



دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،  
آزمایشگاه میکروبیولوژی



# آزمایشگاه میکروب پایه

## آماده سازی محیط های کشت آزمایشگاهی

1

تهیه کننده : سهیلا عباسی



# مقدمه

بقا و رشد میکروارگانیسم ها وابسته به وجود مواد غذایی ، منابع انرژی و شرایط محیطی ایده آل برای رشد آنها می باشد در آزمایشگاه، مجموعه مواد و ترکیبات غذایی که میکروب جهت رشد و تکثیر نیاز دارد، تحت عنوان محیط کشت یا **medium** نامیده می شود محیطهای کشت بطور کلی بر سه پایه، شکل فیزیکی، خصوصیات شیمیایی و نوع عمل و کاربرد، طبقه بندی می شوند.

- ▶ با شناخت فاکتور های محیطی و مواد مغذی مورد نیاز رشد باکتری ها، ایجاد شرایط ویژه برای کشت آنها امکان پذیر می باشد.
- ▶ این شرایط شامل تعادل گازهای اتمسفر، مواد مغذی، دما و رطوبت نسبی هوا است.

## محیط های کشت باکتریایی

برای مطالعه باکتریها باید آنها را بر روی محیطهای مناسب در شرایط فیزیکی مناسب کشت داد این محیطها شرایط شیمیایی لازم برای رشد باکتریها را فراهم میکنند. امروزه انواع زیادی از محیط های کشت میکروبی با ترکیبات متفاوت برای استفاده در آزمایشگاه های میکروبیولوژی، توسط کارخانجات بزرگ تهیه گردیده است. این محیطهای کشت اکثرا بطور پودر مصنوعی (سنتتیک) تهیه شده اند که با حل کردن مقادیر مشخصی از آن در آب مقطر و سپس استریل کردن آنها، می توان سویه های میکروبی را در آن کشت داد.



**محیط کشت (culture medium) :** کشت و تکثیر باکتریها در محیطهای مصنوعی از مهمترین روشهای تشخیصی در باکتری شناسی است. برای کشت موفق باید شرایط مناسب برای رشد باکتری فراهم گردد. از جمله این شرایط مواد غذایی، حرارت و رطوبت کافی، نمک، pH مناسب و حضور یا عدم حضور اکسیژن می باشد .

امروزه کشت باکتریها اغلب بر روی محیطهای کشت مصنوعی صورت میگیرد. محیطهای کشت علاوه بر تامین نیازهای غذایی و بسیاری نیازهای دیگر دارای ترکیباتی هستند که در تشخیص و شناسایی باکتریها نیز موثرند. زمانی که غلظت میکروارگانیزم کم باشد با انجام کشت تعداد باکتریها را میتوان افزایش داد. محیط کشت در واقع محلول، سوسپانسیون یا

مخلوطی است محتوی مواد غذایی (نوترینت های) مورد نیاز برای رشد میکروب هایی که قابل کشت هستند؛ با این توضیح

که تعداد میکروبهایی که در طبیعت وجود دارند ولی در محیط های کشت رشد نمی کنند کم نیست!

این مواد غذایی یا اصطلاحاً نوترینت ها (nutrients) برای کشت باکتری های هتروتروف عمدتاً شامل موارد زیر هستند:

- منبع کربن (مثل انواع قندها)
- منبع نیتروژنی (مثل نمک آمونیم و یا پپتون، تریپتون و ...)
- ترکیبات نمکی (مثل  $\text{NaCl}$  و  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  و ...)
- ترکیبات ایجاد کننده حالت بافری (مثل  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ،  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  و  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )
- معرف های pH که با تغییر رنگ آنها میتوان به اسیدی یا قلیایی بودن محیط پی برد (مثل فنل رد در محیط TSI agar)
- برخی عناصر کمیاب که به مقدار جزئی در برخی محیطهای خاص وارد می شوند (مثل نمک مولیبدن در محیط کشت تثبیت کنندگان نیتروژن)

لازم به توضیح است همه موارد فوق در همه محیط های کشت الزاماً وجود ندارند و بسته به نوع میکروب، ترکیبات موجود در محیط کشت متفاوت هستند. با این وجود برای رشد میکروارگانیسم های هتروتروف (که منبع کربن آن ها ترکیبات آلی هستند) در محیط یک منبع کربنی لازم است. برای رشد اکثر میکروارگانیسم ها (به استثنای باکتری های تثبیت کننده نیتروژن) وجود یک منبع نیتروژنی هم در محیط ضروری است. گاهی در ساخت برخی محیط های کشت از عصاره های خاصی مانند عصاره مخمر (yeast extract)، پپتون (peptone) و تریپتون (tryptone) نیز استفاده می شود. این ترکیبات تأمین کننده کربن و نیتروژن مورد نیاز برای رشد میکروب در محیط هستند.

## انواع محیط کشت از نظر شکل فیزیکی (حالت محیط) :

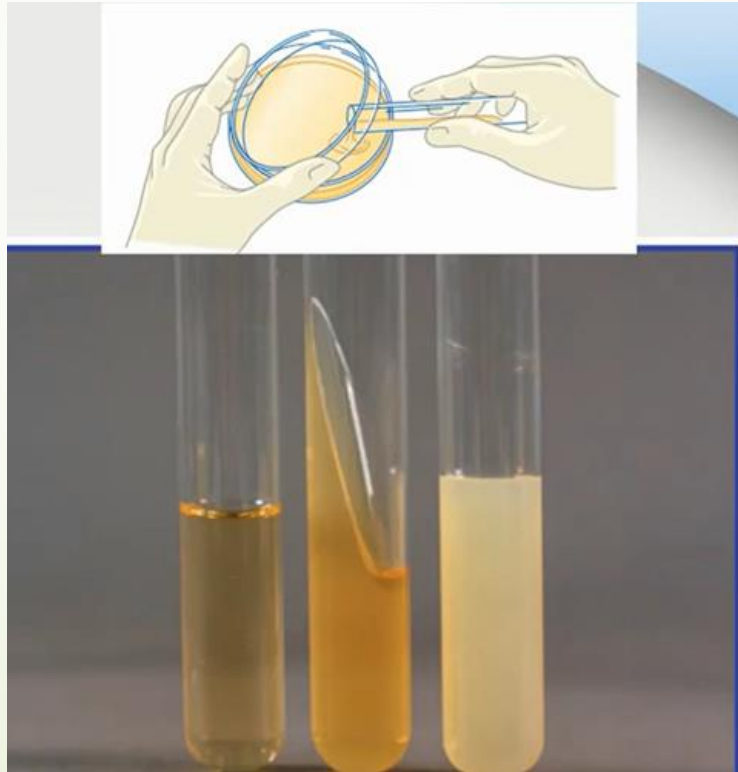
محیط مایع با broth media فاقد آگار بوده و آبگوشت، شیر یا عصاره هستند. رشد میکروبهها در آنها بصورت کدورت دیده می‌شود. آبگوشت مغذی (nutrient broth) حاوی عصاره گوشت گاو و پیتون حل شده در آب بوده و یک محیط معمول و پر مصرف است.

لیتموس میلک (litmus milk) مایع کدری است که حاوی شیر کامل و رنگ است. تیوگلیکولات، مایع چسبنده‌ای است که برای تعیین مصرف اکسیژن بوسیله باکتریها بکار می‌رود. محیط مایع یا آبگوشت می‌توانند محیط کشت مناسبی برای رشد سریع تعداد زیادی از میکروارگانیسمها در بررسیها بر روی رشد و بسیار از تستهای بیوشیمیایی باشند.

این محیط بطور معمول در درون لوله، ارلن یا بطریهای مخصوص ساخته می‌شود و رشد میکروبهها در اینگونه محیطها بصورت کدورت نمایان می‌شود. هر چند رسوب و رشد به صورت پرده‌ای در سطح مایع نیز مشاهده می‌شود.



محیط نیمه جامد یا *semidolid media* دارای کمتر از ۱٪ آگار، در مطالعه رشد، در تعیین حرکت، در پیشبرد رشد بیهوازی، مورد استفاده قرار گیرد. از جمله این محیطها، محیط SIM است که حاوی ۰/۳ تا ۰/۵ درصد آگار می باشد و برای بررسی حرکت و تولید هیدروژن سولفور و واکنش اندول بکار می رود تنها درون لوله آزمایش مورد استفاده قرار می گیرد.



تهیه کننده : سهیلا عباسی

محیط کشت جامد یا solid media دارای ۱/۵٪ یا بیشتر آگار محیط جامد مثل blood agar, nutrient agar برای اهداف زیر استفاده می‌شوند:

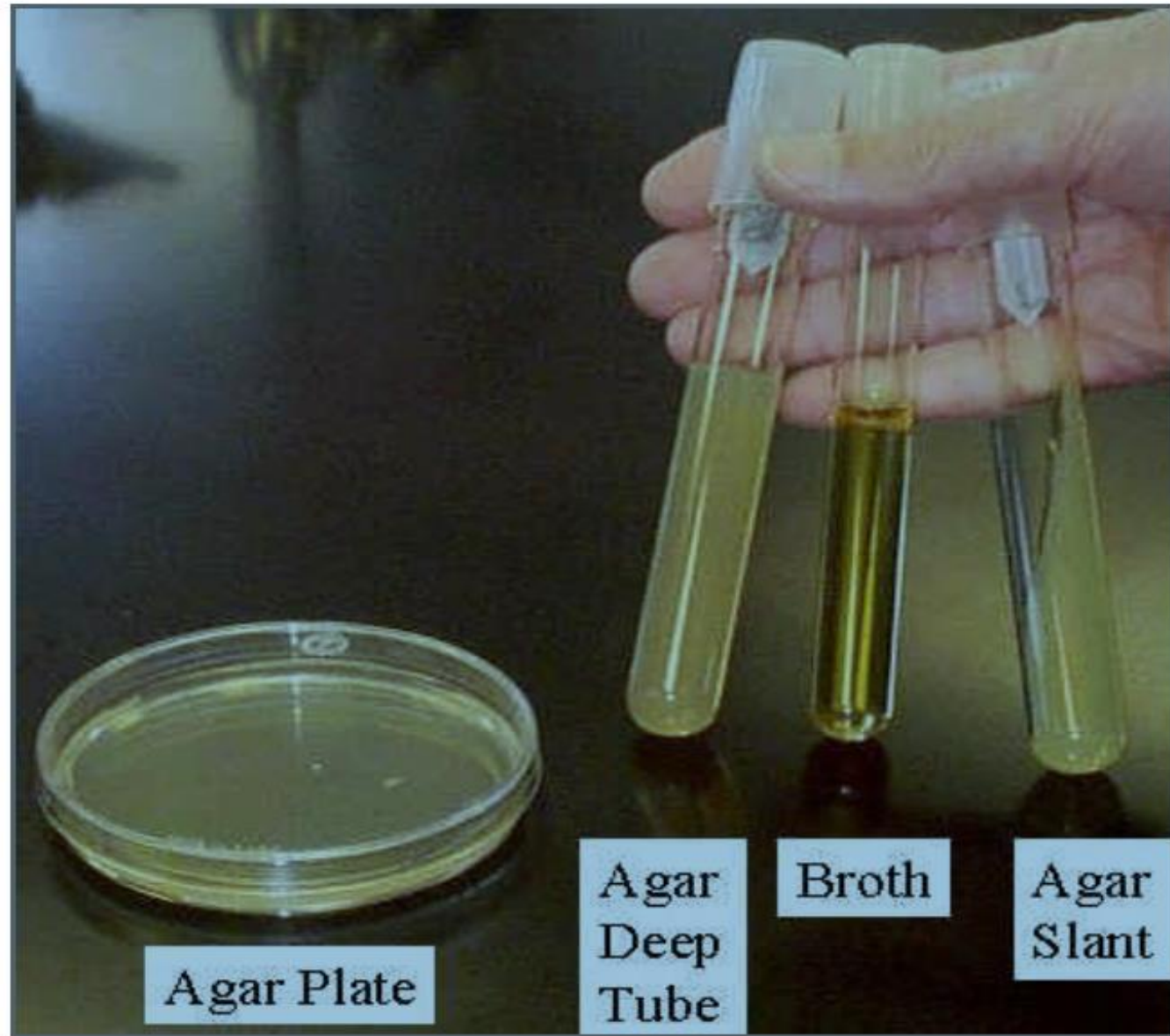
(۱) رشد میکروارگانیسمها در سطح به منظور بررسی ظاهر کلنی.

(۲) برای جداسازی کشت خالص

(۳) برای نگهداری کشتها

(۴) برای مشاهده تستهای شیمیایی خاص

محیط کشت جامد می‌تواند در لوله یا در پلیت تهیه شود. محیط کشت جامد در داخل لوله می‌تواند به فرم اسلنت (slant agar) و یا به فرم deep tube agar درست شود.



تفاوت اصلی بین این محیطها در وجود ماده سفت کننده که معمولاً آگار است در محیطهای جامد و نیمه جامد و نبودن آن در محیط مایع است.

آگار ترکیبی است پلی ساکاریدی که از دیواره سلولی نوعی جلبک قرمز استخراج می شود. این پلیمر از زیرواحدهای گالاکتوز به صورت دو نوع پلیمر آگارز (agarose) و آگاروپکتین (agaropectin) ساخته شده است. این ترکیب به عنوان عامل سفت کننده (solifying agent) در محیط کشت استفاده می شود. زمانی که آگار در آب وارد شود برای حل شدن آن باید آب را به دمای 100 درجه سانتیگراد رسانید. پس از جوشاندن آب و حل شدن آگار با سرد شدن و

رسیدن دمای آن به حدود 46 درجه، آگار در محیط کشت شبکه ای ایجاد می کند که سبب جامد شدن محیط می شود.

اگر محیط کشت دارای 15 تا 20 گرم در لیتر ( 1.5 %) آگار باشد به آن محیط کشت جامد می گویند. در نامگذاری محیط کشت جامد، از کلمه آگار در انتهای نام محیط کشت استفاده می شود مثلاً نوترینت آگار (آگار مغذی)، ائوزین متیلن بلو آگار (EMB agar) ، بلاد آگار (Blood Agar) و غیره.

اگر در محیط کشت آگار وجود نداشته باشد به آن محیط کشت مایع گفته می شود که در نام محیط هم کلمه برات (broth) دیده می شود. مثال های معروف محیط کشت های مایع عبارتند از نوترینت برات (آبگوشت مغذی)، لاکتوز برات و غیره.

حالت دیگر محیط های کشت زمانی است که در یک محیط کشت مقدار آگار نسبت به محیط جامد کمتر باشد. به این نوع محیط کشت نیمه جامد (semi-solid) گفته می شود. از معروف ترین محیط های کشت نیمه جامد می توان محیط کشت SIM را نام برد.

## انواع محیط‌های کشت آزمایشگاهی (کاربرد)

➔ **محیط کشت ساده:** ساده ترین نوع محیط های کشت آزمایشگاهی هستند که دارای ترکیبات ساده مغذی مانند کربوهیدرات، مواد معدنی، ویتامینها، پروتئین و آب می باشند.

# محیط های پیچیده یا کمپلکس

- معمول ترین محیط های کشت آزمایشگاهی بوده که دارای انواع مختلفی از مواد مانند عصاره گوشت، پروتئین ها، مواد مغذی، ویتامین ها و سایر مواد غذایی می باشند. معروف ترین این محیط های کمپلکس نوترینت برات یا آبگوشت مغذی نام دارد که دارای ۵ گرم پپتون، ۱۰ گرم عصاره گوشت، ۵ گرم کلرور سدیم و الیتراب مقطر است.
- چنانچه آگار به محیط کشت افزوده شود، محیط کشت جامد می گردد. مانند نوترینت آگار یا آگار مغذی.
- بیشتر باکتری هایی که رشد آسان دارند مانند اشیریشیاکلی در این محیط به راحتی رشد می کنند.

## محیط‌های کشت اختصاصی یا غنی کننده

➤ بسیاری از باکتری های بیماریزا به ویژه آنهایی که در پزشکی دارای اهمیت هستند به سادگی رشد نمی کنند و نیاز به محیط های کشت غنی تر از محیط های کمپلکس مانند آگار مغذی دارند. دو نمونه از محیط‌های کشت غنی که در آزمایشگاه ها کاربرد بیشتری دارد عبارتند از :

➤ **آگار خون دار :** که علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای خون به عنوان ماده غنی کننده و فاکتور رشد مناسب هستند و برای کشت گونه های باکتری استرپتوکوکوس پایوژنز که عامل عفونت گلو هستند به کار می رود.

➤ **شکلات آگار :** علاوه بر ترکیبات محیط کمپلکس دارای گویچه های قرمز خونی لیز شده و مواد مغذی اضافی است.

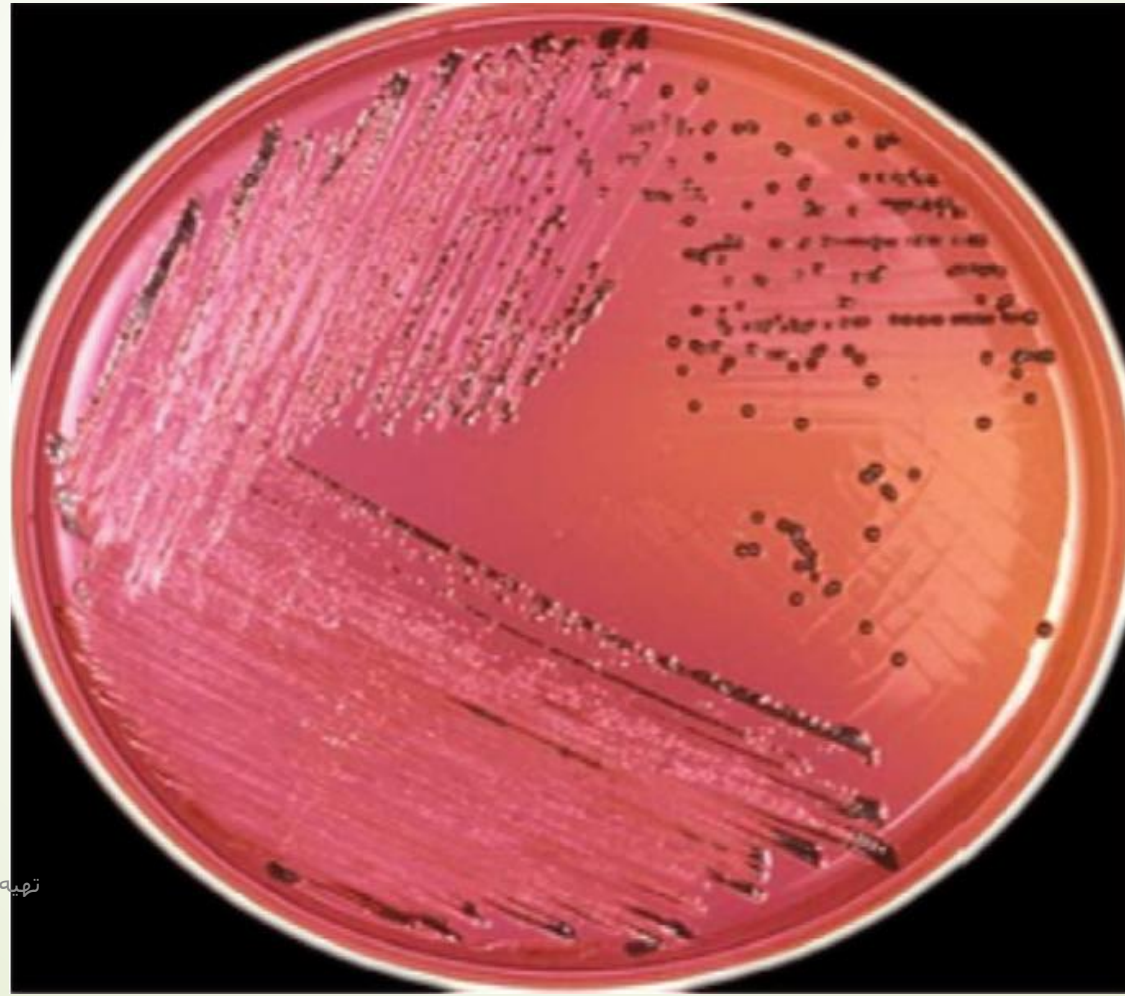
## محیط های کشت انتخابی

محیط های کشتی که از رشد یک گروه از میکروارگانیسم ها نسبت به گروه دیگر جلوگیری می کنند و تنها باعث رشد میکروب مورد نظر در محیط کشت می شوند، محیط کشت انتخابی نامیده می شوند. ترکیباتی مانند آنتی بیوتیک ها، برخی رنگ ها مثل کریستال ویوله و نمکهای صفراوی جزء مواد انتخابی هستند که اگر به محیط کشت کمپلکس افزوده شوند آنها را تنها برای تکثیر پاره ای از باکتری ها مساعد می کنند.

معروف ترین محیط های کشت انتخابی مک کانکی آگار است. این محیط دارای رنگ کریستال ویوله (برای جلوگیری از رشد باکتری های گرم مثبت) و املاح صفراوی (برای جلوگیری از رشد گرم منفی های غیر روده ای) می باشد. در نتیجه در محیط مک کانکی آگار تنها باکتری های گرم منفی روده ای مانند سالمونلا، شیگلا و اشریشیاکلی می توانند رشد کنند



# کلنی باکتری سالمونلا در محیط کشت مک کانکی آگار



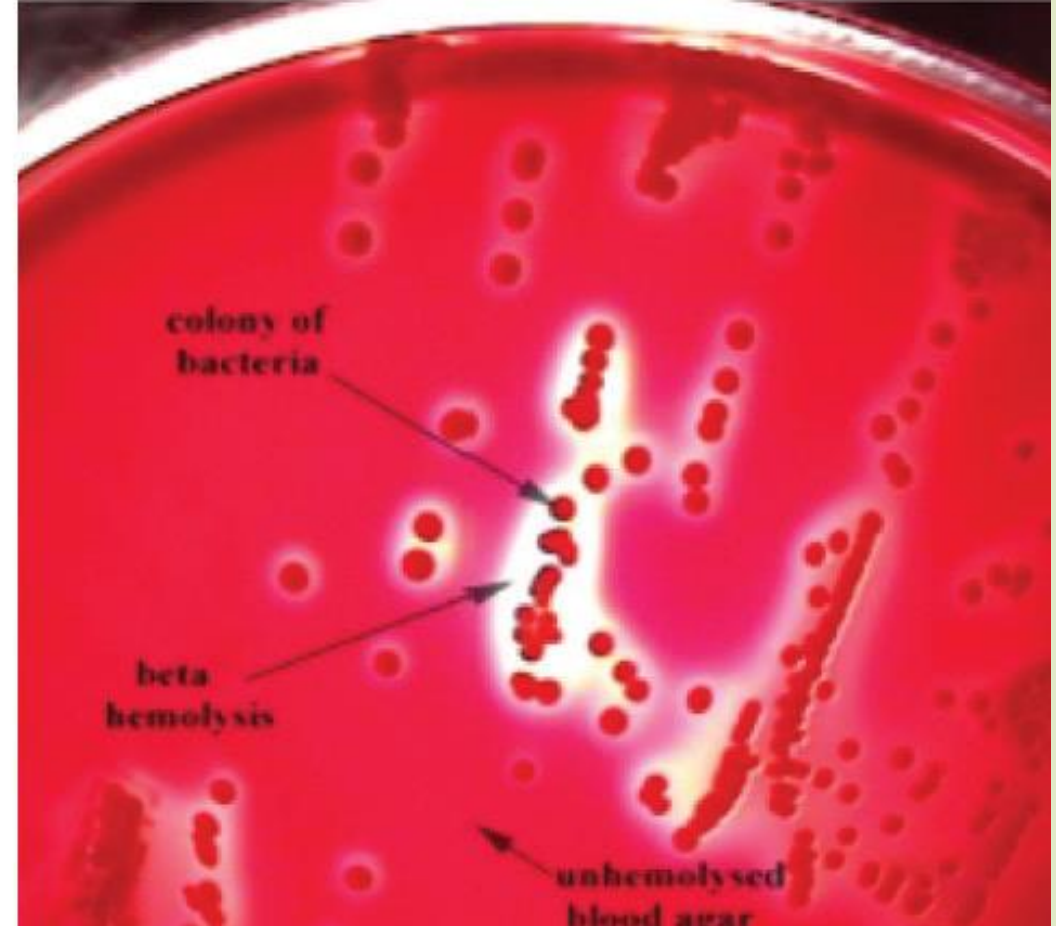
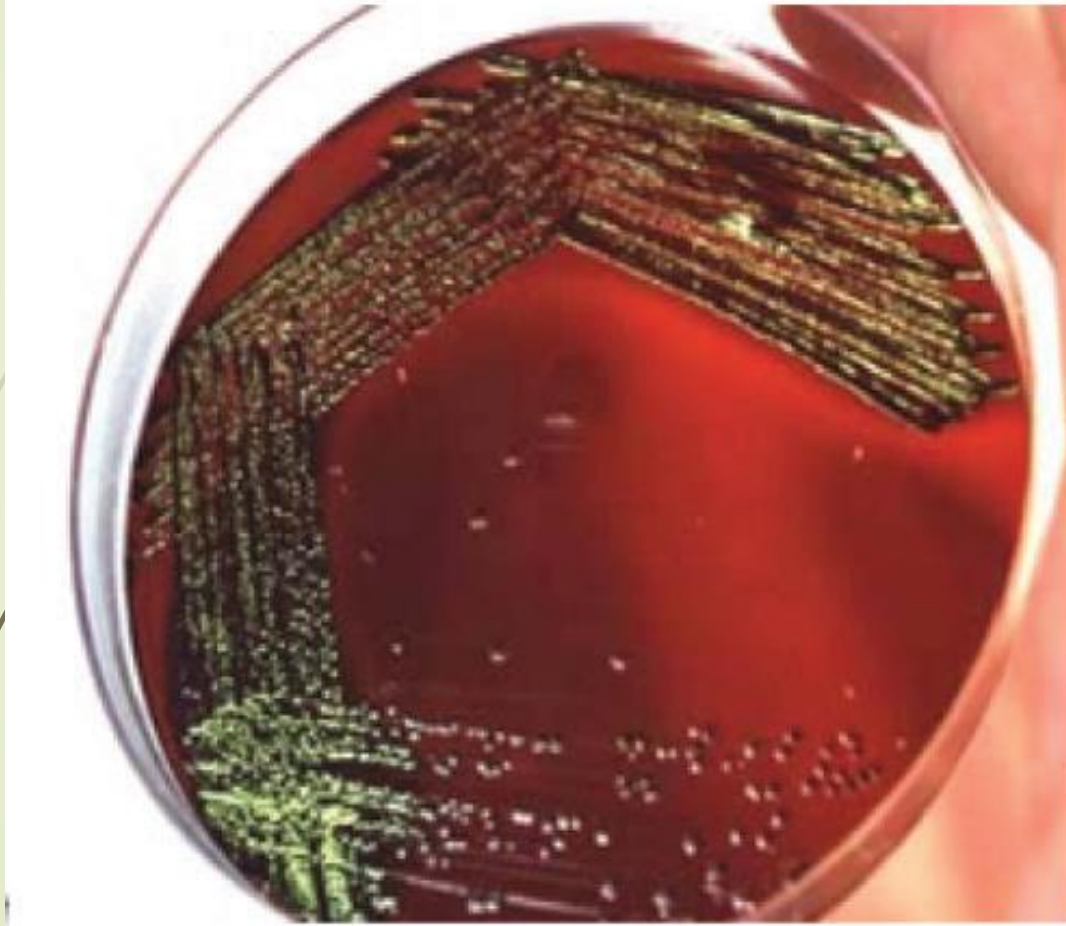
تهیه کننده : سهیلا عباسی

## محیط های کشت افتراقی

این نوع محیط کشت برای تشخیص کلنی میکروارگانیسم های مورد نظر از کلنی سایر باکتری ها به کار می رود که یا از روی رنگ کلنی مانند کلنی های سبز با جلای فلزی و براق باکتری اشیشیا کلی در محیط افتراقی ائوزین متیلن بلو و یا از روی میزان همولیز در محیط های افتراقی خون دار استفاده می شود.

باکتری های همولیز کننده خون از باکتری های بدون همولیز تشخیص داده می شوند (از روی هاله همولیز اطراف کلنی).





تهیه کننده : سهیلا عباسی



توزین مواد سازنده یا پودر آماده محیط. از اسپاتول برای انتقال  
مواد به کاغذ یا ظرف توزین استفاده کنید.

تهیه کننده : سهیلا عباسی



مخلوط کردن محیط. مواد به یک ارلن آب مقطر موجود بر روی دستگاه همزن مغناطیسی اضافه می شود. حرارت و چرخش یک آهن ربا موجب مخلوط شدن محیط می شود.

برای ساختن محیط مایع (Broth) پس از جوشاندن، محیط را در لوله ها با ارلن ها تقسیم کرده و سپس با پنبه ای درب آنها را مسدود و جهت استریل داخل اتوکلاو قرار می دهیم. محیط های مایع همیشه داخل لوله تهیه می شوند.



اتوکلاو لوله های دارای محیط. سبدها لوله ها برای استریل شدن در درون اتوکلاو گذاشته شد.



تقسیم محیط به درون لوله ها. از یک پمپ قابل تنظیم می توان برای تقسیم بندی استفاده کرد.

## استریلیزاسیون توسط دستگاه اتوکلاو

اتوکلاو دستگاهی است که جهت سترون کردن مواد و وسایل آزمایشگاهی تحت گرما، بخار و فشار بالا، در حجم ها و اندازه های متنوع طراحی شده است. منبع گرمایی اتوکلاوها بصورت برقی یا گازی بوده و هر اتوکلاو شامل یک محفظه دوجداره بصورت یک دیگ میباشد. در پایین دیگ یک شیر تنظیم آب وجود دارد که میتوان از طریق آن آب اضافی را خارج نمود.



کامل، ارلن را در اتوکلاو قرار می‌دهیم تا در فشار 15 پوند بر اینچ مربع و حرارت 121 درجه سانتیگراد به مدت 15 دقیقه استریل شود. بعد از استریل کردن، محیط‌ها باید تا حدود ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتیگراد خنک شوند. سپس محیط را در کنار شعله به پلیتهای استریل انتقال می‌دهیم به طوری که حدود دوسوم حجم پلیت را پر کند و بلافاصله درب پلیتها را می‌بندیم. پس از جامد شدن محیط کشت که چند دقیقه‌ای طول می‌کشد، محیط مذکور جهت انتقال میکروبها و کشت آنها آماده است. پلیتها را تا زمان استفاده در یخچال 4 درجه سانتی گراد نگهداری می‌کنند.

طرز ساختن سایر محیطهای کشت نیز همینطور می‌باشد منتهی بعضی از محیطهای جامد پس از جوشاندن، در لوله ریخته شده و بعد استریل می‌شوند که این محیطها را پس از استریل شدن، به طور ایستاده و یا کج (slant) قرار مدهند تا سرد و سفت شوند.

برای ساختن محیط مایع (Broth) پس از جوشاندن، محیط را در لوله‌ها با ارلن‌ها تقسیم کرده و سپس با پنبه‌ای درب آنها را مسدود و جهت استریل داخل اتوکلاو قرار می‌دهیم. محیط‌های مایع همیشه داخل لوله تهیه می‌شوند.





تهیه کننده : سهیلا عباسی





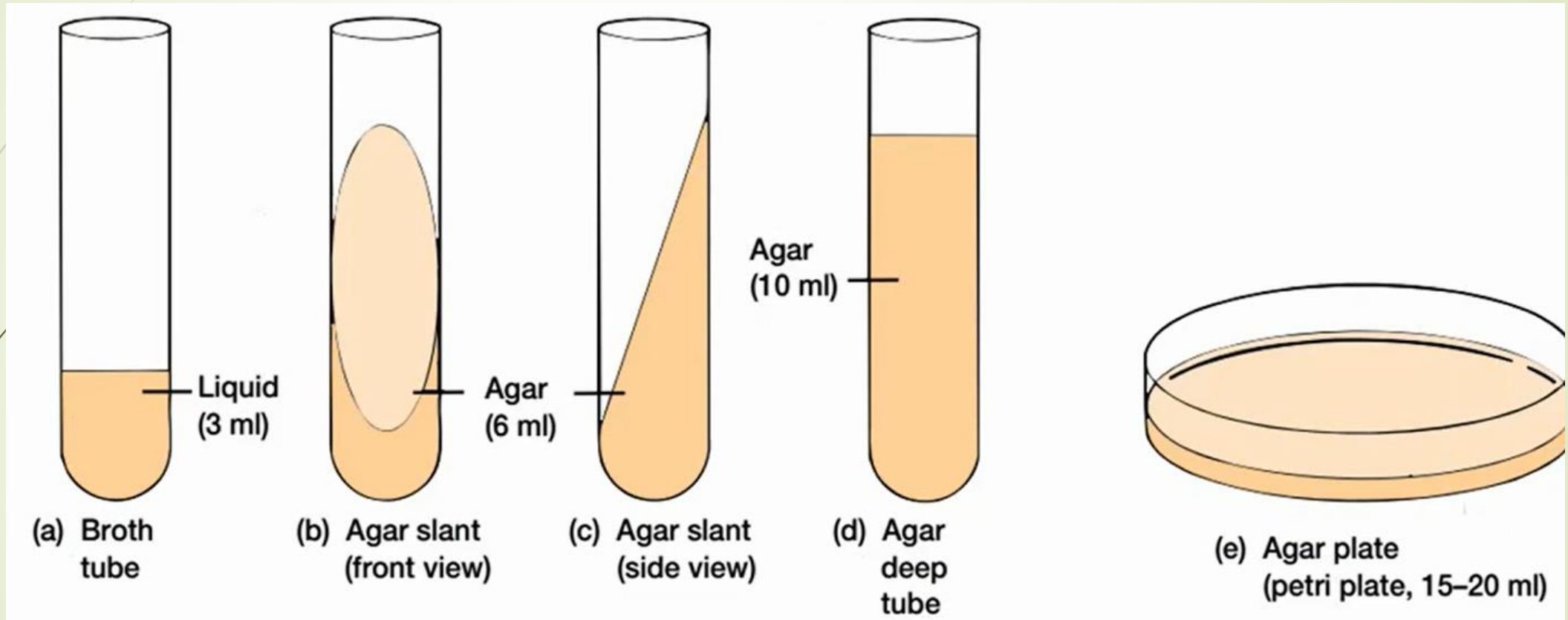
تجهه كنده : سهيلا عباسي



تهیه کننده : سهیلا عباسی



رغبه کننده : سهیلا عباسی



# Culture Media used in Microbiology



تهیه کننده : سهیلا عباسی

با سیاس فراوان از توجه شما