

مقدمه

محیط های کشت نقش اساسی را در آزمایشگاه میکروپ 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 و تحقیقاتی 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 می رود. سه معیار مهم آب مورد استفاده در تهیه محیط های 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 ۱۵ میکروزیمنس 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. معمولاً پتری دیش ها را با اتیلن اکساید و یا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی به روش کروماتوگرافی وجود ی عدم وجود بقایای ای-ن ماده بررسی شود. اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برای 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 پلیانی 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. معمولاً 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

کنترل کیفیت محیط های کشت



محیط کشت بیش از یک لیتر باشد ممکن است مدت زمان بیشتری لازم باشد. کنترل کیفی اتوکلاو، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی استفاده می کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارآرائی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور *Bacillus stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجارتي قابل دسترس می باشد.

|

پارامتر های فیزیکی

محیط کشت های تهیه شده باید از لحاظ فیزیکی و ظاهری بررسی شوند. معیارهای ظاهری قابل بررسی شامل وجود حباب، حفره، ناصافی سطح محیط، ترک خوردگی، یخ زدگی می باشد. ضخامت محیط نیز اهمیت دارد. ضخامت محیط کشت های پلیتی ۴ میلی متر است. pH نیز از مهمترین معیارهای فیزیکی میباشد که باید قبل از اتوکلاو 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 دهنده محیط، نحوه نگهداری و انبار کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریواستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. اغلب محیط های کشت که در پلیت تهیه می شوند در دمای ۴ درجه سانتیگراد حداقل طول عمر آنها یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا ۳-۴ هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت های حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیطهای حاوی آنتی بیوتیک را در عرض یک هفته باید مصرف کرد. از سوی دیگر با گذشت زمان اینگونه محیط های کشت رطوبت خود را از دست داده، بدلیل افزایش غلظت آنتی بیوتیک قدرت انتخابی آنها افزایش می یابد. دمای پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از ۸ ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت تهیه شده در لوله در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شوند ۶-۳ ماه قابل مصرف می باشند.

جدول شماره ۱ 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 و عدم بهم زدن کافی محیط و حرارت بیش از حد.
داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین غلط و عدم 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.

کنترل کیفیت محیط های کشت



روش انجام آزمون کنترل کیفیت میکروبیولوژیکی محیط های کشت

یک کشت از ارگانیزم کنترل را روی پلیت تهیه کنید. بعد از انکوباسیون ۵-۳ کلنی ایزوله را در مقدار کمی TSB و BHI استریل سوسپانسیون کرده و آن 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 و جذب ۰/۰۸ تا ۰/۱۳ 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.

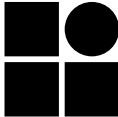
برای آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) یک محیط کشت پلیتی، سوسپانسیون اولیه را به نسبت ۱ به ۱۰۰ در نرمال سالین رقیق نموده و به هر پلیت ۱۰ میکرولیتر از سوسپانسیون رقیق شده را تلقیح می نمائیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $10^4 \times 1$ عدد می باشد. اگر برای محیط های خاصی کلنی های 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 نسبت ۱ به ۱۰ در نرمال سالین یا آب تخلیص شده رقیق نموده و در هر پلیت ۱۰ میکرولیتر یا ۰/۱ میلی لیتر سوسپانسیون رقیق شده تلقیح می کنیم. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت $10^5 \times 1$ 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 ۱۰ میکرولیتر 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 نمائید. به طور نرمال مدت زمان انکوباسیون ۲۴-۱۸ ساعت یا ۴۸-۲۴ ساعت در 35 ± 2 درجه سانتی گراد می باشد. شکلات آگار و محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در ۱۰-۵% CO₂ انکوبه شوند و در ۲۴-۱۸ ساعت و ۴۸-۲۴ ساعت بررسی شوند. برای بی هوازی ها، کشتها عموماً به حداقل ۴۸ ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی و غنی از CO₂ نیاز دارند. برای کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در ۴۲ درجه سانتی گراد در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از CO₂ به مدت ۴۸ ساعت انکوبه شوند.

تفسیر نتایج

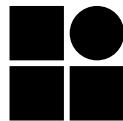
یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های آزمون پیشنهادی برای محیط کشت در جدول ۲-۴، رشد کافی داشته و خصوصیات رشد و مورفولوژی کلنی ها بارز باشد. در محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیزمهای خاص مهار می شود، در ضمن اینکه اجازه رشد کافی به ارگانیزم

کد: M-01/00 صفحه 5 از 7	کنترل کیفیت محیط های کشت	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------	---------------------------------	---

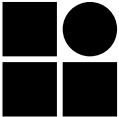
های دیگر می دهد. در بعضی موارد واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول ۲ آمده است باید ایجاد شود.

جدول شماره ۲ کنترل کیفی محیط های کشت باکتریولوژیک متداول

محیط کشت	شرایط و مدت زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترل	نتایج مورد انتظار
ژلوزخون دار Sheep Blood Agar	هوازی و یا CO ₂ 18-24 ساعت دمای ۳۵°C	استرپتوکوکوس پنومونیه ۶۳۰۵	رشد همولیز آلفا
		استرپتوکوکوس پایوژن ۱۹۶۱۵	رشد همولیز بتا
		استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	رشد
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد
شکلات آگار	CO ₂ 24-48 ساعت دمای ۳۵°C	نیسریا گونوره ۴۳۰۶۹	رشد
		هموفیلوس آنفلوانزا ۱۰۲۱۱	رشد
محیط غنی کننده برای باسیل های انتریک (GN)broth	هوازی ۱۸-۲۴ 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 کولی ۲۵۹۲۲	مهار (نسبی - کامل) پس از کشت مجدد، رشد پس از کشت مجدد از GN broth
اثوزین متیلن بلو EMB	هوازی ۱۸-۲۴ ساعت دمای ۳۵°C	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های بیرنگ تا کهربایی
		اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	رشد، آبی - سیاه، جلای سبز فلزی
		انتروکوکوس فکالیز ۲۹۲۱۲	عدم رشد (رشد جزئی)
هکتون انتریک آگار HE	هوازی ۱۸-۲۴ ساعت دمای ۳۵°C	سالمونلا تیفی موریوم ۱۴۰۲۸	رشد، کلنی های آبی تا آبی متمایل به سبز با مرکز سیاه
		شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲	رشد و کلنی های سبز تا

کد: M-01/00 صفحه 6 از 7	کنترل کیفیت محیط های کشت	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------	---------------------------------	---

سبز متمایل به آبی با مراکز سیاه رنگ			
مهار نسبی رشد، کلنی های زرد	انتروکوکوس فکاليس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد کامل و یا نسبی، در صورت رشد کلنی به رنگ زرد تا صورتی مایل به نارنجی	اشريشيا کولی ۲۵۹۲۲		
رشد، کلنی های صورتی	اشريشيا کولی ۲۵۹۲۲	هوای ۱۸ - ۲۴ ساعت دمای ۳۵°C	مکانکی آگار
رشد، کلنی های بیرنگ ، ممانعت از سوارمینگ (تا اندازه ای)	پروتئوس میرابيليس ۱۲۴۵۳		
رشد، کلنی های بیرنگ	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸		
مهار رشد نسبی	انتروکوکوس فکاليس ۲۹۲۱۲		
رشد کلنی های با هاله زرد پس از ۴۸ ساعت	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳	هوای ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت، دمای ۳۵°C	مانیتول سالت آگار
رشد کلنی های با هاله قرمز رنگ پس از ۴۸ ساعت	استافیلوکوکوس اپیدرمیديس ۱۲۲۲۸		
عدم رشد (نسبی)	پروتئوس میرابيليس ۱۲۴۵۳		
رشد، کلنی های بیرنگ با ویا بدون رنگ سیاه در مرکز	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	هوای ۲۴ ساعت دمای ۳۵°C	سالمونلا شینگلا آگار
رشد، کلنی های بیرنگ	شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲		
مهار رشد (کامل)	انتروکوک فکاليس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد (کامل و یا نسبی ، در صورت رشد کلنی های صورتی تا قرمز گل سرخی همراه با رسوب)	اشريشيا کولی ۲۵۹۲۲		

کد: M-01/00 صفحه 7 از 7	کنترل کیفیت محیط های کشت	 آزمایشگاه مرجع سلامت
--------------------------------	---------------------------------	---

رشد	باکترئوئیدوس فراژیلیس ۲۵۲۸۵	هوازی ۴۸ ساعت (درپوش محکم شده) دمای ۳۵°C	تیو گلیکولات با و یا بدون معرف
رشد	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲	هوازی ۲۴-۴۸ ساعت دمای ۳۵°C	محیط کشت های لوله ای مانند BHI , TSB
رشد	استافیلوکوکوس اورئوس ۲۵۹۲۳		
رشد - کلنی های قرمز - مرکز سیاه	سالمونلا تایفی موریوم ۱۴۰۲۸	هوازی ۲۴ ساعت دمای ۳۵°C	زایلوز لیزین دکربوکسیلاز XLD
رشد - کلنی های قرمز	شیگلا فلکسنری ۱۲۰۲۲		
مهار رشد (نسبی)	انتروکوک فکاليس ۲۹۲۱۲		
مهار رشد (نسبی تا کامل - کلنی های زرد تا قرمز متمايل به زرد)	اشریشیا کولی ۲۵۹۲۲		

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