دانشگاه اصفهان

دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروبیولوژی پایه

محیط کشت سازی

تهیه کننده : سهیلا عباسی

زمینه ی نظری

- محیط های کشت در آزمایشگاه میکروبیولوژی به ۶ دسته تقسیم می شوند.
- محیط های کشت پایه تمام نیاز های کشت باکتری را دارد که شامل منبع کربن که از انواع قند ها، منبع نیتروژن که از نمک های آمونیوم دار و عصاره مخمر، یون های ضروری مانند سدیم، پتاسیم، منیزیم و ترکیبات بافری ر محیط کشت و آب است، که بیش از ۷۰٪ باکتری ها روی آن رشد می کند. نوترینت آگار یک محیط کشت پایه است.
- محیط های کشت غنی شده علاوه بر تمامی موارد کشت پایه، یکسری از فاکتور های ضروری برای رشد باکتری ها خاص مانند خون، شیر و... را دارا می باشد. بلاد آگار یک محیط کشت غنی شده می باشد.
محیط های کشت انتخابی فقط یک دسته خاصی از باکتری های در آن رشد می کنند. بلاد آگار سدیم آزید دار یک محیط کشت انتخابی است.
- محیط های کشت افتراقی که توانایی تشخیص چند نوع باکتری مختلف را به ما می دهد. محیط کشت EMB(ائوزین متیلن بلو) یک محیط کشت افتراقی است
- محیط های کشت بیوشیمایی
- محیط های کشت آنتی بیوتیک دار مشابه کشت انتخابی است و برای سنجش حساسیت یک جنس خاص از باکتری ها به آنتی بیوتیک های مختلف استفاده می شود.

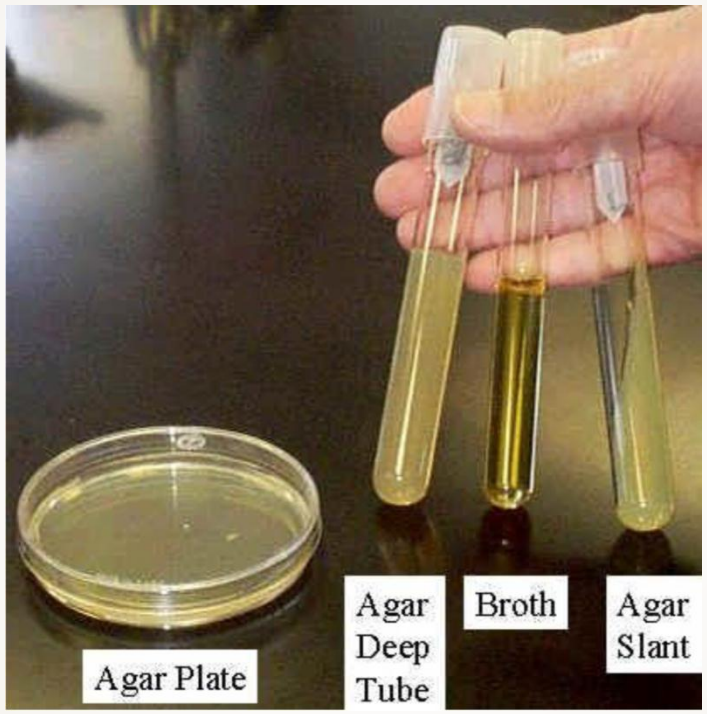
- نوع دیگر تقسیم بندی بر اساس محیط کشت جامد، مایع و نیمه جامد است.
- از محیط کشت جامد برای تشخیص نوع و تعداد کلنی ها و گونه های میکروبی استفاده می شود. در گذشته ها از ژلاتین برای جامد کردن محیط استفاده می شد، ولی امروزه از آگار که نوعی پلی ساکارید است که از نوعی جلبک دریایی حاصل می شود. برای غنی کردن، تکثیر باکتری ها و در بیوتکنولوژی از محیط کشت مایع استفاده می شود. برای تشخیص حرکت باکتری ها از محیط کشت نیمه جامد استفاده می شود. محیط های کشت جامد ۲٪ آگار و نیمه جامد بین۰.۵٪ تا ۱٪ آگار دارند.

روش کار

- امروزه اکثر محیط های کشت مورد استفاده در میکروب شناسی به صورت پودرهای آماده وجود دارند که برای تهیه آن ها باید طبق دستور مقدار معینی از هر محیط کشت را با مقدار مناسبی آب مقطر مخلوط کرد. برای این منظور ابتدا مقدار لازم را در ارلن مایر می ریزیم و مقدار پودر مشخص شده را به تدریج در آن وارد می کنیم و هم می زنیم تا پودر گلوله نشود و به طور یکنواخت حل گردد. گاهی برای تهیه محیط های کشت لازم است مقادیر معینی از مواد مختلف را با مقدار مناسبی آب مقطر مخلوط کرد.در هر صورت در مواقعی که آگار در ترکیب محیط کشت وجود دارد باید آن را در محیط حل کرد به این منظور بعد از مخلوط کردن مقدار لازم پودر و آب ضروری است که مخلوط حاصل جوشانده شود تا رنگ محیط کاملا شفاف گردد به این منظور می توان ازهیتر مغناطیسی کرد که با هم زدن از سوختن و ته گرفتن آگار جلوگیری کند. پس از آماده شدن محیط باید آن را توسط اتوکلاو استریل کرد. اگر منظور تهیه محیط کشت در پلیت باشد محیط را در همان ارلن مایری که تهیه کرده ایم در داخل اتوکلاو به مدت ۱۵ الی ۲۰ دقیقه استریل می کنیم پس از بیرون آوردن ارلن حاوی محیط کشت از داخل اتوکلاو اجازه می دهیم تا دمای آن حدود بین ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی گراد کاهش یلبد سپس در کنار شعله با رعایت شرایط سترون به مقدار ۱۰ تا ۱۵ سی سی در هر پلیت تقسیم می کنیم. برای تهیه محیط کشت در لوله آزمایش باید پس از مخلوط کردن و حرارت دادن مقدار پودر و آب مقطر مشخص در داخل ارلن محیط مذکور را در داخل لوله های آزمایش تقسیم نمود . معمولا تا ۳/۱ لوله ها را از محیط کشت پر می نمایند و سپس آن ها را اتوکلاو می کنند. اگر منظور تهیه محیط آگار شیب دار باشد باید لوله ها را بعد از خارج کردن اتوکلاو به طور کج قرار داد تا محیط کشت بسته شود.

نتیجه

- محیط کشت مایع در لوله های آزمایش ساخته شد و در اتوکلاو گذاشته شد.



- **گزارش کار تهیه ی محیط کشت**

هدف:آشنایی با تهیه ی محیط کشت

مقدمه

تعریف کشت :

هنگامیکه باکتریها در شرایطی مناسب قرار گیرند که قادر به تکثیر و رشد باشند اصطلاحا گفته می شود باکتری کشت داده شده است .

تعریف محیط کشت :

از آنجا که میکروب یک موجود تک سلولی بوده و قادر است کلیه اعمال حیاتی خود را مستقلا انجام دهد بدون آنکه نیاز به سلول دیگری داشته باشد . این اصل بیانگر آن است که میکروبها هم احتیاج به غذا و آب و موادآلی و معدنی دارند. محیطی مغذی که حاوی کلیه احتیاجات یک میکروب اعم از مواد غذایی و عناصر و غیره باشد که موجب رشد آن میکروب شود را اصطلاحا محیط کشت می گویند.

این محیط کشت می تواند بصورت دست ساز بوده یا یطور طبیعی یعنی داخل سلولهای بدن یک جانور باشد. خون بهترین محیط برای رشد یک باکتری می باشد جون تمام احتیاجات یک بامتری اعم از اکسیزن ، مواد مغذی ، PH مناسب ، درجه حرارت لازم و غیره را برای یک باکتری فرآهم می کند.

- میکروبها را می توان بر روی محیطها و در ظروف مختلف کشت داد که انتخاب شکل بستگی به نوع کشت داد. مثلا در کشتهایی که محیط آن مایع است ظروف کشت لوله ای می باشد و محیطهای جامد(آگاردار) هم در پلیت و هم در لوله کشت داده می شوند.
بیشتر محیطهای کشت که درپلیت مصرف می شوند ، محیطهای کشت عمومی هستند که اساسا برای تهیه مواد غذایی لازم جهت رشد باکتری ساخته شده اند . بعضی مواقع این محیطهای کشت عمومی را با اضافه کردن اجزای مغذی که موجب افزایش سریع رشد ارگانیسمها ی سخت رشد می شوند ، غنی می کنند. ماهیت این مواد مغذی چنان است که نمی توان آنها را همراه با محیط اصلی سترون کرد ، بلکه باید بعد از اتوکلاو شدن محیط بطور سترن این مواد اضافه شوند. نمونه هایی از این مواد مغذی عبارتند از : شیر بی چربی ، خون گوسفند ، زرده تخم مرغ و ....
اولین گروه مایع هستند که براث نامیده می شوند مانند نوترین براث- مولر هینتون براث

Media and Culture

in bacteriology labs

- Definition
- History
- Main aims
- Rate of solidity

Agar

- composed of two long-chain polysaccharides (70% agarose and 30% agarapectin).
- melts at 95°C and solidifies at 42°C.
- it is not hydrolyzed by most bacteria and is usually free from growth promoting or growth retarding substances.
- commonly, used at concentration of 1-3% to make a solid agar medium. Reducing the amount of agar to 0.2-0.5% for semi-solid media.
- Stuart's, Amies media, Hugh & Leifson's oxidation fermentation as well as SIM motility medium are semi-solid.

Medium

- Types based on solidity:

1. **Liquid medium**

BHI, TSB, SF, NB, …

2. **Solid medium**

Blood agar, Nutrient agar, chocolate agar, Columbia agar, EMB

3. **Semi-solid medium**

SIM

4. **Biphasic media**

Castaneda system

Egg yolk & serum
too as solidifier

- While serum and egg yolk can be rendered solid by coagulation using heat.
- Serum containing medium, such as:

- Loeffler's serum slope
- Lowenstein Jensen medium
- Dorset egg medium are solidified

Undefined medium & Defined medium

- A *Undefined medium* is a *basal* or *complex* medium.

Contains:

- A source of amino acids and nitrogen (e.g., beef, yeast extract)
- A carbon source. such as glucose
- water
- Various salts

Defined medium

- A *defined medium* (a synthetic medium) is a medium in which

- all the chemicals used are known
- no yeast, animal or plant tissue is present

Is this an Undefined medium or Defined medium ?

Nutrient media (Broth/Agar)

Nutrient agar medium composition:

- Beef Extract-0.3gm (mineral and carbohydrate)
- Peptone-0.5gm (protein and nitrogen source)
- NaCl-0.5gm (electrolyte)
- Agar-1.5gm (solidifying agent)
- Distilled water-100ml pH-7

Minimal media

contain the minimum nutrients possible for colony growth, generally without the presence of amino acids.
used to grow "wild type" microorganisms and select for or against recombinants.

Minimal medium typically contains:

- A carbon source (such as glucose, or a less energy-rich source like succinate.
- various salts (provide essential elements such as magnesium, nitrogen, phosphorus, and sulfur to allow the bacteria to synthesize protein and nucleic acid
- Water

Supplementary minimal media

- A type of minimal media that also contains a single selected agent, usually an amino acid or a sugar.
- This supplementation allows for the culturing of specific lines of auxotrophic recombinants.

Culture media
based on the application in clinical labs

- General medium (Nutrient agar, Muller hinton agar, Nutrient broth, …)
- Selective/Special medium (EMB, MSA, …)
- Differential medium (MAC [*MacConkey agar*], *EMB, XLD, …)*
- Enrichment medium (SF, RV [Rappaport-Vassiliadis Broth], TT, alkaline peptone water …)
- Enriched medium (Blood agar, Chocolate agar, cold enrichment)
- Transport medium (Stuart, Cary-Blair, Amies, …)

Cary-Blair: exclusively associated with enteric transport

Stuart & Amies: widely used for the transportation of a diverse range of clinical swab samples from sites including the eye, ear, nose, throat, skin, genital tract and wounds.

- Galleries (TSI, SIM, MRVP, Citrate agar, ….)

General medium

- Theoretically it supports cultivation of many bacteria.
- Nutrient agar, Muller hinton agar, Nutrient broth, …

Selective/Specialized medium

- Certain media are designed in such a way that
- different bacteria can be recognized on the basis of their colony colour. Various approaches
- include incorporation of dyes, metabolic substrates etc, so that those bacteria that utilize them
- appear as differently coloured colonies. Such media are called differential media or indicator
- media. Exmples: MacConkey's agar, CLED agar, TCBS agar, XLD agar etc.

Selective/Specialized medium

- Some examples of selective media include:
- Eosin methylene blue (EMB) that contains methylene blue – toxic to Gram-positive bacteria, allowing only the growth of Gram negative bacteria
- YM (yeast and mold) which has a low pH, deterring bacterial growth
- MacConkey agar for Gram-negative bacteria
- **brilliant green agar**, a medium that inhibits Gram-positive bacteria while permitting Gram-negative organisms such as *Salmonella* species to grow.

Selective/Special medium

- Hektoen enteric agar (HE) which is selective for Gram-negative bacteria
- Mannitol salt agar (MSA) which is selective for Gram-positive bacteria and differential for mannitol
- Terrific Broth (TB) is used with glycerol in cultivating recombinant strains of *Escherichia coli*.
- xylose lysine desoxyscholate (XLD), which is selective for Gram-negative bacteria
- Buffered charcoal yeast extract agar, which is selective for certain gram-negative bacteria, especially *Legionella pneumophila*

Differential media

- Blood agar which contains bovine heart blood that becomes transparent in the presence of hemolytic streptococcus.
- Eosin methylene blue (EMB), which is differential for lactose and sucrose fermentation.
- MacConkey (MCK), which is differential for lactose fermentation.
- Mannitol salt agar (MSA), which is differential for mannitol fermentation.
- violet red bile agar is used to distinguish coliform bacteria from noncoliform organisms.

Enrichment medium

- liquid media that also serves to inhibit commensals in the clinical specimen. Selenite F broth, tetrathionate broth and alkaline peptone water are used to recover pathogens from fecal specimens.
- SF, RV [Rappaport-Vassiliadis Broth], TT, alkaline peptone water …

Transport Media

- Maintain the viability of organisms in specimen.
- No altering microorganism concentration.
- Contain only buffers and salt.
- Lack of carbon, nitrogen, and organic growth factors.
- Transport media used in the isolation of anaerobes must be free of molecular oxygen.

Transport Media

- Thioglycolate broth for restrict anaerobes.
- Stuart transport medium - a non-nutrient soft agar gel containing a reducing agent to prevent oxidation, and charcoal to neutralise.
- Certain bacterial inhibitors- for gonococci, and buffered glycerol saline for enteric bacilli.
- Venkat-Ramakrishnan(VR) medium for v. cholerae.

Anaerobic media

- **Anaerobic media:** Anaerobic bacteria need special media for growth because they need
- low oxygen content, reduced oxidation –reduction potential and extra nutrients. Media for
- anaerobes may have to be supplemented with nutrients like hemin and vitamin K. Boiling the
- medium serves to expel any dissolved oxygen. Addition of 1% glucose, 0.1% thioglycollate, 0.1%
- ascorbic acid, 0.05% cysteine or red hot iron filings can render a medium reduced. Robertson
- cooked meat that is commonly used to grow Clostridium spps medium contain a 2.5 cm column of

Anaerobic media

- bullock heart meat and 15 ml of nutrient broth. Before use the medium must be boiled in water
- bath to expel any dissolved oxygen and then sealed with sterile liquid paraffin. Methylene blue or
- resazurin is an oxidation-reduction potential indicator that is incorporated in the thioglycollate
- medium. Under reduced condition, methylene blue is colourless.

با تشکر از حسن توجه شما