

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Прокофьев Евгений Сергеевич

Содержание представителей рода *Mycobacterium* в воде и обрастаниях аквариумов с замкнутой системой очистки воды

Выпускная квалификационная работа бакалавра

по направлению подготовки 020400

основная образовательная программа бакалавриата «Биология»

профиль «Клеточная и молекулярная биология»

Работа выполнена на кафедре
микробиологии СПбГУ

Научный руководитель:
ст. преп., к.б.н.

Дмитриева Елена Юрьевна

Санкт-Петербург

2017

Оглавление

	Стр.
Введение	3
1. Обзор литературы «Микобактерии в замкнутых системах очистки и распределения воды»	5
1.1. Таксономическое положение, классификация и идентификация микобактерий	5
1.2. Биологические свойства микобактерий	6
1.2.1 Структурные особенности клеточной стенки микобактерий	6
1.2.2. Физиологические особенности и места обитания микобактерий, оценка их численности	9
1.2.3. Бактериальные биоплёнки с участием микобактерий	13
1.2.4. Микобактерии в симбиозе с Protozoa	16
1.3 Условно-патогенные микобактерии и их участие в патогенезе у людей и гидробионтов	17
1.3.1. Условно-патогенные микобактерии, вызывающие заболевания у гидробионтов	18
1.3.2. Условно-патогенные микобактерии, вызывающие заболевания у людей	21
1.4. Современные представления об эффективности санации водных систем в отношении условно-патогенных микобактерий	25
2. Материалы и методы	29
2.1. Объект исследования	29
2.2. Окраска бактериальных мазков на кислото-спиртоустойчивость	31
2.3. Методики проведения идентификационных тестов	31
3. Результаты и их обсуждение	
3.1. Оценка численности микобактерий в исследованных образцах	38
3.2. Определение оптимального времени оценки кислото-спиртоустойчивости для бактериальных штаммов	34

3.3. Идентификация штаммов микобактерий	40
3.4. Заключение	44
4. Выводы	45
5. Список литературы	46

Введение

В настоящее время всё большее внимание уделяется микробиологическим рискам, связанным с аквакультурой, то есть с искусственным разведением гидробионтов (рыб, ракообразных, моллюсков и др.). Современные объекты аквакультуры все чаще конструируются с замкнутым оборотом воды, её фильтрацией и санацией. На таких объектах создаются условия для формирования специфических биоценозов, в первую очередь, микробиоценоза биофильтров и различных типов обрастаний, включающих как автотрофных, так и гетеротрофных микроорганизмов. Появляется все больше литературных данных о присутствии в подобных биоценозах патогенных и условно-патогенных бактерий, в частности микобактерий, способных повлиять на здоровье объектов аквакультуры и обслуживающего персонала. Ежегодно регистрируется рост количества случаев заболеваний кожи, лимфатических сосудов, легочных и генерализованных инфекций, вызванных у людей нетуберкулезными микобактериями.

Широкому распространению и накоплению микобактерий в замкнутых водных системах с дезинфекцией воды способствует специфическое строение оболочки микобактерий. В ней содержатся гидрофобные миколовые кислоты, снижающие чувствительность микобактерий к дезинфекции, облегчающие их прикрепление к твёрдым поверхностям и последующее образование биоплёнок. Таким образом, на объектах аквакультуры и крупнотоннажной аквариумистике актуально изучать присутствие

микобактерий не только в воде, но и в грунте, на водных растениях, конструктивных элементах, обрастаниях на стенках и в биофильтрах.

В научной литературе имеются ограниченные данные о содержании микобактерий в водных образцах. Недостатком этих исследований является отсутствие эффективного метода выявления микобактерий и отработанного общепризнанного алгоритма проведения этапов их выявления (Falkinham, 2009).

На кафедре микробиологии СПбГУ на протяжении нескольких последних лет исследуется персистенция санитарно-показательных и условно-патогенных бактерий в водных системах с рециркуляцией санируемой воды на примере крупнотоннажных аквариумов Санкт-Петербургского океанариума. Ранее нами была проведена предварительная оценка содержания микобактерий в воде одного из пресных аквариумов, она составила не менее 10 КОЕ/мл воды (Шакирова, 2016). Был предложен алгоритм выявления этих бактерий из водных образцов. На этом этапе было выделено 3 первых штамма водных условно-патогенных микобактерий.

В соответствии с вышеизложенной целью **данной работы** было выявление и оценка численности микобактерий в воде и обрастаниях пресноводного крупнотоннажного аквариума Санкт-Петербургского Океанариум, выделение и идентификация новых штаммов микобактерий. Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Оценить численность микобактерий в воде и обрастаниях пресноводного аквариума № 4. Сформировать коллекцию штаммов микобактерий.
2. Определить оптимальное время оценки кислото-спиртоустойчивости для выделенных штаммов при оценке их численности.
3. Провести идентификацию штаммов микобактерий в коллекции по фенотипическим признакам.

1. Обзор литературы «Микобактерии в замкнутых системах очистки и распределения воды»

1.1. Таксономическое положение, классификация и идентификация микобактерий

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*. На данный момент описано 185 видов микобактерий (Euzebu, 2017).

Микобактерии – это кислото-спиртоустойчивые бактерии, то есть после окрашивания основным фуксином при нагревании они не обесцвечиваются в кислото-спиртовом растворе (Smithwick, 1976). Это ключевое свойство микобактерий, позволяющее выделить их в отдельный род.

В Определителе бактерий Берджи (Holt et al., 1997) микобактерии выделены в отдельную группу 21. В Определителе указано, что по крайней мере некоторые клетки микобактерий в молодых культурах должны быть кислото-спиртоустойчивыми. В Руководстве по систематике Берги (Magee and Ward, 2012) в описании рода *Mycobacterium* кислото-спиртоустойчивость отмечается как основной фенотипический признак, проявляющийся хотя бы на одной из стадии жизненного цикла. Это разногласие в отношении возраста культур микобактерий при оценке признака кислото-спиртоустойчивости до сих пор не имеет объяснения в научной литературе.

Микобактерий принято разделять на две группы по скорости роста: медленно- и быстрорастущие (Pedley et al., 2004). Медленнорастущим микобактериям (например, *M. marinum*) требуется 7-28 дней для образования видимых колоний. Описываются и быстрорастущие микобактерий, например, *M. fortuitum*, *M. chelonae* и *M. abscessus*, которые образуют колонии через 3-5 дней при 37 °С (Falkinham, 1996).

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 (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, быстрое накопления мутаций, приводящее к устойчивости к антибиотикам, увеличивается время для адаптации к стрессорным факторам окружающей среды (Primm et al., 2004).

Риньоном (Runyon, 1959) была предложена классификация микобактерий на основе их способности продуцировать пигмент каротиноидной природы. Были выделены следующие группы микобактерий: фотохромогенные (культуры на свету приобретают лимонно-желтую окраску), скотохромогенные (в темноте образуют оранжево-желтый пигмент) и нехромотогенные (не пигментируются или имеют слабую желто-розовую окраску).

Дифференциация видов рода *Mycobacterium* основывается на биохимических тестах, температуре роста и образованию пигмента (Magee and Ward, 2012).

1.2. Биологические свойства микобактерий

Микобактерии имеют вид слегка изогнутых или прямых неподвижных палочек (0,2–0,6 × 1,0–10 мкм). Большинство видов микобактерий демонстрируют неоднородность окрашивания по Граму, но считаются грамположительными. Может встречаться редуцированное ветвление и нитевидные или мицелиальные структуры, которые при механических воздействиях рассыпаются на короткие палочки или кокки. Микобактерии не образуют спор, капсул и конидий. Колонии микобактерий небольшие суховатые, от белого до кремового цвета, но иногда встречаются жёлтые и оранжевые варианты колоний (Magee and Ward, 2012).

Микобактерии – это кислото-спиртоустойчивые бактерии. Удержание красителя обусловлено наличием длинноцепочечных миколовых кислот, покрывающих всю поверхность клеточной стенки сплошным гидрофобным слоем (Brennan and Nikaido, 1995). Именно миколовые кислоты являются причиной многих биологических особенностей микобактерий, влияющих на их физиологию, устойчивость к условиям окружающей среды и распространённость.

1.2.1. Структурные особенности клеточной стенки микобактерий

Главной особенностью микобактерий является наличие гидрофобной, богатой липидами внешней мембраны. Микобактерии являются одними из самых гидрофобных бактерий (van Oss et al., 1975). Это свойство обуславливается наличием длинноцепочечных миколовых кислот во внешней мембране. Вследствие этого микобактерии имеют низкую проницаемость клеточной стенки и медленно растут, поскольку для биосинтеза миколовых кислот требуются большие энергетические затраты (Brennan and Nikaido, 1995).

Гидрофобность микобактерий является основным фактором, определяющим способность переходить в воздушные аэрозоли (аэрозользацию), образование биоплёнок и устойчивость к антибиотикам и дезинфицирующим средствам. Данные свойства расширяют адаптивный потенциал микобактерий и позволяют им существовать в условиях, губительных для других бактерий (Falkinham, 2009).

Представители рода *Mycobacterium* имеют клеточную стенку, состоящую из тонкого слоя пептидогликана, с которым ковалентно связывается слой полисахарида арабиногалактана. К последнему ковалентно присоединяются миколовые кислоты – разветвленные высокомолекулярные (60-90 атомов углерода) жирные кислоты. Такая структура клеточной стенки получила название кора клеточной стенки или миколил-арабиногалактан-пептидогликанового комплекса (Brennan, 2003). Схема строения клеточной стенки микобактерий представлена на рис. 1.

Сложные гликолипиды, нековалентно связанные с миколовыми кислотами, образуют второй наружный липидный слой клеточной стенки. В результате формируется атипичная мембраноподобная структура, имеющая значительную толщину (более 10 нм) и очень высокую вязкость и низкую текучесть. Эта структура отличается повышенной стабильностью и крайне низкой проницаемостью. Она представляет собой непреодолимый барьер для высокомолекулярных и подавляющего большинства низкомолекулярных соединений, включая спирты, кислоты, щелочи и антибиотики (Falkinham, 2003).

Слабо разветвленные полимерные молекулы полисахарида арабиноманнана, ковалентно связанные с липидами плазматической мембраны, формируют липоарабиноманнан, обеспечивающий выживание патогенных и условно-патогенных микобактерий внутри макрофагов. Он прикреплен к цитоплазматической мембране, пронизывает клеточную стенку и может выходить на её поверхность. Терминальные фрагменты липоарабиноманнана, прежде всего его маннозные радикалы, неспецифически подавляют активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов периферической крови. Это приводит к нарушению иммунного ответа (Brennan, 2003).

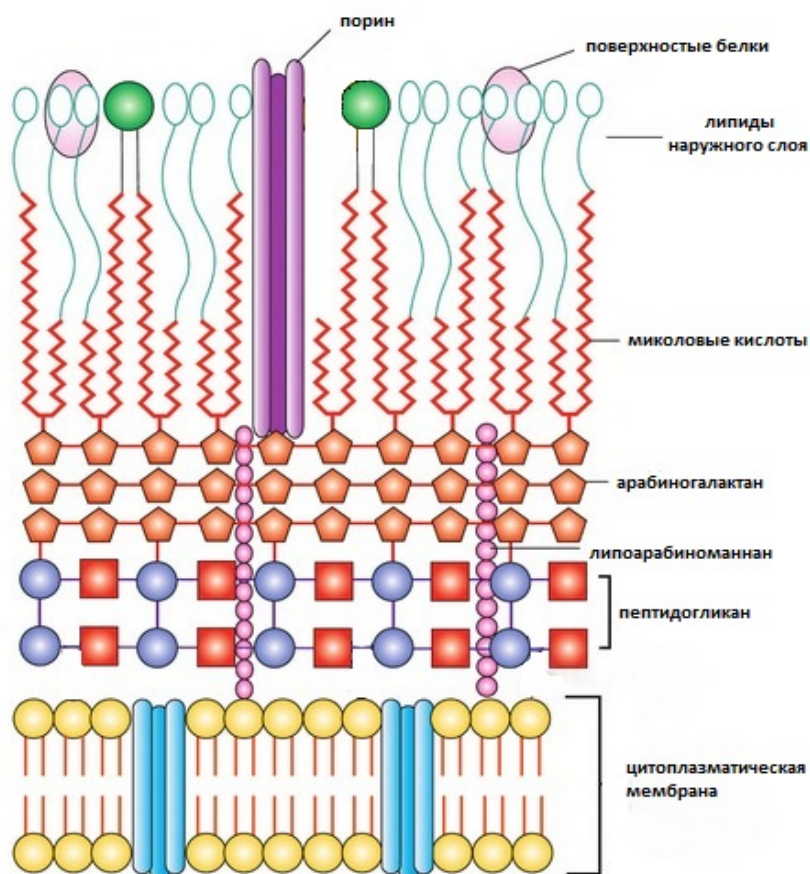


Рис. 1. Схема строения клеточной стенки микобактерий (Velayati and Farnia, 2016)

Порины, пронизывающие толстую оболочку микобактерий, имеют большую длину и служат для поступления небольших гидрофильных молекул в клетку, в том числе питательных субстратов. К примеру, длина главного порина MspA у *M. smegmatis* достигает 10 нм при диаметре 2,5 нм. Такая протяженность поринов замедляет поступление веществ в клетку микобактерий (Jarlier and Nikaido, 1994).

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

1.2.2. Физиологические особенности и места обитания микобактерий, оценка их численности

Микобактерии могут использовать широкий спектр источников углерода и азота. Большинство видов способны адаптироваться к росту на простых субстратах, используя аммиак в качестве источников азота и глицерин в качестве источника углерода в присутствии минеральных солей. Глицерин является обязательной составляющей питательных сред для культивирования микобактерий, поскольку большинство видов эффективно метаболизирует его до пирувата (Stonebrink, 1978).

В качестве источников углерода культивируемые микобактерии используют также ацетат, цитрат, пропанол (Tsukamura, 1983), в качестве источников азота – белки, нитраты и нитриты (McCarthy, 1987).

Олеиновая кислота и другие высокомолекулярные жирные кислоты составляют неотъемлемую часть метаболизма микобактерий, поэтому они входят в состав большинства питательных сред для их культивирования (Stonebrink, 1978).

Микобактерии способны окислять сложные циклические и полициклические органические соединения (Burbach and Perry, 1993; Wang et al., 1995).

Микобактерий по отношению к температуре считают мезофильными бактериями, способными выдерживать понижения и повышения температуры в определённых пределах (Magee and Ward, 2012). Для большинства мезофильных микобактерий оптимальными температурами являются диапазон между 25-35 °С. Отмечено, что микобактерии способны выдерживать колебания температур в интервале от 10 до 50-60 °С (Schulze-Robbecke and Buchholtz, 1992). Так, *M. avium* была выделена Дю Мюлином с коллегами (Du Moulin et al., 1988) из систем горячего водоснабжения больниц (52-57 °С). *M. xenopi* обнаружена в системах горячего городского водоснабжения (45-50 °С) (Slosarek et al., 1993). *M. kansasii* чаще всего выделяли из систем холодного водоснабжения (10-15 °С); было также выяснено, что при температуре выше 45 °С эта микобактерия прекращала свой рост (Wright et al., 1985). *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum* сохраняли рост при 10 °С (George et al., 1980). Температурными оптимумами для *M. haemophilum* и *M. marinum*, возбудителей различных кожных инфекций у человека и животных, являются, соответственно, 32 °С и 30 °С (Schulze-Robbecke et al., 1995).

Термоустойчивость микобактерий увеличивается в ряду: *M. kansasii* > *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. marinum* > *M. avium*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* (Schulze-Robbecke and Buchholtz, 1992).

Было отмечено, что микобактерии могут переживать условия замораживания (-75°C в питательной среде) в течение 15 месяцев (Iivanainen et al., 1995).

Способность микобактерий сохранять жизнеспособность в широком температурном диапазоне позволяет предположить, что они изменяют состав и насыщенность своих мембранных липидов для поддержания определённой жидкостности (Suutari and Laasko, 1993).

Микобактерии являются облигатными аэробами, но они способны расти и в условия низкого содержания кислорода (микроаэрофилия) (Magee and Ward, 2012). Так, для *M. kansasii*, *M. intracellulare* и *M. fortuitum* показано сохранение жизнеспособности при кислородном голодании в условиях лабораторного культивирования (6% кислорода в газовой среде) (Gillespie et al., 1986). Это свойство даёт преимущества микобактериям в средах с низким содержанием кислорода – в водных и почвенных экосистемах.

Оптимальное значение pH для большинства микобактерий 5-6. Отмечено, что *M. scrofulaceum* и *M. avium* теряли жизнеспособность при значениях pH 4,6 (Portaels and Pattyn, 1982). При значениях pH выше 7,5 наблюдался лишь незначительный рост. Оптимум pH среды для роста *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. xenopi*, часто описываемых условно-патогенных микобактерий, составляет от 5,0 до 6,5 (George and Falkinham, 1986).

Микобактерии были выделены из пресной, солоноватой и соленой воды, что указывает на их галотолерантность (Brooks et al., 1984). Так, *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum* активно размножаются в пресной и солоноватой воде с концентрации солей 2% (в пересчете на NaCl) (George et al., 1980). Галотолерантность видоспецифична для микобактерий; способность к росту при 5% NaCl является идентификационным признаком (Magee and Ward, 2012).

Микобактерии устойчивы к действию тяжелых металлов. Показано, что *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum* проявляют устойчивость к кадмию, ртути, серебру и теллуриду. К примеру, микобактерии могут расти при концентрации хлорида ртути 10^{-4} М, что свидетельствует об их способности 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 могут легко переноситься в составе аэрозолей из водной среды в воздушную; это явление называется аэролизацией. Гидрофобные клетки микобактерий прикрепляются к пузырькам воздуха, образующимся в толще воды; при разрывании пузырька формируются капли аэрозоля. Эти капли достаточно малы (5 мкм в диаметре), они легко могут проникать в альвеолы человека при дыхании (Parker et al., 1983). Исследования подтверждают связь между лёгочными инфекциями и аэролизацией микобактерий (Falkinham et al., 2008). При выделении микобактерий из воздушных аэрозолей чаще всего обнаруживают *M. avium* и *M. intracellulare* (Parker et al., 1983).

Микобактерии способны формировать биоплёнки и вступать в симбиотические отношения с простейшими. Эти вопросы будут подробно рассмотрены в последующих главах (1.2.3 - 1.2.4).

Основной средой обитания микобактерий является почва. Микобактерии широко представлены в почве и входят в число самых обильно представленных родов почвенных бактерий (Iivanainen et al., 1999). Быстрорастущие виды микобактерий (*M. flavescens*, *M. chlorophenicum* и др.) играют важную роль в почвенных сообществах, обладая способностью разлагать полициклические ароматические углеводороды. Эти соединения распространены в окружающей среде повсеместно, они плохо поддаются биологическому разложению, многие из них являются мутагенами и/или канцерогенами. Они образуются в результате сгорания ископаемого топлива, сжигания отходов, как побочный продукт промышленных процессов, таких как газификация угля и нефтяная очистка. Способность микобактерий разлагать такие соединения широко используется для очистки почв, загрязненных нефтью (Cheung and Kinkle, 2001).

Так в исследовании, проведенном в Японии (Wang et al., 2006), из загрязненных сбросом промышленных почв были выделены микобактерии, относящихся к видам: *M. vanbaalenii*, *M. austroafricanum*, *M. chubniense/chlorophenicum*, *M. mageritense*, *M. frederiksbergense*.

Свойство микобактерий разлагать и метаболизировать различные сложные углеводы позволяет считать их ключевыми участниками минерализации органических веществ в почве (Falkinham, 2009).

Микобактерии являются естественными обитателями природных водоемов. Гидрофобность поверхности клетки позволяет микобактериям скапливаться на поверхности водоемов, на разделе фаз вода-воздух. Здесь же скапливаются органические гидрофобные частицы, которые микобактерии используют в качестве питательных субстратов (Falkinham, 2002).

Отмечено постоянное присутствие микобактерий в стоячих водоемах с низкими значениями рН воды и с высокой концентрацией органических веществ, таких как торфяные ручьи и болота (Iivanainen et al., 1999). Действительно, из ручьёв с торфяной водой в Финляндии микобактерии были выделены в интервале от $1,1 \times 10^2$ до $1,5 \times 10^4$ КОЕ/мл (Ivanainen et al., 1999). Из богатых торфом почв Финляндии, сфагнума и воды были выделены: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. malmoense*, *M. simiae*, *M. marinum*, *M. xenopi* и *M. botniense* (Torkko et al., 2000).

С другой стороны, микобактерии могут встречаться в водоемах с низким содержанием органических веществ и высокими значениями рН, например, в свободно текущих водах реки Рио-Гранде, США (Bland et al., 2005). В данном исследовании были выделены и идентифицированы следующие виды: *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. lantiflavum*, *M. celatum*, *M. avium*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. kansasii*, *M. interjectum*, *M. nonchromogenicum*, *M. chitae*, *M. phlei*.

Гидрофобность клеточной поверхности является основным фактором, определяющим наличие микобактерий в системах распределения воды. Как быстро, так и медленно растущие микобактерии колонизируют системы водоснабжения путем образования биоплёнок (Torvinen et al., 2004). Медленный рост и устойчивость к дезинфицирующим агентам способствуют выживанию микобактерий в системе распределения воды (Falkinham, 2003). Дезинфекция уничтожает конкурентов, давая микобактериям определённые преимущества в такой олиготрофной среде, как питьевая вода (Norton et al., 2004). В составе биопленок микобактерии приобретают повышенную устойчивость к дезинфицирующим агентам (Steed and Falkinham, 2006). Это способствует увеличению числа микобактерий в системе распределения воды (Falkinham, 2015).

Установлено широкое разнообразие условно-патогенных микобактерий в питьевой воде, например, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M.*

fortuitum, *M. abscessus* и *M. chelonae* (Fischeder et al., 1991; Zhang et al., 1997; Le Dantec et al., 2002).

Фишедер с коллегами (Fischeder et al., 1991), исследовав питьевую воду, показал наличие микобактерий в 72 пробах из 86 с концентрацией 10^2 - 10^3 КОЕ/л. Большинство образцов содержали *M. gordonae* и *M. fortuitum*.

Ле Дантек с коллегами (Le Dantec et al., 2002), также исследовав образцы питьевой воды, показал, что из 144 образцов 104 содержали микобактерий с максимальной концентрацией 50 КОЕ/л; в основном в образцах присутствовали *M. gordonae*, *M. fortuitum* и *M. chelonae*.

Во многих исследованиях был сделан акцент на выделении и подсчете количества микобактерий (особенно *M. avium*) в системах водоснабжения больниц, так как пациенты больниц – основная группа риска для заболеваний, причиной которых становятся микобактерий (Horsburgh, 1992).

M. avium и *M. intracellulare* были выделены из питьевой воды (Glover, 1994), воды бассейнов и аквариумов (Saito and Tsukamura, 1976) и системы водоснабжения больниц (Graham et al., 1988).

В работе нашей группы на предыдущем этапе исследования воды из крупнотоннажного аквариума было установлено присутствие микобактерий в количестве не менее 10 КОЕ/мл (Шакирова, 2016).

Есть множество сведений о наличии микобактерий на медицинских инструментах. Особенно часто микобактерий выделяли из бронхоскопов. Бронхоскопы были загрязнены *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* и *M. chelonae* (Takigawa et al., 1995; Bennett et al., 1994). Наличие микобактерий было связано с недостаточной дезинфекцией бронхоскопов после их использования при осмотре инфицированного пациента. Источником микобактерий в бронхоскопах может стать и вода системы водоснабжения больниц (Bennett et al., 1994). Сохранение микобактерий в бронхоскопах обусловлено их устойчивостью к дезинфицирующим средствам и их способностью формировать биоплёнок (Takigawa et al., 1995).

Микобактерий выделяли также и из продуктов питания. Наиболее часто микобактерий выделяли из молока: в образцах сырого молока были обнаружены *M. kansasii*, *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. fortuitum* (Chapman et al., 1965), в пакетированном пастеризованном молоке была обнаружена *M. paratuberculosis* (Millar

et al., 1996). В последнее время появилось предположение, что паратуберкулёз домашнего скота (болезнь Ионе), вызванный *M. paratuberculosis*, тесно связан с тяжёлой хронической болезнью Крона у людей. Большинство людей подвергаются заражению при употреблении пастеризованного молока (Naser et al., 2000).

Есть данные об обнаружении *M. avium* в образцах сигаретного табака и сигаретных фильтров (Eaton et al., 1995).

1.2.3. Бактериальные биоплёнки с участием микобактерий

Биоплёнки – главные источники условно-патогенных микобактерий и основная причина их устойчивости в системах водоснабжения (Falkinham, 2001). Образование биопленок микобактериями в настоящий момент становится особенно важным из-за их повсеместного распространения в системах очистки и распределения воды и повышения риска возникновения разнообразные инфекции у человека и животных (Primm et al., 2004).

Первое научное описание бактериальных биоплёнок было опубликовано в 30-е гг. (Zobell et al., 1933). В конце 70-х гг. было показано, что бактерии, находящиеся в составе биоплёнок в водной среде по численности преобладали над планктонными клетками: максимальная численность планктонных форм $1,0 \times 10^5$ кл/мл, в составе биоплёнок – $8,0 \times 10^7$ кл/см² (Geesey et al., 1978). Наблюдения за такими же явлениями в других средах подтвердили тенденцию к образованию бактериями биоплёнок (Costerton et al., 1995).

В настоящее время принято считать, что биоплёнка – это микробное сообщество, характеризующееся клетками, необратимо прикрепленными к субстрату или друг к другу, находящимися в матриксе экстраклеточного полимерного вещества, синтезированного самими клетками. Такое сообщество демонстрирует изменение фенотипа в отношении скорости роста и транскрипции генов (Donlan and Cosrerton, 2002).

Биоплёнки могут образовываться на большинстве абиотических и биотических поверхностях. В процессе развития биоплёнок у бактерий изменяются фенотипические характеристики, что приводит к образованию гетерогенного, динамичного и дифференцированного сообщества (Johnson, 2008). Снижение темпов роста, ограниченное проникновение дезинфектантов в биоплёнку, активация генов устойчивости – главные причины, которые сами по себе или в комбинации являются причинами успешной выживаемости бактерий в составе биоплёнок при неблагоприятных воздействиях среды (Lewis, 2001).

Особое значение в настоящий момент имеет формирование биоплёнок на медицинских и технологических устройствах, так как этот процесс может влиять на здоровье людей и промышленные процессы. Рост бактериальных биоплёнок в организме человека приводит к хроническим инфекциям, которые плохо поддаются антимикробной терапии (Lewis, 2001). С другой стороны, биоплёнки полезны в некоторых технологических и во многих естественных процессах, где нужно получить стабильно развивающиеся сообщества полезных микроорганизмов (Kreth et al., 2008).

Биоплёнки, состоящие из одного или более видов бактерий, могут функционировать как резервуар оппортунистических и истинных патогенов человека. Подсчитано, что 65% всех бактериальных инфекций человека так или иначе связаны с биоплёнками (Donlan et al., 2002).

Следует отметить, что исследования на реальных биоплёнках крайне малочисленны, что связано со спецификой их организации и локализации, поэтому большая часть исследований была произведена в лабораторных условиях на модельных объектах, активно образующих биоплёнки, таких как *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, некоторые стафилококки и другие.

Формирование биоплёнки – это сложный и динамичный процесс, который принято делить на несколько этапов (Martinez and Vadyvaloo, 2014):

Формирование биоплёнок микобактериями имеет свои особенности. У микобактерий отсутствуют такие поверхностные структуры, как фимбрии, жгутики, капсулы и чехлы. Эти структуры используются микроорганизмами для достижения поверхности и закрепления на ней. Гидрофобные взаимодействия между экспонированными на поверхность хвостами жирных кислот и гидрофобной поверхностью будут опосредовать прикрепление микобактерий и образование биоплёнок (Recht et al., 2000).

Наличие на поверхности клеток микобактерий гликопептидолипидов определяет их распространение на твердых поверхностях (Recht et al., 2001). Микобактерии двигаются по поверхности с помощью скользящего механизма, то есть движения по твёрдой поверхности вдоль длинной оси бактериальной клетки без участия жгутиков. Это форма подвижности играет важную роль в колонизации различных поверхностей (Martinez et al., 2014).

Существуют межвидовые различия в природе экстраклеточных полимерных веществ. У *M. smegmatis* в основном представлены свободными миколовыми кислотами и

гликопептидолипидами, у *M. marinum* – липоолигосахаридами и липопептидами (Rose et al., 2015). Во время формирования биоплёнки и её созревания гены, связанные с биосинтезом гликопептидолипидов у *M. smegmatis* были на порядок активнее, чем у планктонных форм (Yamazaki et al., 2006). Для *M. smegmatis* также было показано, что синтез миколовых кислот увеличивается в присутствии антибиотиков (Ojha et al., 2008).

Скорость образования биоплёнок различными микобактериями крайне неоднородна. *M. kansasii* в лабораторных условиях начинает образовывать биоплёнки лишь на третью неделю при температуре 35-45 °С, в то время как *M. fortuitum* формирует биоплёнки через 2 часа при температуре 37 °С (Schulze-Robbecke et al., 1989; Hall-Stoodley et al., 1998).

M. avium – наиболее изученная микобактерия в отношении формирования биоплёнок. Именно эта микобактерия чаще других встречается в биоплёнках в системах распределения воды. *M. avium* формирует зрелую биоплёнку в лабораторных условиях через 7 дней при температуре 35-45 °С. Бактерия способна образовывать биопленки на самых разнообразных материалах (медь, железо, пластик и др.), и формирование биоплёнки не зависит от уровня питательных веществ в среде (Williams et al., 2009).

Скорость роста биоплёнок связан также и с характером поверхности. *M. fortuitum* активнее образует биопленки на нержавеющей стали, ПВХ и поликарбонате, чем на медной поверхности или стекле (Williams et al., 2009).

Микобактерии могут формировать биоплёнки и в устройствах для фильтрации воды. Показано, что встроенные блоки угольного фильтра, содержащие серебро, были колонизированы с помощью образования смешанной биоплёнки, включающей в состав *M. avium* и *M. fortuitum*. Такая биоплёнка поддерживала свой рост благодаря устойчивости к серебру *M. avium* (Rodgers et al., 1999).

Устойчивость биоплёнок к антибиотикам – главная проблема, затрудняющая во многих случаях борьбу с инфекциями. Одним из основных механизмов такой устойчивости является горизонтальный перенос генов между бактериями в пределах биоплёнки (Martinez, 2014). Такой перенос генов – важнейшая причина выживаемости бактерий в биоплёнках и увеличения частоты мутаций, ответственных за устойчивости к противомикробным препаратам (Falkinham, 2001).

Будучи основным каркасом биоплёнки, экстраклеточные полимерные вещества также участвует в формировании устойчивости к антибиотикам и усилению

вирулентности. Эти вещества работают как своеобразный механический барьер, помогая инактивировать антибиотики (Wei and Ma, 2013).

1.2.4. Микобактерии в симбиозе с Protozoa

Персистенция микобактерий в системах распределения воды во многом определяется способностью микобактерий вступать в симбиоз с простейшими, которые постоянно присутствуют в данных системах. Гидрофобная поверхность микобактерий обуславливает их лёгкое фагоцитирование простейшими. Исследования доказывают, что свободноживущие простейшие являются естественными хозяевами для некоторых видов микобактерий. Симбиотические отношения с амёбами являются одним из способов распространения микобактерий в водной среде (Falkinham, 2002). Внутри них микобактерии могут пережить неблагоприятные условия (Hoffmann and Michel, 2001).

Первые сообщения о микобактериях, выживающих в амёбах, были получены в 70-х гг (Jadin, 1975; Prasad et al., 1978). Прасад с коллегами (Prasad et al., 1978) показал, что *Acanthamoeba castellanii* может содержать в своей цитоплазме несколько видов микобактерий. *M. avium* и *M. marinum* выживали внутри амёбы без вреда для себя и клетки-хозяина. Другие виды микобактерий (*M. smegmatis*, *M. fortuitum* и *M. phlei*) были полностью лизированы акантамёбой в течение 5 дней.

Выживаемость и рост *M. avium* наблюдался и в других простейших, например, в *Acanthamoeba polyphaga* и *Dictyostelium discoideum*. Было показано, что *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum* выживали в инфузории *Tetrahymena pyriformis*. *M. avium* была найдена в цистах *A. polyphaga* и *T. pyriformis* (Strahl et al., 2001). *M. bovis* выживала при фагоцитировании *A. castellanii* (Taylor et al., 2003).

В экспериментах Штраля (Strahl et al., 2001) было показано, что *M. avium*, *M. intracellulare* и *M. scrofulaceum*, находясь внутри амебы (*Acanthamoeba polyphaga*), размножаются в 4-40 раз быстрее, чем водные свободноживущие микобактерии.

Устойчивость к хлорированию многих простейших имеет решающее значение в их колонизации систем распределения воды. В исследованиях по дезинфекции питьевой воды (были использованы хлор, монохлорамин, диоксид хлора, озон и медно-серебряная ионизация) было показано, что простейшие одноклеточные организмы (*Acanthamoeba sp.*, *Hartmannella sp.* и *Vahlkampfia sp.*) устойчивы в значительной степени ко всем использованным в эксперименте дезинфектантам (Hoffmann and Michel, 2001).

Показано, что *Acanthamoeba polyphaga* и *A. castellanii* выделяют небольшие везикулы, которые могут содержать живых микобактерий. Из-за небольшого размера (2.1–6.4 мкм в диаметре) эти частицы при аэрозолизации могут легко вдыхаться человеком и животными (Newsome et al., 1998).

Некоторые виды и штаммы свободноживущих амёб проявляют устойчивость к воздействию повышенных температур до 55-65 °С (Winiecka-Krusnell and Linder, 2001).

1.3. Условно-патогенные микобактерии и их участие в патогенезе у людей и гидробионтов

В настоящий момент патогенные и условно-патогенные микобактерии принято разделять на несколько групп (комплексов):

- туберкулезный комплекс, в который входят *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* и другие (Falkinham, 1996);
- несколько комплексов условно-патогенных (нетуберкулезных) микобактерий.

Данные микобактерии вызывают оппортунистические инфекции у людей и животных. Наиболее подверженными заражению нетуберкулезными микобактериями являются пациенты больничных учреждений, лица с иммунодефицитами, болезнями лёгких, раком крови, пациенты, подвергшиеся хирургическим вмешательствам (Mirsaedi et al., 2014). Чаще всего поражается дыхательная система, хотя в последнее время наблюдается увеличение инфекции других органов и систем; лимфатические узлы, кожа, мягкие ткани, кости и суставы также поражаются микобактериями (Falkinham, 2009).

В 1980-90-е годы количество описанных 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., WHO, 2004).

Условно-патогенные микобактерии обитают в самых разнообразных природных условиях. На протяжении последних десяти лет условно-патогенных микобактерий выявляли из воды, почвы, домашних и диких животных, пищевых продуктов, а также из водораспределительных систем (Falkinham, 2009). Вследствие их повсеместного

распространения люди окружены этими условно-патогенными микроорганизмами. Заражение людей и животных происходит при контакте с загрязнёнными средами, возможность передачи инфекции от человека к человеку практически исключена (Falkinham, 1996).

1.3.1. Условно-патогенные микобактерии, вызывающие заболевания у гидробионтов

В аквакультуре и аквариумистике вода может содержать микобактерий водопроводной воды и микобактерий, находящихся непосредственно на гидробионтах. Обе группы микобактерий накапливаются в искусственных водных системах. Было показано, что видовой состав микобактерий, выделенных с гидробионтов, отличался от видов, обнаруженных в воде (Beran et al., 2006).

Впервые доказательства того, что микобактерии являются возбудителями инфекции у рыб, появились в 1897 году после изучения Батайоном заражённых сазанов (*Cyprinus carpio*) (Bataillon and Terre, 1897). В ходе многочисленных наблюдений и исследований было выяснено, что к микобактериозам восприимчивы более 167 видов рыб (Jacobs et al., 2009). Гидробионты, инфицированные микобактериями, обитали в пресных и солёных, искусственных и естественных местообитаниях (Novotny et al., 2010).

Инфицирование рыб происходит при поедании пищи, содержащей микобактерии, или непосредственно через воду (Whipps et al., 2007). Было показано, что микобактерии, находящийся в симбиозах с Protozoa, обладают большей вирулентностью; такие протисты также могут служить пищей гидробионтам (Rowe et al., 2014).

В ходе исследования было установлено, что гидробионты могут быть носителями микобактерий, в том числе и патогенных, не имея симптомов заболевания (Rowe et al., 2014).

Микобактериальные заболевания (микобактериозы) входят в число наиболее распространённых хронических заболеваний бактериальной этиологии, встречающихся у рыб в аквариумах и аквакультурах (Noga et al., 1990). В рыбной промышленности микобактериальные инфекции могут значительно снизить продукцию, так как заражению подвергаются большая часть поголовья рыбы, а инфицированная рыба становится истощённой с многочисленными поражениями кожных покровов и внутренних органов. В профессиональной аквариумистике данные инфекции также могут приносить

существенные убытки. Кроме того, некоторые виды микобактерий (особенно *M. marinum*, *M. fortuitum* и *M. chelonae*) могут вызывать кожные инфекции у людей, контактирующих с заражённой рыбой (Lewis et al., 2003).

На сегодняшний день существует множество данных о выделении микобактерий из образцов тканей инфицированных рыб (Primm et al., 2004; Beran et al., 2006; Zanoni et al., 2008; Jacobs et al., 2009; Parikka et al., 2012 и др.).

Так в исследовании, проведённом Бераном с коллегами, было показано, что в тканях больных рыб из крупнотоннажного аквариума микобактерии были выявлены в 41 образце из 58; были идентифицированы следующие виды: *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. flavescens*, *M. chelonae*, *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. celatum*, *M. kansasii* и *M. intracellulare*. Микобактерии были также выделены из моллюсков, ракообразных и амфибии, обитающих в аквариуме (Beran et al., 2006).

Возбудителями заболеваний рыб, вызванных нетуберкулезными микобактериями, являются также *M. abscessus*, *M. haemophilum*, *M. scrofulaceum*, *M. triplex*, *M. terrae*, *M. avium* и другие (Primm et al., 2004).

Отмечается, что в большинстве случаев гидробионты были поражены *M. marinum*, *M. fortuitum* и *M. chelonae* (Zanoni et al., 2008).

M. marinum является основной причиной микобактериозов у рыб в аквакультурах (Ashburner, 1977). *M. marinum* выделен из тканей кишечника многих инфицированных рыб, например, у скалярии (*Pterophyllum scalare*), красного неона (*Paracheirodon axelrodi*), анциструса (*Ancistrus lineolatus*), голубого неона (*Paracheirodon innesi*), пятнистого гурами (*Trichogaster trichopterus*), гуппи (*Poecilia reticulata*) и многих других рыб (Slany et al., 2014).

Вполне вероятно, что высокая плотность популяции, стрессорные факторы, наличие высоких уровней экскретируемых углерода и соединений азота в рециркуляции воды в аквакультурах способствуют росту заболеваемости рыб *M. marinum* (Hedrick et al., 1987).

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

M. chelonae и *M. abscessus* вызывают у рыб появление красновато- и серовато-белых узелков на поверхности брюшины, селезёнки, почек, печени и желудочно-кишечного тракта типа ретикулоэндотелиальных эпителиоидных гранулём (Chang et al., 2006).

В исследовании Занони с коллегами (Zanoni et al., 2008) было показано поражения печени, почек и селезенки у цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum* и *Cichlasoma rneeki*), вызванные *M. chelonae*.

Данио рерио (*Danio rerio*), модельный объект изучения микобактериозов у рыб, чаще всего поражается *M. chelonae*, *M. fortuitum* и *M. marinum*. У рыб отмечается эрозия кожи, изъязвления оснований хвостовых и грудных плавников. В некротических участках показано наличие гранулём. Заражение затрагивало гонады, печень, почки и ткани брюшины (Astrofsky et al., 2000). Формирование гранулём у *Danio rerio*, инфицированной *M. marinum*, показано на рис. 2.

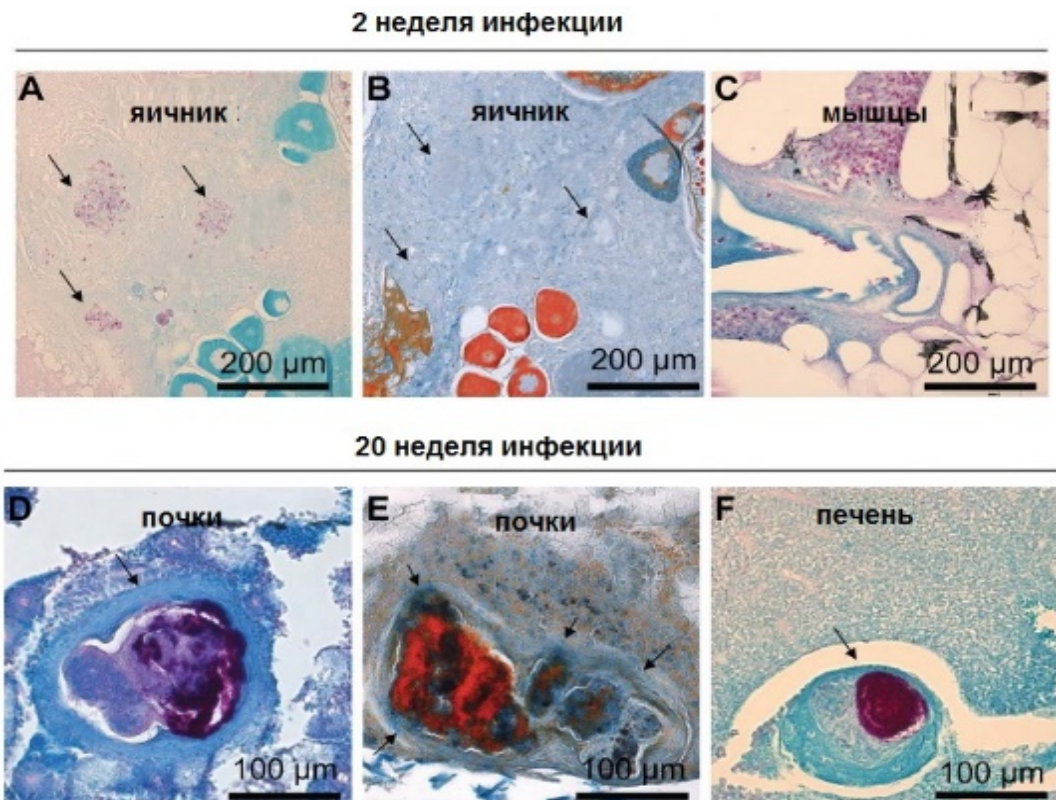


Рис. 2. Формирование гранулём *M. marinum* в тканях инфицированной *Danio rerio*. На ранней стадии инфекции формируются небольшие ограниченные области с микобактериями, называемые ранними гранулёмами (А). Бактерии могут находиться и в свободной форме (В, С). Через 20 недель у рыб наблюдались зрелые гранулёмы (D-F), окружённые фиброзными капсулами (Parikka et al., 2012).

M. fortuitum выделена из органов брюшной полости у здоровых обыкновенных усачей (*Barbus barbus*), из тканей печени, почек и селезенки цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum*), органов желудочно-кишечного тракта кефали (*Mugil curema*) (Zanoni et al., 2008)

M. triplex может являться причиной заболевания у мурен (*Gymnothorax funebris* и *Gymnothorax moringa*) с образованием гранулём на коже вокруг головы и туловища, в пределах дермы и подкожной клетчатки (Herbst et al., 2001).

M. peregrinum выделен из покровов здоровых рыб золотого карася (*Carassius carassius*) и жабр американского сомика (*Ictalurus nebulosus*), 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*) (Zanoni et al., 2008). Возбудитель выделен из тканей желудочно-кишечного тракта кефали (*Mugil curema*) (Perez et al., 2001).

M. haemophilum является причиной множественных гранулём в тканях данио рерио (*Danio rerio*) (Whipps et al., 2007).

M. simiae вызывает поражения печени, почек и селезенки у цихлазом (*Cichlasoma bimaculatum*) (Zanoni et al., 2008).

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

1.3.2. Условно-патогенные микобактерии, вызывающие заболевания у людей

На сегодняшний день особую озабоченность представляют профессиональные группы людей, характеризующиеся высоким риском заражения нетуберкулезными микобактериями (*M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. goodii*), вызывающими заболевания у гидробионтов. Это персонал океанариумов, предприятий аквакультуры, аквариумисты (Акбари et al., 2014). Рыболовы и спасатели в плавательных бассейнах также входят в эту группу риска, они чаще всего заболевают микобактериальными инфекциями (Falkinham, 2002).

Чаще всего инфицируются люди, занимающиеся аквариумистикой или работающие в сферах рыбного производства. Как правило, заражение происходит через ссадины и порезы на коже и при вдыхании аэрозолей (Wolinsky, 1979).

Известно, что именно *M. marinum* является причиной 81,8% случаев поражений кожи, вызванных нетуберкулезными микобактериями (Kuivilaniya et al., 1993).

Впервые эту микобактерию выделил из рыбы в 1926 году Аронсон (Aronson, 1926), но до 1951 года она не рассматривалась как этиологический агент инфекционных заболеваний человека. В это время стали происходить крупные вспышки поражения

кожных покровов у посетителей плавательных бассейнов в Швеции (Linell and Norden, 1951).

M. marinum является возбудителем гранулёматозных поражений кожи у человека, которые могут распространяться в глубоколежащие ткани, становясь причиной тендосиновитов, артритов и остеомиелитов. Инфекция часто связана с развитием лимфангитов (или споротрихоидных инфекций), затрагивающих подкожные лимфоузлы.

M. marinum является причиной генерализованных инфекций у пациентов с иммунодефицитами (Falkinham, 1996). Кожные проявления инфекции *M. marinum* представлены на рис. 3.

Представители этого вида распространены по всему миру и часто становятся причиной зооантропонозов. В исследовании, проведенном в Сингапуре, участвовало 38 пациентов, из которых 34% имели домашние аквариумы, 11% работали на рыбных производствах. В исследовании, проведенном во Франции, участвовало 63 пациента, из которых 84% имели контакт с гидробионтами. В исследовании, проведенном в Гонконге, было обследовано 24 больных, из которых 67% были рыбаками, и в 67% случаев их раны были инфицированы морской водой (Tsuyuguchi and [Matsumoto, 2013](#)).

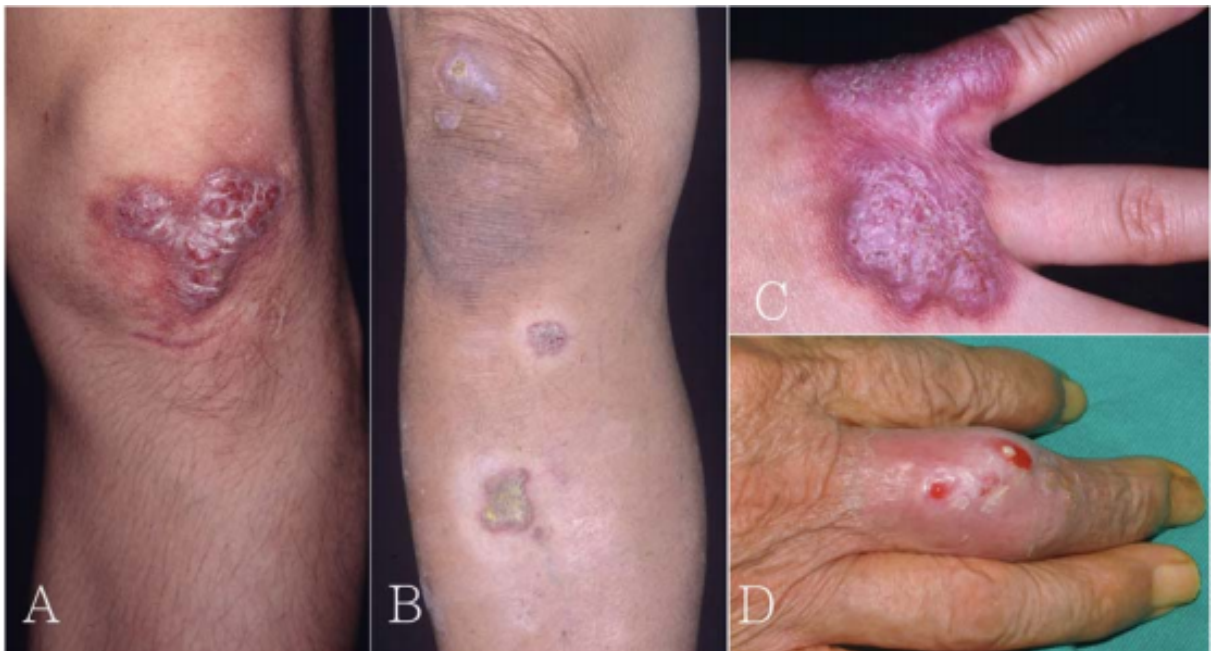


Рис. 3. Кожные проявления инфекции *M. marinum*. Поражения кожи могут быть одиночными (A) или многочисленными (B), они представляют собой эпидермальные гиперкератотические образования. Также пораженные участки кожи могут иметь вид бородавчатых образований (C) и гнойных эриматозных отёков (D) (Tsuyuguchi and Matsumoto, 2013).

Нетуберкулезные микобактерии объединены в ряд групп (комплексов) 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 микобактерий: МАС, MFG, *M.chelonae\abscessus* комплекс, МТС (Kothavade et al., 2013).

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 показал 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.

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

Возбудители группы МАС (особенно *M. avium* и *M. intracellulare*) ответственны за 72% всех инфекций, вызываемых нетуберкулезными микобактериями.

Гиперчувствительный микобактериальный пневмонит был выявлен у спасателей в плавательных бассейнах (Dailloux et al., 1980). После нескольких таких вспышек заболеваний у работников бассейнов были исследованы воздушные аэрозоли, в которых были обнаружены микобактерий, в основном *M. avium* (Parker et al., 1983).

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).

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

В *M.chelonae\abscessus* комплекс входят *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. immunogenum*, *M. massiliense*, *M. bolletii* и *M. salmoniphilum* (Simmon et al., 2011). За

исключением *M. salmoniphilum* все представители являются возбудителями заболеваний человека. *M. chelonae* и *M. abscessus* вызывают заболевания кожи (гранулемы) и мягких тканей (гиподермиты), лимфадениты, пневмонии, инфекции кровотока (бактериемии), генерализованные инфекции (Kothavade et al., 2013).

Для данных видов было показано, что они способны выживать даже в дистиллированной воде (Carson, 1978). Также было отмечено, что эти микобактерии активнее других формируют биоплёнки в системах распределения воды (Wolinsky, 1995).

В группу MFG (*Mycobacterium fortuitum group*) входят следующие виды *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. mucogenicum*, *M. senegalense*, *M. mageritense*, *M. septicum*, *M. houstonense* и *M. bonickei*. Представители группы MFG были выделены из водопроводной воды из многих городов Европы и США (Le Dantec et al., 2002; September et al., 2004; Castillo-Rodal et al., 2012; Dubrou et al., 2013). 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 лёгких (Thomson et al., 2013).

M. fortuitum является возбудителем поражений кожи (волдыри, язвы, фурункулез) и подлежащих тканей, вызывает болезни лёгких, кровеносных сосудов (полиартриты, лейкоцитокластический васкулит), костей и суставов (остеомиелит), кератит и затылочный лимфаденит (Kothavade et al., 2013).

M. septicum является причиной сепсиса у детей с метастазирующей гепатобластомой. Описаны случаи возникновения фиброзно-кавернозного туберкулеза, вызванного *M. septicum*, сопровождающегося потерей в весе и сильным кашлем (Thomson et al., 2013).

M. peregrinum вызывает гранулематозные поражения кожи. Описаны случаи поражения лёгких с образованием каверн, в которых локализовался возбудитель (Kothavade et al., 2013).

Группа MTC (*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). Представители этой группы вызывают остеоартриты, тендовагиниты

(воспаление синовиальной оболочки сухожильного влагалища), гранулемы, болезни легких, кишечника и генерализованные инфекции.

Ниже приводятся инфекционные свойства условно-патогенных микобактерий, не объединенных в группы.

M. kansasii занимает второе место по частоте встречаемости среди нетуберкулезных микобактерий - возбудителей заболеваний лёгких (De Groote, WHO, 2004). В Бразилии и Италии заболеваемость превышает 30%, а в Англии составляет 70% от всех зарегистрированных заболеваний, вызванных нетуберкулезными микобактериями (Prevots et al., 2015). *M. kansasii* вызывает заболевания легких (псевдотуберкулез и пневмония), поражения кожи, генерализованные инфекции.

M. szulgai. Основным источником заражения *M.szulgai* является вода (Maloney et al., 1987). 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 ВИЧ-инфицированных больных зафиксированы случаи генерализованных инфекций (Falkinham, 1996).

M. xenopi По эпидемиологическим данным основным источником *M. xenopi* является водопроводная вода (Collins and Yates, 1984). Эта микобактерия уникальна тем, что главным образом обитает в системах горячего водоснабжения (Falkinham, 1996), она не способна расти при температуре ниже 28 °C (Slosarek et al., 1993).

Заражение происходит при вдыхании аэрозолей, содержащих *M. xenopi* (Collins and Yates, 1984). Заболевания затрагивает легкие и проходит по типу псевдотуберкулеза у больных с иммунодефицитами и генерализованными инфекциями у иммунокомпетентных пациентов.

M. ulcerans Доказано, что вода является главным источником *M. ulcerans* (Barker, 1973). Заражение чаще всего происходит при вдыхании аэрозолей. *M. ulcerans* вызывает образование папул на коже, воспаление подкожной жировой клетчатки, мышц и костей (Nauman, 1993). Такое патологическое состояние в медицине называется язвой Бурули.

M. haemophilum Показано, что основным резервуаром *M. haemophilum* в природе являются земноводные. Вода является возможным источником инфекции у пациентов с ослабленным иммунитетом. *M. haemophilum* чаще всего вызывает абсцессы мягких тканей человека, поражение костей, суставов и кожи (Saubolle et al., 1996).

2.4. Современные представления об эффективности санации водных систем в отношении условно-патогенных микобактерий

Вода центральной системы водоснабжения – это основной источник условно-патогенных микобактерий. Именно эта вода используется в большинстве случаев в профессиональной аквариумистике.

Обычно вода в крупнотоннажной аквариумистике находится в замкнутой системе очистки воды, включающей в себя очистку от механических примесей, флотацию, очистку на биофилтре, озонирование, облучение ультрафиолетом. При заболеваниях гидробионтов в эту систему вводят различные лечебные препараты. В результате подобных обработок в воде начинаются процессы смены микробиоты, и происходит увеличение численности бактерий, устойчивых к различным методам санации и фармакологическим препаратам. Такими бактериями являются в первую очередь микобактерии, обладающие гидрофобностью, непроницаемостью клеточной стенки и медленным ростом (Connell and Nikaido, 1994). Гидрофобность клеточной стенки микобактерий позволяет им прикрепляться к поверхности механических частиц, тем самым снижая эффективность дезинфекции.

Микобактерии способны выживать в достаточно широких диапазонах температур, использовать разнообразные источники углерода и формировать биоплёнки, защищающие бактерии от агрессивного действия дезинфектантов. Весь этот спектр адаптации позволяет сохраняться этим бактериям в системах водоснабжения.

Существует множество данных, подтверждающих устойчивость микобактерий к различным saniрующим обработкам воды (Carson et al., 1978; Covert et al., 1999; Falkinham, 2002 и др.).

Остановимся подробнее на тех методах, что чаще всего используются в профессиональной аквариумистике.

В ультрафиолетовом излучении (10-400 нм) бактерицидным эффектом обладает диапазон 250-270 нм, поражающий вирусы, бактерии и грибы; причём максимум этого действия достигается при длине волны 254 нм. УФ-излучение повреждает нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), образуя пиримидиновые димеры и разрывы в цепи, что губительно действует на развитие и дальнейшее развитие этих организмов; также нарушается структура биомембран. Доза облучения – произведение интенсивности излучения на время (мДж/

см²), является мерой бактерицидной энергии, сообщенной микроорганизмам. Для снижения численности вегетативных клеток бактерий нужна низкая доза порядка 10 мДж/см², для эндоспор - 30-150 мДж/см². Эффективность УФ-излучения сильно коррелирует с мутностью воды, так как взвешенные в воде частицы могут экранировать микроорганизмы, защищая их от излучения. Поэтому фильтрация воды является обязательным условием при использовании УФ-излучения (Falkinham, 2009).

Следствием облучения УФ является появление многочисленных устойчивых мутантных форм бактерий. Эффективность УФ-излучения снижается процессом репарации поврежденных нуклеиновых кислот. Ферменты, участвующие в процессе репарации ДНК (главным образом ДНК-фотолиаза), могут быть активными при отсутствии видимого света (темновая репарация) или же на свету (фоторепарация или фотореактивация) (Covert et al., 1999).

Устойчивость микобактерий к УФ-излучению начали активно изучать в 60-70-е гг. установлено, что микобактерии обладают повышенной устойчивостью к УФ-облучению (Falkinham, 2002). Так исследования Коллинза показали, что *M. tuberculosis*, *M. bovis* и *M. phlei* оказались на 90% более устойчивыми к УФ-излучению, чем грамположительные (*Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus epidermidis*), и на 95%, чем грамотрицательные (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) бактерии (Collins, 1971).

Дальнейшие исследования выявили, что чувствительность к УФ-излучению снижается у микобактерий в следующем порядке: *M. tuberculosis*>*M. fortuitum*>*M. avium*>*M. phlei*>*M. marinum*>*M. kansasii*>*M. smegmatis*>*M. flavescens* (David, 1973).

Среди микобактерий, обнаруженных в водопроводной воде, наибольшую устойчивость проявляет *M. fortuitum*: для полной инактивации требовалось 50 мДж/см². *M. avium* и *M. intracellulare* были инактивированы при 20 мДж/см² (Lee et al., 2010).

Имеются данные, доказывающие, что УФ-облучение может быть достаточно эффективным в снижении количества микобактерий в крупнотоннажных аквариумах (Agbalika et al., 1984).

Озонирование также является эффективным методом санации водных систем в крупнотоннажной аквариумистике. Дезинфицирующее действие озона основано на его сильной окислительной способности с формированием во многих реакциях свободных радикалов. Озон разрушает мембраны и клеточные стенки бактерий, инактивирует многие ферменты и дестабилизирует нуклеиновые кислоты. Органические молекулы после

озонирования могут переходить из биологически устойчивых форм в биоразлагаемые, которые затем легко усваиваются микобактериями (Le Dantec et al., 2002).

Наблюдения показали, что клетки микобактерий, развивающиеся в воде без фильтрации, то есть с повышенной мутностью, были в 10 раз устойчивее к озонированию по сравнению с клетками с водой, прошедшей через фильтр (Falkinham, 2009).

Тэйлером с коллегами было выяснено, что *M. avium* и *M. intracellulare* в 100 раз устойчивее по отношению к дезинфекции озоном, чем *E. coli* (Taylor et al., 2000).

Ле Дантек, проведя исследования воды, взятой до и после озонирования, показал возможность снижения численности микобактерий (*M. peregrinum*, *M. fortuitum* и *M. chelonae*) уменьшилось с 50 КОЕ/л до 10 КОЕ/л (Le Dantec et al., 2002).

Работа Ле Шевалье по освобождению озонированной воды от микобактерий с помощью фильтра с активированным углём показала, что количество бактерий не уменьшалось, поскольку фильтр быстро заселялся микобактериями (Taylor et al., 2000).

При фильтрации также может использоваться кварцевый песок, керамзит или биофильтр. Фильтр, без регулярной замены фильтрующих материалов, может стать источником распространения микобактерий в системе распределения воды. Фильтры обеспечивают идеальную среду обитания для микобактерий, они могут расти на фильтрующих материалах, на которых скапливаются различные органические соединения. Этот факт иллюстрирует исследование Роджерса, в котором он проводил количественный учёт роста *M. avium* на фильтрующих субстратах: на первую и вторую недели количество не менялось и составляло 145 КОЕ/мл, на третьей неделе опыта количество составляло 22000 КОЕ/мл, на пятую – 47000 КОЕ/мл (Rodgers et al., 1999).

Фалкинхамом показано, что численность *M. avium* и *M. fortuitum* коррелирует с мутностью в образцах неочищенной воды, поэтому фильтрация является эффективным способом уменьшения числа быстрорастущих микобактерий в воде при правильной эксплуатации фильтра (Falkinham et al., 2009).

Микобактерии, находясь в фильтре, чаще всего образуют биоплёнки, даже если фильтрующие материалы пропитаны противомикробными агентами. Показано, что *M. avium* в составе биоплёнок сохраняли жизнеспособность в фильтре с угольным наполнителем в присутствии 1000 мкг/мл серебра (Rodgers et al., 1999).

Становится очевидно, что ни один из рассматриваемых способов санации не может полностью устранить микобактерий в аквариумах, но их численность, по-видимому,

может быть значительно снижена за счет эффективной фильтрации и процедур механической очистки. Высокая гидрофобность микобактерий может быть использована для их селективного удаления из воды, пыли и аэрозолей. Так, например, было показано, что клетки нетуберкулёзных микобактерий были почти полностью удалены (>99,9%) из воды при использовании фильтров, покрытых гидрофобными материалами (например, парафином) (Falkinham et al., 2002).

2. Материалы и методы

2.1. Объект исследования

Выделение бактерий рода *Mycobacterium* проводили из воды и обрастаний пресноводного аквариума № 4 Санкт-Петербургского Океанариума (ТРК «Планета Нептун»).

Вместимость аквариума № 4 - 3,3 тонны. Температура воды – 17-18 °С. В аквариуме содержится рыба среднего размера: сом европейский 30-40 см – 3 шт., форель радужная 40-60 см – 2 шт., форель золотая 40-50 см – 5 шт., карп кои 30 -40 см – 6 шт. Режим кормления - 5 раз в неделю (желированный корм - 750 г, рыба - 150 г в неделю). Чистка

аквариума и грунта проводится без участия водолазной службы - 2 раза в месяц с подменной воды в объеме 30 %.

Аквариум № 4 (рис. 4) - открытого типа (водная поверхность не изолирована от экспозиционного помещения), представляет собой имитацию реки с перекатом в центре, разделяющим аквариум на 2 части. Левую часть населяют радужная, золотая форель, карпы кои, правую – сомы. Левая часть аквариума декорирована небольшим водопадом, вода которого с высоты примерно 2,5 м по стене поступает в аквариум.

Наличие водопада является дополнительным источником аэриотической опасности не только для сотрудников, но и посетителей океанариума за счет разбрызгивания воды и образования водного аэрозоля.



Рис. 4. Внешний вид аквариума № 4.

Системы жизнеобеспечения аквариума - замкнутая. Вода из аквариума по трубопроводу поступает в мешочный фильтр для механической очистки и далее в буферную емкость. Из буферной ёмкости с помощью насоса по системе трубопровода вода подается на 2 биофильтра, заполненных пластиковыми «спиралями», покрытыми активным илом. Очищенная вода saniруется путем постоянного облучения ультрафиолетом. Мощность УФ-стерилизатора 225 Вт, интенсивность излучения 65мДж/см².

Пробы воды (около 0,5 л) отбирали в стерильную ёмкость непосредственно из аквариума, под водопадом (рис. 4). Обрастания, сформировавшиеся на синтепоне,

отбирали из левого биофильтра, с глубины 30 см. Внешний вид образца обрастаний представлен на рис. 5.



Рис. 5. Внешний вид образца обрастаний.

Определение численности и выделение микобактерий проводили в течение первых нескольких часов после отбора проб. Из исследуемой воды после тщательного перемешивания делали десятикратные разведения для высева модифицированную среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией (Шакирова, 2016) и РПА для определения ОМЧ.

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).

Образец обрастаний помещали в стерильное металлическое ситечко, осторожно промывали несколько раз стерильным физиологическим раствором. Промытый образец подсушивали стерильной фильтровальной бумагой, отвешивали навеску 500 мг и суспензировали в стеклянном гомогенизаторе двумя порциями физиологического раствора

по 5 мл. Осадок (синтепон) высушивали и взвешивали, его вес составил 170 мг. Таким образом, была получена суспензия обрастаний – 330 мг/10мл, из которой готовили десятикратные разведения.

2.2. Окраска бактериальных мазков на кислото-спиртоустойчивость

Мазки готовили из колоний на 3-ей неделе культивирования исходных посевов и на на 7-8 сутки – для очищенных изолятов. 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 °С.

Окраску мазков проводили при 75 °С 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.

Кислото-спиртоустойчивые бактерии оставались красными, чувствительные к обесцвечиванию бактерии имели синюю окраску.

2.3. 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 60 Вт 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 быстрорастущим, 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 28⁰ и 42⁰С. 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 5 и 16 сутки культивирования при 28 °С. 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 (рис.6).



Рис. 6. Результаты теста на арилсульфатазу.

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

Способность использовать различные источники углерода (инозитол, маннит и цитрат) в присутствии аммонийного азота. Для данного теста готовили минеральную среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,4 г, KH_2PO_4 – 0,5 г, MgSO_4 – 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 °С, оценку посевов проводили в течение 5 - 14 дней.

Нитратредуктазный тест. Тест на нитратредуктазу основан на способности этого фермента восстанавливать нитрат-анионы, находящиеся в питательной среде, до нитрит-анионов. Это проявляется по изменению окраске среды от исходно жёлтого цвета до ярко-красного (вишнёвого) цвета. Проверку проводили с помощью Набора для ускоренного микрообъёмного определения нитратредуктазы бактерий (ФБУН НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера).

Тест ставили с суспензией исследуемых микобактерий в пробирках в объеме 2 мл реакционной смеси. Положительным результатом считали появление на 1-3 минуте ярко-красного (вишнёвого) окрашивания среды при сохранении жёлтой окраски в контрольной пробирке (рис. 7).

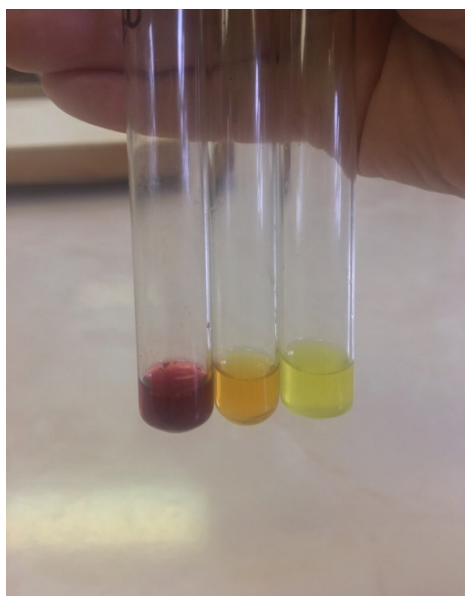


Рис. 7. Результаты теста на нитратредуктазу.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Оценка численности микобактерий в исследованных образцах

К роду *Mycobacterium* в соответствии с Руководством по систематике бактерий Берги (Magee and Ward, 2012) относятся кислото-спиртоустойчивые неправильные палочки, проявляющие арилсульфатазную активность. В соответствии с этим определением в нашей группе на предыдущем этапе работы был предложен алгоритм оценки численности микобактерий (Шакирова, 2016) со следующими этапами выполнения:

(1) высеив воды и суспензии, приготовленной из обрастаний, на неселективную среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией в большом количестве повторностей для получения в итоге не менее сотни отдельных далеко отстоящих друг от друга колоний;

(2) отсев всех колоний на среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией с параллельной проверкой всех клонов на кислото-спиртоустойчивость;

(3) очистка кислото-спиртоустойчивых изолятов, подозрительных на принадлежность к роду *Mycobacterium* клонированием (2-3 пассажа);

(4) подтверждение принадлежности кислото-спиртоустойчивых изолятов к роду *Mycobacterium* по наличию у них арилсульфатазы на 7 и 14 сутки;

(5) подсчет численности в образце по числу подтвержденных кислото-спиртоустойчивых изолятов.

В соответствии с данным алгоритмом образцы воды и обрастаний были высеяны на среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией, всего 106 колоний (75 колонии из воды и 31 колонии из обрастаний). Внешний вид колоний приведен на рис. 8, 9. Важно отметить, что подавляющее количество колоний, как из воды, так и из обрастаний были слизистые, текущие, что сильно затрудняло их очистку на следующем этапе работы.

Кислото-спиртоустойчивость на 3 неделе культивирования была подтверждена у 8 колоний из воды (10% от проверенного числа колоний) и у 30 колоний из обрастаний (97% проверенных колоний).

Все кислото-спиртоустойчивые изоляты после очистки проявляли арилсульфатазную активность. Так они были отнесены к роду *Mycobacterium*.

На основании числа подтвержденных колоний микобактерий мы рассчитали численность микобактерий в воде и обрастаниях. Данные для воды и обрастаний представлены в табл. 1 в сравнении с общим микробным числом.

Таблица 1

Общее микробное число и содержание микобактерий в воде и обрастаниях пресноводного аквариума № 4

Вода		Обрастания	
ОМЧ, КОЕ/мл	Микобактерии, КОЕ/мл	ОМЧ, КОЕ/г сырого веса	Микобактерии, КОЕ/г сырого веса
7,4 x 10²	1,1 x 10³	4,9 x 10⁶	2,3 x 10⁷

На основании полученных данных можно сделать вывод, что содержание микобактерий в исследованной воде высокое, оно превышает на два порядка ранее установленную нашей группой численность для микобактерий в пресной воде Океанариума (не менее 10 КОЕ/мл - Шакирова, 2016) .

Численность микобактерий в обрастаниях также высока. Важно отметить, что содержание микобактерий в обрастаниях совпадает и даже несколько превышает общее микробное число. Можно говорить о преобладании микобактерий в микробиоте обрастаний исследованного пресноводного аквариума.

На этом этапе работы была сформирована коллекция из 26 очищенных штаммов микобактерий – 2 штамма из воды и 24 штамма из обрастаний.



Рис. 8 . Внешний вид колоний из воды на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией на 3-ей неделе культивирования.



Рис. 9. Внешний вид колоний из обрастаний на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией на 3-ей неделе культивирования.

3.2. Определение оптимального времени оценки кислото-спиртоустойчивости для бактериальных штаммов

Для предлагаемого нами алгоритма выявления микобактерий необходимо было установить оптимальный срок выявления кислото-спиртоустойчивости у клонов, проверяемых на принадлежность к роду *Mycobacterium*. Действительно, в Руководстве по систематике бактерий Берги в описании рода *Micobacterium* указано, что для бактерий этого рода характерна кислото-спиртоустойчивость хотя бы на одной из стадии роста («acid–alcohol-fast at some stage of growth») (Magee and Ward, 2012).

Динамика приобретения свойства кислото-спиртоустойчивости не описана в литературе и до сих пор остается не понятным, на каких сроках следует устанавливать этот признак при идентификации, особенно если выделяются микобактерии, как целая группа, то есть с разными скоростями роста.

Для штаммов коллекции была проверена и подтверждена кислото-спиртоустойчивость на 3-ей неделе роста на стадии выделения. Для определения оптимального временного параметра мы дополнительно проверили кислото-спиртоустойчивость 26 штаммов коллекции на 7 – 8 сутки культивирования, когда колонии микобактерий имеют размер всего 2-4 мм диаметром.

Оказалось, что на 7-8 сутки все 26 штаммов микобактерий в коллекции демонстрируют кислото-спиртоустойчивость также, как и на 3-ей неделе культивирования (рис. 10).

При оценке кислото-спиртоустойчивости мы отмечали у 8 изолятов из 26 (35%) на всех сроках культивирования присутствие в мазках не только красных, но и синих клеток, имеющих иную морфологию, чем красные клетки (рис. 10). Это может быть объяснено как незавершенной очисткой изолятов, так и возможностью определенной временной динамики нарастания кислото-спиртоустойчивости у изучаемых изолятов. Иная морфология синих клеток может быть связана с их разрушением в жёстких условиях проведения теста. Однозначно объяснить установленную картину в тесте мы не могли, поэтому на следующем этапе работы идентификацию проводили только для штаммов с однородной красной окраской клеток в мазках.

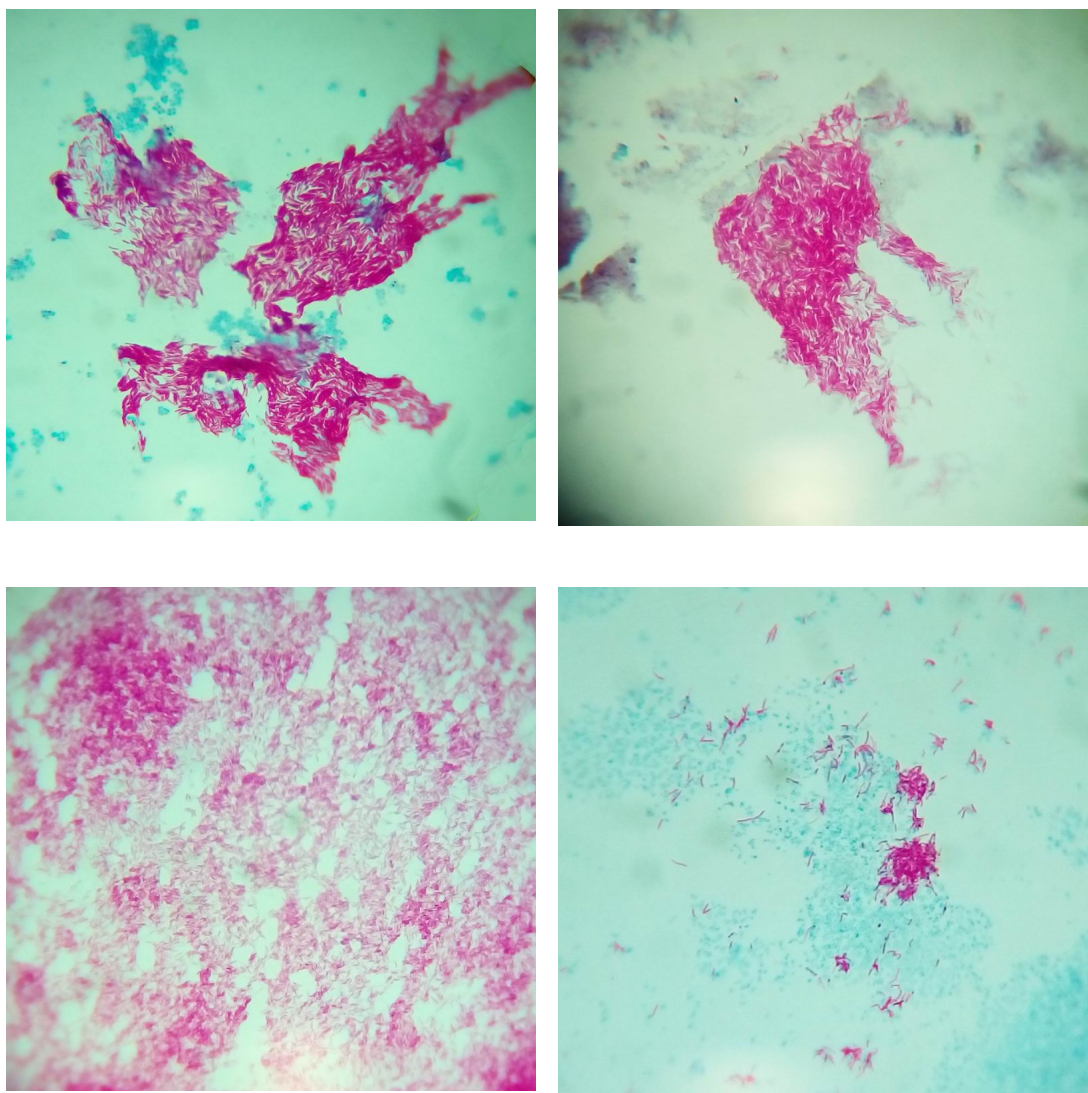


Рис. 10. Внешний вид штаммов микобактерий в тесте на кислото-спиртоустойчивость на 7-8 сутки культивирования на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией.

3.3. Идентификация штаммов микобактерий

Идентификацию проводили для 18 штаммов микобактерий с однородной красной окраской клеток в мазках в тесте на кислото-спиртоустойчивость. 2 штамма из воды этому условию не соответствовали. Таким образом, идентификационные диагнозы были получены только для штаммов микобактерий из обрастаний.

Для идентификации использовали фенотипические признаки в соответствии с современной классификацией. В Руководстве по систематике бактерий Берги (Magee and Ward, 2012) описано 126 видов из них 69 быстрорастущих. На сегодняшний день число видов микобактерий достигло 185 (Euzebu, 2017), то есть ряд видов микобактерий не имеют фенотипического описания для их эффективной идентификации (Magee and Ward, 2012). Таким образом, следует констатировать явную незавершенность идентификационной схемы для микобактерий по фенотипическим признакам.

Ключевыми признаками для видовой идентификации быстрорастущих микобактерий на сегодняшний день являются: хромогенность колоний, способность синтезировать арилсульфатазу, восстанавливать нитрат, способность расти в присутствии 5% NaCl, способность к росту при 42 °C, способность использовать в качестве источника углерода цитрат, манит, инозитол.

Результаты тестов для штаммов нашей коллекции представлены в табл. 2. С целью идентификации провели разделение 18 исследованных штаммов на группы с полным совпадением фенотипических признаков внутри группы. Всего было выделено 5 групп (табл. 2):

Группа 1 – 11 штаммов;

Группа 2 – 3 штамма;

Группа 3 – 2 штамма;

Группы 4 и 5 – по 1 штамму.

В соответствии с признаками, представленными в Руководстве по систематике бактерий Берги выделенным группам бактерий были присвоены следующие идентификационные диагнозы (табл. 3):

Группа 1 – *M.abscessus/M.salmonifilum*;

Группа 2 – *M. senegalense*;

Группа 3 – *M. porcinum*;

Группы 4 - *M. abscessus*;

Группа 5 - *M. smegmatis*.

Следует отметить, что идентифицированные штаммы микобактерий, за исключением одного вида (*M. smegmatis*) по литературным данным являются условно-патогенными видами. Так, *M. abscessus*, может вызывать хронические заболевания лёгких, посттравматические раневые инфекции и различные кожные инфекции у иммунодефицитных людей (Song et al., 2006).

M. abscessus описана как возбудитель болезней пресноводных и морских декоративных рыб (гранулёматозные поражения покровов и внутренних органов) (Zanoni et al., 2008).

Вид *M. salmoniphilum*, пока еще недостаточно хорошо описан фенотипически. Он близко подходит виду *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). Описано, что *M. salmoniphilum* вызывает образование множественных серовато-белых гранулём во внутренних органах различных рыб (Aro et al., 2014).

M. senegalense является возбудителем хронических гранулёматозных поражений кожных покров и лимфатических сосудов различных животных и человека. Описаны случаи инфицирования данной микобактерией персонала, обслуживающего крупнотоннажные аквариумы, при повреждениях кожи при последующем контакте с аквариумной водой (Talavlikar et al., 2011).

M. porcinum является этиологическим агентом туберкулёза лимфатических узлов (туберкулёзный лимфаденит), поражений кожи и остеомиелита у животных и человека (Jacobs et al., 2009).

M. smegmatis считается непатогенным сапрофитным видом (Reyrat and Kahn, 2001) и не представляет по современным представлениям серьезной опасности для людей и гидробионтов.

Следует отметить, что *M. porcinum* и *M. abscessus* были ранее выделены нами из пресноводного аквариума № 19 (Шакирова, 2016).

Таблица 2

Результаты идентификационных тестов для штаммов микобактерий, выделенных из образцов

№ штамма	Хромогенность	42 °С	5% NaCl	Цитрат (на 5 сутки)	Маннит (на 5 сутки)	Инозитол (на 5 сутки)	Арилсульфатаза (на 5 сутки)	Нитратредуктаза (на 5 сутки в пробирке)
76	N	+	+	+	+	+	+	-
82	N	+	+	+	+	+	+	-
84-1	N	+	+	+	-	+	+	-
84-2	N	+	+	+	-	+	+	-
85	N	+	+	+	-	+	+	-
86	N	+	+	+	-	+	+	-
87	N	+	+	+	-	+	+	-
88	N	+	+	+	-	+	+	-
92	N	+	+	+	-	+	+	-
93	N	+	+	+	-	+	+	+
94	N	+	+	+	-	+	+	-
97	N	+	+	+	-	+	+	+
99	N	+	+	+	-	+	+	-
100	N	-	+	+	-	+	+	-
101	N	+	+	+	-	+	+	-
102	N	+	+	+	-	+	+	-
103	N	+	+	+	+	+	+	+
106	N	+	+	+	-	+	+	+

«N» - нехромогенные

Таблица 3

**Фенотипические признаки исследованных штаммов микобактерий и
видов микобактерий по данным Руководства по систематике бактерий Берги
(Magee and Ward, 2012)**

Признаки	Микобактерии									
	<i>M. porcinum</i>	<i>M. senega</i>	<i>M. abc</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. salmophilum</i>	Гр 1	Гр 2	Гр 3	Гр 4	Гр 5
Рост при 42 °С	+	nd	-	+	-	+	+	+	-	+
Хромогенность	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Рост на 5% NaCl	+	+	+	+	?	+	+	+	+	+
Нитратредукция	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Арилсульфатаза на 5 сутки	+	+	+	nd	+	+	+	+	+	+
Рост на единственном источнике углерода:										
- цитрат	+	+	-	+	nd	+	+	+	-	+
- маннит	+	nd	-	+	nd	-	-	+	-	+
- инозитолол	+	nd	-	nd	nd	+	+	+	-	+

«N» - нехромогенные

«nd» - данные отсутствуют

«?» - информация в литературном источнике отсутствует.

3.4. Заключение

Таким образом, предлагаемый нами алгоритм оценки численности микобактерий из воды и обрастаний с помощью прямого высева на неселективную среду Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией и скрининг клонов на кислото-спиртоустойчивость в сочетании с тестом на арилсульфатазу оказался успешным.

Установленное нами содержание микобактерий в воде и обрастаниях – $1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл воды и $2,3 \times 10^7$ КОЕ/г сырого веса обрастаний выше имеющихся на сегодняшний день данных о количественном содержании микобактерий в пресной воде из разных типов водных объектов (Fischer et al., 1991; Le Dantec et al., 2002; Шакирова, 2016).

Все очищенные и идентифицированные штаммы микобактерий представлены следующими видами: *M. porcinum*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. senegalense*, *M. salmonifilum*.

Все выделенные штаммы микобактерий относятся к условно-патогенным видам, опасным для персонала и гидробионтов. Основным источником этих микобактерий являются обрастания, в которых микобактерии находятся в прикрепленном состоянии в составе биоплёнок, что делает их устойчивыми в отношении дезинфицирующих воздействий.

Важно отметить, что виды *M. porcinum*, *M. abscessus* и *M. salmonifilum* ранее нами были выделены из воды другого аквариума (№ 19). Это может указывать на значительное распространение данных видов микобактерий в пресноводных аквариумах Океанариума.

4. Выводы

1. Установлена численность микобактерий в пресноводной воде и обрастаниях Санкт-Петербургского Океанариума; она составила $1,1 \times 10^3$ КОЕ/мл воды и $2,3 \times 10^7$ КОЕ/г сырого веса обрастаний. Полученные значения превышают данные литературы на 2-3 порядка. Численность микобактерий для обрастаний установлена впервые.
2. Окончательно отработан алгоритм определения численности микобактерий в образцах. Рекомендуется оценивать кислото-спиртоустойчивость колоний уже на 7-8 сутки культивирования посевов на среде Löwenstein-Jensen с желточной эмульсией.
3. В работе очищено и идентифицировано 18 штаммов микобактерий, подавляющее большинство (17 из 18 штаммов) были отнесены к условно-патогенным видам: *M. porcinum*, *M. abscessus*, *M. smegmatis*, *M. senegalense*, *M. salmonifilum*.
4. Основным местом сосредоточения условно-патогенных микобактерий в изученном аквариуме являются не только вода, но, в первую очередь, обрастания.
5. Полученная в работе обширная коллекция штаммов микобактерий была идентифицирована.

5. Список литературы

1. Шакирова А.С. 2016. Выявление представителей рода *Mycobacterium* в аквариумной воде, находящейся в замкнутой системе очистки. СПбГУ. Выпускная квалификационная работа, СПбГУ.
2. Agbalika F, Dailloux M, Escallier, Joret, JC. 1984. Analyses bacteriologiques et recherche de mycobacteries al'aquarium tropical de Nancy. Revue fr. Aquariol. 10:113–124.
3. Akbari S, Mosavari N, Tadayon K, Rahmati-Holasoo H. Isolation of *Mycobacterium fortuitum* from fish tanks in Alborz, Iran. Iran J. Microbiol. 6(4):234-9.
4. Aro L, Correa, Martínez K, Ildefonso A. 2014. Characterization of *Mycobacterium salmoniphilum* as causal agent of mycobacteriosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., from a freshwater recirculation system. J. Fish. Dis, 37: 341–348.
5. Aronson JD. 1926. Spontaneous Tuberculosis in Salt Water Fish. J. Infect. Dis. 39(4): 315-320.
6. Ashburner, LD. 1977. Mycobacteriosis in hatchery-confined chinooksalmon (*Oncorhynchus tshawytsca*) in Australia. J. Fish. Biol. 10:523–528.

7. Astrofsky KM, Schrenzel MD, Bullis RA, Smolowitz RM, Fox JG. 2000. Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium spp.* infections in established laboratory zebrafish (*Brachydanio rario*) facilities. *Comp. Med.* 50: 666-672.
8. Bataillon E, Terre L. 1897. La form saprophytique de la tuberculose humaine et de la tuberculose aviare. *Comp. Rend.* 124:1399-1400.
9. Barksdale L, Kim KS. 1977. *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.* 41(1):217-372.
10. Barker DJ. 1973. Epidemiology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 67:43-47.
11. Bennett SN, Peterson DE, Johnson DR, Hall WN, Robinson-Dunn B, Dietrich S. 1994. Bronchoscopy-associated *Mycobacterium xenopi* pseudo-infections. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 150(1):245-50.
12. Beran V, Matlova L, Dvorska L, Svastova P, Pavlik I. 2006. Distribution of mycobacteria in clinically healthy ornamental fish and their aquarium environment. *J. Fish Dis.* 29(7): 383-93.
13. Bland CS, Ireland JM, Lozano E. 2005. Mycobacterial ecology of the Rio Grande. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005. 71(10):5719-5727.
14. Brennan PJ, Nikaido H. 1995. The envelope of Mycobacteria. *Ann. Rev. Biochem.* 64:29-6.
15. Brennan PJ. 2003. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb).* 83(1-3):91-7.
16. Brooks RW, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO III. 1984. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. V. Numbers in eastern United States soils and correlation with soil characteristics. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130(4):630-3.
17. Burback BL, Perry JJ. 1993. Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by *Mycobacterium vaccae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(4):1025-9.
18. Carson LA, Petersen NJ, Favero MS, Agüero SM. 1978. Growth characteristics of atypical mycobacteria in water and their comparative resistance to disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.* 36(6):839-46.

19. Castillo-Rodal AI, Mazari-Hiriart M, Lloret-Sánchez LT. 2012. 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.* 31(5): 683-94.
20. Chapman JS, Bernard JS, Speight M. 1965. Isolation of mycobacteria from raw milk. *Am. Rev. Respir. Dis.* 91:351-5.
21. Chang TC, Hsieh CY, Chang CD, Shen YL, Huang KC, Tu C, Chen LC, Wu ZB, Tsai SS. 2006. Pathological and molecular studies on mycobacteriosis of milkfish *Chanos chanos* in Taiwan. *Dis. Aquat. Organ.* 72(2):147-51.
22. Cheung PY, Kinkle BK. 2001. Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Soil Sci.* 67(5): 2222–2229.
23. Collins FM. 1971. Relative susceptibility of acid-fast and non-acid-fast bacteria to ultraviolet light. *Appl. Microbiol.* 21(3):411-3.
24. Collins CH, Yates MD. 1984. Infection and colonisation by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi*: aerosols as a possible source? *J. Infect.* 8(2):178-9.
25. Connell N, Nikaido H. 1994. Membrane Permeability and Transport in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis.* 18:333-352.
26. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:711-745.
27. Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65(6):2492-6.
28. Dailloux M, Hartemann P, Beurey J. 1980. Study on the relationship between isolation of mycobacteria and classical microbiological and chemical indicators of water quality in swimming pools. *Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiologie Hyg. B.* 171(6):473-86.
29. David HL. 1973. Response of Mycobacteria to ultraviolet light radiation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108(5):1175-85.

30. De Groote MA. 2004. Pulmonary infection in non-HIV infected individuals. World Health Organization. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. Published by IWA Publishing, London, UK.
31. Donlan RM. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg. Infect. Dis.* 8:881–890.
32. Du Moulin GC, Stottmeier KD, Pelletier PA, Tsang AY, Hedley-Whyte J. 1988. Concentration of *Mycobacterium avium* by hospital hot water systems. *JAMA.* 260(11): 1599-601.
33. Dubrou S, Konjek J, Macheras E. 2013. Diversity, community composition, and dynamics of nonpigmented and late-pigment. *Appl. Environ. Microbiol.* 79(18):5498-508.
34. Eaton T, Falkinham III JO, von Reyn CF. 1995. Recovery of *Mycobacterium avium* from cigarettes. *J. Clin. Microbiol.* 33:2757–8.
35. Engelhardt H, Heinz C, Niederweis M. 2002. A tetrameric porin limits the cell wall permeability of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Biol. Chem.* 277(40):37567-72.
36. Euzebu, 2017 <http://www.bacterio.net>
37. Falkinham JO III, George KL, Parker BC, Gruft H. 1984. 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.* 25(1): 137-9.
38. Falkinham JO III. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9(2):177-215.
39. Falkinham JO III, Norton CD, LeChevallier MW. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other *Mycobacteria* in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(3):1225-31.
40. Falkinham JO III. 2002. Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin. Chest. Med.* 23(3):529-51.
41. Falkinham JO III. 2003. Factors influencing the chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9):5685-5689.

42. Falkinham JO III, Iseman MD, de Haas P, van Soolingen D. 2008. *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease. *J. Water Health.* 6(2):209-13.
43. Falkinham JO III. 2009. Surrounded by mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* (2):356-67.
44. Falkinham JO III. 2015. Common features of opportunistic premise plumbing pathogens. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 12(5):4533-45.
45. Fischeder R, Schulze-Röbbecke R, Weber A. 1991. Occurrence of mycobacteria in drinking water samples. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.* 192:154-8.
46. Geesey GG, Mutch R, Costerton JW, Green RB. 1978. Sessile bacteria: an important component of the microbial population in small mountain streams. *Limnol. Oceanogr.* 23(6):1214-1223.
47. George KL, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO III. 1980. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J. Hosp. Infect.* 6(2):175-8.
48. George KL, Parker BC, Gruft H, Falkinham JO III. 1980. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. II. Growth and survival in natural waters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 122(1):89-94.
49. George KL, Falkinham JO III. 1986. Selective medium for the isolation and enumeration of *Mycobacterium avium-intracellulare* and *M. scrofulaceum*. *Can. J. Microbiol.* 32(1): 10-4
50. Gillespie J, Barton LL, Rypka EW. 1986. Phenotypic changes in mycobacteria grown in oxygen-limited conditions. *J. Med. Microbiol.* 21(3):251-5.
51. Glover N, Holtzman A, Aronson T, Froman S. 1994. The isolation and identification of *Mycobacterium avium complex* (MAC) recovered from Los Angeles potable water, a possible source of infection in AIDS patients. *Intl. J. Environ. Hlth. Res.* 4:63-72.
52. Graham L, Warren NG, Tsang AY, Dalton HP. 1988. *Mycobacterium avium complex* pseudobacteriuria from a hospital water supply. *J. Clin. Microbiol.* 25(5):1034-6.
53. Hayman J. 1993. Out of Africa: observations on the histopathology of *Mycobacterium ulcerans* infection. *J. Clin. Pathol.* 46:5-9.

54. Hedrick RP, McDowell T, Groff J. 1987. Mycobacteriosis in cultured striped bass from California. *J. Wildl. Dis.* 23:391–395.
55. Herbst LH, Costa SF, Weiss LM, Johnson LK, Bartell J, Davis R, Walsh M, Levi M. 2001. Granulomatous skin lesions in moray eels caused by a novel *Mycobacterium* species related to *Mycobacterium triplex*. *Infect. Immun.* (7):4639-46.
56. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th edition. vol. 2. 1997. Baltimore. 606-612.
57. Hoffmann R, Michel R. 2001. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int. J. Hyg. Environ Health.* 203(3):215-9.
58. Horsburgh CR, Metchock BG, McGowan JE, Thompson SE. 1992. *AIDS.* 6(5):512-4.
59. Iivanainen EL, Martikainen PJ, Katila ML. 1995. Effect of freezing of water samples on viable counts of environmental mycobacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 21(4):257-60.
60. Iivanainen EL, Martikainen PJ, Väänänen P, Katila ML. 1999. Environmental factors affecting the occurrence of mycobacteria in brook sediments. *J. Appl. Microbiol.* 86(4): 673-81.
61. Jacobs JM, Stine CB, Baya AM, Kent ML. 2009. A review of mycobacteriosis in marine fish. *Fish Dis.* 32(2):119-30.
62. Jadin JB. 1975. Free-living pathogenic amoebae. *Wiad. Parazytol.* 21(3):493-8.
63. Jarlier V, Nikaido H. 1994. Mycobacterial cell wall: Structure and role in natural resistance to antibiotics. *FEMS microbiol. Lett.* 123:11-18.
64. Johnson LR. 2008. Microcolony and biofilm formation as a survival strategy for bacteria. *J. Theor. Biol.* 251(1):24-34.
65. Kothavade RJ, Dhurat RS, Mishra SN, Kothavade UR. 2013. 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.* 32(2):161-88.
66. Kreth J, Zhu L, Merritt J, Shi W, Qi F. 2008. Role of sucrose in the fitness of *Streptococcus mutans*. *Oral. Microbiol. Immunol.* 23(3):213-9.

67. Kullavanijaya P, Sirimachan S, Bhuddhavudhikrai P. 1993. *Mycobacterium marinum* cutaneous infections acquired from occupations and hobbies. *Int. J. Dermatol.* 32(7):504-7.
68. Linell F, Norden, A. 1951. Epidemic of Skin Lesions Produced by a Special Type of Acid-Fast Bacilli. *Int. J. Dermatol.* 8(7):312-9.
69. Le Dantec C, Duguet JP, Montiel A, Dumoutier N, Dubrou S, Vincent V. 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(11):5318-25.
70. Lee ES, Yoon TH, Lee MY, Han SH, Ka JO. 2010. Inactivation of environmental mycobacteria by free chlorine and UV. *Water Res.* 44(5):1329-34.
71. Lewis K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(4):999-1007.
72. Lewis FMT, Marsh BJ, Von Reyn C.F. 2003. Fish tank exposure and cutaneous infection due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention. *Clin.Infect. Dis.* 25(8):56-65.
73. Magee JG, Ward AC. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd edition. vol. 5. The Actinobacteria. Part A. Family III. Mycobacteriaceae. 2012. Springer: 312-375.
74. Maloney JM, Gregg CR, Stephens DS, Manian FA, Rimland D. 1987. Infections caused by *Mycobacterium szulgai* in humans. *Rev. Infect. Dis.* 9(6):1120-6.
75. Millar D, Ford J, Sanderson J, Withey S, Tizard M, Doran T. 1996. PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cows. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(9):3446-52.
76. McCarthy CM. 1987. Utilization of nitrate or nitrite as single nitrogen source by *Mycobacterium avium*. *J. Clin. Microbiol.* 25(2):263-7.
77. Mirsaeidi M, Machado RF, Garcia JG, Schraufnagel DE. 2014. Nontuberculous mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: a population-based comparative study. *PLoS One.* 9(3).

78. Naser SA, Schwartz D, Shafran I. 2000. Isolation of *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* from breast milk of Crohn's disease patients. *Am. J. Gastroenterol.* 95(4): 1094-5.
79. Newsome AL, Scott TM, Benson RF, Fields BS. 1998. Isolation of an amoeba naturally harboring a distinctive *Legionella* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(5):1688-93.
80. Nichols G, Ford T, Bartram J, Dufour A, Portaels F. 2004. Introduction. *Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management.* World Health Organization. Published by IWA Publishing, London, UK.
81. Nightingale SD, Byrd LT, Southern PM, Jockusch JD, Cal SX, Wynne BA. 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect Dis.* 165(6):1082-5.
82. Noga EJ, Wright JF, Pasarell L. 1990. Some unusual features of mycobacteriosis in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. *J. Comp. Pat.* 25(6): 128-36.
83. Norton CD, LeChevallier MW, Falkinham JO III. 2004. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. *Water. Res.* 38(6):1457-66.
84. Novotny L, Halouzka R, Matlova L, Vavra O, Bartosova L, Slany M, Pavlik I. 2010. Morphology and distribution of granulomatous inflammation in freshwater ornamental fish infected with mycobacteria. *J. Fish Dis.* 33(12):947-55.
85. Ojha AK, Baughn AD, Sambandan D. 2008. Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Mol. Micr.* 69(1)164–174.
86. Parikka M, Hammarén MM, Harjula SK, Halfpenny NJ, Oksanen KE, Lahtinen MJ, Pajula ET, Iivanainen A, Pesu M, Rämetsä M. 2012. *Mycobacterium marinum* causes a latent infection that can be reactivated by gamma irradiation in adult zebrafish. *PLoS Pathog.* (9):e1002944.
87. Parker BC, Ford MA, Gruft H, Falkinham JO III. 1983. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. IV. Preferential aerosolization of *Mycobacterium intracellulare* from natural waters. *Am. Rev. Respir. Dis.* 128(4):652-6.

88. Pedley S, Bartram J, Rees G, Dufour A, Cotruvo J. 2004. Pathogenic Mycobacteria in Water: A Guide to Public Health Consequences, Monitoring and Management. WHO. Cornwall, UK. 1-14.
89. Pérez J, Calzada J, León-Vizcaíno L, Cubero MJ, Velarde J, Mozos E. 2001. Tuberculosis in an Iberian lynx (*Lynx pardina*). Vet. Rec. 148(13):414-5.
90. Portaels F, Pattyn SR. 1982. Growth of mycobacteria in relation to the pH of the medium. Ann. Microbiol. 133(2):213-21.
91. Prasad BN, Gupta SK. 1978. Preliminary report on the engulfment and retention of mycobacteria by trophozoites of exenically grown *Acanthamoeba castellanii*. Curr. Sci. 47:245-247.
92. Prevots DR, Marras TK. 2015. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. Clin. Chest. Med. 36(1):13-34.
93. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO III. 2004. Health impacts of environmental mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 17(1):98-106.
94. Recht J, Martínez A, Torello S, Kolter R. 2000. Genetic analysis of sliding motility in *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. 182(15):4348-51.
95. Reytrat JM, Kahn D. 2001. *Mycobacterium smegmatis*: an absurd model for tuberculosis? Trends in Microbiology. 9 (10):472-473.
96. Recht J, Martínez A, Torello S, Kolter R. 2001. Sliding motility and biofilm formation in mycobacteria. Acta. Cient. Venez. 52:45-9.
97. Rodgers MR, Blackstone BJ, Reyes AL, Covert TC. 1999. Colonisation of point of use water filters by silver resistant non-tuberculous mycobacteria. J. Clin. Pathol. 52(8):629.
98. Rose SJ, Babrak LM, Bermudez LE. 2015. *Mycobacterium avium* possesses extracellular DNA that contributes to biofilm formation, structural integrity, and tolerance to antibiotics. 10(5): 154-68.
99. Rowe HM, Withey JH, Neely MN. 2014. Zebrafish as a model for zoonotic aquatic pathogens. Dev. Comp. Immunol. 46(1):96-107.

100. Runyon EH. 1959. Source of scotochromogens. *Am. Rev. Respir. Dis.* 80:277-8.
101. Saito H, Tsukamura M. 1976. *Mycobacterium intracellulare* from public bath water. *Japan. J. Microbiol.* 20(6):561-3.
102. Saubolle MA, Kiehn TE, White MH. 1996. *Mycobacterium haemophilum*: microbiology and expanding clinical and geographic spectra of disease in humans. *Clin. Microbiol.* 9:435-447.
103. September SM, Brözel VS, Venter SN. 2004. Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7571-3.
104. Schulze-Röbbecke R, Fischeder R. 1989. Mycobacteria in biofilms. *Zbl. Hyg.* 188:385-90.
105. Schulze-Röbbecke R, Buchholtz K. 1992. Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(6):1869-73.
106. Schulze-Röbbecke R, Feldmann C, Fischeder R, Janning B, Exner M, Wahl G. 1995. Dental units: an environmental study of sources of potentially pathogenic mycobacteria. *Tuber Lung Dis.* 76(4):318-23.
107. Simmon KE, Brown-Elliott BA, Ridge PG, Durtschi JD. 2011. *Mycobacterium chelonae-abscessus* complex associated with sinopulmonary disease, Northeastern USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17(9):1692-700.
108. Slany M, Makovcova J, Jezek P, Bodnarova M, Pavlik I. 2014. Relative prevalence of *Mycobacterium marinum* in fish collected from aquaria and natural freshwaters in central Europe. *J. Fish Dis.* 37(6):527-33.
109. Slosárek M, Kubín M, Jaresová M. 1993. Water-borne household infections due to *Mycobacterium xenopi*. *Cent. Eur. J. Public. Health.* 1(2):78-80.
110. Smith DS, Lindholm-Levy P, Huitt GA, Heifets LB, Cook JL. 2000. *Mycobacterium terrae*: case reports, literature review, and in vitro antibiotic susceptibility testing. *Clin. Infect. Dis.* 30(3):444-53.

111. Song JY, Sohn JW, Jeong HW, Cheong HJ, Kim WJ, Kim MJ. 2006. An outbreak of post-acupuncture cutaneous infection due to *Mycobacterium abscessus*. BMC Inf. Dis. 6(6): 124-36.
112. Stahl DA, Urbance JW. 1990. The division between Fast- and Slow-Growing species corresponds to natural relationships among the Mycobacteria. J. Bact. 172(1):116-124.
113. Steed KA, Falkinham JO III. 2006. Effect of growth in biofilms on chlorine susceptibility of *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare*. Appl. Environ. Microbiol. 72(6):4007-11.
114. Stonebrink B. 1978. 1978. Counting colonies of microorganisms on solid media. Tijdschr. Diergeneeskd. 103(21):1166-73.
115. Smithwick RW. 1976. Laboratory Manual for Acid-fast Microscopy. 40 pp.
116. Strahl ED, Gillaspay GE, Falkinham JO III. 2001. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. Appl. Environ. Microbiol. 67(10):4432-9.
117. Suutari M, Laakso S. 1993. Effect of growth temperature on the fatty acid composition of *Mycobacterium phlei*. Arch. Microbiol. 159(2):119-23.
118. Taylor RH, Falkinham JO III, Norton C. 2000. Chlorine, chloramine, chlorine dioxide, and ozone susceptibility of *Mycobacterium avium*. Appl. Environ. Microbiol. 66:1702–1705.
119. Takigawa K, Fujita J, Negayama K, Terada S, Yamaji S, Kawanishi K, Takahara J. 1995. Eradication of contaminating *Mycobacterium chelonae* from bronchofibrescopes and an automated bronchoscope disinfection machine. Respir. Med. 89(6):423-7.
120. Talavlikar R, Carson J, Meatherill B, Desai S, Sharma M, Shandro C. 2011. *Mycobacterium senegalense* tissue infection in a child after fish tank exposure. Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. 22(3):101-3.

121. Taylor SJ, Ahonen LJ, de Leij FA, Dale JW. 2003. Infection of *Acanthamoeba castellanii* with *Mycobacterium bovis* and *M. bovis* BCG and survival of *M. bovis* within the amoebae. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(7):4316-9.
122. Thomson R, Tolson C, Carter R, Coulter C. 2013. Isolation of Nontuberculous Mycobacteria (NTM) from Household Water and Shower Aerosols in Patients with Pulmonary Disease Caused by NTM. *J. Clin. Micro.* 51(9):3006–3011.
123. Torkko P, Suomalainen S, Iivanainen E. 2000. *Mycobacterium xenopi* and related organisms isolated from stream waters in Finland and description of *M. botniense*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50:283-289.
124. Torvinen E, Suomalainen S, Lehtola MJ, Miettinen IT, Zacheus O, Paulin L, Katila ML, Martikainen PJ. 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(4):1973-81.
125. Tsuyuguchi K, Matsumoto T. 2013.
126. Tsukamura M. Bacteriostatic effects of sulfadimethoxine and kansasmycin on *Mycobacterium avium-M. intracellulare complex*. 1978. *Kekkaku.* 58(4):247-50.
127. Turenne CY, Cook VJ, Burdz TV, Pauls RJ, Thibert L, Wolfe JN, Kabani A. 2004. *Mycobacterium parascrofulaceum* sp. nov., novel slowly growing, scotochromogenic clinical isolates related to *Mycobacterium simiae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54(5): 1543-51.
128. Van Oss CJ, Gillman CF, Neumann AW. 1975. Phagocytic Engulfment and Cell Adhesiveness. Dekker, New York. 160 pp.
129. Velayati AA, Farnia P. 2016. Atlas of Mycobacterium Tuberculosis. 1st edition. 226 pp.
130. Wang Y, Ogawa M, Fukuda K, Miyamoto H, Taniuchi H. 2006. Isolation and identification of Mycobacteria from soils at an illegal dumping site and landfills in Japan. *Microbiol. Immunol.* 50(7):513-524.
131. Wayne LG, Sramek HA. 1992. Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 5(1):1-25.
132. Wei Q, Ma LZ. 2013. Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *I. J. Mol. Sci.* 14(10):20983–21005.

133. Whipps CM, Dougan ST, Kent ML. 2007. *Mycobacterium haemophilum* infections of zebrafish (*Danio rerio*) in research facilities. *FEMS Microbiol. Lett.* 270(1):21-6.
134. Whipps CM, Butler WR, Pourahmad F, Watral VG, Kent ML. 2007. Molecular systematics support the revival of *Mycobacterium salmoniphilum* (ex Ross 1960) sp. nov., nom. rev., a species closely related to *Mycobacterium chelonae*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57(11): 2525-31.
135. Williams MM, Yakus MA, Arduino MJ. 2009. Structural analysis of biofilm formation by rapidly and slowly growing nontuberculous mycobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(7):2091–2098.
136. Winiecka-Krusnell J, Linder E. 2001. Bacterial infections of free-living amoebae. *Res. Microbiol.* (7):613-9.
137. Wolinsky E. 1979. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Respir. Dis.* 119:107–159.
138. Wolinsky E. 1995. Mycobacterial lymphadenitis in children: a prospective study of 105 nontuberculous cases with long-term follow-up. *Clin. Infect. Dis.* 20:954–963.
139. Wright EP, Collins CH, Yates MD. 1985. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply. *J. Hosp. Infect.* 6(2):175-8.
140. Yamazaki Y, Danelishvili L, Wu M, MacNab M, Bermudez LE. 2006. *Mycobacterium avium* genes associated with the ability to form a biofilm. *Appl. Environ. Microbiol.* 72(1):819–825.
141. Zaroni RG, Florio D, Fioravanti ML, Rossi M, Prearo M. 2008. Occurrence of *Mycobacterium spp.* in ornamental fish in Italy. *J. Fish Dis.* 31(6):433-41.
142. Zhang Y, Rajagopalan M, Brown BA, Wallace RJ. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA PCR for comparison of *Mycobacterium abscessus* strains from nosocomial outbreaks. *J. Clin. Microbiol.* 35(12):3132-9.
143. Zobell CE, Allen EC. 1933. Attachment of marine bacteria to submerged slides. *Exp. Biol. Med.* 30(9):1409-1411.