: a potential risk for employees//Int. J. Environ. Res. Public. Health. - 2015 – Vol. 12 – P. 2870-7.
93. Vaerewijck J.M., Huys G., Palomino J.C. et al. Mycobacteria in drinking water distribution systems: ecology and significance for human health//FEMS Microbiology Reviews – 2005 – Vol.29 - P. 911–934.
94. Van Ingen J., Wagner D. Epidemiology of nontuberculous mycobacterial disease in Germany and worldwide//Der. Pneumologe - 2011- Vol. 8 – P. 396-403.
95. Wallace R.J. Jr., Swenson J.M., Silcox V.A. et al. Spectrum of disease due to rapidly growing mycobacteria//Rev. Infect. Dis. - 1983 - Vol. 5 – P. 657-79.
96. Watral V., Kent. M.L.. Pathogenesis of *Mycobacterium* spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities// Comparative Biochemistry and Physiology, Part C – 2007 – Vol. 145, p.55–60.
97. Wayne L.G., Sramek H.A. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases//Clin. Microbiol. Rev. – 1992 – Vol.5 – P. 1-25.
98. Whipps C.M., Dougan S.T., Kent M.L. *Mycobacterium haemophilum* infections of zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities//FEMS Microbiol. Lett. – 2007 – Vol. 270 – P. 21–26.
99. Wolinsky E., Gomez F., Zimpfer F. Sporotrichoid *Mycobacterium marinum* infection treated with rifampin-ethambutol// Am. Rev. Respir. Dis. - 1972 – Vol. 105 – P.964-7
100. Woods G.L., Washington J.A. 2nd. Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis*: review of microbiologic and clinical aspects// Rev. Infect. Dis. – 1987 - Vol. 9 – P. 275-94.
101. Zanoni R.G., Florio D., Fioravanti M. L. et al. Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy// Journal of Fish Diseases – 2008 – Vol. 31 – P. 433–441.

102. Zelazny A.M., Root J.M., Shea Y.R. et al. Cohort study of molecular identification and typing of *Mycobacterium abscessus*, *Mycobacterium massiliense*, and *Mycobacterium bolletii*// J.Clin. Microbiol. – 2009 – Vol.47 - P. 1985–1995.
103. Хоулт Дж., Криг Н., Снит П. и др. Определитель бактерий Берджи – Москва «Мир» - 2й том, 9е издание – стр. 606 – 612.

8. ПРИЛОЖЕНИЕ.

Последовательности прочитанных при секвенировании фрагментов генов 16s рРНК бактериальных штаммов 14, 40 и 48.

>14_F

TAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACTTTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATA
 CCGAATAGGACCGCGCTCTTCATGGGGTGTGGTGGAAAGCTTTTGCGGTGTGGGATG
 GGCCCGCGGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTACCAAGGCGACGACGGGT
 AGCCGGCCTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACG
 CCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTGTAAACCTCTTCAATAGGGACGAAGCGC
 AAGTGACGGTACCTATAGAAGAAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGTAGGGTCCGAGCGTTGTCCGGAATTAAGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTT
 TGTCGCGTTGTTCGTGAAAACCTCACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGCGATACGGGC
 AGACTAGAGTACTGCAGGGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGA
 TATCAGGAGGAACANNGGTGGCGAANGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGAN
 GAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTA
 ACGGTGGGTACTA

>14_R

CCATCGCCGNNCCCACCTTCGACGGCTCCNTCCACAAGGGTTAGGCCACCGGCTTCG
 GGTGTTACCGACTTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATT
 CACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGGGGTTCGAGTT

GCAGACCCCGATCCGAACTGAGACCGGCTTTGAAAGGATTCGCTCCACCTCACGGCA
 TCGCAGCCCTTTGTACCGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCAT
 GATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCTCACGAGT
 CCCACCATAACGTGCTGGCAACATGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAA
 CCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGCACACAGGCCA
 CAAGGGAACCAATATCTCTACTGGCGTCCTGTGCATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTT
 CGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCC
 TTTGAGTTTTAGCCTTGCGGGCCGTACTCCCCA

>40_F

GGCCCTTCGGGGTNCTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCT
 GCACTCTGGGATAAGCCTGGGAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACACTTC
 ATGGTGAGTGGTGCAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTG
 TTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAC
 CGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
 ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCT
 TCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAG
 AAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGT
 CCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTTGTCGCGTTGTTTCGTGAAAAC
 TCACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGA
 GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
 CGAA

>40_R

CTCCCTCCAAAAGGTTAGGCCACTGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCATGACGTGAC
 GGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCTGATCTGCGATT
 ACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACCCCAATCCGAACTGAGACCA
 GCTTTAAGGGATTCGCTCCACCTTACGGCTTCGCAGCCCTCTGTACTGGCCATTGTAG
 CATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCTT
 CCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTACGAGTCCCCGGCATTACCCGCTGGCAACATAG
 GACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACG
 ACAGCCATGCACCACCTGCACACAGGCCACAAGGGAATACCTATCTCTAGATACGTCC
 TGTGCATGTCAAACCCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATGCTC
 CGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAGTCTTGCGACCGTACTCC

CCAGGCGGGGTACTTAATGCGTTAGCTACGGCACGGATCCCAAGGAAGGAAACCCAC
ACCTAGTACCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCA

>48_F

GGCCCTTCGGGGTACTCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCT
GCACTCTGGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGACCACACACTTC
ATGGTGAGTGGTGCAAAGCTTTTTCGGGTGTGGGATGAGCCCGCGGCCTATCAGCTTG
TTGGTGGGGTAATGGCCCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGTGAC
CGGCCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCT
TCGGGTGTAAACCTCTTTCAGTAGGGACGAAGCGAAAGTGACGGTACCTACAGAAG
AAGGACCGGCCAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTCCGAGCGTTGT
CCGGAATTACTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGTGGTTTGTTCGCGNTGTTTCGTGAAAAC
TCACAGCTTAACTGTGGGCGTGCGGGCGATACGGGCAGACTAGAGTACTGCAGGGGA
GACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGG
CGAAGGCGGGTCTCTGGGCAGTAACTGACGCTGANGAGCGAAAGCGTGGGTAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTT
CCTTCCTTGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTA

>48_R

CGCCGATCCCACCTTCGACAGCTCCCTCCAAAAGGTTAGGCCACTGGCTTCGGGTGT
TACCGACTTTCATGACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCG
CAGCGTTGCTGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGAC
CCCAATCCGAACTGAGACCAGCTTTAAGGGATTCGCTCCACCTTGCGGCTTCGCAGC
CCTCTGTA CTGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGACT
TGACGTCATCCCCACCTTCCTCCGAGTTGACCCCGGCAGTCTCCTACGAGTCCCCGGC
ATTACCCGCTGGCAACATAGGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACA
TCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCTGCACACAGGCCACAAGGGA
ATACCTATCTCTAGGTACGTCCTGTGCATGTCAAACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTG
CATCGAATTAATCCACATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT
TTAGTCTTTCGACCGTACTCCCCAGGCGGGGTACTTAATGCGTTAGCTACGGCACGGA
TCCCAAGGAAGGAAACCCACACCTAGTACCCACCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGG
TATCTAATCCTGTTTCGCTACCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACTGCCAGAG
ACCCGCCTTCGCCACCGGTGTTCCCTCCTGATATCTGCGCATTCCACCGCTACACCAGG

AATCCAGTCTCCCCTGCAGTACTCTAGTCTGCCCCGTATCGCCCCGACGCCACAGTT
AAGCTG

Конкатемеры

>14_conc

taacacgtgggtgatctgccctgcaacttgggataagcctgggaaactgggtctaataccgaataggaccgcctctcatgggggtgtggg
gaaagcttttgcgggtgtgggatgggcccggcctatcagcttgttgggtgggtaatggcctaccaaggcgacgacgggtagccggcctg
agagggtgaccggccacactgggactga
gatacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatgggcgcaagcctgatgcagcgacgccgctgaggggatg
acggccttcgggttgaaacctcttcaatagggacgaagcgcaagtgcaggtacctatagaagaaggaccggccaactacgtgccagca
gccgcgtaatacgtagggtccgagcgttgc
cggaatactgggcgtaaagagctcgtaggtggttgcgcgttctcgtgaaaactcacagcttaactgtgggcgtgcgggcgatacgggc
agactagagtactgcaggggagactggaattcctggtgtagcgggtggaatgcgcagatatcaggaggaacannnggtggcgaangcggg
tctctgggcagtaactgacgctgangagcg
aaagcgtggggagcgaacaggattagataccctggtagtccacgccgtaaacggtgggtactannnnnnnnnnnnnnnnnnnnnn
nn
gcacaagcggcggagcatgtggattaatcgatgcaacgcgaagaaccttacctgggttgacatgcacaggacgccagtagagatattgg
ttccctgtggcctgtgtgcaggtggtgcatggctgtcgtcagctcgtgtcgtgagatgttgggttaagtcccgaacgagcgaaccctgt
ctcatgttccagcacgttatggtgggactcgtgagagactgccggggtcaactcggaggaagggtg
gggatgacgtcaagtcacatgcccttatgtccagggttcacacatgctacaatggccggtacaaagggtgcgatgccgtgaggtgga
gcgaatccttcaaagccggtctcagttcggatcggggtctgcaactgacccccgtgaagtcggagtcgctagtaatcgagatcagcaac
gctgcggtgaatacgttcccggccttg
tacacaccgccctcacgtcatgaaagtcggtaacaccgaagccggtggcctaaccctgtgganggagccgtcgaaggtgggnncg
gcgatgg

>40_conc

ggcccttcggggtnctcgagtggcgaacgggtgagtaacacgtgggtgatctgccctgcaacttgggataagcctgggaaactgggtcta
ataccggataggaccacacacttcatggtgagtgtgcaaagcttttgcgggtgtgggatgagcccggcctatcagcttgttgggtgggta
atggcccaccaaggcgacgacgggtagc
cggcctgagagggtgaccggccacactgggactgagatacggcccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgcacaatggg
cgcaagcctgatgcagcgacgccgctgaggggatgacggccttcgggttgaaacctcttcaagtagggacgaagcgaaagtgcggta
cctacagaagaaggaccggccaactacgtgccca

gcagccgcggtaatacgtagggtccgagcgttccggaattactgggcgtaaagagctcgtagggtggttctcgcggtttcgtgaaaact
cacagcttaactgtgggcgtgccccgatacggcagactagagtactgcaggggagactggaattcctggtgtagcgggtggaatgcgc
agatatcaggaggaacaccgggtggcgaan
nnntgtagtccacg
ccgtaaacgggtgggfactagggtgtgggtttccttccttgggatccgtgccgtagctaacgcattaagtacccccgctggggagtacggctgc
aagactaaaactcaaaggaattgacggggggccgcacaagcggcggagcatgtggattaattgatgcaacgcgaagaaccttacctgg
gthtgcagcagaggacgtatctagagataggattcccttggcctgtgtgaggtggtcatggctgtctgcagctcgtgctgagatg
ttgggttaagcccgaacgagcgaaccttgcctatgttgccagcgggtaatgccggggactc
gtaggagactgccgggtcaactcggaggaaggtggggatgacgtcaagtcatcatgcccttatgtccagggctcacacatgctacaat
ggccagtacagagggtgcgaagccgtaagggtggagcgaatcccftaaagctggtctcagttcggattggggctgcaactcgacccat
gaagtcggagtcgctagtaatcgagatc
agcaacgtcggtgaatacgttcccgggcctgtacacaccgccgtcacgtcatgaaagtcggtaacaccccgaagccagtgccctaac
cttttgaggaggag

>48_assembl/rc

ggcccttcggggactcagtgaggcaacgggtgagtaaacacgtgggtgatctgccctgacctcgggataagcctgggaaactgggtcta
ataccgataggaccacacattcatggtgagtgggtgcaaagcttttgcgggtgtgggatgagccgcggcctatcagcttgggtggggta
atggcccaccaaggcgacgacgggtgac
cggcctgagagggtgaccggcactgggactgagatacggccagactcctacgggaggcagcagtggggaatattgacaatggg
cgcaagcctgatgagcgcgcccgtgaggatgacggccttcgggtgtgaaacctttcagtagggacgaagcgaagtagcggta
cctacagaagaaggaccggccaactacgtgcca
gcagccgcggtaatacgtagggtccgagcgttccggaattactgggcgtaaagagctcgtagggtggttctcgcgntgttcgtgaaaact
cacagcttaactgtgggcgtgccccgatacggcagactagagtactgcaggggagactggaattcctggtgtagcgggtggaatgcgc
agatatcaggaggaacaccgggtggcgaag
gggggtctctgggcagtaactgacgtgaggagcgaagcgtgggtagcgaacaggattagatacctggtagtccacgccgtaaaccg
tgggtactagggtgtgggtttccttccttgggatccgtgccgtagctaacgcattaagtaccccgctggggagtacggctgcaagactaaa
ctcaaagggaattgacggggggccgcacaa
gcggcgagcatgtggattaattcgatgcaacgcgaagaaccttacctgggttgacatgacacaggacgtacctagagataggtattccctt
gtggcctgtgtgaggtggtcatggctgtctgcagctcgtctgtagatgtgggttaagcccgaacgagcgaaccttgcctatgt
tgccagcgggtaatgccggggactc
gtaggagactgccgggtcaactcggaggaaggtggggatgacgtcaagtcatcatgcccttatgtccagggctcacacatgctacaat
ggccagtacagagggtgcgaagccgaaggtggagcgaatcccftaaagctggtctcagttcggattggggctgcaactcgacccat
gaagtcggagtcgctagtaatcgagatc
agcaacgtcggtgaatacgttcccgggcctgtacacaccgccgtcacgtcatgaaagtcggtaacaccccgaagccagtgccctaac
cttttgaggaggactgtcgaaggtgggatcggcg

