تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت

نکات عمومی در مورد محیط های کشت:

آب:

کیفیت محیط های کشت بطور مستقیم بستگی به کیفیت مواد خام مورد استفاده در تهیه آنها دارد. آب یکی از مهمترین موادی است که در تهیه محیط های کشت بکار میرود. سه معیار مهم برای آب مورد استفاده در تهیه محیط های کشت شامل وجود یونهای مس، قدرت هدایت الکتریکی و pH می باشد. در شرایط ایده آل یونهای مس بدلیل خاصیت مهارکنندگی برای اغلب میکروارگانیسم ها نباید در آب مورد استفاده جهت تهیه محیط های کشت وجود داشته باشد. قدرت هدایت الکتریکی آب باید کمتر از 15 میکرو زیمنس باشد وهمچنینpH آب مورد استفاده بهتر است کمی اسیدی باشد ولی نباید کمتر از 5/5 باشد.

توزین محیط کشت و افزودن آب:

طبق دستورالعمل تهیه محیط کشت که بر روي قوطي نصب گرديده است، مقدار مناسبي از پودر محیط کشت را با دقت وزن نماييد. ظرف محیط کشت را دور از کوران هوا و رطوبت باز کنید. از استنشاق پودرها به خصوص آنهايي که داراي مواد سمي هستند و تماس طولاني مدت آنها با پوست اجتناب کنید. پودر را به سرعت، به دقت و بدون ايجاد توده اي از غبار وزن کنید. هرچه زودتر درب ظرف را ببندید. نصف حجم آب مورد نياز را داخل ظرف بريزيد. سپس مقدار وزن شده محیط کشت را به آن اضافه نماييد. براي چند دقيقه به تندي تکان دهيد. باقيمانده آب را به ديواره ظرف بريزيد تا ذرات محیط کشت چسبيده به ديواره نيز وارد محلول شوند. اين مرحله بسيار مهم است، چون پودر خشک محیط کشت در بالاي سطح آب، ممکن است در اتوکلاو استريل نشود و منبع آلودگي گردد.

حل کردن محیط کشت:

محیط هاي کشت بدون آگار، معمولا با تکان دادن آهسته و ملايم حل خواهند شد. اما محیط هاي کشت حاوي آگار بايد قبل از حرارت دادن به مدت چند دقيقه با آب مخلوط شوند. سپس حرارت داده شوند تا آگار قبل از اتوکلاو کردن، حل شود. محیط هاي کشت را بجوشانيد بدون آنکه بسوزند.

محیط هاي کشتي که نبايد اتوکلاو شوند، بعد از اين مقدار حرارت دادن، براي تقسيم داخل پليت ها يا ظروف ديگر آماده خواهند بود. اکثر محیط هاي کشت به استريليزاسيون نهايي (در دماي $121^{\circ}C$ به مدت 15 دقيقه) نياز خواهند داشت.

اندازه گيري و تنظيم pH:

محیط هاي کشت دهيدراته اگر بطور مناسب تهيه شوند نيازي به تنظيم pH ندارند. pH نهايي محصول استريل شده را مي توان روي پليت يا بطري اندازه گيري کرد، اما بايد آنها را بعد از سنجش pH دور ريخت. بنابراين بعد از استريل شدن و خنک شدن محیط کشت تا دماي $25^{\circ}C$، مقدار pH را در حد مورد نظر (0/2 ±) تنظيم نماييد. تنظيم pH معمولا با استفاده از هيدروکسيد سديم 40 گرم در ليتر

(تقريبا" يک مولار) و يا با استفاده از اسيد کلريدريک 36/5 گرم در ليتر (تقريبا" يک مولار) انجام مي شود.

توزيع:

محيط کشت را در ظرفي مناسب با حجم 2 تا 3 برابر حجم محيط کشت بريزيد تا بتوانيد آنرا به خوبي تکان دهيد و مخلوط کنيد.

استريليزاسيون:

بعضي از محيط هاي کشت به استريليزاسيون با اتوکلاو احتياجي نداشته و با جوشاندن استريل مي شوند که دستور ساخت آنها بر روي برچسب قوطي محيط کشت قيد گرديده است. استريليزاسيون ساير محيط هاي کشت توسط حرارت مرطوب يا صافي غشايي انجام مي گردد که اين موارد نيز بر روي بر چسب قوطي محيط کشت قيد گرديده است.

الف) استريليزاسيون با حرارت مرطوب:

استريليزاسيون محيط کشت تا حجم يک ليتر، در اتوکلاو به مدت 15 دقيقه و در دماي $121^{\circ}C$ (فشار 1/2 کيلوگرم بر سانتيمترمربع) انجام مي گيرد. براي حجم هاي بيشتر از يک ليتر بايد چرخه استريليزاسيون را بطور مناسب تغيير داد. اما چون اکثر مشکلات در استريليزاسيون محيط هاي کشت وقتي رخ ميدهد که مقادير بيشتر از دو ليتر محيط کشت بايد استريل شود، لذا توصيه مي شود که مقادير زياد محيط کشت را در حجم هاي کوچکتر تقسيم نماييد.

کنترلی کیفی اتوکلاو ، کنترل دما و فشار اتوکلاو بایستی بطور مداوم انجام گردد. برای کنترل اتوکلاو از اندیکاتورهای شیمیائی TST استفاده می کنند. از اندیکاتورهای بیولوژیکی که جهت کنترل کارائی اتوکلاو استفاده می کنند اسپور *Bacillus Stearothermophilus* را می توان نام برد که بصورت تجاری قابل دسترس می باشد.

ب) استريليزاسيون با صافي غشايي:

از صافي غشايي براي استريل کردن محيط هاي کشت و ترکيبات حساس به حرارت استفاده مي شود. استريليزاسيون بوسيله صافي غشايي تحت شرايط خلاء يا افزايش فشار انجام مي پذيرد. از غشاء ها و صافيهاي با قطر منفذ 0/22 يا 0/45 ميکرومتر استفاده نماييد. اين فيلترها بايد قبل از استفاده، در اتوکلاو استريل شوند. در مورد غشاء ها و صافيهايي که در بسته بنديهاي استريل به فروش مي رسند، به دستورالعمل سازنده مراجعه نماييد. قسمت هاي مختلف دستگاه صافي را با صافي يا بدون صافي در اتوکلاو به مدت 15 دقيقه در دماي $121^{\circ}C$ استريل نماييد.

آماده سازي جهت مصرف:

بعد از استريليزاسيون، اجازه دهيد دماي محيط كشت به حدود 50 C برسد، سپس با رعايت شرايط آسپتيک در ظروف نهايي تقسيم نماييد. هيچ وقت محيط كشت را در دماي بالاتر از 50 C تقسيم نكنيد. مكمل هاي حساس به گرما و حرارت بايد بعد از اين كه دماي محيط كشت به حدود 50 C رسيد، به آن اضافه شوند. اجازه دهيد دماي مكمل (ساپلمنت) استريل قبل از اين كه به محيط كشت اضافه شود، به دماي اتاق برسد. سپس مكمل را با رعايت شرايط آسپتيک به محيط كشت اضافه نموده، خوب مخلوط كنيد و در ظروف نهايي كه از قبل استريل شده اند، تقسيم نماييد.

پتری دیش:

کیفیت پتری دیش های مورد استفاده در تهیه محیط نیز اهمیت دارد. معمولاً پتری دیش ها را را با اتیلن اکساید ویا اشعه گاما استریل می کنند. در صورت استفاده از پتری دیش هایی که با اتیلن اکساید استریل شده باشند بایستی از نظر وجود بقاياي اين ماده بررسی شود زیرا اتیلن اکساید دارای خاصیت مهار کنندگی برای میکروارگانیسم ها می باشد و می توان آن را با روش کروماتوگرافی اندازه گرفت. در صورت استفاده از پتری دیش های شیشه ای بایستی از پتری دیش هايي از جنس بروسیلیکات استفاده کرد. استفاده از پتری دیش هايي از جنس قلیائی ممکن است موجب آزاد سازی قلیا در داخل محیط کشت گردد.

پارامترهای فیزیکی:

محیط کشت های تهیه شده باید قبل از استفاده، از لحاظ فیزیکی و ظاهری نیز 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 های کشت پلیتی نباید کمتر از 3 میلی متر باشد.

نگهداری محیط های کشت تهیه شده:

طول عمر محیط های کشت تهیه شده بستگی به نوع اجزاء تشکیل دهنده محیط، نحوه نگهداری و ذخیره کردن آنها دارد. تمامی محیط های کشت باید دور از نور نگهداری شوند. تابش نور به محیط های کشت موجب تشکیل مواد باکتریوستاتیک و باکتریساید مانند پراکسیداز می گردد. طول عمر اغلب محیط های کشت پليتي در دمای 4 درجه سانتیگراد یک هفته می باشد ولی اگر در داخل کیسه های پلاستیکی بسته بندی شوند بطوریکه هوا داخل آنها نفوذ نکند تا 4-3 هفته قابل مصرف هستند. طول عمر محیط های کشت حاوی آنتی بیوتیک بستگی به پایداری آنتی بیوتیک موجود در آن دارد. در مجموع محیط های حاوی آنتی بیوتیک را در مدت 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. پلیت ها را باید قبل از مصرف به دمای اتاق رساند. اگر پلیت محیط کشت بیش از 8 ساعت در دمای اتاق باقی بماند برای مصرف مناسب نمی باشد. محیط های کشت لوله اي در مقایسه با محیط های کشت پلیتی عمر طولانی تري دارند. اغلب این محیط های کشت اگر در دمای 4 درجه سانتیگراد نگهداری شوند 6-3 ماه قابل مصرف می باشند.

موارد استثناء: تايوگليكولات براث، اندول نيترات براث و SIM فقط بـه مدت يكماه قابل نگهداري مـي باشند. محيط هاي CTA Medium و OF Medium حاوي كربوهيدرات و مولرهينتون براث فقط به مدت 6 هفتـه قابل نگهداري مي باشند.

جدول 1- علل اشکالات رایج در محیط های کشت

اشکال	علت
نرم بودن آگار	حرارت بیش از حد، pH پایین که موجب هیدرولیز اسید در محیط کشت می گردد، توزین یا مخلوط نکردن درست، حل نشدن کامل آگار، حجم نادرست آب، رقیق سازي زیاد با مایع تلقیح یا مکمل ها و ذخیره سازي طولاني در دماي 50 ^{o}C
pH نامناسب	استفاده از شیشه های قلیائی، آب ناخالص، حرارت بیش از حد، آلودگی شیمیائی، اندازه گیری pH در دماي نامناسب، استفاده از pH متر غیرکالیبره، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، ذخیره سازي نادرست محیط کشت دهیدراته و کیفیت پایین آب یا ظروف
رنگ یا تیرگي غیرطبیعي	ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، حرارت دادن بیش از حد، pH نامناسب، حل نشدن کامل محیط کشت و ذخیره سازي طولاني در دماي 50 ^{o}C
سمیت	حرارت دادن بیش از حد (سوزاندن محیط)، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، قرارگیري در معرض مستقیم نور خورشید و حجم نادرست مکمل اضافه شده
رشد ضعیف ارگانیسم یا داشتن خاصیت ضعیف انتخابی و یا افتراقی	استفاده از آب و یا شیشه آلات آلوده، استفاده از پودرهای محیط کشت خراب شده، توزین یا مخلوط نکردن درست، حرارت بیش از حد، ذخیره سازي طولاني محیط کشت، خشك شدن، تیرگي وتغییر pH محیط کشت
لخته یا کواگوله شدن محیط کشت	حرارت بیش از حد محیط در هنگام افزودن مکمل به آن
رگه رگه شدن محیط کشت	رگه رگه سیاه: نیم سوز شدن آگار رگه رگه روشن: سرد شدن آگار موقع افزودن مکمل
ایجاد رسوب یا کدورت	pH نامناسب، ناخالص بودن آب، استفاده از شیشه آلات کثیف، حل نشدن محیط کشت، کیفیت پایین آب یا ظروف، حرارت بیش از حد و ذخیره سازي طولاني در دماي 50 ^{o}C

کنترل کیفی محیط های کشت میکروبی:

اصطلاحات مربوط به سویه های میکروبی کنترل

- سویه کنترل (Control Strain): میکروارگانیسمی که برای ارزیابی عملکرد میکروبی محیط کشت استفاده می شود.
- سویه مرجع (Reference Strain): میکروارگانیسمی که حداقل تا سطح جنس و گونه شناسایی شده و بر اساس ویژگی ها و ترجیحاً منشا آن، فهرست بندی و تعریف شده است.
- ذخیره های مرجع (Reference Stocks): کشت های بدست آمده از پاساژ سویه مرجعی که از مراکز بین المللی تهیه شده است.
- ذخیره های کاری (Working Stocks): کشت مجددی که از کشت های ذخیره جهت کنترل کیفیت محیط های کشت استفاده می شود.

منبع سویه های کنترل:

همه سویه های کنترل که در جدول 2 از آنها نام برده شده است، ATCC می باشند (American type culture collection). این سوشها، حداقل سوشهایی هستند که باید برای ارزیابی هر محیط کشت استفاده شوند. ارگانیسم های مورد استفاده برای اهداف کنترل کیفی مي تواند از سویه های National collection باشد. سویه های دیگری نیز ممکن است توسط سازنده محیط کشت به کار رود که شامل مجموعه ای از سویه های وحشی (Wild strain) یا بدست آمده از نمونه های بیمار می باشد که مختص هر آزمایشگاه بوده و برای انجام آزمایش هاي بیشتر به کار می روند.

روش انجام آزمون کنترل کیفیت محیط های کشت

تهیه سوسپانسیون میکروبی:

یک کشت از ارگانیسم کنترل کیفی روی پلیت بلادآگار تهیه کنید. بعد از انکوباسیون پلیت 5-3 کلنی ایزوله را در مقدار کمی تریپتیکیس سوی براث (TSB) استریل حل نمایید تا سوسپانسیون میکروبی حاصل شود و آن را برای چهار یا پنج ساعت انکوبه نمایید. سپس کدورت آن را با استاندارد نیم مک فارلند تنظیم کنید. (استاندارد نیم مک فارلند در طول موج 625 nm، دارای جذب 0/08 تا 0/1 ناتومتر می باشد)

به جای این روش می توان مستقیماً از کلنی های ایزوله روي پلیت، سوسپانسیون میکروبی مطابق با کدورت نیم مك فارلند تهیه کرد. بدین ترتیب که 5-3 کلنی ایزوله روی پلیت 24 ساعته را در 5-3 میلی لیتر سرم فیزیولوژی استریل حل کرده و کدورت آن را با نیم مک فارلند تنظیم نمایید. با هر روشی که این سوسپانسیون میکروبي تهیه شود، باید کدورتي حاوی 10^7-10^8 CFU/ml کلنی داشته باشد. (مطابق با استاندارد نیم مک فارلند).

بررسی آزمایش هاي عملکردی محیط کشت (Performance testing)

1- **آزمایش ظرفیت مغذی بودن (Nutritional activity) محیط هاي کشت پلیتی** مانند بلاد آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **1 به 100** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl 10 یا ml 0/01 سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^4-10^3 می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون را ده بار رقیق تر تهیه نمایید.

2- **آزمایش ظرفیت مهار کنندگی محیط های کشت انتخابی پلیتي** مانند مکانکي آگار

سوسپانسیون اولیه را به نسبت **1 به 10** در نرمال سالین یا آب مقطر استریل رقیق نموده و مقدار µl 10 یا ml 0/01 سوسپانسیون رقیق شده را به محیط کشت مورد آزمایش تلقیح کنید. تعداد کلنی های مورد انتظار در هر پلیت (CFU/plate) 10^5-10^4 می باشد. برای اجتناب از رشد زیاد باکتری در بعضی از محیطهای کشت انتخابی ممکن است نیاز باشد که سوسپانسیون ده بار رقیق تر تهیه شود.

3- آزمایش محیط های کشت لوله ای

هر لوله باید با µl 10 یا ml 0/01 از سوسپانسیون اولیه تهیه شده مطابق با نیم مک فارلند (بدون رقیق سازي) تلقیح شود. گاهی ممکن است به تلقیح کمتر یا بیشتر نیاز باشد.

محیط مورد آزمون را بعد از تلقیح تحت شرایطی که در جدول 2 آمده است، انکوبه نمایید. به طور نرمال زمان انکوباسیون، 24-18 ساعت یا 48-24 ساعت در دمای $35\pm2\ ^oC$ می باشد. محیط شکلات آگار و سایر محیط های کشت برای جداسازی انتخابی گونه های نیسریای بیماریزا باید در 10- 5% Co_2 انکوبه شوند و در فواصل زماني24-18 ساعت وسپس 48-24 ساعت بررسی گردند.

برای باکتري هاي بی هوازی، کشتها عموماً به حداقل 48 ساعت انکوباسیون در شرایط بی هوازی و غنی از Co_2 نیاز دارند.

در مورد کمپیلوباکتر آگار، پلیتها باید در $42\ ^oC$ در شرایط میکروآئروفیلیک غنی از Co_2 به مدت 48 ساعت انکوبه شوند.

4- کنترل محیط های کشت براي آزمایشهاي بیوشیمیایی

از سوسپانسیون میکروبی رقیق نشده برای کنترل این محیطها استفاده می کنیم.

پس از تلقیح، تمام کشت ها را در شرایط لازم (از نظر Co_2، رطوبت و یا شرایط بیهوازی و درجه حرارت مناسب) قرار داده و پس از طی مدت زمان لازم (24 تا 48 ساعت) آنها را مورد بررسی قرار می دهیم. محیط های مناسب دارای رشد کافي از کلنی های باکتریهاي مورد نظر مي باشند و در مورد محیطهای انتخابی مهار میکروارگانیسمهای مورد نظر باید مشخص باشد.

کنترل محیط های ساخته شده تجاری (آماده مصرف):

1- رطوبت: محیطهای کشت باید بدون هر گونه رطوبت اضافی بوده، همچنین هیچ نشانه ای از خشک شدن اطراف محیط کشت نباید مشاهده گردد.

2- سترون بودن: محیطهای کشت باید عاري ازآلودگی باشند.

رنگ: محیطهای کشت آگار خوندار نباید هیچ نشانه ای از همولیز داشته باشند و محیطهای کشت دیگر نباید هیچگونه تغییر رنگ غیر طبیعی داشته باشند.

بررسی آلودگی محیط های کشت (استریل بودن محیط های کشت):

در صورتیکه تعداد پلیت یا لوله تهیه شده در هر سری ساخت یا Lot، 100 عدد یا کمتر باشد، باید به تعداد 3-5% محیط هاي تهیه شده را در دماي ^{o}C 37-35 به مدت 5-2 روز انکوبه نمود. برای Lot های با تعداد بیش از 100، باید به تعداد 10 پلیت یا لوله را به طور تصادفی برداشته و در شرایط فوق انکوبه نمود. بعد از انکوباسیون هیچ گونه رشد میکروبی نباید مشاهده شود.

تفسیر نتایج:

یک محیط کشت زمانی قابل قبول می باشد که با همه سویه های پیشنهادی برای آزمون محیط کشت که در جدول 2 مشخص شده است، رشد کافی داشته و خصوصیات مورفولوژیکي کلنی ها بارز باشد. در مورد محیط های انتخابی، رشد بعضی از ارگانیسم های خاص مهار می شود، ضمن اینکه اجازه رشد کافی به سایرارگانیسم می دهد. در بعضی موارد، واکنشهای رنگی خاص یا همولیز همچنانکه در جدول 2 آمده است، باید ایجاد شود. مثلاً در مورد کشت بلادآگار ایجاد همولیز مناسب ضروری است و یا برای محیط مکانکی آگار ایجاد واکنش های رنگی برای سویه های میکروبی مشخص ضروری می باشد.

سایر معیارهای تضمین کیفیت:

محیطهای کشت آماده مصرف باید از نظرموارد زیر نیز بررسی شوند:

- شکستگی ظروف پتری
- پر شدن ناصاف پلیتها
- ترک خوردگی محیط کشت در پلیتها
- وجود همولیز (برای بلاد آگار)
- یخ زدگی
- وجود مقدار زیاد حباب یا حفره در سطح محیط کشت

جدول 2

محیط کشت	زمان انکوباسیون	ارگانیسم های کنترلی	نتیجه قابل انتظار

بایل اسکولین آگار	24 ساعت	*استرپتوکوک فکالیس* *S. faecalis* *استرپتوکوک پایوژنز* *S. pyogenes*	رشد مثبت، محیط سیاهرنگ می شود رشد منفی
بلاد آگار جار شمع دار CO_2	24 ساعت	*استرپتوکوک پایوژنز* *Streptococcus pyogenes* *استرپتوکوک پنومونیه* *S. pnemoniae*	رشد مثبت دارای همولیزبتا رشد مثبت دارای همولیز آلفا
شکلات آگار	24 ساعت	*هموفیلوس آنفلوانزا* *Haemophilus influenzae*	رشد مثبت
لایزین دکربوکسیلاز (محیط بوسیله روغن استریل پوشانده میشود)	48 ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *شیگلافلکسنری* *Shigella flexneri*	مثبت (بنفش رنگ می شود) منفی (بدون تغییر رنگ)
اورنیتین (دکربوکسیلاز)	48 ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *کلبسیلا پنومونیه* *K. pneumoniae*	مثبت منفی
آرژینین (دی هیدرولاز)	48 ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *پروتئوس میرابیلیس* *Proteus mirabilis*	مثبت منفی
ژلاتیناز	24 ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli* *باسیلوس سوبتیلیس* *Bacillus subtilis*	منفی مثبت
کلایگلرآیرون آگار	24 ساعت	*سیتروباکتر فروندی* *Citrobacter frundii* *سالمونلا تایفی موریوم* *S. typhimurium* *شیگلا فلکسنری* *Sh. flexneri* *اسینتوباکتر کالکوستیکوس* *Acinetobacter calcoaceticus*	گاز + $A/A, SH_2$ گاز یا بدون گاز + $K/A, SH_2$ K/A تغییر نمی کند
مک کانکی آگار (همراه با کریستال ویوله)	24 ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli* *پروتئوس میرابیلیس* *Proteus mirabilis* *استرپتوکوک فکالیس* *S. faecalis*	کلنی های قرمز رنگ کلنی های بیرنگ، بدون سوارمینگ (خزش) رشد منفی
مالونات	24 ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli* *کلبسیلا پنومونیه* *K. pneumonia*	منفی (سبز رنگ) مثبت (آبی رنگ)
مانیتول سالت آگار	24 ساعت	*استافیلوکوک اورئوس* *S. aureus* *S. epidermidis* *استافیلوکوک اپیدرمیدیس* *اشرشیا کلی* *E. coli*	کلنی های زرد رنگ کلنی های قرمز رنگ رشد منفی
MRVP	48 ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli* *کلبسیلا پنومونیه* *K. pneumonia*	MR مثبت- VP منفی MR منفی- VP مثبت
مولرهینتون آگار	24 ساعت	*استافیلوکوک اورئوس* *S. aureus ATCC 25923* *سودوموناس آئروژینوزا* *P. aeruginosa ATCC 27853* *اشرشیا کلی* *E. coli ATCC 25922*	به جدول میزان هاله عدم رشد قابل قبول در بخش آنتی بیوگرام مراجعه شود
نیترات براث	24 ساعت	*اشرشیا کلی* *E. coli*	مثبت

		اسینتوبا کتر کالکوستیکوس *Acinetobacter calcoaceticus*	منفی
آب پپتونه (اندول)	24 ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	مثبت
		کلبسیلا پنومونیه K. pneumoniae	منفی
فنیل آلانین دآمیناز	24 ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	منفی
		پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	مثبت
سالمونلا شیگلا آگار (S.S) یا دزوکسی کلات سیترات آگار	24 ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	منفی
		سالمونلا تایفی موریوم *Salmonella typhimurium*	کلنی های بیرنگ
		یرسینیا انتروکولیتیکا *Yersinia enterocolitica*	کلنی های بیرنگ
		شیگلا فلکسنری Shigella flexneri	کلنی های بیرنگ
سلنیت برات (SF)	24 ساعت	*سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium*	بعد از کشت مجدد رشد می کند
		اشرشیا کلی E. coli	بعد از کشت مجدد رشد نمی کند
سیمون سیترات (در لوله های با درپیچ شل در انکوباتور گذاشته شود)	48 ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	رشد منفی
		کلبسیلا پنومونیه K. pneumonia	رشد مثبت- رنگ آبی
TCBS آگار	24 ساعت	*Vibrio SPP*	کلنی های زرد رنگ
تایر مارتین	24 ساعت	*نایسریا منتژیتیدیس* *Neisseria meningitidis (CO_2)*	رشد مثبت
		نایسریا گونوره N. Gonorrhoeae	رشد مثبت
		اشرشیا کلی E. coli	رشد منفی
تایوگلیکولات براث Thioglycollate broth	24 ساعت	*باکتروئیدس فراجیلیس* *Bacteriodes fragilis*	رشد مثبت
TSI عمق محیط باید 3 سانتی متر باشد (با درپیچ شل اتوو گذاری شود)	24 ساعت	*سیتروباکتر فروندی* *Citrobacter frundii*	گاز + A/A, SH_2
		سالمونلا تایفی موریوم S. typhimurium	گاز یا بدون گاز + K/A, SH_2
		شیگلا فلکسنری Sh. flexneri	K/A
		اسینتوباکتر کالکوستیکوس *Acinetobacter calcoaceticus*	تغییر نمی کند
محیط اوره	24 ساعت	*اشرشیا کلی E. coli*	منفی
		پروتئوس میرابیلیس P. mirabilis	مثبت، صورتی

منابع :

1- Quality Assurance for commercially prepared Microbiological Culture Media- Second Edition ; Approved standard.- Third edition document M22-A3. Vol. 24 No.19; 2006.

2- Oxoid company- General Guide to the use of Oxoid culture Media.

3- محيط هاي كشت آزمايشگاهي (موارد مصرف وكنترل كيفي) به انضمام اطلس رنگي محيط هاي كشت؛ گرد آوري و ترجمه مهناز صارمي – محمد علي صارمي؛ آزمايشگاه مرجع سلامت، وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشكي؛ 1387