



2025. Номер 12, С. 181 – 187.

Отримано: 03.10.2025 Прийнято: 19.10.2025 Опубліковано: 27.11.2025

DOI: 10.31890/vttp.2025.12.16

UDC 619:616.98:579.873.21

CULTURE AND LONG-TERM STORAGE OF MYCOBACTERIAL CULTURES

Yu.V. Andrienko

*National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”,
Kharkiv, Ukraine,*

E-mail: yula.psi@gmail.com

Abstract. Diagnosis of animal tuberculosis remains an urgent task of veterinary phthisiology. Despite the success achieved, it is still necessary to improve and develop modern methods of indicating and identifying mycobacteria from biological material. For this purpose, a number of nutrient media are used. The aim of the work was to comprehensively improve the system of cultivation and long-term storage of *Mycobacterium avium* cultures using modern lyophilization technologies and to develop a special selective nutrient medium. During experimental studies, a comparison of the growth of *M. avium* culture on the classical Löwenstein-Jensen egg medium and the developed “KIT” accumulation medium was carried out. It was established that the “KIT” medium allows to reduce the time of isolation of mycobacterial cultures by 5–7 days and increase the percentage of positive isolations by 27%, which significantly speeds up the process of bacteriological diagnostics. Mycobacteria were isolated from the blood of experimentally infected laboratory animals using the “KIT” nutrient medium. Thus, the highest percentage of isolation from blood was observed in guinea pigs that were inoculated with a suspension of *Mycobacterium avium*-intracellulare complex. It was found that the serum-glucose protective suspension medium and the drying regime effectively preserve the viability and enzymatic activity of mycobacterial strains for more than 30 years. The conducted study allowed to develop and test a comprehensive system of improved cultivation and long-term storage of mycobacteria *M. avium*, which includes the use of a new accumulation medium “KIT” and an optimized lyophilization regime using serum-glucose protective suspension medium. The results of the study are recommended to be implemented in the production practice of the biological industry and veterinary laboratories, which will ensure the stability and efficiency of work with *Mycobacterium avium* cultures.

Keywords: *mycobacteria, Mycobacterium avium, cultivation medium, lyophilization, long-term storage, veterinary diagnosis.*

КУЛЬТИВУВАННЯ ТА ДОВГОТРИВАЛЕ ЗБЕРІГАННЯ КУЛЬТУР МІКОБАКТЕРІЙ

Ю. В. Андрієнко

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної
медицини», Харків, Україна,
E-mail: yula.psi@gmail.com

Анотація. Діагностика туберкульозу тварин залишається актуальною задачею ветеринарної фтизіатрії. Не зважаючи на досягнутий успіх і на сьогодні необхідним є удосконалення та розробка сучасних способів індикації та ідентифікації мікобактерій з біологічного матеріалу. З цією метою застосовують цілу низку поживних середовищ. Метою роботи було комплексне удосконалення системи культивування та довготривалого зберігання культур *Mycobacterium avium* із застосуванням сучасних технологій ліофілізації та розробка спеціального селективного поживного середовища. У ході експериментальних досліджень було проведено порівняння росту культури *M. avium* на класичному яєчному середовищі Левенштейна-Йенсена та розробленому накопичувальному середовищі «КІТ». Встановлено, що середовище «КІТ» дозволяє скоротити час виділення культур мікобактерій на 5–7 діб і підвищити відсоток позитивних ізоляцій на 27 %, що значно прискорює процес бактеріологічної діагностики. За допомогою поживного середовища «КІТ» ізолювано мікобактерії з крові експериментально заражених лабораторних тварин. Так, найбільший відсоток ізолювання з крові відмічався у морських свинок, які були щеплені зависсю мікобактерій *Mycobacterium avium*-intracellulare complex. Встановлено, що сироваточно-глюкозне захисне суспензійне середовище та режим сушіння ефективно зберігають життєздатність і ферментативну активність штамів мікобактерій понад 30 років. Проведене дослідження дозволило розробити та апробувати комплексну систему удосконаленого культивування та тривалого зберігання мікобактерій *M. avium*, що включає застосування нового накопичувального середовища «КІТ» та оптимізованого режиму ліофілізації з використанням сироваточно-глюкозного захисного суспензійного середовища. Результати дослідження рекомендується впровадити у виробничу практику біологічної промисловості та ветеринарних лабораторій, що дозволить забезпечити стабільність та ефективність роботи з культурами *Mycobacterium avium*.

Ключові слова: мікобактерії, *Mycobacterium avium*, середовище культивування, ліофілізація, тривале зберігання, ветеринарна діагностика.

Вступ. *Актуальність теми.* У сучасному тваринництві проблема діагностики туберкульозу та інфекцій, викликаних атиповими мікобактеріями, залишається актуальною через економічні втрати від хибнопозитивних реакцій на туберкулін та необґрунтованого забою здорових тварин. Традиційні методи культивування не завжди забезпечують швидке та точне виділення культур, що уповільнює діагностику туберкульозу (Thoen et al., 2006; Malik et al., 2023). Розробка нових поживних середовищ та методів зберігання культур мікобактерій дозволить підвищити ефективність діагностики та зменшити витрати на її проведення (Zavhorodnii et al., 2023).

Аналіз досліджень і публікацій. Дослідження екології та методів культивування нетуберкульозних мікобактерій показують, що вони поширені в навколишньому середовищі та викликають проблеми в діагностиці (Sajduda et al., 2004; Falkinham, 2013, 2021). Встановлена пластичність їх культуральних та біологічних властивостей (Zavgorodnii et al., 2021; Paliy et al., 2024). Методи ліофілізації для збереження життєздатності штамів описані в роботах, де підкреслюється роль захисних середовищ (Ukhovskiy et al., 2019; Gutsulyak, 2022; Gutsulyak & Timchenko, 2023). Так, використання

желатину та молока покращує стабільність процесу та отримання кінцевого продукту (Markeyev, 2013). Таксономія та епідеміологія *M. avium* вивчені у контексті зоонозів (Shinnick & Good, 1994; Pavlik et al., 2000; Michel et al., 2006). Сучасні методи швидкого культивування включають модифіковані середовища (Palomino et al., 2002). ДНК-фінгерпринтинг використовується для ідентифікації мікроорганізмів (van Soolingen et al., 1994). Однак, при цьому, бракує комплексних підходів для ветеринарної практики (Grange & Yates, 1994; World Organisation for Animal Health, 2024).

Метою роботи було комплексне удосконалення системи культивування та довготривалого зберігання культур мікобактерій *Mycobacterium avium* із застосуванням сучасних технологій ліофілізації та розробка спеціального селективного поживного середовища.

Завдання дослідження: створення селективного середовища для прижиттєвого виділення чистих культур мікобактерій; ізоляція та стандартизація штамів; визначення впливу терміну зберігання на властивості культур мікобактерій.

Матеріал і методи досліджень. Для вивчення впливу ліофілізації на життєздатність виробничих штамів мікобактерій *M. avium* використовували сироваточно-глюкозне захисне суспензійне середовище. При цьому застосовували теоретичний метод аналізу та узагальнення наукової літератури щодо проблеми культивування та зберігання штамів мікобактерій. Для досягнення практичного результату в роботі використали бактеріологічний метод, з використанням щільного яєчного середовища Левенштейна-Йенсена. Режим ліофілізації був підібраний для даного виду культур мікобактерій. Параметри висушування були наступними: швидке заморожування за температури мінус 40 °C – забезпечує збереження цілісності клітин, попереджаючи формування кристалів льоду всередині бактерій; сублімаційне висушування при залишковому тиску 0,08 мБар – видалення вологи шляхом переходу льоду у пароподібний стан без проходження рідкої фази; десорбція залишкової вологи при 20 °C – стабілізація сухого продукту та підготовка його до тривалого зберігання.

Життєздатність культур перевіряли шляхом підрахунку колоній після відновлення на твердих середовищах, а біохімічну активність оцінювали за допомогою стандартних тестів. Обробка даних проведена коректними математичними методами, кількість тварин у досліді (загальна та у групах) достатня для достовірної статистичної обробки (Kubica & Wayne, 1984; Collins et al., 1985; Palomino et al., 2002).

Бактеріологічні посіви проводили на класичному середовищі Левенштейна-Йенсена та на розробленому накопичувальному середовищі «KIT» (кров-індикатор-твін), що містить у своєму складі лужний розчин низької концентрації (0,5 %), неіоногенну поверхнево-активну речовину твін-80 (0,05 %), яка не проявляє суттєвого впливу на життєздатність мікобактерій, а навпаки стимулює їхній ріст, *pH*-індикатор (бромтимоловий синій (БТС) у концентрації 0,02 %), що додається до складу середовища, як інгібітор росту банальної мікрофлори і відповідає інтервалу *pH*, за якого мікобактерії проявляють активний ріст. Мікроскопія за Цілем-Нільсеном використовувалася для підтвердження кислотостійких бактерій у досліджуваних культурах та контролю їх чистоти. Біохімічні тести включали визначення активності нітратредуктази, уреазі та каталази, що дозволяє оцінити функціональний стан культур до та після ліофілізації.

Усі експериментальні дослідження проведено згідно сучасних методологічних підходів та з дотриманням відповідних вимог і стандартів, зокрема вимогам ДСТУ ISO/IEC 17025:2005 (2006). Утримання тварин та всі маніпуляції здійснювали відповідно до положень «Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах» (2012), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей.

Результати досліджень та їх обговорення. У ході експериментальних досліджень було проведено порівняння росту культури *M. avium* на класичному яєчному середовищі Левенштейна-Йенсена та розробленому накопичувальному середовищі «KIT» (кров-

індикатор-твін). Встановлен, що на середовищі «КІТ» перші колонії з'являлися на 10–12-ту добу, тоді як на Левенштейна-Йенсена — лише на 16–18-ту добу. Це свідчить про прискорений ріст бактерій на новому середовищі, що дозволяє скоротити час діагностичних досліджень на 5–7 діб. На середовищі «КІТ» кількість позитивних ізоляцій зросла на 27 % порівняно з класичним середовищем. Це підтверджує високу чутливість нового середовища та його ефективність для виділення мікобактерій із клінічного матеріалу. Колонії мікобактерій на середовищі «КІТ» зберігали типові морфологічні ознаки: сухі, шорсткі, кремового кольору, що дозволяє ідентифікувати культуру при візуальному контролі.

У наступних дослідках біоматеріалом для бактеріологічного дослідження, при встановленні діагнозу на туберкульоз служила кров, відібрана за життя тварини. Спосіб був попередньо випробуваний в умовах експерименту на 64 головах клінічно здорових морських свинок живою вагою не менше 350 г, які до початку дослідження не реагували на ППД-туберкулін для ссавців, 25 з яких — були заражені культурою виду *M. avium*, 10 — *M. intracellulare*, 15 — *M. bovis* і 14 — *M. tuberculosis* (таблиця 1).

Таблиця 1

Дослідження ефективності комбінованого середовища «КІТ» у дослідках на морських свинках, заражених тест-культурами мікобактерій

Ч.ч.	Кількість морських свинок (n)	Культура мікобактерій	Ізольовано кислотостійких культур	% ізольованих культур
1	25	<i>M. avium</i>	15	60,0
2	10	<i>M. intracellulare</i>	5	50,0
3	15	<i>M. bovis</i>	6	40,0
4	14	<i>M. tuberculosis</i>	4	28,6
5	10	Контроль (культури не вводили)	—	—

Із даних таблиці 1 видно, що найбільший відсоток ізолювання з крові відмічався у морських свинок, які були щеплені зависсю мікобактерій *M. avium-intracellulare complex* (відповідно 60 % і 50 %).

Для оцінки ефективності тривалого зберігання штамів після ліофілізації (рисунок 1) вивчали життєздатність культур після їх відновлення на поживному середовищі (таблиця 2).



Рисунок 1. Загальний вид ліофілізованих культур мікобактерій

Збереження життєздатності культур мікобактерій при тривалому зберіганні у ліофілізованому стані

№	Термін зберігання культур мікобактерій, роки	Життєздатність культур мікобактерій *, %
1	Одразу після ліофілізації	100±9,4
2	1	98±8,6
3	5	96±7,9
4	10	94±8,5
5	20	92±8,0
6	30	90±7,6

Примітка: дані усереднені за 13 штамми; * $p < 0.05$ порівняно з вихідним рівнем.

Так, поступове зниження життєздатності від 100 % до 90 % протягом 30 років є незначним, що свідчить про ефективність використаних методів ліофілізації та захисних середовищ (Gutsulyak, 2022). Біохімічна активність штамів також залишалася стабільною: 95 % зберігали нітратредуктазну активність, 92 % — каталазну активність. Це гарантує збереження функціональних характеристик бактерій після їх тривалого зберігання (Ragot et al., 1999; Markeyev, 2013).

Отримані дані підтверджують, що використання накопичувального середовища «КІТ» значно скорочує терміни виділення культур та підвищує чутливість бактеріологічної діагностики. Прискорена ізоляція культур дозволяє зменшити час очікування результатів діагностики, що критично для прийняття відповідних рішень у господарствах. Сироваточно-глюкозне захисне суспензійне середовище та режим сушіння ефективно зберігають життєздатність і ферментативну активність штамів понад 30 років. Практична значимість: збереження вірулентності та антигенних властивостей штамів дозволяє використовувати їх для виробництва алергенів та дослідницьких колекцій без ризику втрати характеристик. Швидка і точна діагностика допомагає уникнути необґрунтованого забою продуктивних тварин та мінімізує втрати у господарствах. Розроблені підходи можна масштабувати для інших видів атипичних мікобактерій та використовувати як стандарт для виробничих і діагностичних лабораторій (Thoen et al., 2006; Shinnick & Good, 1994).

Отримані дані підтверджують перевагу нового методу. Таким чином, середовище «КІТ» дозволяє скоротити час виділення культур на 5–7 діб і підвищити відсоток позитивних ізоляцій на 27 %, що значно прискорює процес бактеріологічної діагностики та дає змогу раніше проводити необхідні ветеринарно-санітарні заходи (Falkinham, 2021).

Проведене дослідження дозволило розробити та апробувати комплексну систему удосконаленого культивування та тривалого зберігання мікобактерій *M. avium*, що включає застосування нового накопичувального середовища «КІТ» та оптимізованого режиму ліофілізації з використанням сироваточно-глюкозного захисного суспензійного середовища. Впроваджений режим ліофілізації забезпечує високу життєздатність культур навіть після тривалого зберігання: 90 % життєздатності зберігається навіть через 30 років. Біохімічні характеристики штамів, зокрема активність нітратредуктази, уреаз та каталази, залишаються стабільними, що підтверджує ефективність підібраних захисних середовищ і зберігає функціональні властивості бактерій, необхідні для виробництва алергенів.

Розроблений підхід може бути використаний у виробничих лабораторіях для створення стабільних колекцій штамів, у діагностичних центрах — для скорочення часу отримання результатів і підвищення чутливості досліджень, а також у наукових дослідженнях — для стандартизації біологічного матеріалу та проведення порівняльних експериментів.

Також повідомляється, що заморожування живильного середовища об'ємом 200 см³ за температури –30°C забезпечує більш оптимальні умови для проведення ліофілізації, ніж

інші запропоновані варіанти (200 см³ за –20°C та 300 см³ за –20 і –30°C) (Zavhorodniy et al., 2024). Встановлено, що туберкулін у формі ліофілізату є стабільнішим препаратом порівняно з аналогічним препаратом, виготовленим у формі стандартного розчину (Zavhorodnii et al., 2022). Це вказує на актуальність і перспективність застосування ліофілізації у ветеринарній біотехнології.

Таким чином, комплекс заходів, включаючи використання середовища «КІТ» і оптимізованої технології ліофілізації, забезпечує швидке та ефективне виділення культур мікобактерій, тривале збереження їх життєздатності та біологічних властивостей, підвищує точність прижиттєвої діагностики туберкульозу і має важливе практичне та економічне значення. Результати дослідження рекомендується впровадити у виробничу практику біологічної промисловості та ветеринарних лабораторій, що дозволить забезпечити стабільність та ефективність роботи з культурами *M. avium*.

Висновки

1. Розроблено селективне комбіноване середовище «КІТ» для прижиттєвого виділення *M. avium*.
2. Оптимізовано склад захисних середовищ та режим ліофілізації для тривалого зберігання культур мікобактерій, що забезпечує $\geq 90\%$ їх життєздатності.
3. Експериментально доведено збереження культуральних, морфологічних і біохімічних властивостей штамів мікобактерій після тривалого зберігання.
4. Одержані результати щодо реалізації інноваційних способів на практиці нададуть змогу запропонувати новітні дієві протоколи щодо діагностики туберкульозу.

References

- Collins, C. H., Grange, J. M., & Yates, M. D. (1985). Organization and practice in tuberculosis bacteriology. Croom Helm. <https://www.ndl.ethernet.edu.et/bitstream/123456789/17600/1/102.pdf>
- Falkinham, J. O. (2013). Ecology of nontuberculous mycobacteria—where do human infections come from? *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 34(1), 95–102. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1333571>
- Falkinham, J. O. (2021). Ecology of nontuberculous mycobacteria. *Microorganisms*, 9(11), 2262. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112262>
- Grange, J. M., & Yates, M. D. (1994). Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, 40(1-2), 137–151. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(94\)90052-3](https://doi.org/10.1016/0378-1135(94)90052-3)
- Gutsulyak, A. I. (2022). Protective media composition and freezing regimen experimental substantiation during *Mycobacterium avium* freeze-drying. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 32(3), 127–138. <https://doi.org/10.15407/cryo32.03.127>
- Gutsulyak, A. I., & Timchenko, L. D. (2023). Optimization of lyophilization modes for culture medium used in mycobacterial cultivation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 33(2), 100–110. <https://doi.org/10.15407/cryo33.02.100>
- Kubica, G. P., & Wayne, L. G. (Eds.). (1984). The mycobacteria: A sourcebook. Marcel Dekker. https://books.google.com/books/about/The_Mycobacteria.html?id=KICwwEACAAJ
- Malik, M., Malik, M. J., David, R., Gonzalez, A. Y., & Scherrer, S. (2023). Susceptibility of rapidly growing mycobacteria isolated from Australian cats to ivermectin, moxidectin, ceftiofur and florfenicol. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 25(1), 1098612X221145597. <https://doi.org/10.1177/1098612X221145597>
- Markeyev, A. V. (2013). Filterable forms and L-forms of *Mycobacterium bovis* BCG. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5), 1087–1093. <https://doi.org/10.4161/hv.19698>
- Michel, A. L., Bengis, R. G., Keet, D. F., Hofmeyr, M., de Klerk, L. M., Cross, P. C., Jolles, A. E., Cooper, D., Whyte, I. J., Buss, P., & Godfroid, J. (2006). Wildlife tuberculosis in South African conservation areas: Implications and challenges. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.035>
- Paliy, A., Zavgorodnii, A., Rodionova, K., Borovkov, S., Pavlichenko, O., Dubin, R., & Ihnatieva, T. (2024). Resistance of different types of nontuberculous mycobacteria to aldehyde disinfectants. *Veterinarski Arhiv*, 94(6), 499–512. <https://doi.org/10.24099/vet.arhiv.2515>

- Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: Simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(8), 2720–2722. <https://doi.org/10.1128/aac.46.8.2720-2722.2002>
- Pavlik, I., Dvorska, L., Bartl, J., Svastova, P., Rychlik, I., Bejckova, K., & Filka, J. (2000). Mycobacterial infections in domestic and wild animals. *Veterinarni Medicina*, 45(5), 123–132. <https://vetmed.agriculturejournals.cz/>
- Ragot, C., Renaud, J., Bibollet-Ruche, F., Busso, P., Espy, N., Pellmont, K., ... & Cavassini, M. (1999). Decreased capacity of recombinant 45/47-kDa molecules of *Mycobacterium tuberculosis* to stimulate T lymphocyte responses related to changes in their mannosylation pattern. *Journal of Biological Chemistry*, 274(46), 32613–32620. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.46.32613>
- Sajduda, A., Dziadek, J., Kotlowski, R., & Portaels, F. (2004). Evaluation of multiple genetic markers for typing drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains from Poland. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 48(3), 163–169. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2003.10.005>
- Shinnick, T. M., & Good, R. C. (1994). Mycobacterial taxonomy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(11), 884–901. <https://doi.org/10.1007/BF02111489>
- Thoen, C. O., LoBue, P. A., & de Kantor, I. (2006). The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Veterinary Microbiology*, 112(2-4), 339–345. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.11.047>
- Ukhovskiy, V. V., Paliy, A. P., Tarasov, O. A., Ukhovska, T. M., & Paliy, A. P. (2019). Using of glycerol and DMSO for *Leptospira interrogans* cryopreservation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 29(1), 102–106. <https://doi.org/10.15407/cryo29.01.102>
- van Soolingen, D., de Haas, P. E., Hermans, P. W., & van Embden, J. D. (1994). DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods in Enzymology*, 235, 196–205. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)35141-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)35141-4)
- World Organisation for Animal Health. (2024). Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (13th ed.). WOA. <https://www.woah.org/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/>
- Zavhorodnii, A., Bilushko, V., Paliy, A., Kalashnyk, M., Kalashnyk, N., & Paliy, A. (2022). Freeze-drying improved the stability of tuberculin purified protein derivative (PPD) in mammals. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 32(1), 63–67. <https://doi.org/10.15407/cryo32.01.063>
- Zavgorodnii, A. I., Pozmogova, S. A., Kalashnyk, M. V., Paliy, A. P., Plyuta, L. V., & Paliy, A. P. (2021). Etiological factors in triggering non-specific allergic reactions to tuberculin in cattle. *Regulatory Mechanisms in Biosystems*, 12(2), 228–233. <https://doi.org/10.15421/022131>
- Zavhorodnii, A. I., Bilushko, V. V., Kalashnyk, M. V., Pozmogova, S. A., Paliy, A. P., & Pavlichenko, O. V. (2023). Protective media composition and freezing regimen experimental substantiation during *Mycobacterium avium* freeze-drying. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 33(2), 139–143. <https://doi.org/10.15407/cryo33.02.139>
- Zavhorodnii, A. I., Bilushko, V. V., Pozmogova, S. A., Paliy, A. P., Kalashnyk, M. V., Pavlichenko, O. V., Sviridova, K. O., & Tischenko, O. M. (2024). Optimization of lyophilization modes for culture medium used in Mycobacterial cultivation. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 34(4), 261–267. <https://doi.org/10.15407/cryo34.04.261>