

УДК 619:616.98:579.873.21

A.I. Zavhorodnyi^{1*}, V.V. Bilushko¹, S.A. Pozmohova¹,
A.P. Paliy¹, M.V. Kalashnyk¹, O.V. Pavlichenko¹, K.O. Sviridova¹, O.M. Tishchenko²

Оптимізація умов ліофілізації живильного середовища для культивування мікобактерій

UDC 619:616.98:579.873.21

A.I. Zavhorodnyi^{1*}, V.V. Bilushko¹, S.A. Pozmohova¹, A.P. Paliy¹, M.V. Kalashnyk¹, O.V. Pavlichenko¹, K.O. Sviridova¹, O.M. Tishchenko² Optimization of Lyophilization Modes for Culture Medium Used in Mycobacterial Cultivation

Реферат: У роботі наведено результати оптимізації умов процесу ліофілізації яєчного живильного середовища для культивування мікобактерій. Встановлено, що заморожування живильного середовища об'ємом 200 см³ за температури –30°C забезпечує більш оптимальні умови для проведення ліофілізації, ніж інші запропоновані в роботі варіанти (200 см³ за –20°C та 300 см³ за –20 і –30°C). Це дозволяє зменшити кількість вибракуваних флаконів та зберегти елективні властивості середовища. Інші умови заморожування виявились менш ефективними. Отримані результати досліджень також довели, що використання рекомендованих умов для проведення ліофілізації може пришвидшити появу перших ознак росту мікобактерій на 1–2 доби.

Ключові слова: мікобактерії, живильне середовище, температура, заморожування, ліофілізація, культивування.

Abstract: The paper presents the results of improving the lyophilization mode of egg-based culture medium for mycobacterial cultivation. The freezing of culture medium of 200 cm³ volume at –30°C was established to provide more optimal conditions for lyophilization than other options we suggested here (200 cm³ at –20°C and 300 cm³ at –20 and –30°C). This enables to reduce the number of rejected vials and preserve the elective properties of the medium. Other freezing modes occurred to be less efficient. Our findings also showed the use of recommended modes for lyophilization as capable to accelerate the appearance of first signs of mycobacterial growth by 1–2 days.

Key words: mycobacteria, culture medium, temperature, freezing, lyophilization, cultivation.

Бактеріологічний метод є основним для встановлення остаточного діагнозу на туберкульоз [4, 9]. У цьому аспекті надзвичайно важливого значення набуває якість живильних середовищ, які використовують для ізоляції культур мікобактерій із біологічного матеріалу, відібраного від хворих або підозрілих на захворювання тварин [2, 5]. Для індикацій мікобактерій найбільш часто застосовують живильні середовища з додаванням яєчного жовтка [1, 7]. Поряд з цим повідомлялося, що такі середовища є малоефективними для дослідження біологічного матеріалу з низькою кількістю мікобактерій [6]. Крім того, важливими умовами ефективного застосування є регуляція рН та визначення осмолярності живильного середовища тощо [3]. Для ліофілізації живильного середовища його спочатку заморожують, а після в умовах вакууму з нього шляхом суб-

Bacteriological testing is the main method to make a final diagnosis of tuberculosis [3, 9]. In this aspect, the quality of culture media used to isolate mycobacterial cultures from biological material collected from either sick or suspected animals is of utmost importance [1, 4]. For mycobacterial indication, the egg yolk-supplemented culture media are the most commonly used [5, 7]. Herewith, these media were reported to be slightly efficient for studying biological material with a low number of mycobacteria [6]. In addition, important conditions for efficient use are pH regulation, osmolarity determination in culture medium, and so on [2]. To lyophilize a culture medium, it should first be frozen, and then moisture is removed from it by vacuum sublimation. Lyophilized products have a longer shelf life because they are stored without moisture, which may promote the microorganism growth, and

¹Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», м. Харків

²Харківський національний медичний університет, м. Харків

¹National Scientific Center 'Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine', Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, University

***Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:**

вул. Григорія Сковороди, 83, м. Харків, Україна 61023;

тел.: +380 95 059 8225

електронна пошта: bw.pochta@gmail.com

***To whom correspondence should be addressed:**

83, Hryhorii Skovorody str., Kharkiv, Ukraine 61023;

tel. +380 95 059 8225

e-mail: bw.pochta@gmail.com

Надійшла 11.12.2023

Прийнята до друку 21.11.2024

Received December, 11, 2023

Accepted November, 21, 2024

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

© Publisher Publishing House 'Akademperiodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2024

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

лімації видаляють вологу. Ліофілізовані продукти мають довший термін придатності, оскільки зберігаються без вологи, яка може сприяти розмноженню мікроорганізмів, що знижує якість продукту. Даний спосіб дозволяє зберегти структуру і корисні властивості продукту [8]. Від правильно підібраних умов ліофілізації залежать елективні та селективні властивості середовища, проте не завжди вдається досягти відповідної якості кінцевого продукту. Так, внаслідок недосконалості самого режиму ліофілізації або порушення умов її проведення часто зовнішній вигляд вмісту живильного середовища у виготовлених серіях флаконів (10% і більше від загальної кількості) не відповідає вимогам чинних нормативних документів.

У зв'язку з цим актуальність даної роботи обумовлена необхідністю удосконалення умов ліофілізації яєчного живильного середовища для запобігання отримання у серії вибракуваних за зовнішнім виглядом флаконів внаслідок нерівномірного заморожування всього об'єму середовища. Крім того, за умов більш якісної ліофілізації збільшується термін зберігання середовища.

Метою роботи було визначення оптимальних температурних умов ліофілізації та об'єму яєчного живильного середовища, яке підлягає заморожуванню у флаконі, що дозволило б отримувати стабільний препарат для ефективного культивування мікобактерій.

Матеріали та методи

Живильне середовище для культивування мікобактерій має такий склад: калій фосфорнокислий однозаміщений (1,54), магній сірчанокислий (0,15), натрій лимонно-кислий тризаміщений (0,38), глікокол (5,0), малахітовий зелений 2% (15,0), гліцерин хімічно чистий (6,0), яєчна маса (C1) (670,0), вода дистильована (до 1000,0), pH ($7,0 \pm 0,2$) (Реєстраційне посвідчення ВВ-00588-06-13 від 29.07.2013 «Сухе живильне середовище для культивування мікобактерій»).

Заморожування живильного середовища у скляних флаконах проводили в апараті HZ-12:50 (Friger, Чехія) з етиловим спиртом-ректифікатом. Рідке середовище розливали порціями по 200 і 300 см³ у скляні флакони з гумовими пробками ємністю по 500 см³. Флакони поміщали у морозильну камеру у горизонтальному положенні. Заморожували продукт при безперервному обертанні флаконів навколо горизонтальної осі двома способами: 1 — до температури -20°C ; 2 — до температури -30°C . При цьому флакони з 200 см³ живильного середовища заморожували

thus degrade product quality. This method enables to preserve the structure and useful properties of the product [8]. Properly selected lyophilization conditions affect the elective and selective properties of the medium, but it is not always possible to achieve the appropriate quality of the final product. For example, the appearance of contents of culture medium in the manufactured vial batches (10% or more of the total) does not often meet the requirements of applicable regulations due to either imperfect lyophilization mode or broken conditions of its implementation.

In this regard, the relevance of this research proceeds from a need to improve the lyophilization modes for egg-based culture medium to prevent the manufacture of vials rejected by appearance in a batch due to uneven freezing of the entire medium volume. In addition, with improved lyophilization, the shelf life of the medium increases as well.

The research aim herein was to determine the optimal temperature conditions for lyophilization and the volume of egg-based culture medium to be frozen in a vial, which would allow obtaining a stable product for efficient micobacterial cultivation.

Materials and methods

The culture medium for mycobacterial cultivation is as follows: monopotassium phosphate (1.54), magnesium sulfate (0.15), trisodium citrate (0.38), glycine (5.0), malachite green 2% (15.0), chemically pure glycerin (6.0), egg mass (C1) (670.0), distilled water (up to 1000.0), pH (7.0 ± 0.2) (Registration Certificate BB-00588-06-13 of July 29, 2013 'Dry culture medium for mycobacterial cultivation').

The culture medium was frozen in glass vials using HZ-12:50 device (Friger, Czech Republic) with rectified alcohol. The liquid medium was poured in portions of 200 and 300 cm³ into 500 cm³ glass vials with rubber stoppers. The vials were placed into freezer in a horizontal position. The product was frozen with continuous rotation of vials around the horizontal axis in two ways: 1 – down to -20°C ; 2 – down to -30°C . Herewith, the vials with 200 cm³ of culture medium were frozen for 20 min, and those with 300 cm³ of culture medium were done for 30 min. To control the freezing temperature, a thermometer was placed into one of the vials. The vials with hardening medium were then kept for 12 hrs in an HC 77:50 refrigerator (Friger) at -50°C . Then the vial content was dried in a freeze-drying unit LZ-45.27 (Friger) for 24 hrs under the following parameters: first 8 hrs at 35°C (vacuum 6.7 Pa); next 16 hrs at 56°C (vacuum 0.3–0.5 Pa). The residual humidity of lyophilized medium was



впродовж 20 хв, а флакони з 300 см³ живильного середовища — 30 хв. Для контролю за температурою заморожування в один із флаконів поміщали термометр. Потім флакони з живильним середовищем для загартування витримували впродовж 12 годин у холодильній камері НС 77:50 (Friger) за температури –50°C. Далі вміст флаконів висушували на установці для сублімаційної сушки LZ-45.27 (Friger) впродовж 24 годин за такими параметрами: перші 8 годин — за температури 35°C (вакуум 6,7 Па), наступні 16 годин — за температури 56°C (вакуум 0,3–0,5 Па). Залишкову вологість ліофілізованого середовища визначали згідно з ТУ У 24.6-00497087-006-2004. Цей показник не перевищував 3,0%, що відповідає вимогам нормативних документів.

Крім того, визначали оптимальний об'єм середовища у флаконі (загальна ємність — 500 см³) перед заморожуванням і ліофілізацією. Для цього досліджували флакони з об'ємом середовища 200 і 300 см³. Для контролю використовували аналогічне живильне середовище, яке не піддавали ліофілізації.

Для регідратації середовища до флакону з сухою масою в два етапи додавали стерильну дистильовану воду. Спочатку вносили 100 см³ і помішуванням повністю змивали суху масу зі стінок флакона. Потім додавали воду по стінці флакона до об'єму 200 або 300 см³ середовища і витримували у термостаті при (37,5 ± 0,5)°C, періодично перемішуючи протягом 3-х годин до утворення однорідної суспензії. Після цього суспензію розливали у бактеріологічні пробірки ємністю 5,0 см³, закривали стерильними ватно-марлевими пробками та коагулювали у скошеному положенні за температури 90°C впродовж 60 хв.

Для дослідження зразків середовища готували завись культури референтного штаму *Mycobacterium bovis* (Vallee) із розрахунку 1,0 см³ стерильного фізіологічного розчину на 1,0 мг бактеріальної маси культури. Із гомогенної завись живої культури мікобактерій готували розведення на стерильному фізіологічному розчині у титрах від 10⁻¹ до 10⁻⁵. Завись мікобактерій із приготованих розведень окремо засівали в 5 пробірок із середовищем по 0,1 см³, закривали промоченими в парафіні стерильними ватно-марлевими пробками і витримували у термостаті за температури (37,5 ± 0,5)°C протягом 30 діб. Огляд росту висіяної культури до появи перших помітних колоній проводили щодобово, а потім кожні 3–5 діб. Інтенсивність росту тест-культури *M. bovis* (Vallee) визначали у відсотках

measured according to the Technical Specifications of Ukraine 24.6-00497087-006-2004. This index did not exceed 3.0%, which met the legal requirements.

In addition, the optimal volume of medium in a vial (500 cm³ total capacity) prior to freezing and lyophilization was determined. For this purpose, the vials with a medium volume of 200 and 300 cm³ were tested. To control, a similar culture medium, not subjected to lyophilization was used.

To rehydrate the medium, a sterile distilled water was supplemented to a vial with dry mass in two stages. First, 100 cm³ were introduced and the dry mass was completely washed off the walls of the vial by stirring. Then water was added along the vial wall to a volume of 200 or 300 cm³ of medium and kept in a thermostat at (37.5 ± 0.5)°C, stirring occasionally within 3 hrs until a homogeneous suspension was formed. After that, the suspension was poured into 5.0 cm³ bacteriological tubes, sealed with sterile cotton gauze plugs, and coagulated in a beveled position at 90°C for 60 min.

To analyze the media samples, a culture suspension of the *Mycobacterium bovis* (Vallee) reference strain was prepared assuming 1.0 cm³ of sterile saline per 1.0 mg of bacterial culture mass. From a homogeneous suspension of live mycobacterial culture, dilutions in sterile saline were prepared in titers from 10⁻¹ to 10⁻⁵. A mycobacterial suspension from the prepared dilutions was separately inoculated into five 0.1 cm³ tubes with the medium, closed with sterile cotton gauze plugs soaked in paraffin and kept in a thermostat at (37.5 ± 0.5)°C for 30 days. The growth of inoculated culture until the first visible colonies appeared was monitored daily, and then every 3–5 days. The growth intensity of *M. bovis* (Vallee) test culture was determined as a percentage by the number of colonies, growing on culture medium surface. The intensity of test culture growth in the studied medium samples was compared with that in the control (non lyophilized) medium, where the growth intensity, ensuring a complete coverage of medium surface at a dilution of 10⁻¹ was assumed as 100%. In this case, the number of culture colonies that partially merged with each other to form a continuous growth was more than 50. The area of the culture relative to that of the medium surface (in percent) was calculated in a bacteriological test tube by applying a contrast grid to the image and outlining the boundaries of mycobacterial culture growth (Fig. 1). This enables to calculate a share of the culture growth area in relation to the total surface area of the medium. In total, five repeats of cultural testing were performed.



за кількістю колоній, що виростили на поверхні живильного середовища. Інтенсивність росту тест-культури на дослідних зразках середовища порівнювали з ростом на контрольному (неліофілізованому) середовищі, в якому інтенсивність росту, що забезпечує повне покриття поверхні середовища у розведенні 10^{-1} , приймали за 100%. При цьому кількість колоній культури, які частково зливалися між собою з утворенням суцільного росту, становила більше 50. Підрахунок площі культури відносно площі поверхні середовища (у відсотках) в бактеріологічній пробірці здійснювали нанесенням на зображення контрастної сітки та окресленням меж росту культури мікобактерій (рис. 1). Це дозволяє підрахувати частку зони росту культури відповідно до загальної площі поверхні середовища. Всього було проведено п'ять повторів культуральних досліджень.

Крім того, якість ліофілізації середовища оцінювали органолептичним методом. Після ліофілізації живильне середовище повинно мати вигляд сухої дрібнопористої маси світло-зеленого кольору.

Статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили із застосуванням програми «Statistica 10.0» для Windows (StatSoft, США). Числові дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою параметричних критеріїв Ст'юдента і Фішера. Різницю між двома величинами вважали статистично значущою на рівні $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Після ліофілізації флакони з живильним середовищем, які не відповідали вимогам до зовнішнього вигляду, були вибракувані (табл. 1).

Вибракувані флакони містили живильне середовище з недрібнопористими неоднорідними ділянками у вигляді тяжів. Встановлено, що температура -20°C не забезпечувала рівномірне пристінне заморожування середовища у об'ємах 200 і 300 cm^3 , про що свідчить кількість вибракуваних флаконів із середовищем (табл. 1). Слід зазначити, що температура заморожування -30°C при об'ємі середовища 300 cm^3 не забезпечувала якісну заморозку середовища, на відміну від флаконів з 200 cm^3 живильного середовища.

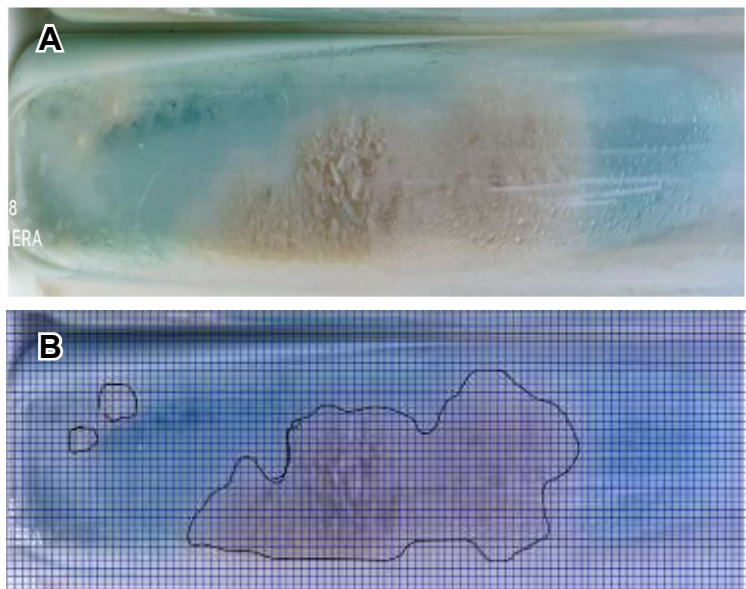


Рис. 1. Ріст тест-культури *M. bovis* у розведенні 10^{-5} на поверхні живильного середовища (200 cm^3 , температура заморожування -30°C) (А) та приклад розрахунку частки зони росту культури мікобактерій відносно поверхні середовища (В).

Fig. 1. Growth of *M. bovis* test culture at a dilution of 10^{-5} on culture medium surface (200 cm^3 , -30°C freezing temperature) (A) and an example of calculating a share of growth area of mycobacterial culture relative to the medium surface (B).

In addition, the quality of medium lyophilization was assessed by organoleptic method. After lyophilization, the culture medium should look like a dry, fine-porous mass of light green color.

The results obtained were statistically processed using the 'Statistica 10.0' software for Windows (StatSoft, USA). Numerical data were analyzed by variability method using the Student's t-test and F-test. The difference between two values was considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

After lyophilization, the vials with culture medium not meeting the appearance requirements were rejected (Table 1).

Rejected vials contained the culture medium with not fine porous heterogeneous areas in the form of strands. The temperature of -20°C was found not to ensure the uniform near-wall freezing of medium in volumes of 200 and 300 cm^3 , as evidenced by the number of rejected vials with the medium (Table 1). It should be noted that freezing temperature of -30°C at a volume of 300 cm^3 ensured no high-quality freezing of the medium, unlike the vials with 200 cm^3 of medium.

The Table 2. shows the results of study of the impact of freezing modes for semi-finished medium on lyophilization quality assessed by test culture growth intensity in the culture medium.



Таблиця 1. Вплив режиму ліофілізації на кількість вибраковки флаконів

Table 1. Impact of lyophilization mode on rejected vial number

Об'єм середовища, см ³ Medium volume, cm ³	Температура заморожування, °C Freezing temperature, °C	Кількість вибракуваних флаконів, % Number of rejected vials, %
200	-20	20
	-30	–
300	-20	30
	-30	20

Результати дослідження впливу умов заморожування напівфабрикату середовища на якість ліофілізації за інтенсивністю росту тест-культури на живильному середовищі наведено у табл. 2.

На рис. 1, А наведено приклад росту тест-культури мікобактерій виду *M. bovis* у бактеріологічній пробірці (розведення 10⁻⁵) на 30 добу культивування, що займає 47% від загальної площі поверхні живильного середовища, замороженого у об'ємі 200 см³ за температури -30°C. Під час вивчення інтенсивності росту різних дослідних зразків середовищ звертали увагу на появу першої видимої колонії тест-культури у зразках. У ліофілізованому живильному се-

Fig. 1. A shows an example of growth of *M. bovis* mycobacteria test culture in a bacteriological test tube (10⁻⁵ dilution) on day 30 of culture, which covers 47% of the total surface area of the medium frozen in 200 cm³ volume at -30°C. When studying the growth intensity of different experimental media samples, the attention was paid to appearance of first visible colony of test culture in the samples. In the lyophilized culture medium frozen at -30°C in a volume of 200 cm³, the growth of *M. bovis* tuberculosis pathogen test culture was observed even to day 21 after inoculation, while in other culture media it was revealed not earlier than on day 24, and in the control medium – on day 22 (Fig. 2).

Таблиця 2. Якісні характеристики дослідних зразків сухого живильного середовища для культивування мікобактерій ($M \pm m$)Table 2. Qualitative characteristics of experimental samples of dry culture medium for micobacterial cultivation ($M \pm m$)

Об'єм середовища, см ³ Medium volume, cm ³	Температура заморожування, °C Freezing temperature, °C	Інтенсивність росту тест-культури на середовищі (%) у розведеннях Growth intensity of test culture in medium (%) in dilutions				
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
200	-20	75 ± 8,0*	78 ± 7,5*	63 ± 6,0*	56 ± 5,3*	45 ± 3,2*
	-30	95 ± 8,4	83 ± 7,2	67 ± 6,0	62 ± 5,5	51 ± 5,0
300	-20	79 ± 8,2*	82 ± 7,5	60 ± 6,0*	53 ± 5,5*	39 ± 4,0*
	-30	84 ± 8,0*	73 ± 7,4*	58 ± 6,0*	51 ± 5,1*	41 ± 5,2*
Контроль (неліофілізоване середовище) Control (non-lyophilized medium)		97 ± 9,1	87 ± 8,3	70 ± 5,9	61 ± 5,6	53 ± 4,7

Примітки: *— результати значущі відносно контролю, $p \leq 0,05$; інтенсивність росту 100% — суцільний ріст культури, який покриває всю поверхню живильного середовища.

Notes: *— results are significant relative to the control, $p \leq 0.05$; 100% growth intensity is the confluent culture growth, covering the entire surface of medium.



редовищі, замороженому за температури -30°C у об'ємі 200 см^3 , вже на 21 добу після висіву спостерігали ріст тест-культури збудника туберкульозу виду *M. bovis* на інших живильних середовищах — не раніше 24 доби, а на контрольному середовищі — на 22 добу (рис. 2).

Наступним етапом у визначенні ефективності виготовлених живильних середовищ були біологічні дослідження щодо ізоляції збудника туберкульозу із патологічного матеріалу, отриманого від заражених лабораторних тварин (морських свинок) тест-культурою збудника туберкульозу виду *M. bovis* (Vallee). Встановлено, що за швидкістю прояву росту перших видимих колоній та їх кількістю при ізоляції культури *M. bovis* із біологічного матеріалу найкращі показники спостерігалися на неліофілізованому (контрольному) живильному середовищі та на середовищі, яке було заморожене за температури -30°C у об'ємі 200 см^3 . За інших умов (-20°C у об'ємах 200 і 300 см^3 та -30°C у об'ємі 300 см^3) рівномірне заморожування середовища не забезпечувалося, у вибракуваних флаконах спостерігали недрібнопористі неоднорідні ділянки у вигляді тяжів. Помітний ріст перших колоній на цих середовищах виявляли на 23–25 добу. Варто зазначити, що згідно з результатами В.А. Brown-Elliott та співавт. [5] це відбувалося на 5–7 діб раніше, ніж у зразках дослідних живильних середовищ, виготовлених із використанням інших умов ліофілізації. Швидкість, інтенсивність росту колоній тест-культури *M. bovis* та їх кількість на живильному середовищі об'ємом 200 см^3 , замороженому за температури -30°C , були ідентичними показникам контрольного неліофілізованого середовища.

Висновки

1. Результати проведених досліджень показали, що за температури -30°C впродовж 20 хв забезпечується найбільш рівномірне заморожування середовища у зразках об'ємом 200 см^3 .

2. Живильне середовище, виготовлене за визначеним способом заморожування (-30°C ; 200 см^3), забезпечує появу перших ознак росту культур мікобактерій на 1–2 доби раніше у порівнянні з контрольним середовищем і на 3–4 доби раніше ніж в інших дослідних зразках середовища.

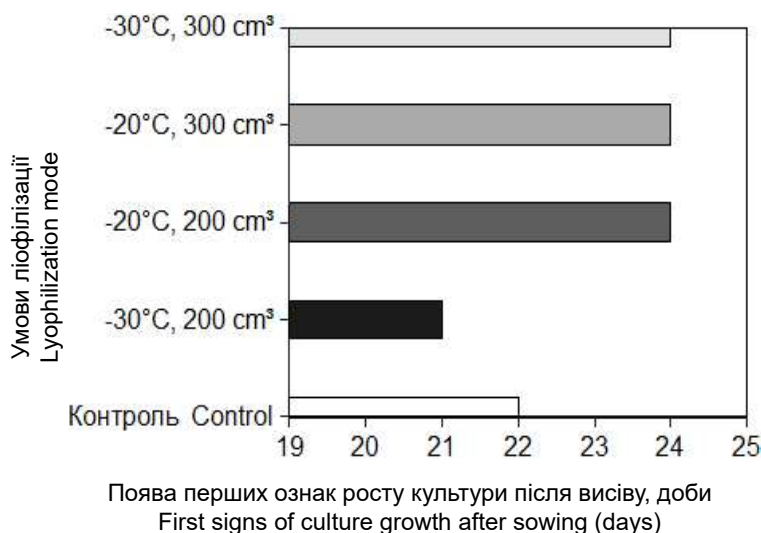


Рис. 2. Перші ознаки росту тест-культури *M. bovis* на ліофілізованих живильних середовищах для культивування мікобактерій.

Fig. 2. First signs of *M. bovis* test culture growth in lyophilized culture media for mycobacterial cultivation.

The next step in determining the efficiency of prepared culture media included biological studies to isolate tuberculosis pathogen from pathological material obtained from laboratory animals (guinea pigs) infected with test culture of tuberculosis pathogen *M. bovis* (Vallee). It was found that in terms of growth rate of first visible colonies and their number during *M. bovis* culture isolation from biological material, the highest indices were observed in non-lyophilized (control) culture medium and in that frozen at -30°C in a volume of 200 cm^3 . Under other conditions (-20°C in 200 and 300 cm^3 volumes and -30°C in 300 cm^3 volume), no uniform freezing of the medium was ensured, and not fine-porous porous heterogeneous areas in the form of strands were observed in rejected vials. A noticeable growth of first colonies in these media was detected on day 23–25. It should be noted that as reported by B.A. Brown-Elliott *et al.* [4], this occurred 5–7 days earlier than in the samples of experimental culture media prepared using other lyophilization modes. The rate, growth intensity of *M. bovis* test culture colonies and their number in a 200 cm^3 culture medium frozen at -30°C were identical to those of the control unlyophilized medium.

Conclusions

1. Our findings have shown a temperature of -30°C and 20 min duration to ensure the most uniform freezing of medium in samples of 200 cm^3 volume.



Література

1. Alexander KJ, Furlong JL, Baron JL, et al. Evaluation of a new culture medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from environmental water samples. *PLoS One*. [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2023 Dec 08]; 16 (3): e0247166. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247166>
2. Basu S, Bose C, Ojha N, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 2015; 11(4): 182–4.
3. Boldi MO, Denis-Lessard J, Neziri R, et al. Performance of microbiological tests for tuberculosis diagnostic according to the type of respiratory specimen: A 10-year retrospective study. *Front Cell Infect Microbiol*. [Internet]. 2023 Mar 2 [cited 2023 Dec 08]; 13: 1131241. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1131241/full>
4. Brown-Elliott BA, Molina S, Fly T, et al. Evaluation of a novel rapidly-growing mycobacteria medium for isolation of *Mycobacterium abscessus* complex from respiratory specimens from patients with bronchiectasis. *Heliyon*. [Internet]. 2019 Oct 24 [cited 2023 Dec 08]; 5 (10): e02684. Available from: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(19\)36344-3](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(19)36344-3)
5. Feshchenko Yul, Zhurylo OA, Babarova AI. [Laboratory diagnosis of tuberculosis infection: a studyguide]. Kyiv: Medicine 2019: 304 p. Ukrainian.
6. Harris NB, Robbe-Austerman S, Payeur JB. Effect of egg yolk on the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using the ESP II liquid culture system. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 17: 554–60.
7. Mayahi M, Mosavari N, Esmaeilzadeh S, et al. Comparison of four different culture media for growth of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolated from naturally infected lofts of domestic pigeons. *Iran J Microbiol*. 2013; 5 (4): 379–82.
8. Rodriguez J, Alcántara R, Rodríguez J, et al. Evaluation of three alternatives cost-effective culture media for *Mycobacterium tuberculosis* detection and drug susceptibility determination using the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay. *Tuberculosis (Edinb)*. [Internet]. 2022 Dec 10 [cited 2023 Dec 08]; 137: 102273. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147297922200110X>
9. Zavgorodnii AI, Pozmogova SA, Kalashnyk MV, et al. Etiological factors in triggering non-specific allergic reactions to tuberculin in cattle. *Reg Mech Biosyst*. 2021;12(2): 228–33.

2. The culture medium prepared according to a specific freezing mode (-30°C ; 200 cm^3) provided the first signs of growth of mycobacterial cultures 1–2 days earlier as compared to the control medium and 3–4 days earlier vs. other studied medium samples.

References

1. Alexander KJ, Furlong JL, Baron JL, et al. Evaluation of a new culture medium for isolation of nontuberculous mycobacteria from environmental water samples. *PLoS One*. [Internet]. 2021 Mar 3 [cited 2023 Dec 08]; 16 (3): e0247166. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0247166>
2. Basu S, Bose C, Ojha N, et al. Evolution of bacterial and fungal growth media. *Bioinformation*. 2015; 11(4): 182–4.
3. Boldi MO, Denis-Lessard J, Neziri R, et al. Performance of microbiological tests for tuberculosis diagnostic according to the type of respiratory specimen: A 10-year retrospective study. *Front Cell Infect Microbiol*. [Internet]. 2023 Mar 2 [cited 2023 Dec 08]; 13: 1131241. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2023.1131241/full>
4. Brown-Elliott BA, Molina S, Fly T, et al. Evaluation of a novel rapidly-growing mycobacteria medium for isolation of *Mycobacterium abscessus* complex from respiratory specimens from patients with bronchiectasis. *Heliyon*. [Internet]. 2019 Oct 24 [cited 2023 Dec 08]; 5 (10): e02684. Available from: [https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440\(19\)36344-3](https://www.cell.com/heliyon/fulltext/S2405-8440(19)36344-3)
5. Feshchenko Yul, Zhurylo OA, Babarova AI. [Laboratory diagnosis of tuberculosis infection: a studyguide]. Kyiv: Medytyna 2019: 304 p. Ukrainian.
6. Harris NB, Robbe-Austerman S, Payeur JB. Effect of egg yolk on the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* using the ESP II liquid culture system. *J Vet Diagn Invest*. 2005; 17: 554–60.
7. Mayahi M, Mosavari N, Esmaeilzadeh S, et al. Comparison of four different culture media for growth of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* isolated from naturally infected lofts of domestic pigeons. *Iran J Microbiol*. 2013; 5 (4): 379–82.
8. Rodriguez J, Alcántara R, Rodríguez J, et al. Evaluation of three alternatives cost-effective culture media for *Mycobacterium tuberculosis* detection and drug susceptibility determination using the microscopic observation drug susceptibility (MODS) assay. *Tuberculosis (Edinb)*. [Internet]. 2022 Dec 10 [cited 2023 Dec 08]; 137: 102273. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147297922200110X>
9. Zavgorodnii AI, Pozmogova SA, Kalashnyk MV, et al. Etiological factors in triggering non-specific allergic reactions to tuberculin in cattle. *Reg Mech Biosyst*. 2021; 12(2): 228–33.

