مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگا ه میکروب شناسی ایفا می کنند و بطور گسترده ای جهت جداسازی، تعیین هویت و آنتی بیوگرام میکروارگانیسم های بیماریزا بکار میروند. بسیاری از آزمایشگاهها بطور روتین محیط های کشت مورد نیاز برای مصارف تشخیصی وتحقیقاتی را خودشان تهیه می نمایند. با این همه جهت اطمینان از اینکه محیط های کشت، کیفیت خوب و نتایج مطلوبی داشته باشند بایستی روشهای کنترل کیفی مناسبی بکار گرفته شود. برای رسیدن به این هدف بایستی در تهیه و مصرف محیط های کشت معیارهای زیر را در نظر گرفت.

مواد خام

کیفیت محیط ها بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین مواردی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط ها ی کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل نباید یونهای مس در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد چون خاصیت مهار کنندگی برای میکرو ارگانیسم ها را دارد. قدرت هدایت الکتریکی آن باید کمتر از ۱۵میکروزیمنس باشد. pH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی در هر حال نباید کمتر از ۵/۵ باشد.

پتری دیش

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولا پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. درصورت استفاده از پتری دیش هائی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود یا عدم وجود بقایای این ماده بررسی شود. اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برا ی میکروارگانیسم ها میباشد. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هایی از جنس بوروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هایی از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

استریل کردن محیط های کشت

استریل کردن، یک مرحله اساسی در تهیه محیط های کشت است. معمولا برای استریل کردن محیط های کشت از اتوکلاو استفاده می کنند. با این همه ارتباط نزدیکی بین مدت زمان لازم جهت استریل کردن و حجم محیط وجود دارد. حرارت بیش از حد ممکن است منجر به تخریب محیط های کشت گردد. بنابراین تنظیم دما و مدت زمان آن اهمیت ویژه ای دارد. در شرایط معمولی دمای 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه برای استریل کردن یک لیتر محیط کشت کافی است. در صورتیکه حجم

محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمـان بیشـتری لازم باشـد. کنتـرل کیفـی اتـوکلاو، کنترل دما و فشار اتـوکلاو بایسـتی بطـور مـداوم انجـام گـردد. بـرای کنتـرل اتـوکلاو از انـدیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اند یکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می‌کننـد اسپور *Bacillus stearothermophilus* را مـی تـوان نـام بـرد کـه بصـورت تجـارتی قابـل دسـترس می‌باشد.

|

پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحا ظ فیزیکـی و ظـاهری بررسـی شـوند. معیارهـای ظـاهری قابـل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگـی مـی باشـد. ضـخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط کشت های پلیتی۴میلی متر است. pH نیز از مهمتـرین معیارهـای فیزیکی میباشد که باید قبل ازاتوکلاو کردن و پس از آن با pH متر کالیبره شده اندازه گیری گردد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزا تشکیل دهنـده محـیط، نحـوه نگهـداری و انبـار کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط هـای کشـت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. اغلب محیط هـای کشـت کـه در پلیت تهیه می شوند در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولـی اگـر در در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخـل آنهـا نفـوذ نکنـد تـا ۳-۴ هفتـه قابـل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت های حاوی آنتی بیوتیک بسـتگی بـه پایـداری آنتـی بیوتیـک موجود در آن دارد. در مجموع محیطهای حاوی آنتی بیوتیک را در عرض یک هفته باید مصـرف کـرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افـزایش غلظـت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد.دمای پلیـت هـا را بایـد قبـل از مصـرف بـه دمـای اتـاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشـد. محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طـولانی دارنـد. اغلـب ایـن محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ماه قابل مصرف می باشند.

جدول شماره۱ علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پائین که موجب هیدرولیز آگار می گردد. توزین غلط، مخلوط نکردن خوب و عدم حل شدن
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در حرارت نامناسب، استفاده از pH متر استاندارد نشده و استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رنگ نامناسب	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد و pH نامناسب
تیره شدن شدن محیط	حرارت دادن بیش از حد، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده
رشد ضعیف ارگانیسم	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب ویا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده،توزین غلط وعدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.

کنترل کیفی محیط های کشت

برای کنترل کیفی محیط های کشت از سویه های کنترل کیفی استفاده می کنند. سویه های کنترل کیفی از منابع مختلف مانند American Type Culture Collection (ATCC) قابل تهیه می باشند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیسم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده وآن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمائید. کدورت را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج ۶۲۵nm وجذب ۰/۰۸ تا۰/۱۳ می باشد). به این روش می توان یک سوسپانسیون در سرم فیزیولوژی از کلنی های ۲۴ ساعته تهیه و کدورت آن را مطابق روش فوق تنظیم نمود.

برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هرپلیت ۱۰میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱-۲\times۱۰^{۴}$ عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های ایزوله بدست نیاید سوسپانسیون باید ده بار رقیق تر تهیه شود.

برای آزمایش ظرفیت مهارکنندگی (Inhibitory activity) محیط های کشت انتخابی، سوسپانسیون اولیه را به نسب۱ به ۱۰ درنرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰میکرولیتر یا۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $۱-۲\times۱۰^{۵}$ می باشد. جهت اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیط های کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر شود. برای آزمایش محیط های کشت لوله ای، هر لوله باید با ۱۰میکرولیتر یا ۰/۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه مطابق با نیم مک فارلند تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط کشت مورد کنترل کیفی را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول ۲-۴ آمده است انکوبه نما ئید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴- ۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در ۲ ± ۳۵ درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵% Co_2 انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموما به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی وغنی از Co_2 نیاز دارند. برای کمپیلوباکترآگار، پلیتها باید در۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

تفسیر نتایج

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲-۴، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسمهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیسم

های دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمـده اسـت باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲ کنترل کیفی محیط های کشت باکتریولوژیک متداول

محیط کشت	شرایط ومدت زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترل	نتایج مورد انتظار
ژلوزخون دار Sheep Blood Agar	هوازی و یا co_2 24 -18 ساعت دمای ۳۵°c	استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۵	رشد همولیز آلفا
		استرپتوکوکوس پایوژن ۱۹۶۱۵	رشد همولیز بتا
		استافیلوکوکوس اورئوس۲۵۹۲۳	رشد
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد
شکلات آگار	CO_2 24-48 ساعت دمای ۳۵°c	نیسریا گونوره ا ۴۳۰۶۹	رشد
		هموفیلوس آنفلوانزا ۱۰۲۱۱	رشد
محیط غنی کننده برای باسیلهای انتریک (GN)broth	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد پس از کشت مجدد
		شیگلا سونئی ۹۲۹۰	رشد پس از کشت مجدد، ممکن است بوسیله محیط سلنیت مهار شود
		اشریشیا کو لی۲۵۹۲۲	مهار(نسبی –کامل) پس از کشت مجدد،رشد پس از کشت مجدد از GN broth
ائوزین متیلن بلو EMB	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ تا کهربایی
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	رشد، آبی- سیاه، جلای سبز فلزی
		انتروکوکوس فکالیس ۲۹۲۱۲	عدم رشد (رشد جزئی)
هکتون انتریک آگار HE	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد ،کلنی های آبی تا آبی متمایل به سبز با مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	رشد و کلنی های سبزتا

			سبز متمایل به آبی با مراکز سیاه رنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار نسبی رشد، کلنی های زرد
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهاررشدکامل ویا نسبی، در صورت رشد کلنی به رنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی
مکانکی آگار	هوازی ۲۴- ۱۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد، کلنی های صورتی
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	رشد، کلنی های بیرنگ ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)
		سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ
		انتروکوکوس فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد نسبی
مانیتول سالت آگار	هوازی ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، دمای ۳۵°c	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشدکلنی های با هاله زرد پس از ۴۸ ساعت
		استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس ۱۲۲۲۸	رشد کلنی های با هاله قرمز رنگ پس از ۴۸ساعت
		پروتئوس میرابیلیس ۱۲۴۵۳	عدم رشد (نسبی)
سالمونلا شیگلا آگار	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد،کلنی های بیرنگ با ویا بدون رنگ سیاه در مرکز
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد، ،کلنی های بیرنگ
		انتروکوک فکالیس۲۹۲۱۲	مهار رشد(کامل)
		اشریشیا کولی۲۵۹۲۲	مهار رشد (کامل ویا نسبی ، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخی همراه با رسوب)

تیو گلیکولات با و یا بدون معرف	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای ۳۵°c	باکتروئیدوس فراژیلیس۲۵۲۸۵	رشد
محیط کشت های لوله ای مانند BHI ,TSB	هوازی۲۴-۴۸ ساعت دمای ۳۵°c	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°c	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد- کلنی های قرمز- مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری۱۲۰۲۲	رشد-کلنی های قرمز
		انتروکوک فکالیس ۲۹۲۱۲	مهار رشد (نسبی)
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	مهار رشد (نسبی تا کامل- کلنی های زرد تا قرمز متمایل به زرد)

References:
1- National Committee for Clinical Laboratory Standards: Quality assurance for commercially prepared microbiology culture media ed2 Approved standards; M22-A22) Wayne, Pa 1996 NCCLS
2- Mahon CR. Manuselis. Text book of Diagnostic Microbiology Ed. 2 –W. B Saunders Company .2000