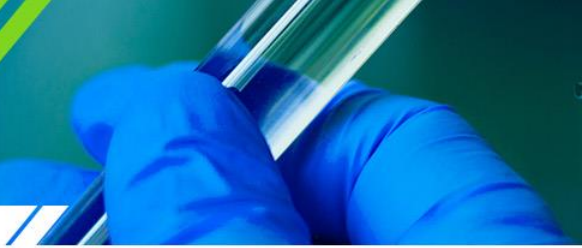
کلی فرم ها در مواد غذایی

نصیرپور
کارشناس آزمایشگاه

ویژگی کلیفرم ها

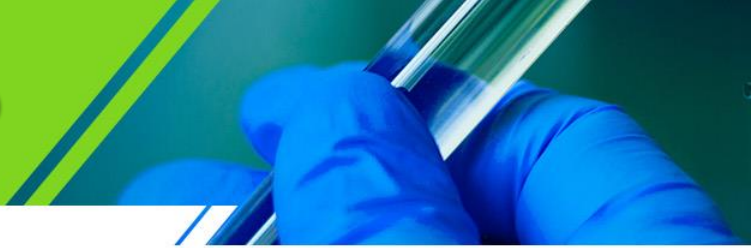


- کلی فرم ها باکتریهای میله ای کوتاه ، هوازی و بی هوازی اختیاری ، گرم منفی و غیر اسپورزا هستند. در دامنه pH وسیعی ۹-۴/۴ قادر به رشد بوده و لاکتوز را در مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۲-۳۷ درجه سانتیگراد همراه با تولید گاز تخمیر میکنند.
- این باکتری ها در حضور نمک های صفراوی رشد می کنند در حالیکه باکتریهای گرم مثبت قادر به رشد در این شرایط نمی باشند. لذا از این خاصیت برای جداسازی کلی فرم ها از منابع مختلف استفاده میشود.

- گروه کلی فرم های مدفوعی شامل کلی فرم هایی است که قادرند در صورت افزایش دما (۴۴/۵ یا ۴۵ درجه سانتیگراد) رشد کنند. استفاده از دمای بالای انکوباسیون عامل جدا کردن کلی فرم های مدفوعی از غیر مدفوعی است.

- مهمترین باکتریهای شاخص مورد استفاده در آزمایش باکتریولوژیکی آب کلی فرم ها هستند که از سال ۱۹۱۴ توسط اداره بهداشت عمومی آمریکا به عنوان شاخص آلودگی آب آشامیدنی معرفی شدند.

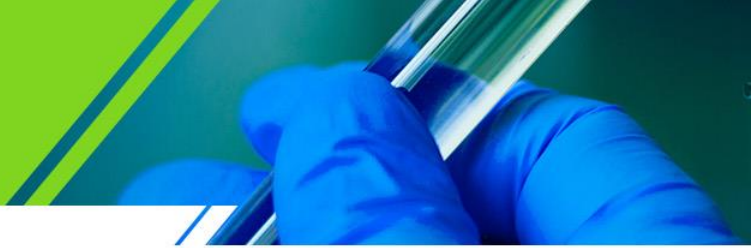
دلیل اهمیت کلی فرم ها در مواد غذایی



- امکان رشد در مواد غذایی مختلف به دلیل استفاده از اکثرکربوهیدرات ها و مواد آلی موجود در مواد غذایی به عنوان منبع انرژی
- قادر به استفاده از ترکیبات ازته نسبتا ساده به عنوان منبع نیتروژن
- توانایی سنتز اکثر ویتامین های مورد نیاز خود
- رشد در محدوده ی وسیعی از درجه حرارت (از کمتر ۱۰درجه سانتیگراد تا حدود ۴۶ درجه سانتیگراد)
- رشد در دامنه pH وسیعی از ۹-۴/۴
- قادر به تولید مقدار زیادی اسید و گاز از قندها
- توانایی تولید طعم های نامطلوب
- امکان تولید مواد لزج و ایجاد حالت طنابی در مواد غذایی

- حدود بیست گونه از باکتریها در گروه کلی فرم ها جای می گیرند که مهم ترین آنها شامل *اشرشیا* ، *انتروباکتر* ، *سیتروباکتر و کلبسیلا* می باشد.

Escherchia



- باکتری میله ای شکل به طول ۱-۳ و عرض ۰/۵ تا ۰/۶ میکرون
- گرم منفی ، هوازی بی هوازی اختیاری ، متحرک و معمولا فاقد کپسول
- حرارت اپتیمم برای رشد مطلوب ۳۷ درجه سانتیگراد (تا دمای ۴۸ درجه را نیز تحمل می کند)
- قادر به رشد در دامنه ی pH از ۴/۴ تا ۹(pH مناسب برای تولید سم ۷)
- کلیه ی سوش ها قادر به تخمیر لاکتوز و گلوکز و تولید گاز
- مقاوم در برابر خشکی و مواد شیمیایی گندزدا

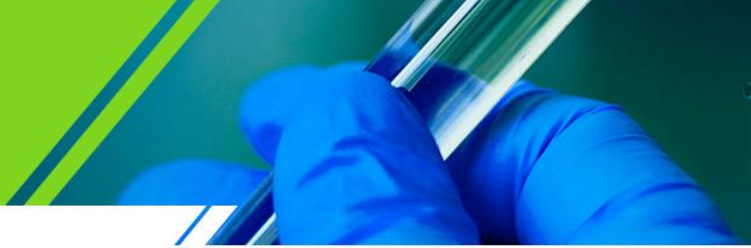
❖ *اشریشیا* در شرایط بی‌هوازی، مخلوطی از اسیدها مانند لاکتات، سوکسینات، اتانول، استات و دی اکسید کربن را تولید می‌کند .

❖ انواع بیماریزای آن دارای پیلی و کپسول هستند و کد ژنتیکی آن ها در پلاسمید است.

❖ در این باکتری سه گروه آنتی ژن وجود دارد:

- آنتی ژن O : آنتی ژن غشاء خارجی سلول و مقاوم به حرارت
- آنتی ژن H : آنتی ژن تاژک
- آنتی ژن K : آنتی ژن کپسول و حساس به حرارت

Escherchia



- باکتری های ***E.coli***، یکی از مهم ترین باکتریهای عفونت زا و مسمومیت زا می باشند و به طور کلی، آن دسته از سوش های **E.coli** را که مسمومیت غذایی ایجاد میکند به گروه های زیر تقسیم می کنند:

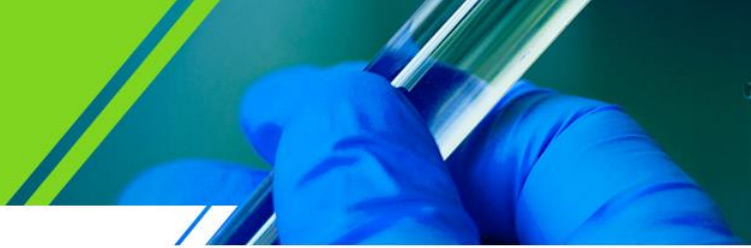
- انتروتوکسیژنیک *اشریشیا کلی* (**ETEC**):ایجاد دو نوع انتروتوکسین (**Labile toxin**) **LT** یا **ST** (**Stable toxin**) می کند. این تیپ شایعترین عامل اسهال مسافرتی در جهان است و ایجاد بیماری شبه وبا می کند.

- انتروپاتوژنیک *اشریشیا کلی* **(EPEC)** : ایجاد انتروتوکسین نمی کند. این تیپ عامل اسهال اطفال بوده و افراد بزرگسال نسبت به آن مقاوم هستند.

- انتروهموراژیک *اشریشیا کلی* **(EHEC)**: این باکتری با ایجاد یک سیتوتوکسین به نام وروتوکسین در روده عامل ایجاد اسهال خونی است.

- انتروایتویسیو *اشریشیاکلی* **(EIEC)**: قادر به تولید انتروتوکسین نمی باشد و همانند *شیگلا* بطور مستقیم با تهاجم بافتی به سلول‌های روده آسیب می‌رساند.

Enterobacter

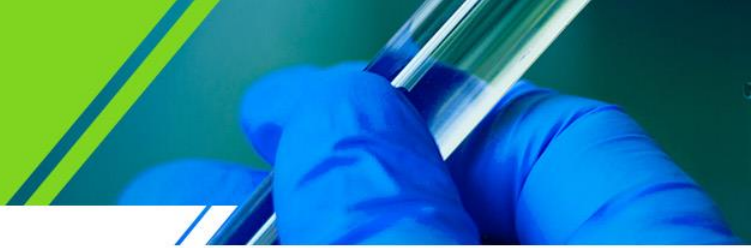


- باکتری گرم منفی ، میله ای شکل ، معمولا متحرک
- عدم تولید رنگدانه
- کم توقع بوده به طور وسیعی در طبیعت بر روی گیاهان در آب همچنین در لوله گوارش مشاهده می شوند.
- تحمل دامنه حرارتی گسترده ای داشته و بر روی تعداد زیادی از محصولات و محیط های کشت رشد و تکثیر می نمایند.
- قادر به تخمیرگلوکز و لاکتوز همراه با تولید اسید و گاز
- در هنگام رشد در مواد غذایی باعث ایجاد بوی نامطبوع و حالت لزج و چسبنده

❖ یکی از مهم ترین گونه های انتروباکتر ها ، انترو باکتر آئروجنس می باشد که پراکندگی زیادی بر روی گیاهان و فرآورده های گیاهی دارند.

❖ در فرآورده های تخمیری گیاهی در صورتی که باکتری های اسید لاکتیک عملشان را به خوبی انجام ندهند باعث مشکل می شود.

Citrobacter

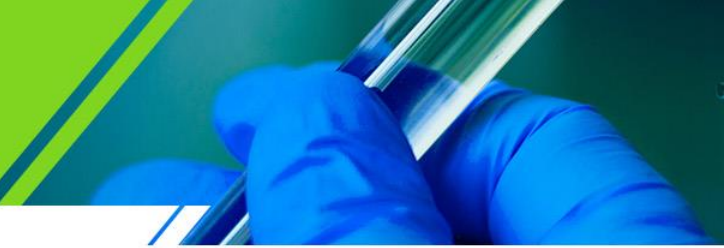


- باسیل گرم منفی به طول ۲-۶ و قطر ۱ میکرون، بی هوازی اختیاری و فاقد اسپور
- متحرک و دارای فلاژن از نوع پریتریش
- قادر به تخمیر گلوکز و سایر کربوهیدرات ها و تولید اسید و گاز
- اکسیداز منفی، کاتالاز مثبت ،متیل رد مثبت
- همه ی ارگانیسم های این جنس قادر به استفاده از سیترات به عنوان تنها منبع کربن

❖ این ارگانیسم، به فراوانی در آب، خاک، غذا و مجرای گوارشی حیوانات و انسانها یافت میشود و مجرای معده ای -روده ای انسان را کلونیزه میکند.

❖ سیتروباکتر، پاتوژنی فرصت طلب است که باعث طیف وسیعی از عفونتها در مجرای ادراری، مجرای تنفسی، زخمها، استخوان، اندوکاردیوم، مننژ و روده ها می گردد.

Klebsiella



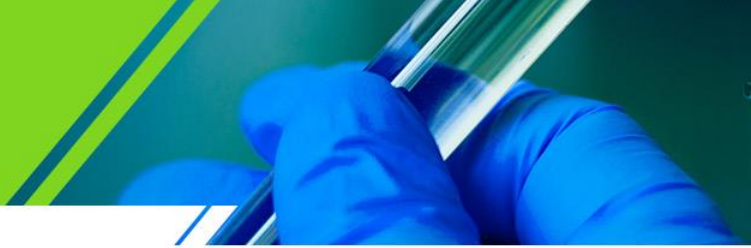
- غیر متحرک ، میله ای راست ، به قطر ۰/۳-۱ و ارتفاع ۰/۶ -۶ میکرون
- کپسول دار بوده و به صورت تک تک ، جفت یا در زنجیره های کوتاه ظاهر می شود .
- اکسیداز منفی و کاتالاز مثبت

❖ این ارگانیسم ها در آب ، فاضلاب و خاک ، در قسمتی از فلور دهان ، فارنکس و روده، در دانه ها و غذاهای تازه و یخ زده پیدا شده اند .

❖ کلبسیلا ها ارگانیسم های بیماری زای فرصت طلبی بوده و علائم چندی از قبیل پنومونی و عفونت قسمت های بالای سیستم تنفسی ظاهر می سازد همچنین قادر به ایجاد فساد در مواد غذائی می شوند.

❖ معروفترین عضو این جنس *کلبسیلا پنومونیه* عامل بیماری ذات الریه باکتریایی است.

IMViC Tests

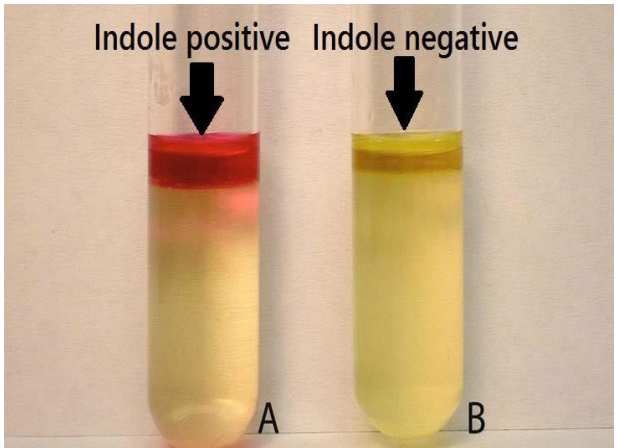


- برای جداسازی انواع کلی فرم ها از یکدیگر، تست IMViC که مجموعه از آزمایشهای بیوشیمیایی است، استفاده می شود.
- IMViC شامل حروف اول کلمات Methyl red-Indol-Vogesproskauer-Citrat می باشد (حرف کوچک i برای سهولت تلفظ به کار رفته است.)

Citrat	Voges Proskauer	Methyl red	Indol	نام باکتری
-	-	+	+	*اشرشیاکلی*
+	+	-	-	*انتروباکتر آئروجنس*
+	-	+	-	*سیتروباکتر*
+	-	+	-	*کلبسیلا*

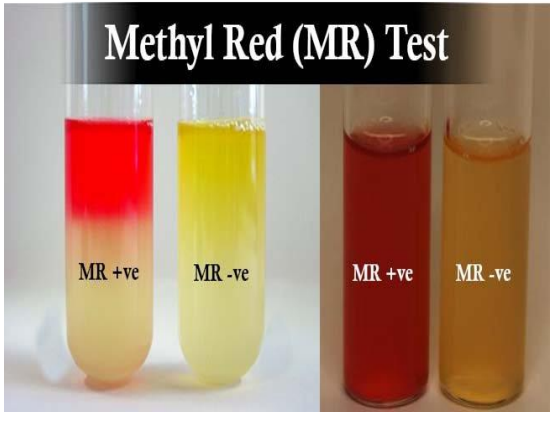
- ایندول Indol :

نمونه را به لوله دارای محیط کشت تریپتون واتر تلقیح کنید و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون کنید. با افزودن ۱ میلی لیتر از معرفKovacs ، ایندول را آزمایش کنید. ظاهر شدن رنگ قرمز در لایه فوقانی بیانگر تجزیه تریپتوفان و در نتیجه به وجود آمدن ایندول در محیط انکوبه گذاری شده می باشد.



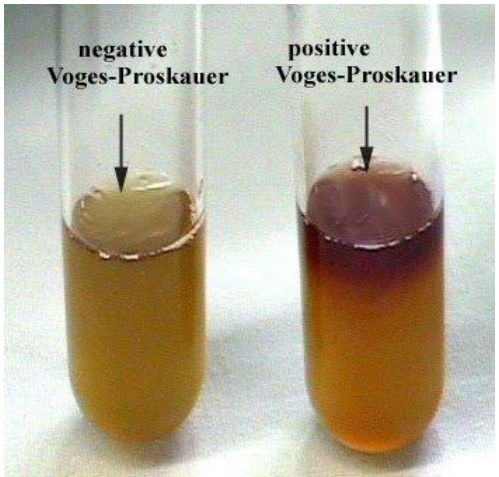
- متیل رد Methyl red :

نمونه را درون لوله حاوی MR-VPبراث تلقیح کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در انکوباسیون قرار دهید. بعد از پایان زمان انکوباسیون به لوله ۵ قطره محلول متیل رد اضافه کنید. میزان اسید حاصل از تخمیر قندها در حین انکوباسیون گذاری pH محیط را تغییر می دهد. معرف متیل رد در pH کمتراز ۴/۵ به رنگ قرمز و در pH بیشتر از ۴/۵ به زرد رنگ می شود.



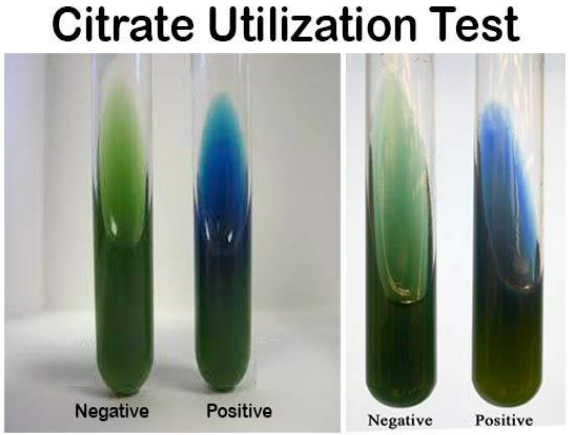
- ترکیبات واکنش دهنده ووگس-پروسکوئر Voges Proskauer :

نمونه را درون لوله حاوی MR-VPبراث تلقیح کرده و ۲۴ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوباسیون کنید. ۱ میلی لیتر از این ماده را به یک لوله آزمایش منتقل کنید. ۰/۶ میلی لیتر محلول-α نفتول و ۰/۲ میلی لیتر ٪۴۰ KOH را به لوله اضافه کنید و لوله را تکان دهید. مقداری کریستال کراتین اضافه کنید. لوله را روی شیکر لوله قرار داده و اجازه دهید ۲ ساعت بماند. در صورتی که باکتری قادر به تولید استوئین باشد، استوئین تولید شده با کراتین اضافه شده به محیط ترکیب و ایجاد رنگ قرمز می کند.

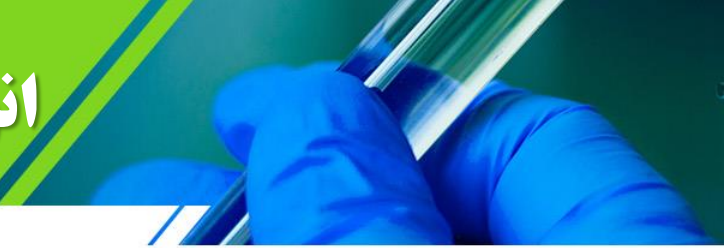


- سیترات Citrat :

نمونه بر روی محیط کشت شیبدار سیمون سیترات به صورت عمقی و سطحی کشت داده و به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار دهید.در صورتی که باکتری توانایی استفاده از سیترات به عنوان منبع انرژی را داشته باشد محیط را قلیایی نموده و باعث ایجاد حالت کدورت و تغییر رنگ محیط به آبی می شود.

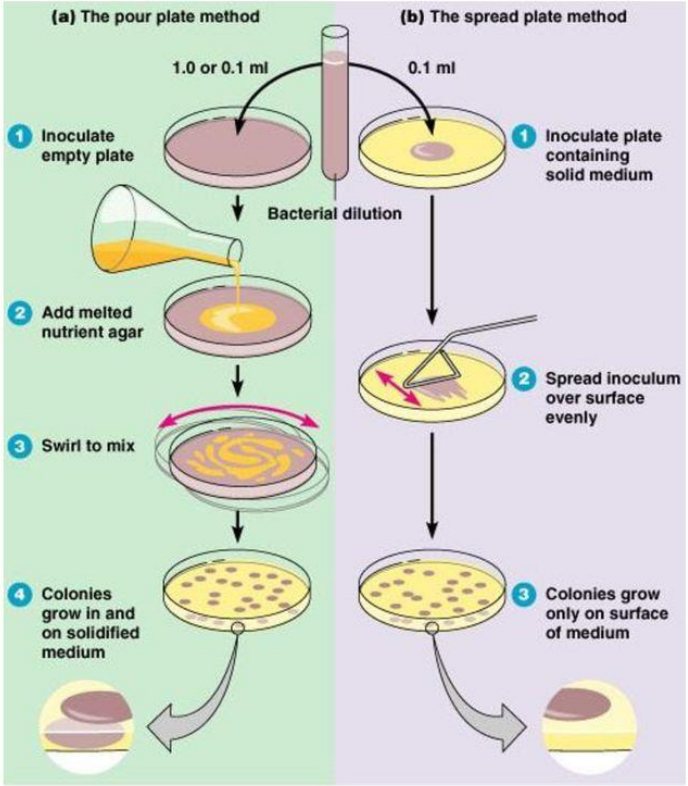


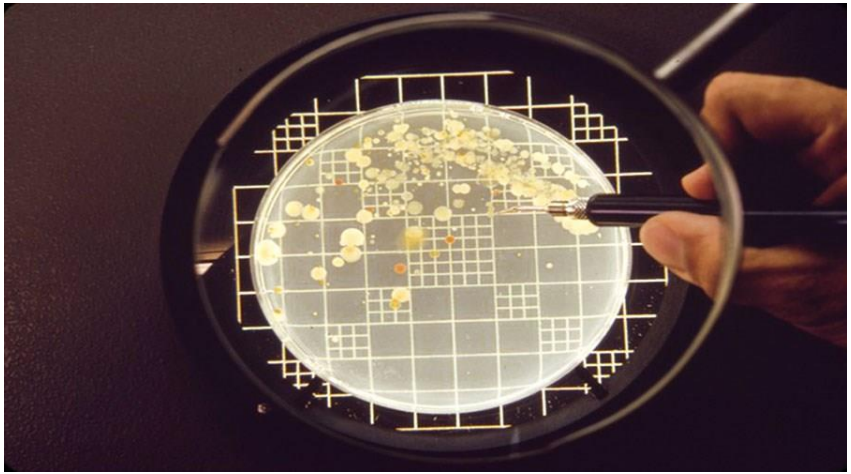
انواع روش های تشخیص میکروارگانیسم ها



- روش های متداول
  - روش شمارش صفحه ای استاندارد Standard plate count (SPC)
  - روش اندازه گیری بیشترین تعداد احتمالی MOST Probable Number (MPN)
  - روش احیا رنگ Dye reduction (DR)
  - روش شمارش مستقیم میکروسکوپی Direct microscopy count (DMS)

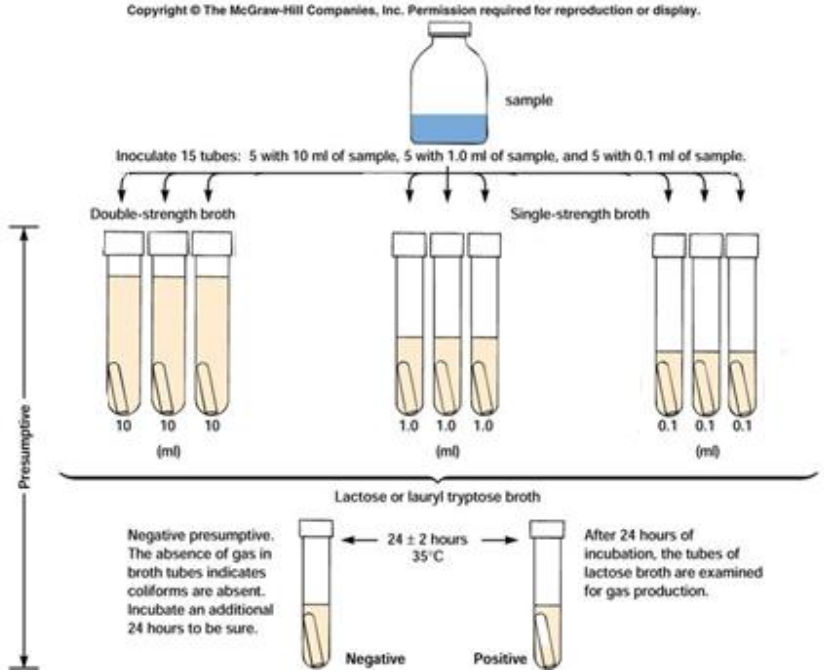
standard plate count (SPC)



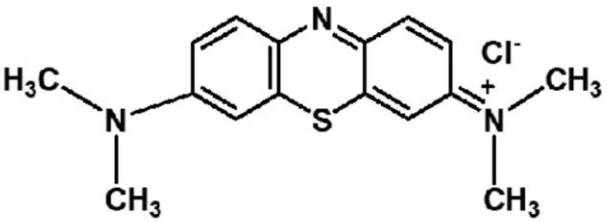


MOST Probable Number (MPN)

Flow chart of Presumptive MPN

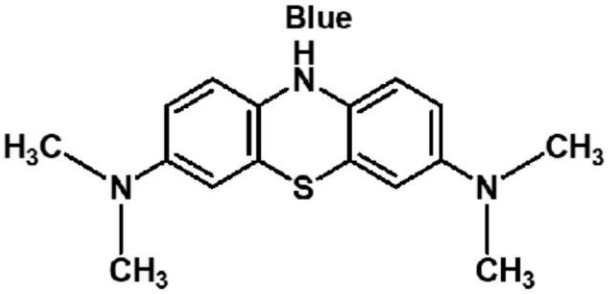


Dye reduction (DR)



Methylene Blue (MB)

Blue



Leucomethylene Blue (LMB)

Colorless

Direct microscopy count (DMS)

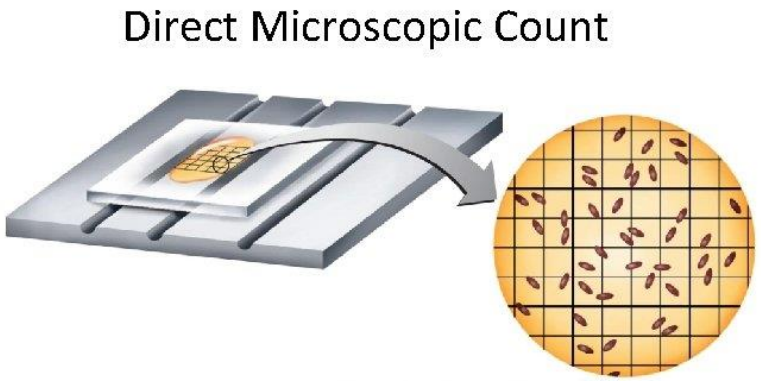
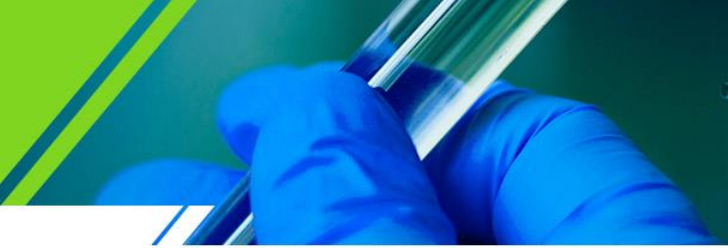


Figure 6.20



- روش های مدرن:

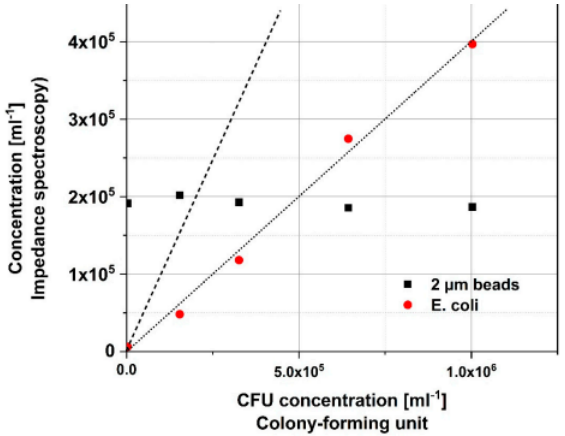
➢ روش های فیزیکی (مانند روش امپدانس ، روش میکروکالریمتری و فلوسیتومتری)

➢ روش های شیمیایی (مانند نوکلئاز مقاوم به حرارت ، اندازه گیری ATP، PCR، رادیومتری)

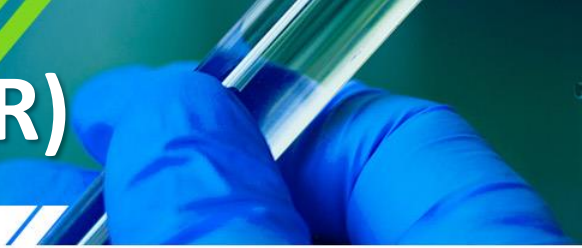
➢ روش های ایمونولوژیکی (مانند آنتی کور فلوئورسنت ، آزمونELISA ، آزمون Radio Immuono Assay (RIA))

روش امپدانس

- امپدانس در واقع مقاومت ظاهری یک مدار الکتریکی در برابر جریان متناوب است.میکروارگانیسم ها در حین رشد در محیط کشت سوبستراهایی با هدایت الکتریکی پایین را به محصولی با هدایت بالاتر متابولیزه می کنند و با اندازه گیری این میزان تغییر،می توان تعداد میکروارگانیسم ها را تخمین زد.بین تعیین زمان امپدانس و تعداد میکروارگانیسم ها رابطه عکس وجود دارد.



Polymerase Chain Reaction(PCR)



- واکنش زنجیره ای پلیمراز Polymerase Chain Reaction(PCR) یکی از تکنیکهای شناسایی بر اساس ژنتیک مولکولی می باشد که با استفاده از پرایمر صورت میگیرد.

- به وسیله این روش قسمت کوچکی از DNA در مدت زمان کوتاهی به تعداد زیاد تکثیر شده که در نتیجه DNA راحتتر شناسایی شده و برای هدفهای بعدی مورد استفاده قرار میگیرد.

- به طور کلی تکنیک PCR یک روش قدرتمند و سریع جهت تشخیص حضور میکروبهای بیماری زای غذایی و ردیابی باکتری ها در غلظت های پایین می باشد.

- تکنیک PCR برای ردیابی باکتری های بیماری زا نظیر ***E.coli***، *لیستریا مونسیتوژنز*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و سایر عوامل بیماری زا بکار میرود.

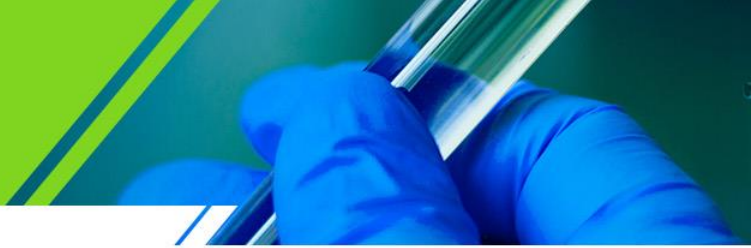
- روش PCR شامل مراحل زیر می باشد:

۱- قطعه ای از DNAباکتری مورد نظر را که باید بزرگ و تکثیر شود ، مشخص می کنند .

۲-با کمک حرارت ۵۵ درجه دو رشته DNAرا از یگدیگر باز کرده و در واقع DNAباکتری را دناتوره می کنند .

۳-با استفاده از دو پرایمر که به دو طرف این قطعه DNAمتصل می شود و یک آنزیم مقاوم به حرارت به نام DNAپلیمراز، DNAباکتری را پلی مریزه و تکثیر می نمایند. (این آنزیم از باکتری گرمادوستی به نام ترموفیلوس آکواتیکوس بدست می آید)

ELISA



- یکی از تکنیک هایی که به طور وسیع و گسترده ای برای جستجوی میکروبها در مواد غذایی مورد استفاده قرار می گیرد ، الایزا میباشد که اساس آن اتصال یک آنزیم به آنتی ژن یا آنتی بادی مورد نظر است .

مراحل کار عبارتند از:

۱- باکتری یا توکسین مورد نظر (آنتی ژن) روی یک فاز جامد قرار داده می شود که این فاز جامد معمولا پلی استیرن Styrene Poly است.

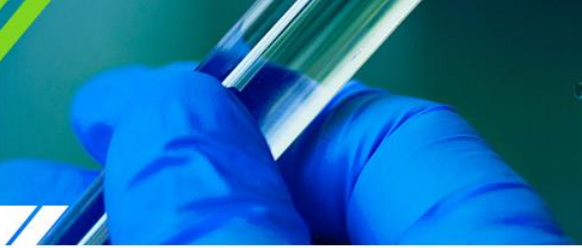
۲ -آنتی سرم اضافه می شود.

۳-پادتن اختصاصی که حاوی آنزیم است اضافه می شود .(آنتی ایمونوگلوبولین)

۴-شستشوی مالیم می دهند و میزان آنزیم باقیمانده در لوله یا حفره میکروتیتر را اندازه گیری می کنند. مقدار مصرف آنزیم ، میزان پادتن های اختصاصی سرم اولیه مورد آزمایش قرار می گیرد.

- موارد کاربرد این آزمون عبارتند از:
- تعیین و شناسایی انتروتوکسین های استافیلوکوکی
- تعیین و شناسایی توکسین های بوتولیسمی
- تعیین و شناسایی آنتی کورهای توکسوپلاسما

انواع محیط های کشـــت



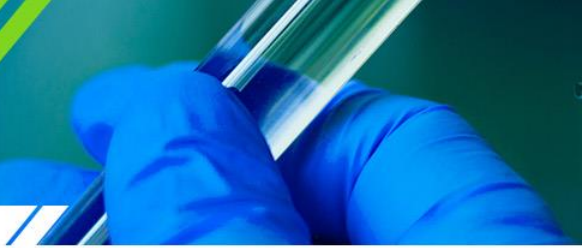
۱- محیط کشت های مغذی:

این محیط کشت با وجود دارا بودن کلیه مواد لازم برای رشد باکتری ها ،فاقد مواد ضد میکروبی نیز می باشند، به طوریکه تمام باکتری ها می توانند رشد کنند.

از این محیط ها برای جدا کردن میکروارگانیسم هایی که تعدادشان در یک جمعیت میکروبی کم است استفاده میشود به طوریکه یک نمونه شامل میکروارگانیسم مورد نظر به داخل محیط کشت مغذی مایع تلقیح می شود و تحت شرایط مطلوب آن میکروب انکوبه می شود. در این شرایط میکروارگانیسم مورد نظر از دیگر میکروبها سریعتر رشد میکند و برای جداسازی و شناسایی داخل یک محیط جامد کشت داده می شود.

از جمله محیط های مغذی میتوان به سلنیت براث، نوترینت آگار ، تتراتیونات آگار و بلاد آگار اشاره کرد.

انواع محیط های کشـــت



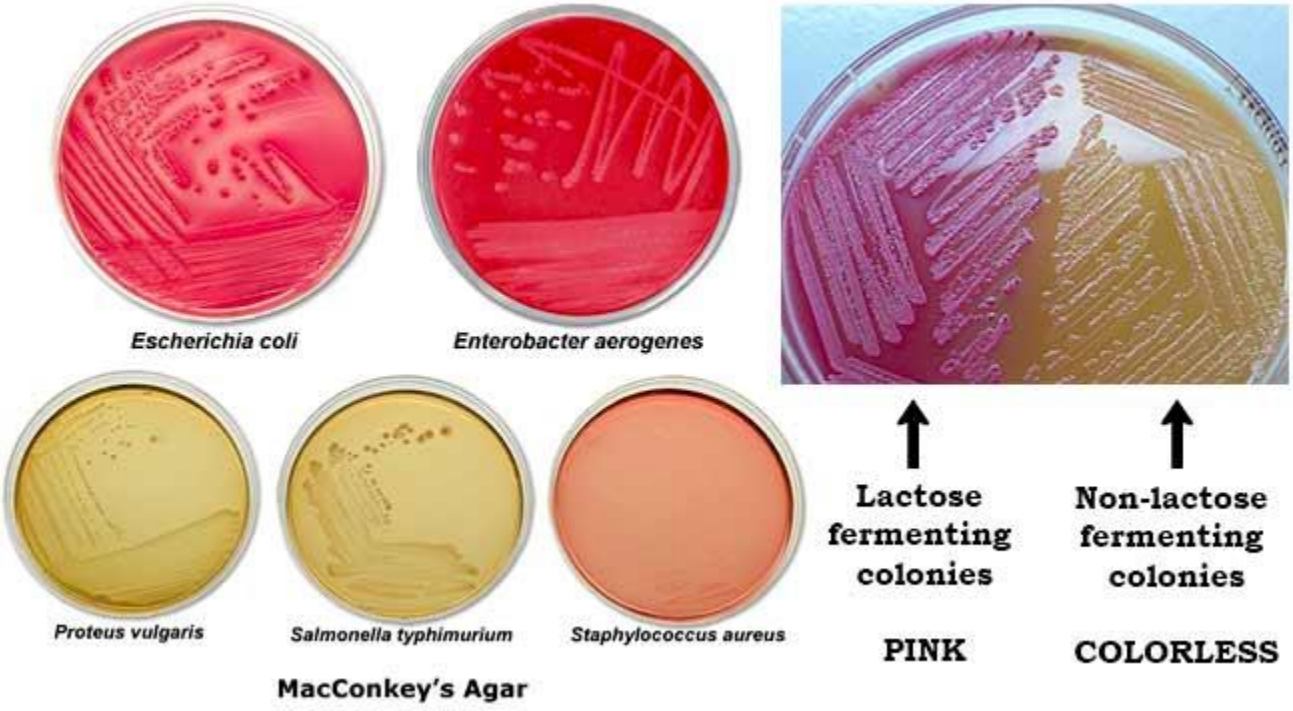
۲- محیط کشتهای افتراقی :

این محیط کشتها به دلیل داشتن مواد شیمیایی معین ،سبب رشد گروه مشخصی از میکروارگانیسم ها می شود. همچنین به دلیل وجود اندیکاتور های مختلف سبب می شوند تا کلنی های تشکیل شده در اثر رشد میکروارگانیسم ها از نظر ظاهری با هم متفاوت باشند.

از این محیط ها می توان به محیط کشت مک کانکی آگار اشاره کرد . این محیط کشت اولا به دلیل داشتن نمک های صفراوی از رشد باکتریهای گرم مثبت جلوگیری می کند و ثانیا به دلیلی داشتن لاکتوز و معرف قرمز خنثی سبب تفاوت رنگ در بین کلنی دارای قدرت تخمیر لاکتوز و فاقد توانایی تخمیر لاکتوز می شود.از این محیط کشت جهت تشخیص کلی فرم ها و غیر کلی فرم های خانواده انتروباکتریاسه استفاده می شود.

از دیگر محیط کشت های افتراقی میتوان به ائوزین متیلن بلو(EMB) اشاره کرد که حضور رنگهای ائوزین و متیلن بلو سبب جلوگیری از رشد انواع باکتریهای گرم مثبت می شود. در این محیط باکتری های اشریشیا کلی ها به رنگ تیره به همراه درخشش سبز با جلای فلزی دیده می شوند.

MacConkey's Agar



Violet Red Bile Agar(VRBA)

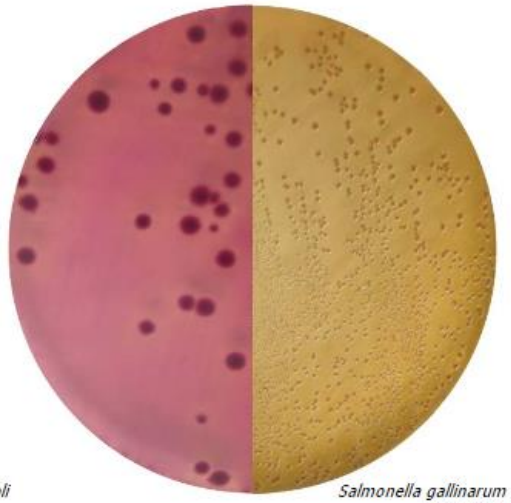
VIOLET RED BILE AGAR WITH LACTOSE (VRBL) ISO 4832

Selective medium for the detection and enumeration of coliforms in dairy products, water and food

FORMULA IN g/l

Lactose	10.00	Bile Salts	1.50
Gelatin Peptone	7.00	Neutral Red	0.03
Sodium Chloride	5.00	Crystal Violet	0.002
Yeast Extract	3.00	Bacteriological Agar	15.00

Final pH 7.4 ± 0.2 at 25°C



Escherichia coli
ATCC 25922

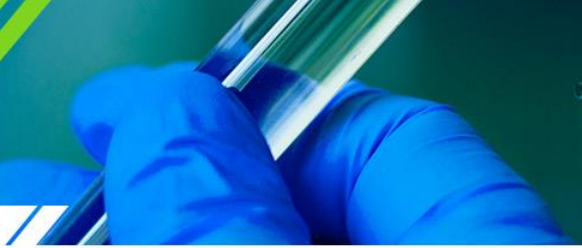
Salmonella gallinarum
NCTC 9240

Eosin Methylene-blue Lactose Sucrose Agar(EMB)

EMB agar

Only gram-negative bacteria grow on EMB agar. (Gram-positive bacteria are inhibited by the dyes eosin and methylene blue added to the agar.) Based on its rate of lactose fermentation, *E. coli* produces dark, blue-black colonies with a metallic green sheen on EMB agar.

انواع محیط های کشـــت



۳- محیط کشتهای انتخابی:

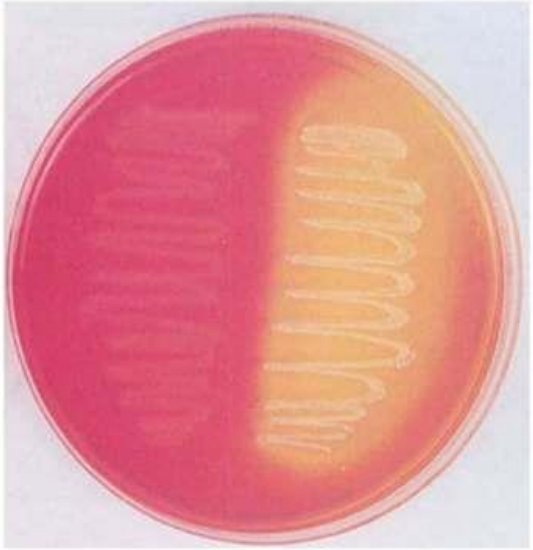
در این نوع محیط کشت ها فقط باکتری ویژه ای رشد می کنند و به علت دارا بودن مواد بازدارنده ی رشد و همچنین ترکیبات اختصاصی موجود درآن از رشد سایر باکتریها جلوگیری می شود.

از این محیط کشت ها می توان به مانیتول سالت آگار (Manitol Salt Agar) و برد پارکر (Barid parker Agar) اشاره کرد که برای شناسایی و جداسازی استافیلوکوکوس ها مورد استفاده قرار می گیرند.

Manitol Salt Agar (MSA)

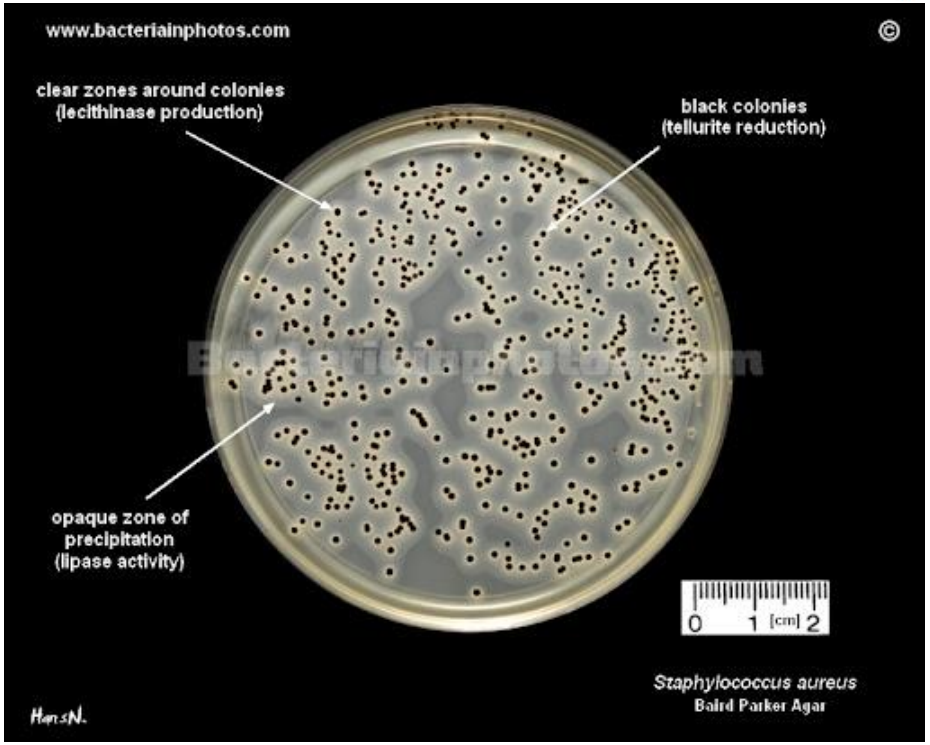
Mannitol Salt Agar

- Mannitol fermenters includes: Staphylococcus aureus
- Non-mannitol fermenters includes: Staphylococcus epidermidis
- Positive growth but non-mannitol fermenters includes: Micrococcus luteus
- Negative growth includes: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa



MSA (Mannitol Salt Agar)

Barid parker Agar



مراجع :

- میکروبیولوژی مواد غذایی- تالیف ویلیام فریزیر ، دنیس وستهوف ترجمه دکتر سید علی مرتضوی ، دکتر مهدی کاشانی نژاد
- اطلس میکروبیولوژی مواد غذایی – تالیف سید علی مرتضوی، الهام خانی پور ، سید هاشم پرور
- آزمون های میکروبی مواد غذایی – تالیف دکتر گیتی کریم
- میکروب های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت های غذایی – تالیف دکتر ودود رضویلر