بنام خدا

نام درس: کنترل کیفیت مواد اولیه

مدرس: الهه اربیدار

دانشکده فنی و حرفه ای شهریار

گروه: صنایع غذایی – کنترل کیفیت

جلسه : ۱تا ۶

۱۳۹۸

به نام خدا

با سلام خدمت دانشجویان عزیز

با توجه به وضعیت پیش آمده (ویروس کرونا) جزوه درس کنترل کیفیت تهیه شده است. سعی شده است به صورت شیوا و روان به حضور شما ارائه شود. در صورت وجود سوال یا ابهامی از طریق آدرس ایمیل در تماس باشید.

الهه اربیدار

e.arbidar@gmail.com

روشهای عمومی

رطوبت:

قسمت اعظم ترکیب مواد غذایی‌را آب تشکیل می‌دهد . بندرت بعضی از اقسام مواد غذایی مثل روغنها ممکن‌است فاقد رطوبت باشند ولی‌حتی اجسام متبلور نیز که‌نسبتاً خالص باشند شامل مقداری رطوبت هستند که توسط‌سطح این‌اجسام جذب‌می‌شود. بافتهای حیوانی وگیاهی شامل. مقادیر زیادی آب است و سبزیجات برگی شکل شامل ۹۰٪ و یا بیشترآب می‌باشند. گوشتهای مختلف دارای ۶۰-۷۰درصد رطوبت هستند. درحیوانات و نباتات ترکیب عمده و اساسی‌مایع جاری در اعضاء، خون ولنف وشیرهٔ گیاهی‌ومایعات بین یاخته‌ای‌را آب تشکیل می‌دهد.

قسمتی ازآب مواد غذایی به‌آسانی توسط فشارو یا حرارت خارج می‌شود ولی‌قسمتی دیگر ازآب محتوی که‌بصورت الصاق یا ترکیب در مادهٔ غذایی موجود است باشکال‌خارج میشود که آنراآب پیوسته[۱] می گویند.

اندازه‌گیری مقدار آب یارطوبت درمواد غذائی از چند نظر دارای اهمیت است.

۱- تشخیص‌خلوص ، دربسیاری از موارد مانند شیر و یا مواد غذایی دیگر که به نسبت معینی دارای آب می‌باشند. تعیین مقدار رطوبت ومادهٔ خشک می‌تواند تا حدی معیار تشخیص خلوص واقع شود .

۲- قابلیت نگهداری مواد غذایی، در محیط مرطوب رشد میکروارگانیسم سریعترانجام میشود و بهمین دلیل یکی ازروشهای حفظ و نگهداری مواد غذایی خشک کردن آن است. درمواد غذایی خشک، میزان رطوبت نباید از حد معین تجاوز کند از این روکنترل و اندازه‌گیری رطوبت در این مواد دارای اهمیت خاصی میباشد.

الف - روشهای متداول اندازه‌گیری رطوبت در مواد غذایی

۱- روش اندازه‌گیری رطوبت در حرارت بالا:

این روش در مورد انواع مواد غذایی که حرارت بالا کیفیت آنها را تغییر نمی‌دهد بکار می‌رود. برای این منظور مادهٔ غذایی‌را در اتووبرقی در حرارت ۱۰۰ - ۱۰٥ درجه سانتی‌گراد قرار میدهند تا رطوبت خودرا از دست بدهد.

لوازم ودستگاهها :

۱- اتووبرقی که درجهٔ حرارت آن در ۲ ± ۱۰۳ درجه سانتی گراد قابل تنظیم باشد.

۲- دسیکاتور که حاوی یک مادهٔ رطوبت گیر مؤثرباشد.

۳- ترازوی آزمایشگاهی با حساسیت ۰/۱ میلی گرم.

٤- ظروف ته پهن از جنس چینی‌ویا فلزی (نیکل - آلومینیم ، فولاد زنگ نزن) باحداقل قطر ٦۰ میلیمتر و ارتفاع ۲٥ میلی‌متر .

روش آزمون

ظرف مخصوص اندازه گیری رطوبت‌را مدت نیم ساعت در اتوو ۲ ± ۱۰۳ درجه سانتیگراد بگذارید. سپس آنرا در دسیکاتور تا درجه حرارت آزمایشگاه سرد کنید و بادقت یک میلی گرم توزین نمایید، ٥ تا ۱۰ گرم از نمونهٔ مورد آزمایش‌را به ظرف منتقل کرده و مجدداً بدقت یک میلی گرم آنرا توزین نموده و به اتوو منتقل کنید. پس‌از٦ساعت ظرف‌را از اتوو خارج نموده و پس‌از سرد کردن در دسیکاتور آنرا دقیقاً توزین نمائید و دوباره‌آنرا بداخل‌اتوو منتقل کنید. پس از یک ربع ساعت عمل توزین‌را بنحوی که ذکر شد تکرار نمائید ، هرگاه دو وزن بدست آمده باهم تفاوت داشته باشنداین عمل‌را باید تا بدست آمدن وزن ثابت تکرارکرد. مقدار درصد رطوبت‌را از رابطهٔ زیر محاسبه کنید:

$$\frac{(M_1 - M_2) \times \text{۱۰۰}}{M_0}$$

M_0 = وزن نمونه:
M_1 = وزن ظرف و نمونه‌قبل‌از خشک کردن:
M_2 = وزن ظرف و نمونه‌بعداز خشک کردن.

تبصره :

۱- ظروفی که برای اندازه‌گیری رطوبت بکار می روند بایستی ته پهن باشند.

۲- حرارت اتوو در قسمتهای مختلف متفاوت است ازینرو هر گاه از اتوو الکتریکی مجهز به بادبزن استفاده شود خیلی بهتراست چون بدین وسیله حرارت در قسمتهای مختلف اتوو یکنواخت خواهد بود.

در موقع باز کردن در اتوو بادبزن را بایستی خاموش کرد.

۳- توزین نمونه بایستی بسرعت انجام گیرد چون هنگام توزین ، وزن نمونه بسته به شرایط محیط ممکن است سریعاً تغییر کند (در محیط مرطوب جذب رطوبت کرده و در محیط خشک رطوبت از دست می‌دهد).

در مورد برخی از موادی که دارای مقدار زیادی پروتئین هستند مانند گوشت و پنیر اضافه نمودن مقداری شن و الکل در پخش و یکنواخت کردن نمونه بسیار مؤثراست.

٤- برای تعیین رطوبت در اغذیه مایع مانند سرکه، آبجو، شیر وغیره که دارای مقدار قابل توجهی آب هستند بایستی ابتدا آنهارا روی حمام بخار حرارت داده و پس از تبخیر کامل در اتوو خشک کرد. در مورد برخی دیگر از انواع مواد غذایی مانند ژلاتین، مربا و انواع ژله ها بهتراست آنهارا در آب حل کرده و پس از تبخیر آب روی حمام بخار آنها را در اتوو خشک کرد.

۲- اندازه‌گیری رطوبت با استفاده از کورهٔ الکتریکی با خلاء:

برخی از انواع مواد غذایی مانند اکثر میوجات که دارای مقدار قابل ملاحظه‌ای فروکتوز هستند، در اثر حرارت زیاد تغییر ماهیت می‌دهند. ازینرو برای اندازه‌گیری رطوبت در این دسته از مواد غذایی از کوره‌های الکتریکی با خلاء استفاده می‌شود.

با استفاده از این نوع کوره‌ها در حرارت ۶۰-۷۰ درجه سانتی گراد وبا استفاده از خلاء، مادهٔ غذایی رطوبت خودرا از دست می‌دهد. روش کار مانند طریقهٔ فوق‌الذکر است.

۳- اندازه‌گیری رطوبت با استفاده از دسیکاتور با خلاء :

دراین روش مادهٔ خشک کننده یارطوبت گیر[1] ، اسیدسولفوریک است، وجود خلاء عمل خشک کردن را تسریع می کند.

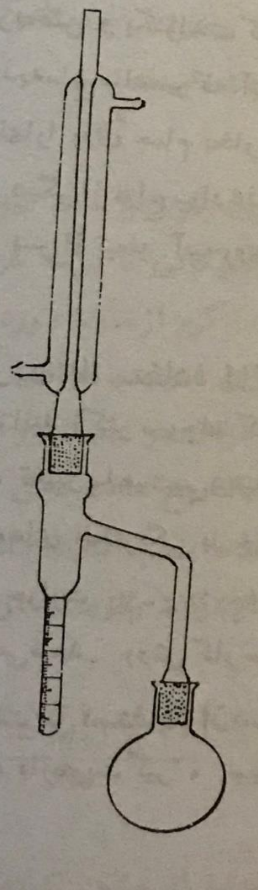
---

[1] Desicant

٤- روش تقطیر :

رطوبت آن دسته ازمواد غذایی که شامل مقادیری مواد فرار هستند بوسیلهٔ روش تقطیر اندازه‌گیری می‌شود مثلا در مورد انواع ادویه یا سبزیجات معطر که حاوی مقدار زیادی مواد فرار هستند ، روشهای حرارتی خشک قابل استفاده نبوده و این روش توصیه می شود .

دستگاهی که برای این منظور بکار می‌رود دستگاه تقطیر ساده‌ایست مطابق شکل ١ که شامل یک بالن بظرفیت ٢٥٠ سانتی متر مکعب، یک قسمت گیرنده که قسمت انتهایی آن برحسب سانتی‌متر مکعب مدرج بوده و بوسیله لولهٔ خمیده‌ای به‌بالن مربوط می‌شود . و بالاخره سرد کننده که عمل تقطیرو برگشت بخارات آب‌را انجام می‌دهد.



شکل ١- دستگاه تقطیر برای اندازه‌گیری رطوبت

روش آزمون

مقدار معینی از نمونه مورد آزمایش را که حاوی ۲-۵ سانتی‌متر مکعب آب باشد توزین کرده به بالن دستگاه منتقل کنید ۷۵ سانتی‌متر مکعب تولوئن یا گزیلول به‌آن افزوده و چند قطعه سنگ جوش نیز به آن اضافه کنید. دستگاه‌را مانند شکل ۱ بهم مربوط کرده و جریان آب سرد را در سردکننده برقرار نمایید. لولهٔ‌مدرج گیرنده‌را از حلال پر کنید برای این کار می‌توان حلال را از قسمت سردکننده‌به لوله ریخت. سپس بالن را حرارت دهید درنتیجه حرارت، حلال و آب محتوی نمونه هردو تبخیر شده و پس از تقطیر در ناحیه سردکننده، در داخل لوله مدرج جمع می‌شود قطرات آب چون از حلال سنگین‌تر است در زیر حلال قرار می‌گیرد و قطرات زیادی حلال نیز از ناحیهٔ لوله خمیده بداخل بالن بر می‌گردد. عمل تقطیر را ادامه دهید تا دیگر قطرات آب در لولهٔ خمیده جمع نشود. حرارت‌را قطع کنید و برای اینکه قطرات آبی که احتمالا در جدار لولهٔ سردکننده مانده است بداخل قسمت گیرنده منتقل شود، سردکننده‌را با مقداری حلال بشویید. مقدار آب جمع شده معادل مقدار آب موجود در نمونه بر حسب گرم است (یک سانتی‌متر مکعب آب برابر با یک گرم است) و می‌توان مقدار درصد آب موجود در مادهٔ غذایی مورد آزمایش‌را حساب کرد.

ب- روشهای سریع اندازه‌گیری رطوبت :

در کارخانجات تهیهٔ مواد غذایی عامل زمان بسیار مهم بوده و در کارهای عادی و کنترل دایمی محصول، روشهای سریع آزمایشگاهی بیشتر مورد نظر است.

دو روشی که ذیلا شرح داده می‌شود روش کارتر - سیمون[1] و روش استفاده از کورهٔ ماوراء قرمز این نظر را تأمین می‌نماید ولی بایستی توجه داشت که موادی که در حرارتهای بالا تجزیه شده و تغییر ماهیت می‌دهند نباید بوسیلهٔ این دو روش عمل شوند.

۱- روش کارتر-سیمون:

در این روش از کورهٔ مخصوص کارتر - سیمون استفاده میشود. مادهٔ غذایی و بخصوص غلات و آرد در حرارت ۱۵۵ درجه‌سانتی گراد و در مدت ۱۵ دقیقه خشک می‌شوند. با تغییر درجه‌حرارت و شرایط آزمایش، این روش در مورد مواد غذایی دیگر نیز قابل اجرا است.

---

[1] Carter - Simon Method

کورهٔ این دستگاه‌در حدود ۲۰ سانتی‌متر طول‌و۸سانتی‌متر عرض و۵سانتی‌متر ارتفاع دارد و در دو انتها بوسیله دریچه‌ای باز و بسته می‌شود . ظروف مخصوص این‌دستگاه ، فلزی و ته پهن و قطر آنها در حدود ٦ سانتی‌متر و ارتفاع آنها ۳ - ٤ سانتی‌متراست.

کوره دستگاه ظرفیت ۳ ظرف را درعین‌حال‌دارد. ظروف‌را از یک انتهای کوره‌وارد و از انتهای دیگرخارج می کنند .

روش آزمون .

۱- دستگاه راروشن کنید و یک ظرف خالی اندازه‌گیری رطوبت در آن قرار دهید.

۲- بسته به تعداد نمونه‌ای که عمل می‌شود ظروف مخصوص را با درآن دراتوو معمولی با حرارت ۱۰۰درجه سانتیگراد خشک کرده و پس از سرد کردن در دسیکاتوردقیقاً توزین کنید. ۰/۰۰۵ ± ۵ گرم از نمونه‌را در آن توزین نمایید.

۳- وقتی که درجه‌حرارت کوره‌به ۱۵۰ درجه سانتیگراد رسیددوظرف دیگر که حاوی در حدود ۵ گرم از نمونه است در آن قرار دهید. درست پس از ۵ دقیقه اولین ظرف‌توزین شده حاوی نمونه‌را بداخل کوره بگذارید (در آنرا در دسیکاتور نگاه دارید) .

٤- درست پس از پنج‌دقیقه ظرف دیگر حاوی نمونه توزین شده‌را در داخل کوره قرار دهید .

۵ - بدین ترتیب نمونه‌هارا بفاصلهٔ پنج دقیقه در داخل کوره قرار دهید هر ظرف مدت پنج دقیقه در فواصل معین کوره توقف داشته و بعداً بطرف جلو رانده می‌شود وپس‌از ۱۵دقیقه از طرف دیگر کوره خارج‌می‌شود. بلافاصله پس‌از خروج هر ظرف درآنرا گذاشته و به دسیکاتور منتقل کنید و پس‌از سرد شدن‌وتوزین نهائی مانند روش حرارتی مقدارتفاوت وزن ودرصد رطوبت‌را در نمونه محاسبه نمایید.

۲-استفاده از کورهٔ مادون قرمز:

در این روش از لام مادون قرمز بعنوان منبع حرارت استفاده می‌شود. این لام در ترازوی مخصوص کار گذاشته شده است، ازطرفی نمونهٔ مادهٔ غذایی در ترازو توزین شده و با قرار دادن لام مادون قرمز بالای آن در مدت کوتاهی کلیه رطوبت موجود تبخیر شده و از روی درجات ترازو مقدار درصد رطوبت مستقیماً قرائت می‌شود . این روش بسیار سهل وسریع بوده و بخصوص درمورد غلات و انواع آرد و بیسکویت و نیز مواد مشابه بکار می‌رود .

انواع ترازوهای مختلف مجهز به لام‌مادون قرمز بدین منظور تهیه شده است. درجات ترازو برحسب درصد رطوبت تنظیم شده و مقدار برداشت نمونه و طول مدت خشک کردن در مورد انواع مواد غذایی و بر حسب میزان رطوبت موجود متفاوت می‌باشد.

مدت لازم‌برای خشک کردن مواد را می‌توان پس از چند بار تجربه تعیین نمود.

در این روش بایستی دقت کرد که حرارت لازم و طول مدت بحدی نباشد که سبب سوختن مواد مورد آزمایش شود. پس‌از اینکه درجهٔ نشان دهندهٔ مقدار رطوبت در موقعیت خود ثابت شد و تغییر نکرد مقدار درصد رطوبت رااز روی درجات‌دستگاه می‌توان مستقیماً قرائت نمود.

ج- روشهای شیمیایی

روش شیمیایی‌دقیقی که برای‌اندازه گیری‌رطوبت درمواد یکه‌دارای‌مقدار جزیی‌رطوبت هستند توسط کارل فیشر[1] معرفی شد و خصوصاً جهت‌اندازه گیری رطوبت در مواد قندی، انواع آب نبات، شکلات و محصولات مشابه و سبزیجات خشک بکار می‌رود. اساس این آزمایش‌واکنش محلول کارل‌فیشر با آب‌است. محلول کارل فیشر عبارت‌ازمخلوط ید، انیدرید سولفورو، پیریدین درمتانول میباشد. دراین روش انیدرید سولفورو درمجاورت آب بوسیلهٔ ید اکسیده شده و تبدیل به انیدرید سولفوریک‌می‌شود که بوسیله پیریدین از مخلوط خارج می‌گردد. وقتیکه کلیهٔ آب موجود درمحیط بدین ترتیب مصرف میشود، یددرمحیط آزاد می‌گردد و تغییر رنگ حاصل را می‌توان مشاهده نمود. برخی از انواع دستگاههایی که بدین منظور تهیه شده‌اند خاتمه عمل‌را بصورت اتوماتیک تعیین می‌نمایند.

روش شیمیایی دیگر استفاده از تأثیر آب برکربورکلسیم[2] است، این جسم با آب ایجاد گاز استیلن مینماید که بااندازه‌گیری میزان گاز ایجاد شده ویا اندازه‌گیری تفاوت‌وزن مادهٔ مزبور میزان رطوبت سنجیده می‌شود.

$$\mathrm{Ca\,C_2 + 2H_2O \longrightarrow C_2H_2 + Ca\,(OH)_2}$$

روشهای دیگری‌نیز برای‌اندازه گیری‌رطوبت در مواد غذایی موجود است. ازضریب شکست و یا تعیین دانسیته برای اندازه‌گیری رطوبت در مواد قندی استفاده می‌شود.

---

[1] Karl Fischer

[2] Calcium Carbide

یکی دیگر از روشهای تعیین رطوبت استفاده از خاصیت هدایت جریان الکتریکی[1] است. هر قدر رطوبت مادهٔ غذایی بیشتر باشد خاصیت انتقال جریان الکتریکی آن مادهٔ غذایی بیشتر است و بر اساس این تأثیر دستگاههای الکتریکی متعدد ساخته شده که جهت تعیین رطوبت بخصوص در کارخانجات تهیهٔ آرد، نان و بیسکویت و غیره که روشهای سریع آزمایشگاهی مورد نظر است بکار می‌رود.

خاکستر :

تعریف - هرگاه مادهٔ غذایی‌را بوسیلهٔ حرارت و مواد شیمیایی اکسیده کرده و بسوزانید بطوری که باقی‌ماندهٔ خاکستری رنگی باقی بماند، این باقی مانده املاح معدنی موجود در مادهٔ غذایی است که اصطلاحاً خاکستر[2] نامیده می‌شود. فلزات و شبه فلزاتی که در درجه اول در مواد غذایی وجود دارند عبارتند از : سدیم، پتاسیم، منیزیم، منگنز کلسیم، آهن، گوگرد، فسفر، کلر و نیز مقدار جزیی مس، روی، کبالت، آلومینیم. فلزات و شبه فلزات بصورت املاح کربنات و فسفات و سولفات و کلرور در مواد غذایی یافت می‌شوند.

برای اندازه‌گیری خاکستر یک مادهٔ غذایی از دو روش استفاده می کنند خاکستر کردن خشک[3] که از حرارت استفاده می‌شود و خاکستر کردن مرطوب[4] که از اسید سولفوریک یا اسید نیتریک و یا اسیدهای قوی دیگر استفاده می‌شود. خاکستر کردن مرطوب در مواردیکه از باقی‌ماندهٔ خاکستر برای اندازه‌گیری عناصر معدنی مانند کلسیم، فسفر و غیره بخواهند استفاده کنند بکار می‌رود.

لوازم و دستگاهها:

۱- کورهٔ الکتریکی با ترموستات که حرارت آن بین ۵۰۰ تا ۵۵۰ درجه سانتیگراد تنظیم شده باشد.

۲- بوته چینی[5] یا آلومینیومی دردار، باقطر دهانهٔ ۳۰ تا ۴۰ میلی متر.

۳- ترازوی آزمایشگاهی با حساسیت ۰/۱ میلی گرم.

۴- دسیکاتور که حاوی یک مادهٔ رطوبت گیر مؤثر باشد.

روش کار:

بوته‌را همراه با در آن قبلا روی شعله بسوزانید وپس از سرد نمودن در دسیکاتور آنرا دقیقاً توزین کنید. در حدود ۵ گرم از نمونه مورد آزمایش را دقیقاً در آن توزین کنید،

---

[1] Condactivity Method
[2] Ash
[3] Dry Ashing
[4] Wet Ashing یا
[5] Crucible

ابتدا آنرا روی شعله بسوزانید (نمونه نباید مشتعل شود) پس از سوزاندن مقدماتی بوته‌را به کورهٔ الکتریکی با حرارت ۵۰۰-۵۵۰ درجه سانتیگراد منتقل کنید و عمل حرارت دادن‌را ادامه دهید تا رنگ خاکستر کاملا روشن شود(تیرگی رنگ خاکستر دلیل باقی ماندن کربن آلی در نمونه‌است) هرگاه رنگ خاکستر تیره باشد بوته‌را از کوره خارج کرده وسرد نمایید و محتوی آنرا با چند قطره آب مقطر مرطوب نموده و پس از تبخیر رطوبت بر روی صفحهٔ گرم ویا حمام بخار بوته‌را مجدداً بداخل کوره منتقل کرده و حرارت را تا بدست آمدن خاکستر روشن ادامه دهید.

بوته‌را همراه بادر آن از داخل کورهٔ الکتریکی خارج کرده و آنرا در دسیکاتور سرد نمایید وسپس مجدداً آنرا توزین نمایید. در هنگام توزین ، در بوته بایستی گذاشته شود.

مقدار درصد خاکستر نمونه‌را از رابطهٔ زیر محاسبه کنید.

$$\frac{\left(M_2 - M_1\right) \cdot 100}{M_o}$$

M_o = وزن نمونه

M_1 = وزن بوته بادر

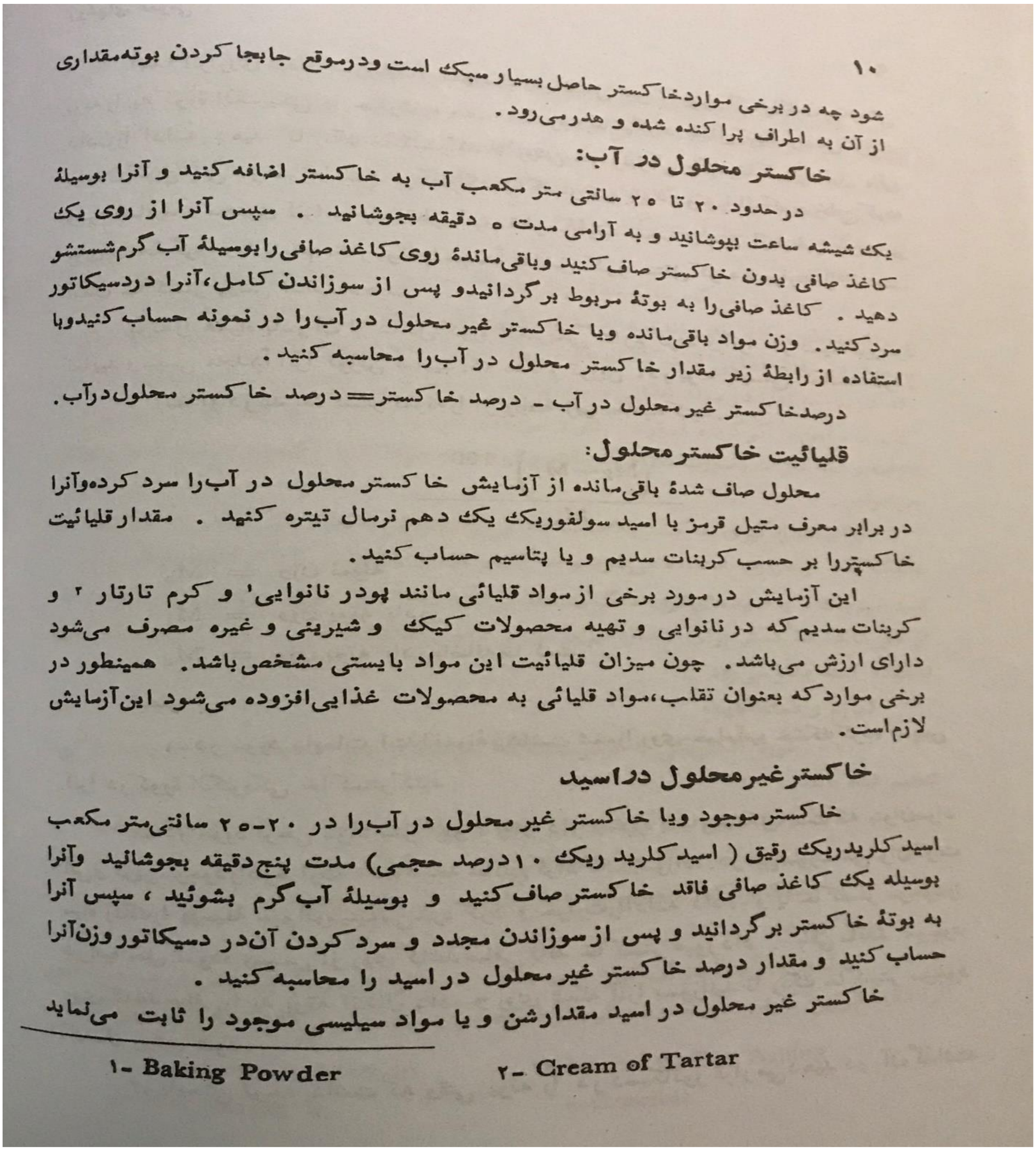
M_2 = وزن بوته بادر باضافه خاکستر .

تبصره :

۱- در مورد مایعات ابتدا نمونهٔ برداشت شده‌را روی حمام‌آب خشک کرده وسپس آنرا در کورهٔ الکتریکی خاکستر کنید.

۲- در مورد برخی مواد مثل جو ، چاو دار و غیره بسیار مشکل است که بتوان مواد آلی و کربن موجود را در حرارت ۵۰۰ درجه سانتی گراد کاملا سوزاند. در این صورت می‌توان ذرات سیاه رنگ‌را بوسیلهٔ سیم آلومینیومی خرد کرد و حرارت‌را ادامه داد. و یا خاکستر موجود را درآب حل نموده وسپس از روی کاغذ صافی فاقد خاکستر عبور داد. باقی ماندهٔ موجود روی کاغذ صافی‌را به بوته انتقال داده و روی شعله آنرا بسوزانید تا رنگ خاکستر موجود کاملا روشن شود.

۳- بایستی توجه داشت که وقتی بوته را در دسیکاتور قرار می‌دهید در آن گذاشته



شود چه در برخی مواردخاکستر حاصل بسیار سبک است ودرموقع جابجا کردن بوته‌مقداری از آن به اطراف پراکنده شده و هدرمی‌رود.

خاکستر محلول در آب:

خاکستر محلول در آب: به خاکستر مکعب آب به خاکستر اضافه کنید و آنرا بوسیلهٔ یک شیشه ساعت بپوشانید و به آرامی مدت ۵ دقیقه بجوشانید. سپس آنرا از روی یک کاغذ صافی بدون خاکستر صاف کنید وباقی‌ماندهٔ روی کاغذ صافی‌رابوسیلهٔ آب گرم‌شستشو دهید. کاغذ صافی‌را به بوتهٔ مربوط برگردانیدو پس از سوزاندن کامل،آنرا دردسیکاتور سرد کنید. وزن مواد باقی‌مانده ویا خاکستر غیر محلول درآب‌را در نمونه حساب کنیدوبا استفاده از رابطهٔ زیر مقدار خاکستر محلول درآب‌را محاسبه کنید.

درصدخاکستر غیر محلول درآب - درصد خاکستر= درصد خاکستر محلول درآب.

قلیائیت خاکسترمحلول:

محلول صاف شدهٔ باقی‌مانده از آزمایش خاکستر محلول در آب‌را سرد کرده‌وآنرا در برابر معرف متیل قرمز با اسید سولفوریک یک دهم نرمال تیتره کنید. مقدار قلیائیت خاکسترا بر حسب کربنات سدیم و یا پتاسیم حساب کنید.

این آزمایش درمورد برخی ازمواد قلیائی مانند پودر نانوایی[1] و کرم تارتار[2] و کربنات سدیم که در نانوایی و تهیه محصولات کیک و شیرینی و غیره مصرف می‌شود دارای ارزش می‌باشد. چون میزان قلیائیت این مواد بایستی مشخص باشد. همینطور در برخی مواردکه بعنوان تقلب،مواد قلیائی به محصولات غذایی‌افزوده می‌شود این‌آزمایش لازم‌است.

خاکسترغیرمحلول دراسید

خاکستر موجود ویا خاکستر غیر محلول درآب‌را در ۲۵-۲۰ سانتی‌متر مکعب اسیدکلریدریک رقیق (اسیدکلریدریک ۱۰ درصد حجمی) مدت پنج‌دقیقه بجوشانید وآنرا بوسیله یک کاغذ صافی فاقد خاکستر صاف کنید و بوسیلهٔ آب‌گرم بشوئید، سپس آنرا به بوتهٔ خاکستر برگردانید و پس ازسوزاندن مجدد و سرد کردن آن‌در دسیکاتور وزن‌آنرا حساب کنید و مقدار درصد خاکستر غیر محلول دراسید را محاسبه کنید.

خاکستر غیر محلول در اسید مقدارشن و یا مواد سیلیسی موجود را ثابت می‌نماید

---

[1] Baking Powder

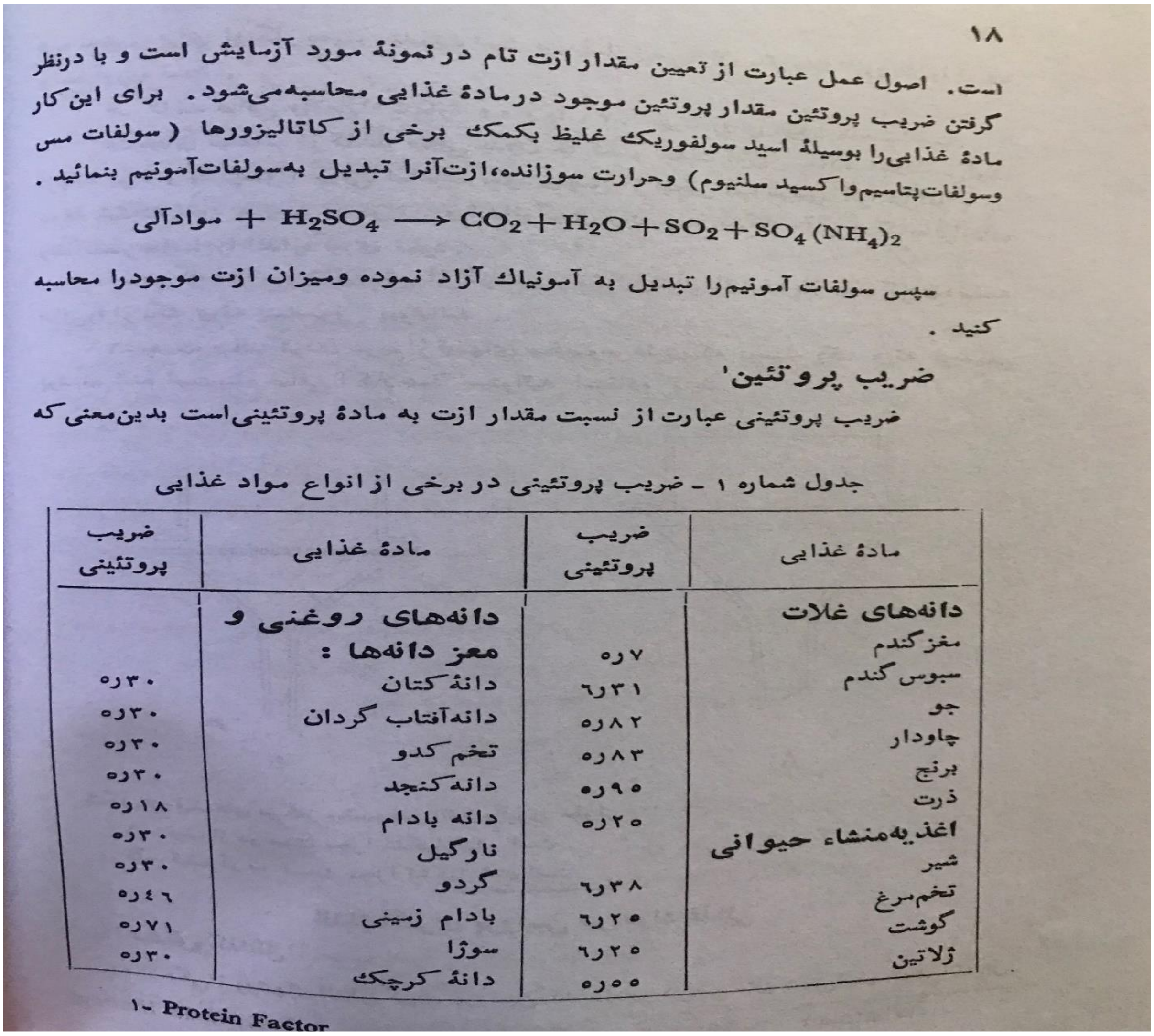
[2] Cream of Tartar

مثلا در مورد انواع ادویه و یا سبزیجات خشک و غیره که به عنوان تقلب و برای سنگین کردن محصول، این مواد به آن اضافه می شود و یا در تهیه آن دقت نشده است ای آزمایش لازم به نظر میرسد.

اندازه گیری پروتئین در مواد غذایی

روش کلدال

یکی از روش های اندازه گیری پروتئین که ساده و در عین حال دقیق است روش کلدال است.



۱۸

است. اصول عمل عبارت از تعیین مقدار ازت تام در نمونهٔ مورد آزمایش است و با درنظر گرفتن ضریب پروتئین مقدار پروتئین موجود درمادهٔ غذایی محاسبه‌می‌شود. برای این کار مادهٔ غذایی‌را بوسیلهٔ اسید سولفوریک غلیظ بکمک برخی از کاتالیزورها (سولفات مس وسولفات‌پتاسیم‌واکسید سلنیوم) وحرارت سوزانده، ازت‌آنرا تبدیل به‌سولفات‌آمونیم بنمائید.

$$\text{مواد آلی} + H_2SO_4 \longrightarrow CO_2 + H_2O + SO_2 + SO_4(NH_4)_2$$

سپس سولفات آمونیم‌را تبدیل به آمونیاک آزاد نموده ومیزان ازت موجودرا محاسبه کنید.

ضریب پروتئین[1]

ضریب پروتئینی عبارت از نسبت مقدار ازت به مادهٔ پروتئینی‌است بدین‌معنی که

جدول شماره ۱ - ضریب پروتئینی در برخی از انواع مواد غذایی

مادهٔ غذایی	ضریب پروتئینی	مادهٔ غذایی	ضریب پروتئینی
دانه‌های غلات		**دانه‌های روغنی و معز دانه‌ها :**	
مغز گندم	٥ر٧	دانهٔ کتان	٥ر٣٠
سبوس گندم	٦ر٣١	دانه‌آفتاب گردان	٥ر٣٠
جو	٥ر٨٢	تخم کدو	٥ر٣٠
چاودار	٥ر٨٣	دانهٔ کنجد	٥ر٣٠
برنج	٥ر٩٥	دانه بادام	٥ر١٨
ذرت	٥ر٢٥	نارگیل	٥ر٣٠
اغذیه به‌منشاء حیوانی		گردو	٥ر٣٠
شیر	٦ر٣٨	بادام زمینی	٥ر٤٦
تخم مرغ	٦ر٢٥	سوژا	٥ر٧١
گوشت	٦ر٢٥	دانهٔ کرچک	٥ر٣٠
ژلاتین	٥ر٥٥		

---

[1] Protein Factor

در گوشت مقدار ازت مادهٔ پروتئینی ۱۶٪ است و با درنظر گرفتن نسبت $\frac{۱۰۰}{۱۶}$ عدد ۶ر۲۵ که ضریب تبدیل ازت به پروتئین است حاصل می‌شود.

در گندم نسبت ازت به مادهٔ پروتئین ۱۷ر۵ درصد است و بدین سبب ضریب تبدیل را ۵ر۷ درنظر می گیرند. و در شیر ولبنیات این ضریب ۶ر۳۸ است.

الف ـ روش ماکرو کلدال[1]

وسایل لازم:

۱ـ بالن مخصوص کلدال (برای هضم ماده غذایی)

۲ـ ارلن مایر ۲۵۰-۳۰۰ سانتی‌متر مکعبی

۳ـ استوانهٔ ۵۰ سانتی‌متر مکعبی

۴ـ بورت ۱۰۰ سانتی‌متر مکعبی

۵ـ دستگاه تقطیر کلدال

مواد شیمیایی

۱ـ اسید سولفوریک غلیظ

۲ـ سولفات مس

۳ـ سولفات دوپتاس

۴ـ اکسید سلنیوم

۵ـ محلول اسید بوریک ۲ درصد

۶ـ محلول اسید سولفوریک ۰ر۱ نرمال

۷ـ معرف ـــ ۰ر۰۱۶ گرم متیل قرمز و ۰ر۰۸۳ گرم برموکرزول سبز را در صد قسمت الکل حل کنید.

روش آزمون،

مقدار ۰ر۷ تا ۳ر۵ گرم از نمونه را بر حسب میزان ازت موجود در مادهٔ غذایی در کاغذ صافی کوچک و یا یک ورقه کوچک آلومینیومی دقیقاً وزن کرده و در داخل بالن هضم بیاندازید سپس ۲۰ سانتی‌متر مکعب اسید سولفوریک غلیظ، ۸۰ گرم از مخلوط کاتالیزور

---

[1] Macro Kjeldahl

(۹۶ درصد سولفات سدیم خشک، ۳ر۵ درصد سولفات مس و ۰ر۵ درصد دی‌اکسید سلنیوم) به آن افزوده و بالن را به دستگاه مخصوص هضم کلدال وصل کرده و حرارت دهید.

حرارت باید درابتدا ملایم بوده و پس از اینکه محتوی بالن دیگر کف نکرد حرارت را زیاد کنید و گاهگاهی بالن را بهم بزنید و حرارت را آنقدر ادامه دهید تا مایع بیرنگی در ته بالن باقی بماند. دراین موقع نمونه کاملا هضم شده است (چون بخارات متصاعد شده از بالن درموقع هضم محرك و سوزاننده هستند بایستی عمل حرارت دادن در محوطهٔ سرپوشیده Hut انجام شود تا از پخش گازهای حاصل در محوطهٔ آزمایشگاه جلوگیری بعمل آید) عمل هضم تقریباً درحدود ۲ ساعت و یا بیشتر طول خواهد کشید در فواصل عمل بایستی هرچند وقت یکبار بالن راتکان دهید تاعمل بطور یکنواخت انجام شده و هرگاه مقداری ازنمونه به دیواره بالن چسبیده باشد بایستی آنرا بوسیلهٔ آب مقطر شسته تا تمام نمونه در ته بالن جمع شود.

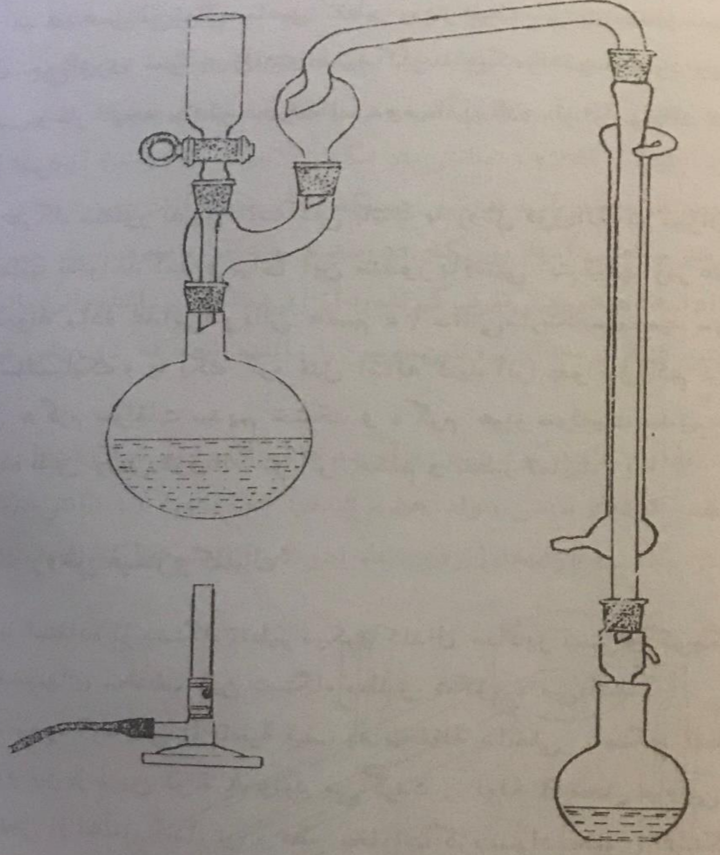
تقطیر مادهٔ هضم شده:

بالن را بگذارید سرد شود. و سپس آنرا با ۴۰۰ سانتی‌متر مکعب آب مقطر ردفعات مکرر شستشو داده واز راه قیف مربوط به بالن تقطیر بداخل آن بریزید: عمل شستشوی بالن هضم را چندین مرتبه تکرار کنید تا مطمئن شوید که تمام قسمت هضم شده ببالن دستگاه تقطیر وارد شده و چیزی از آن هدر نرفته است. چند قطعه سنگ جوش به آن بیافزایید.

در زیر قسمت سرد کننده (کندانسور) دستگاه تقطیر یک ارلن مایر محتوی ۵۰ سانتی‌متر مکعب محلول اسید بوریک و چند قطره معرف قرار دهید. دستگاه تقطیر راکاملا و با دقت ببندیدو توجه داشته باشید که شیر آب مربوط به کندانسورباز باشدو قسمتهای مختلف دستگاه بطور محکم بهم مربوط باشند.

سپس از راه قیف دستگاه تقطیر به مقدار کافی محلول سود ۵۰ درصد بیافزایید تامحیط عمل قلیایی شود (اقلا ۷۵ سانتی متر مکعب سود لازم است) بالن را حرارت دهید وعمل تقطیررا ادامه دهید تا تمام آمونیاك متصاعدشده دربالن گیرنده جمع شود معمولا ۱۵۰ سانتی‌متر مکعب از مایع تقطیر شدهٔ اولیه شامل آمونیاك محتوی می‌باشد برای اطمینان بیشتر تقریباً درحدود ۳۰۰ سانتی‌متر مکعب از محلول تقطیر شده را جمع‌آوری نموده و پس ازآن حرارت را قطع کنید.

ازابتدا یک شاهدهم درنظر گرفته شده و کلیه‌اعمال فوق‌الذکررابا شاهدانجام دهید



شکل ٤

دستگاه تقطیر ماکرو کلدال

فقط بالن شاهد فاقد نمونهٔ غذایی‌است . ارلن‌مایر محتوی مایع تقطیر شده‌را از زیر دستگاه جدا نموده و محلول‌را بوسیله اسید سولفوریک ۰ر۱ نرمال‌خنثی کنید. هر سانتی‌مترمکعب اسیدسولفوریک ۰ر۱ نرمال برابر با ۰ر۰۰۱٤ گرم ازت است. با درنظر گرفتن‌این‌رابطه مقدار درصد ازت و نیز با در نظر گرفتن ضریب پروتئین، مقدار درصد پروتئین را در یک مادهٔ غذایی حساب کنید.

تبصره :

۱- در عمل می‌توان حاصل تقطیر را در ظرف محتوی مقدار معینی اسید کلریدریک ۰ر۱ نرمال جمع‌آوری نمود و زیادی اسید کلریدریک را توسط سود و یا پطاس ۰ر۱ نرمال خنثی نمود. و در نتیجه مقدار مصرف اسید و معادل آن مقدار آمونیاک تقطیر شده را برحسب ازت تعیین نمود.

۲- هرگاه منظور تعیین ازت کلی باشد با روش فوق‌الذکر میزان نیترات و نیتریت موجود بحساب نخواهد آمد و برای این منظور بایستی بترتیب زیر عمل شود.

به نمونهٔ مادهٔ غذایی در بالن هضم ۲۵ سانتی‌مترمکعب اسید سولفوریک غلیظ و یک گرم اسید سالسیلیک و یا یک گرم فنل اضافه کنید آنرا بفواصل کم در مدت ده دقیقه بهم بزنید سپس ۸ گرم سولفات سدیم خشک و ۵ گرم هیپوسولفیت سدیم و ۲ گرم پودر روی به آن افزوده طبق روش فوق‌الذکر آنرا هضم و تقطیر نمایید.

ب - روش میکروکلدال[1]

با استفاده از دستگاه تقطیر میکروکلدال مقادیر کمتر و کوچکتر آمونیاک سنجیده می‌شود. قسمتهای مختلف این دستگاه مطابق شکل ۰ می‌باشد.

مواد مورد آزمایش از ناحیهٔ قیف به محفظهٔ داخلی دستگاه تقطیر وارد می‌شود و بخارات گرم نیز ازطریق لولهٔ A وارد می‌گردد. لولهٔ B محل خروجی مواد موردآزمایش می‌باشد و پس از اختتام آزمایش و قطع بخارات گرم، مواد محتوی دستگاه تقطیر بطورخودکار ازاین محل خارج می‌شود و شستشوی دستگاه عملی می‌گردد.

روش آزمون :

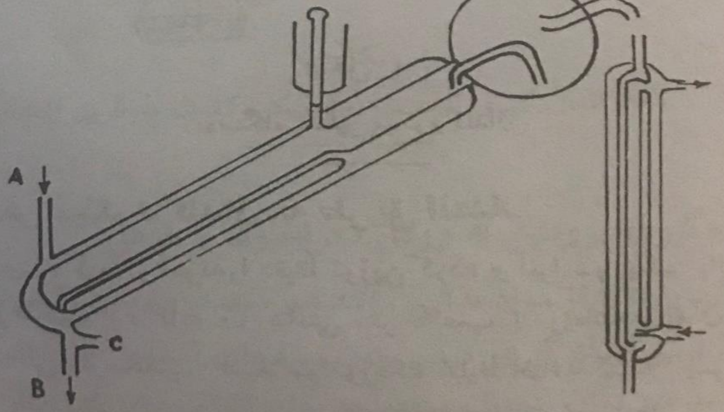
روش عمل مشابه روش ماکروکلدال است با این تفاوت که مقادیر نمونه و مواد شیمیایی مورد مصرف به نسبت کاهش یافته‌اند:

در حدود ۰ر۱۵ گرم از نمونهٔ خشک مادهٔ غذایی را توزین کرده و در بالن‌های مخصوص هضم دستگاه میکروکلدال (بظرفیت ۳۰ تا ۳۵ سانتیمتر مکعب) ریخته و به

۱- Micro Kjeldahl

آن ۸ر۰ گرم از مخلوط کاتالیزور (۹۶ درصد سولفات سدیم خشک، ۵ر۳ درصد سولفات مس و ۵ر۰ درصد اکسید سلینوم) و ۲ سانتی‌متر مکعب اسید سولفوریک غلیظ به آن اضافه کنید. پس از حرارت دادن و هضم مادهٔ غذایی مطابق آنچه که در روش ماکروکلدال گفته شد. نمونه‌را با مقدار کافی آب رقیق کرده و از ناحیهٔ قیف به دستگاه تقطیر وارد کنید. سپس با افزودن سود غلیظ (اقلا ۱۵ سانتی‌متر مکعب سود ۴۰ درصد) آنرا قلیایی نمایید و بالاخره با برقراری جریان بخار آب بداخل دستگاه ، آمونیاك آزاد شده‌را در قسمت گیرنده که حاوی ۱۰ سانتی‌متر مکعب اسید بوریک ۲ درصد و چند قطره معرف است جمع‌آوری کنید مدت ۱۰ دقیقه تقطیر را ادامه دهید و سپس ظرف گیرنده‌را از زیر دستگاه برداشته و آنرا با اسید کلریدریک ۲ر۰ نرمال تیتره کنید و مقدار پروتئین موجود را مانند آنچه که در روش قبلی ذکر شد محاسبه نمایید.

برخی از مواد غذایی مانند گوشت و فرآورده های آن را می‌توان ابتدا بروش قبلی (ماکروکلدال) هضم کرده و سپس مواد هضم شده‌را در بالن ۱۰۰ سانتی‌متر مکعبی رقیق نموده و ۱۰ سانتی متر مکعب از محلول رقیق شده‌را در دستگاه میکروکلدال مطابق آنچه که

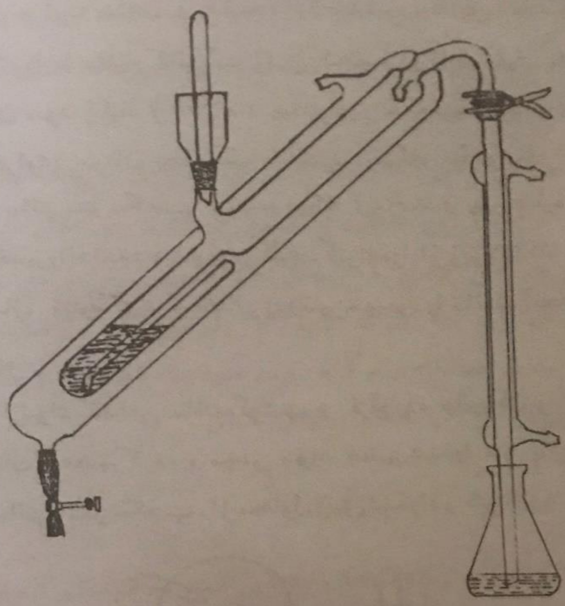


شکل ۵

دستگاه تقطیر میکروکلدال ، سیستم Markham

A- محل ورود بخار.
B- محل خروج آب.
C- دریچهٔ اطمینان.

گفته شد تقطیر کنید. امتیاز این طرزنمونه برداری‌این است که در صورتی که خواسته باشید عمل تقطیررا چندبار تکرار کنید محلول به اندازهٔ کافی موجود خواهدبود.



شکل ۶

دستگاه تقطیر میکرو کلدال

ج - روش میکرو کلدال به طریق انتشار[۱]

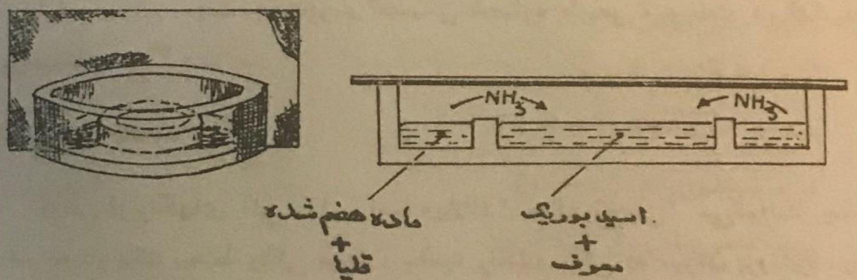
در حدود ۲ گرم از نمونه‌را دقیقاً توزین کرده و آنرا در یک بالن کوچک هضم دستگاه کلدال (ظرفیت ۵۰ تا ۱۰۰ سانتی متر مکعب) ریخته و به‌آن ۴ گرم از مخلوط کاتالیزور ۱۰ سانتی متر مکعب اسید سولفوریک غلیظ اضافه کنید. پس از هضم کامل نمونه‌را به یک بالن‌حجمی ۱۰۰ سانتی‌متر مکعبی منتقل کرده و تا حجم ۱۰۰ سانتی متر مکعب رقیق کنید.

جهت‌آزاد نمودن‌آمونیاك از ظرف دوخانه‌ای‌مخصوص مطابق شکل ۷ استفاده‌می‌شود یک سانتیمتر مکعب از مادهٔ هضم شده به‌فضای خارجی ظرف ریخته و در فضای داخلی ۲ سانتی‌متر مکعب اسید بوریک ۲ درصد و چند قطره معرف متیل قرمز اضافه کنید، یک -

---

[۱] Conway Micro - diffusion Technique

قطره معرف فنل فتالئین به فضای خارجی و به مایع هضم‌شده اضافه نمائید و درآنرا کاملا مسدود کنید . سپس یک سانتی متر مکعب محلول پتاس اشباع به‌فضای خارجی اضافه کرده و در حالی که در آنرا گذاشته‌اید باچندبار حرکت دادن ظرف، مایع هضم شده‌وپتاس را مخلوط کنید. ظرف‌را بگذارید مدت یک شب بحال خود باشد، آمونیاك متصاعد شده از فضای خارجی به فضای داخلی حاوی اسید بوریک منتشر و جذب آن شده و سپس با استفاده از بورت ۲ سانتی‌متر مکعبی‌مایع موجود در فضای داخلی‌رابوسیلهٔ اسیدسولفوریک ۰.ر. نرمال تیره کنید با محلول هضم شدهٔ موجود می‌توان تعداد بیشتری آزمایش درعین‌حال انجام داد ، یک شاهدهم بایستی در نظرگرفته شود.



شکل ۷

دستگاه اندازه‌گیری ازت به روش‌میکرو کلدال به طریق انتشار

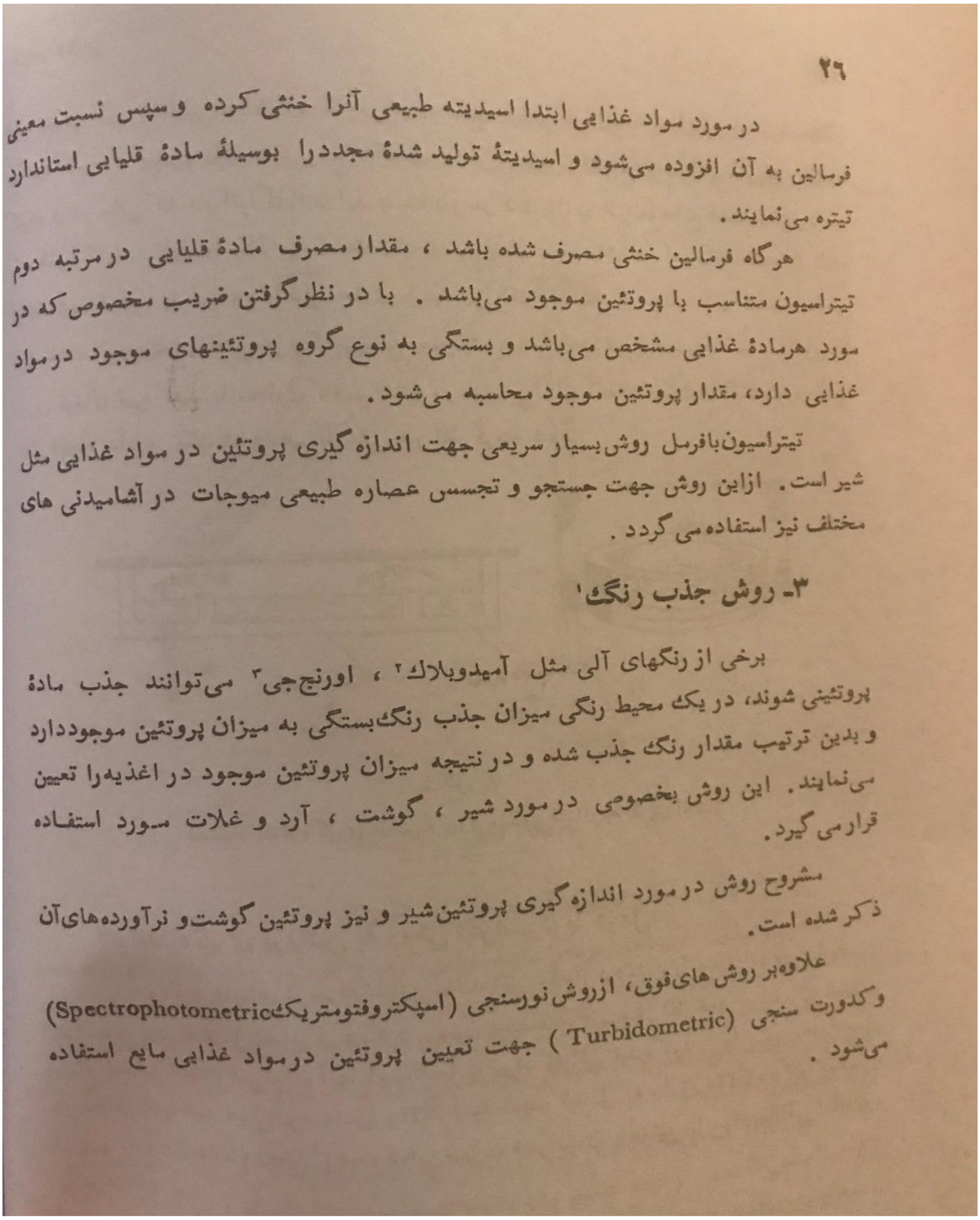
۲- اندازه‌گیری پروتئین به روش تیتراسیون با فرمل[1]

در مورد پاره‌ای از موادغذایی مانند شیر، مقدار پروتئین را می‌توان با روش‌سریع تیتراسیون بوسیلهٔ فرمل اندازه‌گیری کرد . چون اسیدهای آمینه از نظر فعل و انفعال اسیدی بسیار ضعیف هستند نمی‌توان آنهارا مستقیماً با مواد قلیائی تیتره کرد. ولی هرگاه‌این عمل درمجاورت‌فرمالین عملی‌شود عامل NH_2 اسید آمینه تبدیل به عامل $-N=CH_2$ (متیلن- ایمینو Methylene-imino) شده دراین‌صورت تیتراسیون پروتئین با مواد قلیائی امکان‌پذیرخواهد بود.

$$RCOOH\text{-}NH_2 + H\text{-}CHO \rightarrow H_2O + R\text{-}COOH\text{-}N=CH_2$$

---

[1] Formol Titration



در مورد مواد غذایی ابتدا اسیدیته طبیعی آنرا خنثی کرده و سپس نسبت معینی فرمالین به آن افزوده می‌شود و اسیدیتهٔ تولید شدهٔ مجدد را بوسیلهٔ مادهٔ قلیایی استاندارد تیتره می‌نمایند.

هرگاه فرمالین خنثی مصرف شده باشد ، مقدار مصرف مادهٔ قلیایی در مرتبه دوم تیتراسیون متناسب با پروتئین موجود می‌باشد . با در نظر گرفتن ضریب مخصوص که در مورد هرمادهٔ غذایی مشخص می‌باشد و بستگی به نوع گروه پروتئینهای موجود در مواد غذایی دارد، مقدار پروتئین موجود محاسبه می‌شود.

تیتراسیون‌بافرمل روش‌بسیار سریعی جهت اندازه گیری پروتئین در مواد غذایی مثل شیر است. ازاین روش جهت جستجو و تجسس عصاره طبیعی میوجات در آشامیدنی های مختلف نیز استفاده می گردد .

۳- روش جذب رنگ[1]

برخی از رنگهای آلی مثل آمیدوبلاک[2] ، اورنج‌جی[3] می‌توانند جذب مادهٔ پروتئینی شوند، در یک محیط رنگی میزان جذب رنگ‌بستگی به میزان پروتئین موجوددارد و بدین ترتیب مقدار رنگ جذب شده و در نتیجه میزان پروتئین موجود در اغذیه‌را تعیین می‌نمایند. این روش بخصوصی در مورد شیر ، گوشت ، آرد و غلات مورد استفاده قرار می گیرد.

مشروح روش در مورد اندازه گیری پروتئین‌شیر و نیز پروتئین گوشت‌و نرآورده‌های‌آن ذکر شده است.

علاوه‌بر روش های‌فوق، ازروش نورسنجی (اسپکتروفتومتریک‌Spectrophotometric) وکدورت سنجی (Turbidometric) جهت تعیین پروتئین در مواد غذایی مایع استفاده می‌شود .

علم میکروبیولوژی:

میکروبیولوژی مطالعه انواع میکروب هاست و گروه بزرگ و گونه گونی از زیاگان ذره بینی که بصورت تک سلولی یا توده ای از سلولها (کلنی) زندگی میکنندااین علم شامل ویروس ها نیز میگردد که ذره بینی بوده وساختار سلولی ندارند. بنابراین سلول میکروبی متمایزاز سلول جانوری و گیاهی است زیرا سلولهای اخیر غالبا قادر به زندگی مستقل در طبیعت نبوده تنها بصورت بخشی از زیاگان چند سلولی بسر میبرند. یک سلول میکروبی عمدتا قادر به انجام فرایندهای رشد تولید مثل وتولید انرژی

بصورت مستقل از سایر سلول ها از همان نوع یا نوع دیگر میباشند درکل علم میکروبیولوژی علم شناخت موجودات زنده ریز که با چشم غیر مسلح قابل دیدن نیستند مانند ویروس ها ،باکتری ها، قارچ ها، کپک ها، جلبک ها . میکروبیولوژی به عنوان یکی از مهمترین رشته های علوم زیستی به دو دلیل مورد مطالعه قرار میگیرد:

۱.**بعنوان یک علم زیست شناسی پایه**(fundamental): میکروبیولوژی ابزار پژوهشی فوق العاده ای جهت درک ماهیت و اهمیت فرایندهای زندگی فراهم میسازد. فهم و درک اصلی و اساسی ما از مطالعه فرایندهای شیمیایی و فیزیکی حیات از بکار گرفتن میکروارگانیسم ها بدست میاید که درباره پایه های میکروبیولوژی بحث میکندکه شامل Immunology (مقاومت بدن در برابر میکروب ها) Eppidemiology (همه گیر شناسی) Etiology (عامل مولد بیماری).

۲. **بعنوان علم زیست شناسی کاربردی**(Appliaed): میکروبیولوژی با بسیاری مسائل علمی مهم در پزشکی و کشاورزی و صنعت سروکار دارد . در برخی از بیماریهای مهم انسان و جانوران و گیاهان بوسیله میکروارگانیسم ها رخ میدهد.
میکروارگانیسم ها نقش عمده ای در حاصلخیزی خاک ایفا میکند. بسیاری از فرایندهای صنعتی مهم پایه میکروبیولوژی دارند و این امر به پیدایش و توسعه رشته جدیدی بنام بیوتکنولوژی منجر شده است. میکروارگانیسم ها در بیماریزایی و کشاورزی صنایع غذایی انرژی و محیط اهمیت ویژه دارند. کشف میکروبها با اختراع میکروسکوپ ارتباط داشت نخستین کسی که میکروبها را با جزئیات کامل مشاهده کرد تاجر اهل هلند بود.

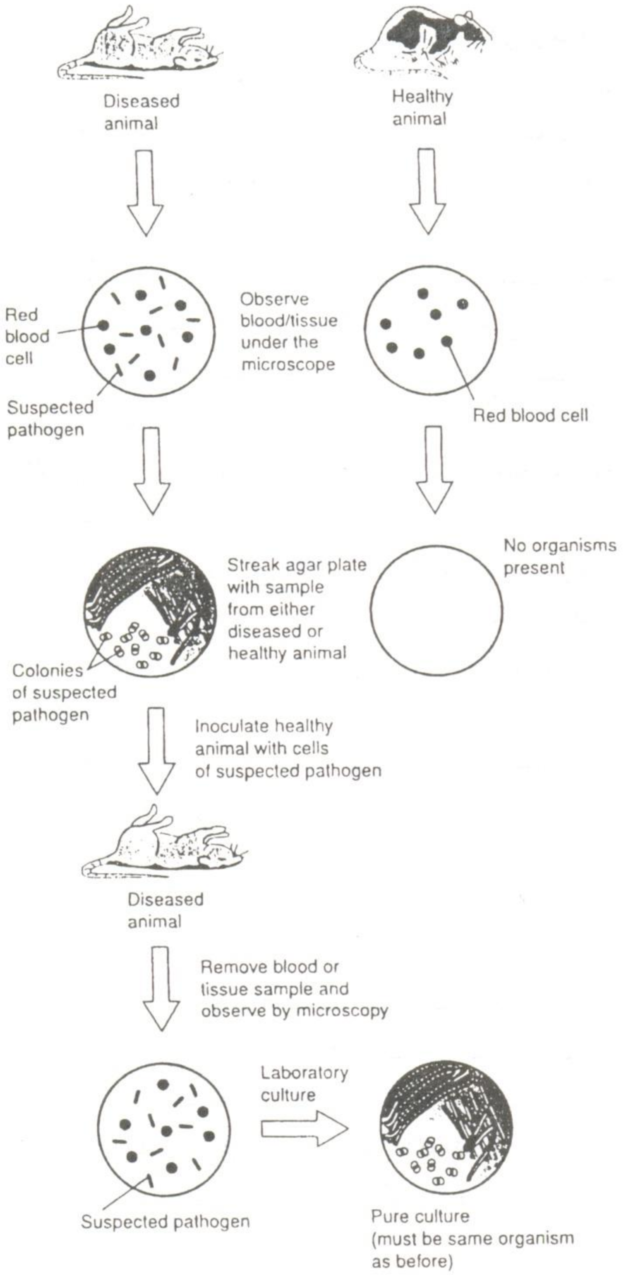
Origin of life: فردبه نام fergas گفت که یک سری موجودات ریز هستندکه ایجادبیماری میکنند که ما آنها را نمیبینیم در زمان ارسطو نظریه منشائ حیات مطرح شد یعنی هر موجود زنده ای از موجود غیر زنده بوجود آمده است.

پاستور نظریه تولید خودبخودی (spantaneus generation)که هر موجود زنده از موجود زنده مشابه خود به وجود آمده است را ارائه کرد :هرگاه غذایی را مدتی نگه داریم فاسد میشود و انواع باکتری ها در ان رشد میکند بعضی اعتقاد داشتند که این میکروبها بطور خودبخودی از مواد بی جان بوجود امده اند . پاستور نشان داد که این ساختارهای زنده در هوا وجود دارند او اینکار را با عبور هوا از پنبه نشان داد. و از گرما برای از بین بردن الودگی ها استفاده کرد که امروزه این روش را سترون کردن (sterilization) می نامند صنایع غذایی مدیون پاستور است زیرا اصول او در صنایع کنسرو سازی و نگهداری از غذاها بکار میرود . پاستور همچنین واکسن بیماری سیاه زخم وبای پرندگان و هاری را کشف کرد.اولین کسی بود که واکسیناسیون را بوجود آورد.

کخ و نظریه عامل مولدبیماری: با مطالعه کخ روی *Bacillus anthracis* این نظریه را اثبات کرد. اصول چهارگانه کخ عبارتند از:میکروب باید همواره در جانوران مبتلا به بیماری وجود داشته باشد بر خلاف افراد سالم. میکروب را باید در کشت خالص دور از بدن جانور کشت داد. چنین کشتی با تلقیح در جانوران حساس بایستی علائم بیماری ویژه را فراهم اورد .
میکروب را بایستی از جانور بیمار بتوان جدا کردو در شرایط ازمایشگاه کشت داد که باید مشابه میکروب های جدا شده اول باشد.

نرمال فلور(**Normal flora**): میکروب های زنده که در بدن هر جانوری وجود دارد اما بی ضرر است. راههای انتقال بیماری ۱- مستقیم که نه از طریق تنفس و نه از طریق غذا منتقل میشود فقط از طریق مقاربتی و تزریق خون فرد مبتلا میشود مانند سوزاک Neasseria gonorra ۲- غیر مستقیم: آقای لیستر با مطالعه بر روی مواد ضد عفونی و

Streptococcus عامل تب زایمان متوجه شد که این باکتری از طریق هوا و غذا میتواند منتقل شود.(شکل ۱)


Diseased animal
Healthy animal
Red blood cell
Observe blood/tissue under the microscope
Suspected pathogen
Red blood cell
Streak agar plate with sample from either diseased or healthy animal
No organisms present
Colonies of suspected pathogen
Inoculate healthy animal with cells of suspected pathogen
Diseased animal
Remove blood or tissue sample and observe by microscopy
Laboratory culture
Suspected pathogen
Pure culture (must be same organism as before)

شکل.۱-اصول کخ برای اثبات اینکه میکروارگانیسم عامل یک بیماری خاص است.

میکروسکوپ و انواع ان:

همانطور که گفته شد اغاز علم میکروبشناسی با اختراع میکروسکوپ در ۱۶۷۷ توسط لوون هوک بود.میکروسکوپها را به دو دسته نوری و الکترونی تقسیم میکنند.

میکروسکوپ نوری (Optical microscope): منبع نور بصورت نور مرئی یاپرتوهای ماورائ بنفش است انواع میکروسکوپ نوری متداول عبارتنداز: زمینه روشن، زمینه تاریک، فلوئورسا نس و فاز متضاد. میکروسکوپ نوری به دو شکل ساده (یک عدسی) مرکب(دو عدسی)وجود دارد.امروزه از نوع میکروسکوپ های مرکب بیشتر استفاده میشودکه از عدسی های چشمی و شیئ تشکیل شده است. اجزای میکروسکوپ نوری شامل: یکی از سه نوع عدسی چشمی که دارا ی قدرت x8, x10,x12/5 میباشد ممکن است مورد استفاده قرار گیرد عدسی های شیئ که مهمترین بخش میکروسکوپ میباشد دارای ۴ نوع و با بزرگنمایی x4 , x10 ,x40 , 100x میباشد. و به ترتیب به نامهای عدسی بسیار ضعیف، عدسی کم قدرت، عدسی پر قدرت و عدسی روغنی نامیده میشود. این عدسی ها از طریق صفحه گردان تغییرمکان داده و بر روی صفحه نگهدارنده لام قرار میگیرند عدسی های چشمی در بالای لوله میکروسکوپ و شیئ در پایین آن قرار دارند. عدسی چشمی پرتوهای نورانی که از عدسی شیئ به توسط یک منشور عبور داده شده اند را دریافت میکند. لوله ای که عدسی ها به ان به ان متصلند توسط دو پیچ تنظیم کننده حساس و تنظیم کننده غیر حساس با بدنه میکروسکوپ اتصال میابد بوسیله پیچهای تنظیم گر میتوان فاصله عدسی شیئ را نسبت به جسم مورد ازمایش تغییر داد.

پایه (Base): در واقع پایه اسکلت اصلی میکروسکوپ محسوب میشودمنبع نوری اغلب در بخش پایه قرارگرفته است .

صفحه نگهدارنده لام یا سکوی میکروسکوپ (stage):این صفحه محل قرارگیری لام مورد بررسی است و در مرکز آن سوراخی وجود دارد که اجازه عبور پرتوهای نورانی از منبع نور به سمت عدسی هارا میدهد این صفحه درزیر عدسی های شیئ قرارگرفته و به بدنه میکروسکوپ متصل است . پیچهایی بنام پیچهای ماکرومتری و میکرومتری صفحه مذکور را به سمت بالا و پایین حرکت میدهد.

کندانسور(condeansor) : درزیر سکوی میکروسکوپ قرار دارد و از چند عدسی تشکیل شده است و عمل ان جمع کردن نور و ارسال ان به داخل عدسی شیئ است . که توسط یک پیچ بطرف بالا و پایین حرکت میکند. غالبا همراه کندانسور یک دیافراگم وجوددارد که عمل ان کنترل مقدار نور ی است که از کندانسور عبور میکند ودارای شاتری است که بادکمه بازو بسته میشود.

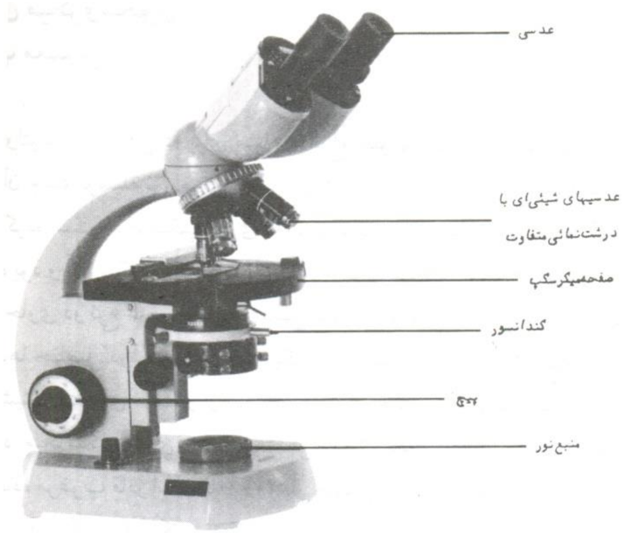
منبع نور: منبع نور اکثرا یک لامپ الکتریکی است که ممکن است در جلومیکروسکوپ قرار گیرد. پرتوهای نور پس از برخورد با اینه ای که در زیر کندانسور، به درون کندانسور فرستاده میشود. ممکن است منبع نور بطور مستقیم در زیر کندانسور قرارمیگیرد. که دراین حالت نیازی بوجود اینه نمیباشد

بزرگنمایی میکروسکوپ:

بزرگنمایی میکروسکوپ Magnification :بزرگنمایی یا درشت نمایی میکروسکوپ عبارت است ازحاصل ضرب قدرت دو عدسی چشمی و شیئ که با هم مورد استفاده قرار میگیرند. مثلا اگر عدسی چشمی x10 با عدسی روغنی با قدرت x100همراه باشد بزرگنمایی با میکروسکوپ x1000 خواهد بود که بیانگر حاصل ضرب توانایی دو عدسی ۱۰ .۱۰۰ میباشد.

توان تفکیک یا قدرت تشخیص(resolving power) :براساس قدرت تشخیص حداقل فاصله بین دو نقطه است که توسط میکروسکوپ بوضوح و جدا از یکدیگر مشاهده گردند. RF معادل نصف طول موج لامبدا میباشد طول موج نور مریئ 0.4 تا 0.7 میکرون میباشد. بنابراین قطر کوچکترین جسمی که توسط میکروسکپ نوری قابل روئت است برابر 0.2

میکرون میباشد. از سویی قدرت تفکیک عدسی به عاملی بنام ضریب شکست نور بستگی دارد . ضریب شکست هوا کمتراز شیشه است لذا پرتوهای نورانی به هنگام عبوراز شیشه لام به هوا منحرف شده ودچار شکستگی میشوند. این مسئله باعث هدررفتن پرتوهای نورانی شده و عدد روزنه ای را کاهش میدهد در عدسی x100 با استفاده از روغن ایمرسیون ضریب شکست نورکاهش یافته و بنابراین از اتلاف نور در اثر انعکاس و شکست در هوا جلوگیری میشود و در نتیجه نور بیشتری وارد عدسی میگردد. (شکل۲)



شکل۲-ساختمان میکروسکوپ نوری

موجودات زنده به دو گروه پروکاریوت(Procaryot) و یوکاریوت(Euocaryot) طبقه بندی میشود.

پروکاریوتها به دو گروه سیانوباکترها وباکتری ها تقسیم میشود. باکتری ها به Archeobocteria و Eubacteria تقسیم میشود. ارکیاها اغلب بی هوازی اند وقادر به زندگی در مجاورت هوا نیستند.بسیاری از انها در شرایط غیر عادی زندگی میکنند مثل چشمه های اب گرم و ابهای بسیار شور و ابهاو خاکهای اسیدی و بازی و برخی متان زا هستند و تولید متان بخشی از متابولیسم انرژی انهاست.

یوکاریوت ها به Animal وPlant و protista تقسیم میشود. Protistaبه سه گروه fungi و protozoa و Alga تقسیم میشود.

ساختمان سلولی پروکاریوت ها:

سلول پروکاریوتی در هر سطحی نسبت به سلول یوکاریوتی ساده تر است بجزاینکه پوشش سلولی درپروکاریوت ها پیچیده تر است . ساختمان سلولهای پروکاریوتی بایستی دارای خصوصیات زیر باشد:

-محتویات درون سلول را در بر گرفته وانرا از محیط خارج جدا میکند

- اطلاعات ژنتیکی را ذخیره و همانندسازی نماید

- اجزای سلولی را سنتز نماید

- ترکیبات پر انرژی را تولید ذخیره و به مصرف برساند.

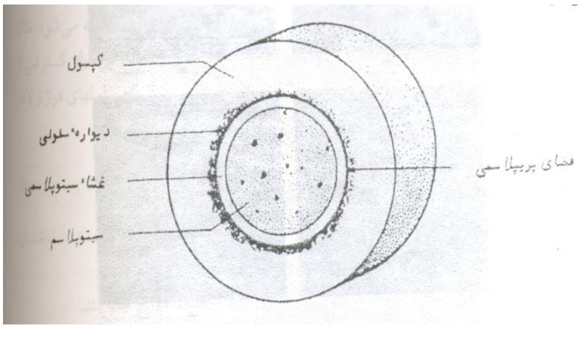
- علاوه بر صفات فوق برخی از باکتری ها دارای حرکت سلولی بوسیله فلاژلا و انتقال اطلاعات ژنتیکی بوسیله پیلای و ذخیره انرژی و واحدهای سازنده مواد هستند.

شبه هسته Nucleoid:

شبه هسته پروکاریوتی معدل هسته یوکاریوت است که DNA در ان وجود داردو حاوی یک کروموزوم خطی یا حلقوی است میتواندآنرا به عنوان یک کروموزوم در نظر گرفته و بوسیله متلاشی ساختن ملایم و سانتریفیوژ کردن شبه هسته را جدا کرد.که شاملRNA , RNA , DNA پلیمراز است.

ساختمانهای سیتوپلاسمی: سلول های پروکاریوتی فاقد پلاستید های خودکار مانند میتوکندری و کلروپلاست ها هستند. انزیمهای انتقال الکترون این سلولها در غشائ سیتوپلاسمی جای دارند. رنگدانه های فتوسنتزی (باکتریوکلروفیل)در باکتریهای فتوسنتز کننده در ساختمانهای خاص غشایی قرار دارندکه ممکن است بصورت وزیکل های گرد یا لایه ای یا ورق مانند در زیر غشای سلولی دیده شود. ۵۰٪ پروتئن های سلول در سیتوپلاسم قرار دارند و انزیم های متابولیسمی راه های گلیکولیز و پنتوزفسفات و چرخه گلی اکسالات و چرخه کربس و کاتالاز و دهیدروژناز استراز ها و پروتئاز ها در سیتوپلاسم وجود دارد.

پوشش سلولی Cell envelop: اکثر باکتری ها دارای دو نوع ساختار بنام دیواره سلولی و غشای سیتوپلاسمی میباشند که سیتوپلاسم را احاطه میکند برخی از آنها ساختار سومی بنام کپسول دارند . لایه هایی که سلولهای پروکاریوتی را احاطه میکند در مجموع پوشش سلولی نامیده میشود. ساختمان و تشکیلات پوشش سلولی در باکتری گرم مثبت و گرم منفی متفاوت است. در واقع این تفاوت موجب تقسیم باکتریها به دو گروه شده است. بسیاری از +Gو-G و ارکئوباکتر ها دارای یک لایه شبکه ای دوبعدی بلوری پروتئنی (لایه S) بعنوان خارجی ترین قسمت از پوشش سلولی هستند این لایه سلول را در برابر انزیم های تخریب کننده دیواره و تهاجم محفظت میکند ودر حفظ شکل سلول و چسبیدن سلول به سطح اپیدرمی میزبان دخالت دارد. (شکل ۳)

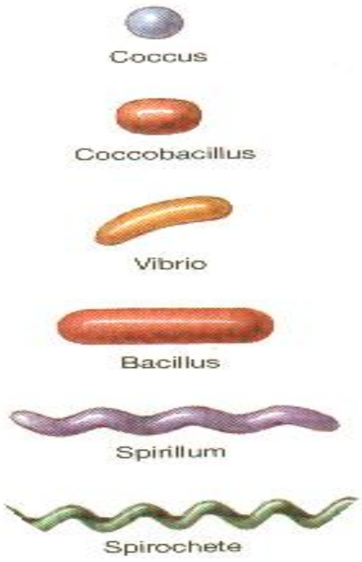


شکل۳-شکل لایه های سطحی اطراف سیتوپلاسم

روش های رنگ امیزی: به منظور مشاهده بهتر سلول ها بویژه سلولهای کاملا شفاف و غالبا متحرک انها را کشته وسپس رنگ میکنند و در زیر میکروسکوپ مشاهده میکنند. از روی واکنش رنگ امیزی میتوان میکروبها را به دو دسته تقسیم کرد. انواع رنگ ها را میتوان بر اساس تمایل انها نسبت به اجزای سلولی به دو گروه اصلی تقسیم کرد ۱- رنگ های مثبت که تمایل قوی نسبت به یک یا چند جز سلول داشته و میتواند قسمت هایی از سلول را رنگ نماید ۲- رنگ های منفی که قادر به نفوذ در پوشش سلولی نمیباشدو با فراهم کردن تباین تیره ای در زمینه سبب دیده شدن میکروبها میگردد که برای نشان دادن ساختارهای سطحی سلول زنده بکار میرود. در رنگ امیزی ساده از یک نوع ررنگ استفاده میشود مثل ابی متیلن که باکتری به رنگ ابی در میاید . رنگ های بازی اصولا با DNAو RNA سلول ترکیب میشود رنگ های اسیدی مثل سافرانین و فوشین و قرمز کنگو ترکیبهای سلول و اصولا پروتئن های بازی را رنگ مینماید .سودان سیاه برای رنگ کردن قطرات چربی در باکتریها بکار میرود.

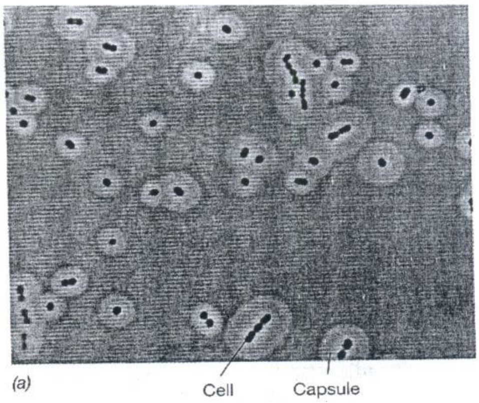
رنگ های افتراقی: بر حسب توانایی جذب رنگ و حفظ ان میتوان باکتری ها را به دوگروه تقسیم کرد متداولترین این روش رنگ امیزی گرم میباشد پزشک دانمارکی Hans christian gram در ۱۸۸۴ برای متمایز کردن باکتری ها ی مولد ذات الریه از هسته سلولهای الوده پستانداران میزبان این روش را ابداع کرد . گرم مثبت به رنگ بنفش و گرم منفی به رنگ قرمز در میاید. علت این واکنش گرم به ساختمان شیمیایی دیواره سلولی مربوط میشود دیواره سلولی گرم مثبت هامتفاوت از گرم منفی هاست . در گرم منفی ها دیواره سلولی لیپید بیشتری داشته و مقدار کمپلکس مورئین ان کم است و ضخامت شان کمتراز گرم مثبت هاست . الکل غلیظ دیواره سلولی گرم منفی ها را حل کرده و یا تغییر ساختمان میدهد در نتیجه فراکمپلکس کریستال ویوله – ید را از سلول میسر میسازد در حقیقت این اختلاف به تراوا بودن بیشتر گرم منفی ها نسبت به الکل است. رنگ امیزی افتراقی دیگر روش مقاوم اسید (Acid fast) میباشد که مختص باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوسیس یا باکتری سل است. برای رنگ امیزی ساختارهای ویژه سلولی نظیر فاژ – اسپور –و مواد هسته از این نوع رنگ امیزی استفاده میشود.

شکل باکتری ها: باکتری ها دارای سه شکل کروی (Coccus) میله ای (Rod) مارپیچی (Spirillum) میباشند.



کپسول یا لایه لعابی : گلیکوکالیکس

بسیاری از پرکاریوت ها در سطح خود مواد لزج و چسبناکی ترشح میکنند و براحتی میتوان انرا بکمک رنگ امیزی منفی نشان داد ابتدا باکتری ها را روی لام ثابت میکنند و بارنگ مرکب چین انرا رنگ میکنند مرکب چین در کپسول نفوذ پیدا نمیکند بلکه زمینه دید را تاریک میسازد در نتیجه مواد کپسولی بصورت لایه روشنی در زمینه تاریک به چشم میخورد . کلنی باکتری های سازنده کپسول بر روی محیط های جامد غالبا مرطوب درخشان و لزج دیده میشود کپسول فقط بوسیله گونه های خاصی از باکتری ها تولید میشود و تولید ان به شرایط ابتدایی محیط بستگی دارد ترکیب شیمیایی کپسول متغییر است در برخی پلی ساکاریدی ودر سایرین پلی پپتیدی مرکب از یک یا دو نوع امینواسید نوع غیر طبیعی D است. کپسول لایه محافظتی در برابر شرایط خاص محیط برای باکتری ها ایجاد مینماید کپسول باکتری مولد ذات الریه انتروکوکوس نمونیا *Streptococcus. Pnemoniae* بیش از سایر باکتریها مطالعه شده است کپسول باکتریها غالبا عامل چسبندگی بوده و برای ایجاد پوسیدگی دندان ضروت دارد. *Str. Mutans* عامل اصلی پوسیدگی دندان برای تولید پوسیدگی بصورت توده های انبوه روی سطح دندان انباشته میشود وبرای این اثصال به کپسول مرکب از گلوکان و فروکتان احتیاج دارد این دو ماده اختصاصا از ساکاروز ساخته میشود واز قندهای دیگر تولید نمیشود. کپسول گاهی خاصیت انتی ژنی دارد هرگاه باکتری کپسول دار با انتی سرم کپسول مخلوط کرده ودر زیر میکروسکوپ مطالعه شود کپسول متورم شده و به وضوح دیده میشود.(ازمایشQuellung).



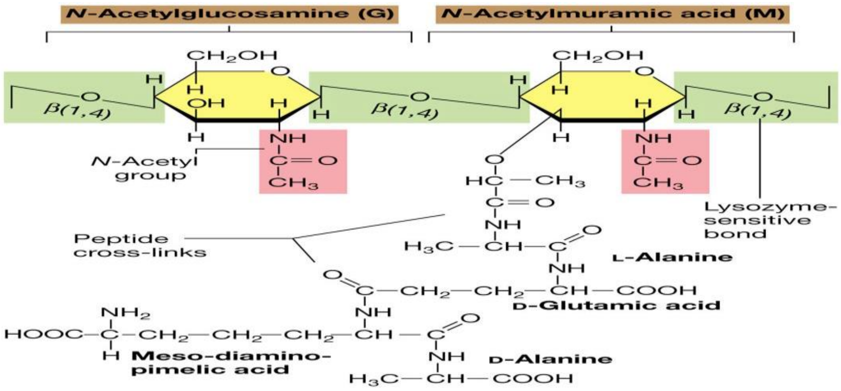
شکل۴-کپسول باکتری Acinetobacter

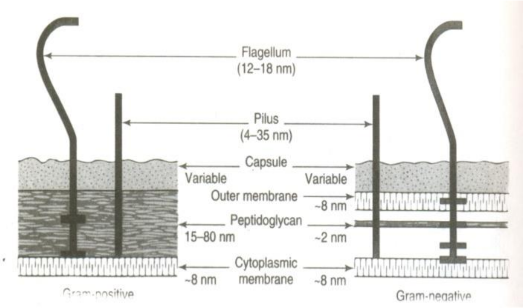
دیواره سلولی پروکاریوتها: پپتیدوگلیکان و مولکولهای منسوب به **آن** لایه بین کپسول وغشای سیتوپلاسمی را رویهم رفته دیواره سلولی cell wall نامند این دیواره در گرم مثبت ها عمدتا از پپتیدوگلیکان و اسید تیکوئک ودر گرم منفی از پپتیدوگلیکان و لیپوپروتئین و فسفو لیپید و لیپوپلی ساکارید ساخته شده است . دیواره سلولی در باکتریها چند نقش ایفا میکند به باکتریها شکل میدهد ودارای شاخص انتی ژنی است لایه لیپوپلی ساکاریدی دیواره سلولی تراوایی غیرانتخابی است ولی لایه غشای خارجی گرم منفی عبور مولکولهای نسبتا درشت را به تاخیر میاندازد یا متوقف میکند . دیواره سلولی محل

اتکای برای بیوسنتزترکیبهای دیواره محسوب میشود ودر تقسیم سلولی نقش دارد .بدون دیواره سلول متلاشی میشود در گرم مثبتها این دیواره از دو بخش پپتیدوگلیکان (موکوپپتید یا مورئن) واسید تیکوئیک ساخته شده است.

پپتیدوگلیکان:

این بخش پلیمر پیچیده ای است مرکب از سه قسمت **الف.** داربست که از استیل گلوکز امین و ان استیل مورامیک اسید که بطور یک در میان قرار میگیرد و با پیوند ۴-۱ گلیکوزیدی بیکدیگر پیوند میشود این دو قنداز نظر شیمیایی از گلوکز ساخته میشود این اسکلت در همه باکتری ها یکسان است . **ب-** مجموعه ای از زنجیره های جانبی مرکب از چهار امینواسید یعنی زنجیره تتراپپتیدی مشابه است که به ان استیل مورامیک اسید پیوند یافته است. **ج-** علاوه بر ان یکسری پل های عرضی یا پیوند تقاطعی پپتیدی بین لایه ها وجود دارد.لایه های پپتید.گلیکان با پل های عرضی بهم متصل میشوند و یک مولکول غول پیکر را بوجود می اورد که اسکلت محکمی را را دو طرف غشای سیتوپلاسمی میسازد. زنجیره جانبی و پل تقاطعی بر حسب گونه باکتری ها متفاوت است در گرم منفی ها پل تقاطعی و پپتیدی مستقیم بین گروه امینی دی امینوپایمیلیک اسید(DAP) یک زنجیره جانبی با گروه کربوکسیل د-الانین انتهای زنجیره جانبی دیگر بوجود میاید. زنجیره جانبی همه گونه ها صفت مشترک مهمی دارند. امینواسید ان در گرم مثبت ها بترتیب ال – الانین و د-گلوتامین و ال-لایزین و د-الانین در گرم منفی ها در وضع سه بجای لایزین دی امینوپایملیک اسید قرار میگیرد DAP ماده ای منحصر به دیواره سلولی پروکاریوت ها ست این ماده پیش ماده لیزین در بیوسنتز لیزین در متابولیسم است.


N-Acetylglucosamine (G)
N-Acetylmuramic acid (M)
CH₂OH
β(1,4)
N-Acetyl group
Peptide cross-links
Lysozyme-sensitive bond
L-Alanine
D-Glutamic acid
Meso-diamino-pimelic acid
D-Alanine
HOOC–C–CH₂–CH₂–CH₂–CH–C=O
H₃C–CH–COOH

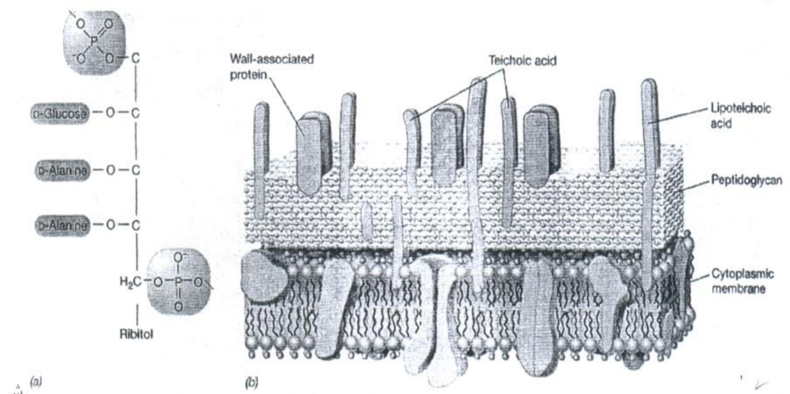

Flagellum
(12–18 nm)
Pilus
(4–35 nm)
Capsule
Variable
Variable
Outer membrane
~8 nm
Peptidoglycan
15–80 nm
~2 nm
Cytoplasmic
membrane
~8 nm
~8 nm
Gram-positive
Gram-negative

شکل۶-مقایسه ساختمان پوشش سلولی باکتری گرم +و -

پوشش سلولی گرم مثبت ها: پوشش سلولی گرم مثبت ها نسبتا ساده بوده و از دو تا سه لایه تشکیل شده است . غشا سیتوپلاسمی یک لایه پپتیدوگلیکان ضخیم و در بعضی باکتری ها یک لایه بنام کپسول یا یک لایه S در خارج دارند.

اجزای اختصاصی دیواره سلولی گرم مثبت ها: در این دیواره مقدارزیادی اسید تیکوئیک یا تیکورونیک وجود دارد ودارا ی مولکولهای پلی ساکاریدی هستند . اسید تیکوئیک : این پلی ساکارید اسیدی مولکولهای محلول در اب دارای ریبیتول یا گلیسرول متصل بهم از طریق فسفات دی استر میباشد دو نوع اسید تیکوئیک وجود دارد . اسید تیکوئیک دیواره که بطور کووالان به پپتیدوگلیکان پیوند میشود و اسید تیکوئیک غشا که بطو کووالان به گلیکولیپید غشا پیوند میشود برخی گرم مثبت ها اسید تیکوئیک دیواره ندارند ولی همه گونه ها دارای اسید تیکوئیک غشا است واحدهای تکراری اسید تیکوئیک میتواند گلیسرول یا ریبیتول باشد .این اسید یون Mg را مهار میکند و این یون را برای سلول فراهم میکند و در کار طبیعی پوشش سلولی مشارکت دارد. (شکل۶)

پلی ساکاریدها: در اثر هیدرولیز دیواره گرم مثبت ها قندهای خنثی نظیر مانوز ـ ارابینوز- گالاکتوز- رامنوز ـ گلوکز امید تولید مینماید که قند ها به شکل واحد های کوچک پلی ساکاریدی در دیواره سلولی قرار دارند..(شکل۶)


D-Glucose
D-Alanine
D-Alanine
Ribitol
Wall-associated protein
Teichoic acid
Lipoteichoic acid
Peptidoglycan
Cytoplasmic membrane
(a)
(b)

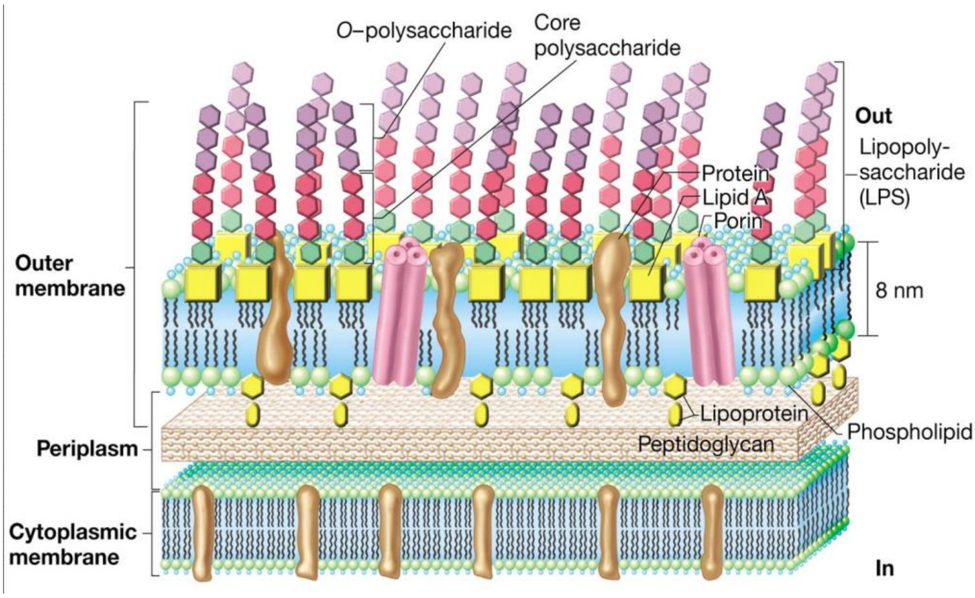
شکل۷-ساختمان کلی دیواره باکتری گرم مثبت

اجزای اختصاصی دیواره سلولی گرم منفی ها: دیواره سلولی گرم منفی ها سه بخش دارد که بیرون بخش پپتیدوگلیکان قرار میگیرد عبارتنداز لایه لیپوپروتئینی و لایه فسفولیپیدی (غشای خارجی) و لایه لیپوپلی ساکاریدی.

لایه لیپوپروتئینی : مولکول های لیپوپروتئین با لایه های غشای خارجی و پپتیدوگلیکان پیوند تقاطعی حاصل میکند بخش پروتئنی دارای ۱۵ امینو اسید است که اخرین آن یعنی لایزین، با عامل آمین با پیوند پپتیدی به کربوکسیل DAP زنجیره جانبی تترادپپتیدی پپتیدوگلیکان متصل میشود . لیپو پروتئین فراوان ترین پروتئین سلول های گرم منفی است و نقش ان تثبیت و پایدار ساختن غشای خارجی و وصل کردن ان به پپتیدوگلیکان است.

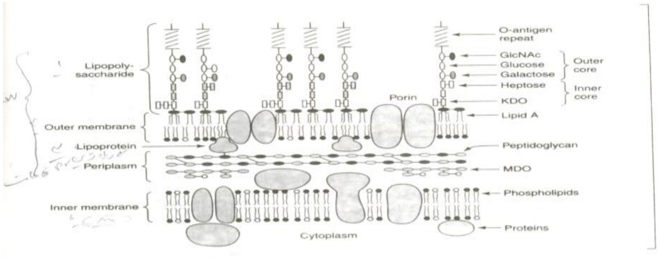
غشای خارجی : بخش فسفولیپیدی یا غشای خارجی از دو لایه فسفو لیپید ترکیب یافته که دران فسفولیپیدها ی تیغه های خارجی بوسیله لیپو پلی ساکارید اشغال شده است غشای خارجی مانند غشای سیتوپلاسمی (غشای داخلی) به حالت موزائیک سیال و محتوی یک سری پروتئن محصور در زمینه فسفولیپیدی است. غشای خارجی از خارج شدن ونشت پروتئن پری پلاسمی جلوگیری میکند و باکتریها (روده ای ها) را از اثر نمکهای صفراوی هیدرولیتیک محیط میزبان حفاظت میکند وجود منافذ پروتئین در غشا خارجی انرا نسبت به مواد محلول کوچک تراوا میسازد و مولکولهای درشت برخی انتی بیوتیک ها به کندی در ان نفوذ میکند.(علت مقاومت گرم منفی ها به انتی بیوتیکها) برخلاف غشای سیتوپلاسمی غشای خارجی نسبت به مولکولهای کوچک نسبتا تراوایی دارد و انتقال از طریق کانالهای پروتئینی بنام پورین که اختصاصی و غیر اختصاصی عمل میکنند عبور مینماید.

لیپوپلی ساکارید($L.P.S$): این بخش دیواره سلولی گرم منفی ها از یک ترکیب پیچیده لیپیدی بنام لیپید A ساخته شده است این لیپید از واحدهای دی ساکاریدی مرکب از گلوکز امین فسفر دار ساخته شده که به ان چند اسید چرب زنجیره بلند متصل میشود . lpsدر حیوانات فوق العاده سمی است و انرا اندوتوکسین گرم منفی ها میشناسند این ترکیب به سطح سلول میچسبد و تنها با متلاشی کردن ان ازاد میگردد هنگامیکه lps به لیپید A و پلی ساکارید تجزیه میشود خاصیت سمی با لیپید A باقی میماند . باعث پایداری غشا و جلوگیری از اتصال آنتی بیوتیک میشود.


O–polysaccharide
Core polysaccharide
Out
Lipopoly-saccharide (LPS)
Protein
Lipid A
Porin
Outer membrane
8 nm
Lipoprotein
Phospholipid
Peptidoglycan
Periplasm
Cytoplasmic membrane
In

شکل ۸

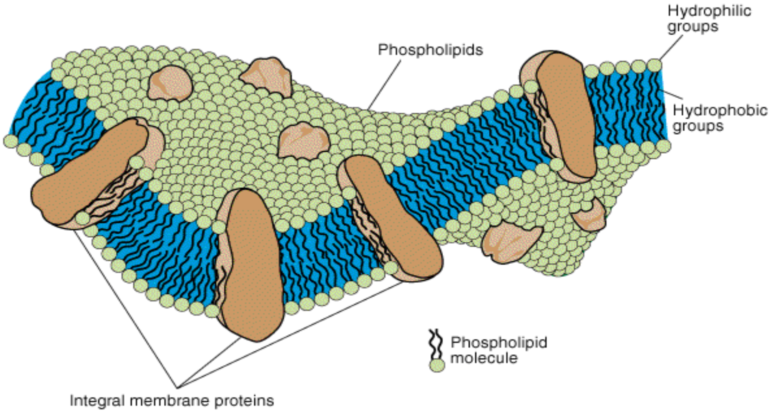
فضای پری پلاسمیک : فضای بین غشای خارجی و داخلی (غشای سیتوپلاسمی) را فضای پریپلاسمی مینامند این فضا دارای پپتیدوگلیکان ابدار ژله ای شده است عده زیادی از پروتئینها و الیگوساکاریدها در ان وجود دارد که به اسانی قابل انتشار در ژل هستند. پروتئینهای پری پلاسمی شامل پروئین های متصل شونده به مواد اختصاصی اند از جمله انزیم های هیدرولیتیک مانندالکالین فسفاتاز و۵ نوکلئوتید از که مواد غیر قابل انتقال به مواد قابل انتقال میشکند واین ترکیبات در تنظیم فشار اسمزی سلول دخالت دارند.(شکل۹)


O-antigen repeat
GlcNAc
Glucose
Galactose
Heptose
KDO
Lipid A
Outer core
Inner core
Porin
Lipopoly-saccharide
Outer membrane
Lipoprotein
Periplasm
Peptidoglycan
MDO
Phospholipids
Inner membrane
Proteins
Cytoplasm

شکل۹-پوشش باکتری های گرم منفی و فضای پری پلاسمیک

غشای سیتوپلاسمی:

غشای سیتوپلاسمی باکتریها را غشای سلولی یا غشای داخلی مینامند این غشا از فسفولیپید و پروتئین تشکیل شده است عملکرد عمده غشای سیتوپلاسمی ۱. نفوذپذیری انتخابی و انتقال مواد محلول ۲. انتقال الکترون و فسفریلاسیون اکسیداتیو در گونه های هوازی ۳. ترشح انزیم های هیدرولیز کننده ۴. دارا بودن انزیم ها و مولکولهای حاملی که در سنتز DNA پلیمرهای دیواره سلولی و لیپیدهای غشا نقش دارند. ۵. دارا بودن گیرنده ها و سایر پروتئین های کموتاکسی و سایر سیستم های تبدیل کننده پیامهای حسی است.


Hydrophilic groups
Phospholipids
Hydrophobic groups
Phospholipid molecule
Integral membrane proteins

شکل۱۰

انزیم های موثر بر دیواره سلولی :

۱-انزیم لیزوزیم پیوندبتا ۴-۱ گلیکوزیدی اسکلت پپتیدوگلیکانی را میشکند این انزیم در ترشحات بدن (اشک بزاق ترشحات بینی) و سفیده تخم مرغ یافت میشود گرم مثبت ها در اثر فشار اسمزی پایین تر از سلول تحت این انزیم متلاشی میشوند و

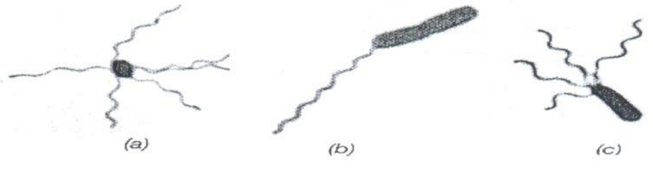
پروتوپلاست ازاد میشود در گرم منفی غشای خارجی مانع رسیدن لیزوزیم به پپتیدوگلیکان میشود اما اگر سلول تحت تاثیر دی امین تترااستیک اسید (EDTA)قرار گیرد وسپس لیزوزیم اثر داده شود دیواره سلول را از دست داده و به شکل اسفروبلاست در میاید .۲- باکتریها اتولیزین های بسیاری ترشح میکنند این آنزیمها نقش مهمی در رشد سلولی و تقسیم آن بر عهده دارند.۳- انزیم های هیدرولیتیک که پپتیدوگلیکان را تجزیه میکند (گلیکوزیدازها امیدازها پپتیدازها) بعلاوه پس از مرگ باکتری ها در اتولیز انها شرکت مینمایندو پپتیدوگلیکان را تجزیه و متلاشی میکند.در صورتیکه پروتوپلاست واسفروبلاست بتواند رشد کنندو تقسیم شوند به انها اشکال L گویند.

عوامل ضد باکتریایی موثر بر غشا:

دترجنت ها که دارا ی گروهای ابدوست و چربی دوستند غشای سیتوپلاسمی را متلاشی کرده و سلول را میکشد گروهی از انتی بیوتیک ها یعنی پلی مکسین هادارای ساختمان لیپیدی حلقوی دترجنت مانند است که بطور انتخابی به غشا باکتری ها صدمه میزند تعدادی از انتی بیوتیک ها عمل بیوسنتز ی غشارا مختل میسازد مانند نالیدیکسیک اسید و نووبیوسین سنتز DNA و T.A را متوقف میکند.

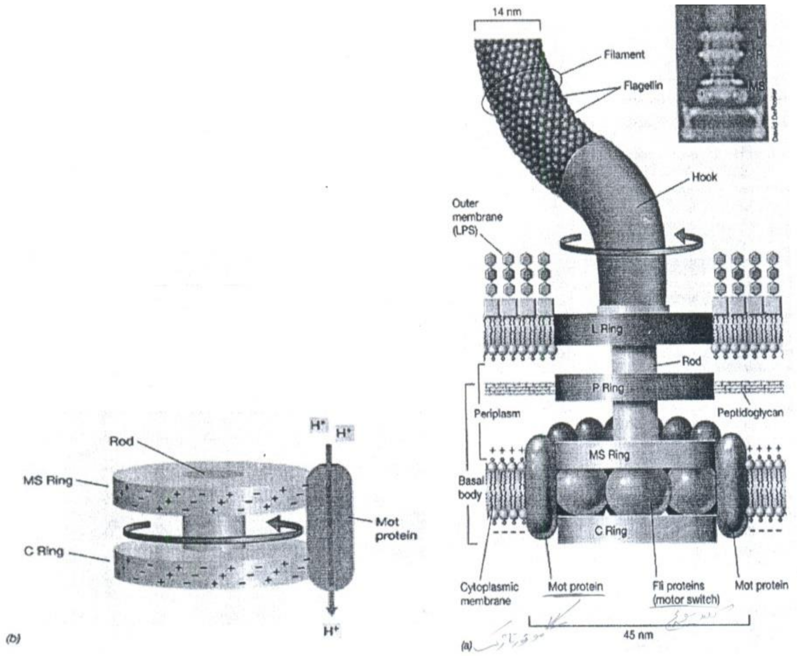
حرکت میکروبی : تاژک

همه باکتری ها متحرک نیستند بسیاری از سلولها میتوانند با نیروی خود حرکت کنند حرکت سلولها را قادر میسازد تا به قسمتهای مختلف محیط اطراف دسترسی داشته باشند حرکت به سلول کمک میکند تا به منابع ومکانهای جدید راه یافته و زنده بمانند . دونوع اصلی از تحرک سلولی شامل شناوری (swimming) و لغزشی (g liding)است. چگونگی حرکت سلول به مسیر هدایت شده به سمت محرک ویژه و یا دورشدن از ان محرک را پدیده taxes نامند. بسیاری از پرکاریوتها با شناورکردن حرکت میکنند. این عمل به علت ساختمانی بنام تاژک flagellum انجام میگیرد.عمل تاژک با چرخش به جلو بردن سلول یا کشیدن سلول به عقب از میان محیط مایع انجام میشود. در باکتری تاژه دار تاژه ها به غشای سیتوپلاسمی چسبیده و از دیواره سلولی بیرون میایند تاژک زوائد باریک ودرازی هستند که از یک انتها ازاد و از انتهای دیگر به سلول متصل هستند ارایش تاژکها در اطراف باکتریها سه نوع است : ۱. Peritrichous (تاژک در اطراف سلوی پراکنده) ۲. مونوتریکوس (یک تاژک قطبی) . ۳ Lophotrichous (چندین تاژک قطبی).(شکل۱۱)



یک تاژک از چندین هزار مولکول پروتئینی بنام فلاژلین flagellin تشکیل شده است. از نظر شکلی تاژک دارای سه بخش است: ۱.بخشی که بارنگ امیزی دیده میشود رشته (filament) نام دارداین پروتئین را انتی ژنH نامند ۲. بخش قلاب استین مانند ی که در دیواره سلولی وارد میشود و رشته را به پیکر پایه متصل میسازد. قلاب (hook) مارپیچی است و دارای الیاف پروتئینی در هم بافته میباشد. ۳. بخش پیکر پایه (basal body) یا جسم پایه که ترکیب شیمیایی نا شناخته دارد که در گرم مثبت ها از دو جفت حلقه تشکیل شده یکی در غشای سیتوپلاسمی و دیگری در لایه مورئین . در گرم منفی ها ۴ حلقه میباشد که به ترتیب از پایین به بالا در غشای سیتوپلاسمی – فضای پری پلاسمی – لایه پپتیدوگلیکان و لایه

فسفولیپیدی قرار گرفته است که به ترتیب l,p,s,m نامیده میشود .(شکل۹)


14 nm
Filament
Flagellin
MS
Hook
Outer membrane (LPS)
L Ring
Rod
P Ring
Periplasm
Peptidoglycan
MS Ring
Basal body
C Ring
Cytoplasmic membrane
Mot protein
Fli proteins (motor switch)
Mot protein
45 nm
(a)
H⁺
H⁺
Rod
MS Ring
C Ring
Mot protein
H⁺
(b)

شکل۱۲-ساختمان و عمل تاژک باکتری گرم منفی

حرکت تاژه(flagellar movement) :

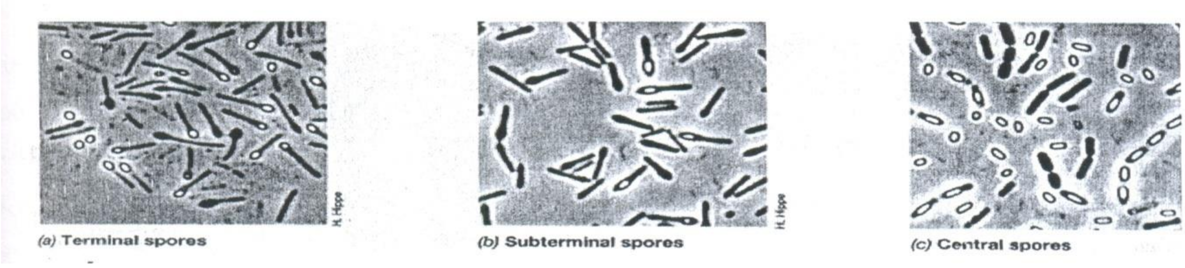
تاژک موتور کوچک چرخشی است که دارای دو جز اصلی موتور (چرخان rotor وقسمت ثابت stator) هستند. rotorمیله مرکزی و حلقه هاست این ساختمان جسم پایه را تشکیل میدهد. قسمت ثابت موتور پروتئن های Mot است که جسم پایه را احاطه کرده و تولید نیروی گردنده چرخشی میکند. حرکت چرخشی تاژک توسط جسم پایه صورت میگیرد انرژی مورد نیاز برای چرخش از نیروی محرکه پروتون حاصل میشود حرکت پروتون از میان غشای سیتوپلاسمی توسط کمپلکس MOT سبب چرخش تاژک میشود. حدود ۱۰۰۰ پروتون در هر چرخش جابجا میشود جاذبه و کشش بین با – و + موجب میشود که جسم پایه همزمان با جریان پروتون در درون قسمت ثابت موتور بچرخد.

مژه (pilli):

تعداد زیادی از گرم منفی ها دارای زوائد سخت سطحی هستند که مژه (موهای L) یا فیمبریا نامیده میشود که ظریف تر از تاژک هستند و از زیر واحدهای پروتئنی پیلین (PILLI) تشکیل شده اند. پروتئین هایی که در نوک مژه ها قرار دارند مسول ویژگی های اتصالی مژه هستند در باکتری ها دو نوع مژه ۱. معمولی که در چسبیدن باکتریها ی همزیست و بیماریزا به سلول های میزبان نقش دارند. ۲. مژه جنسی که در اتصال باکتری دهنده و گیرنده در روند ادغام باکتری نقش دارند. مژه نقش Ag دارد.

اندوسپور (Endospore) :

گونه های خاصی از باکتریها (از قبیل باسیل های گرم مثبت هوازی اجباری و بی هوازی اجباری)در پاسخ به شرایط محیطی یک چرخه تکامل را طی میکنند ساختمانی بنام اندوسپور را در طی فرایند اسپورزایی (sporulation) تولید میکنند و سلولهای متمایزی هستند که به گرما مواد شیمیایی کشنده و تشعشع فوق العاده مقاوم هستند اندوسپور ساختمانی برای بقا در شرایط سخت است اسپور یک سلول در حال استراحت است. وقتی در شرایط تغذیه ای مطلوب قرار گیرد یک سلول زایا تولید میشود. باکتریهای تشکیل دهنده اسپور بیشتر در خاک هستند مانند باسیلوس و کلوستردیوم ها. (شکل۱۰)


(a) Terminal spores (b) Subterminal spores (c) Central spores

شکل۱۳- اندوسپور باکتری

تولید اسپور :فرایند تولید اسپور هنگامی اغاز میشود که شرایط تغذیه ای نا مطلوب شود و در اغاز این فرایند تخلیه منابع کربن و نیتروژن یا هر دو مهمترین عامل است که رشد متوقف و اسپور ایجاد میشود د راین فرایند تعداد زیادی ساختمانها و انزیم ها و متابولیت ها ی جدید تولید میشود و همزمان تعداد زیادی از اجزای باکتری فعال ناپدید میشود این یک فرایند تمایز واقعی را نشان میدهد.

خواص اسپور:

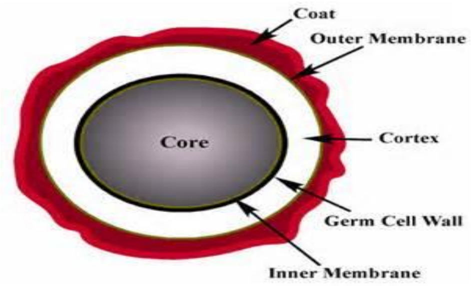
۱.بخش مرکزی core: بخش مرکزی شامل پروتوپلاست اسپور است که دارای هسته کامل (کروموزوم) همه اجزا دستگاه سازنده و سیستم مولد انرژی بر پایه گلیکولیز است (چرخه شکستن قندهاست) مقاومت اسپور در برابر گرما به علت نبودن اب ازاد و زیاد بودن مقدار اسید دی پیکولونیک بصورت دی پیکولینات کلسیم است این ماده از طریق بیوسنتز لیزین ساخته میشود.

۲.دیواره اسپور: درونی ترین لایه ای که غشای درونی اسپور را احاطه میکند که دارای پپتیدوگلیکان طبیعی بوده و بعداز تندش اسپور دیواره سلول رویشی یا باکتری فعال بعدی را تشکیل میدهد.

۳.کورتکس cortex: ضخیم ترین لایه پوشش اسپور است ودارای پپتیدوگلیکان غیرطبیعی با پیوندهای تقاطعی(پل های عرضی) کمتر از پپتیدوگلیکان دیواره سلولی است که نسبت به لیزوزیم حساس است و اتولیز ان نقش اصلی در تندش اسپور را ایفا میکند

۴.پوشش coat: دارای ترکیب پروتئنی کراتین مانند با پیوندهای دی سولفیدی فراوان است نا تراوا بودن این لایه موجب مقاوم بودن نسبی اسپور نسبت به مواد ضد میکروبی است.

۵.پوسته خارجی Exosporium : یک غشای لیپوپروتئینی همراه با هیدرات کربن است.



شکل۱۴.

۶.زایایی Germination: فرایند زایایی شامل سه مرحله است فعال شدن و اغازین و رشد خارجی یا فراتر

a.مرحله فعال شدن: تعدادزیادی از اندوسپور ها بلافاصله پس از تشکیل قادر به زایای نیستند اما پس از چند روز استراحت در یک محیط غنی از مواد مغذی با اسیب دیدن یک یا چند پوشش اسپور زایا میشوند از بین عواملی که قادرند حالت استراحت اسپور را خاتمه دهند از گرما- خراشیدگی پوشش اسپور- اسیدی بودن محیط و ترکیبات حاوی گروه های سولفیدریل ازاد میتوان نام برد.

b. مرحله اغازین : پس از فعال شدن در صورتی که شرایط محیطی مطلوب باشد زایایی اغاز میشود گونه های مختلف دارای گیرنده هایی هستند که عوامل موثر متفاوت مانند ال- الانین یا ادنوزین را بعنوان علامت غنی بودن محیط تشخیص میدهند. اتصال عامل موثر با گیرنده به سرعت روند اتولیز پپتیدوگلیکان کورتکس را فعال میسازد اب جذب میشود کلسیم دی پیکولینات رها میشود و تعدادی از اجزای اسپور بوسیله انزیم های هیدرولیز کننده تخریب میشوند.

c.مرحله رشد خارجی: تخریب کورتکس و لایه های خارجی منجر به خروج یک سلول فعال جدید از اسپور میشود که از پروتوپلاست و دیواره احاطه کننده ان تشکیل شده است سپس یک دوره بیوسنتز فعال بنام مرحله رشد خارجی شروع وبا تقسیم باکتری خاتمه میابد. این مرحله به تامین تمام مواد مغذی ضروری برای رشد نیاز دارد.

اگزوسپور: باکتریهای اکسید کننده متان نظیر Methylosinus اگزوسپور تولید میکند این اسپور در خارج سلول رویشی در اثر جوانه زدن در یک انتها سلول بوجود میاید و مقاوم خشکی و گرما بوده و بر خلاف اندوسپور فاقد دی پیکولینات کلسیم است .

کنیدیوسپور و اسپورانژیوسپور:

گروه بزرگی از باکتری ها بنام اکتینومیست ها هایف های منشعبی تشکیل میدهندکه از نوک ان در اثر دیواره بندی اسپور بصورت تک تک یا زنجیری ساخته میشوند اگر اسپور ها در کیسه مسدود شود انرا اسپورانژیوم می نامند و در صورت ازاد بودن کنیدیوسپور یا کندی گویند که در برابر خشکی مقاومند اما نسبت به گرما مقاوم نیستند.

:Taxonomy

علم طبقه بندی را تاگسونومی گویند. معیارهای طبقه بندی باکتری هاشامل ۱. Morphological ۲ . Staining ۳ . growth ۴. Nutrition 5 . بیوشیمیایی میکروبها ۶. ژنتیک میکروبها ۷.ریبوزوم ۸. ایمونولوژی ۹. فاژ ها ۱۰. فیزیولوژی

مورفولوژی : شکل ظاهر – اندازه – توانایی تولید اسپور – تولید فاژ- تولید مژه – تاژک – دیواره سلولی – تولید کپسول معیار طبقه بندی بین جنس ها و گونه های باکتری است.

Staining: انواع رنگ امیزی و نوع واکنش گرم و واکنش Acid fast

الگوی رشد: چه دمایی برای رشد باکتری نیاز است (temp) و pH مناسب رشد و هوازی یا بی هوازی بودن باکتری و colonymorphology به چه صورت است؟

الگوی تغذیه: از چه موادی بعنوان منبع اصلی انرژی استفاده میکندو روش استفاده از قند اکسید است یا تخمیر .

ژنتیک: مهمترین معیار طبقه بندی ژنتیک میکروب است چرا میکروب میتواند پس از تخمیر قند را مصرف میکند ؟ چون انزیم های تخمیر قند را دارد که از روی mRNA ساخته شده است این شامل ژنتیک مولکولی است.

خصوصیت ریبوزوم: rRNA ریبوزومی جزیی از سلول است که در روند تکامل کمترین تغییر در ان ایجاد شده rRNA مشابه میتواند جد مشترک داشته باشد اساس طبقه بندی برگی (Bergy) است.

خصوصیات ایمونولوژیک یا سرولوژیک تعیین میکند که انتی ژن سطحی در ویروس یا باکتری بهم شبیه است یا نه؟

فاژتایپینگ (phagetyping) : باکتری ها را بر اساس فاژهایی که انها را الوده میکند (infact)میکند طبقه بندی میکنند فاژ لامبدا که میزبان ان E.coli K88

فیزیولوژی میکروارگانیسم : نوع بیوسنتز پروتیئن و پاسخ باکتری به استرس محیطی و راههایی که برای بیوسنتز ماکرومولکولها استفاده میکند.

راهنمای عملی سیستماتیک باکتریولوژی برگی (Bergy s Manual) در ۴جلد در ۱۹۸۴ چاپ شد که بر اساس ویژگی دیواره سلولی به ۴ گروه یوباکترهای گرم منفی که دیواره سلولی دارندو باکتری های گرم مثبت که دیواره سلولی دارند یوباکترها ی فاقد دیواره سلولی وارکئو باکتریها تقسیم بندی نمود.

کشت میکروارگانیسم ها:

کشت میکروارگانیسم ها یک روند رشد و تکثیر ارگانیسم ها باتهیه شرایط محیطی مناسب میباشد میکروارگانیسم های در حال رشد تکثیر میشوند و به عناصری که در ساختمان شیمیاییشان وجود دارد نیاز دارند اورگانیسم ها برای تولید ماکرومولکولها و حفظ شیب غلظت شیمیایی ضروری در دو طرف غشا خود نیاز به انرژی متابولیک دارند. عواملی که باید طی رشد کنترل شوند عبارتنداز : مواد مغذی، pH و حرارت ،هوا ،غلظت نمک هاو قدرت یونی محیط کشت. نیاز های باکتری ها برای رشد موادی مانند کربن هیدروژن نیتروژن فسفر و گوگرد است. منابع انرژی متابولیک شامل تخمیر(

fermentation) تنفس(Respiration) فتوسنتز(photosynthesis) است. یک ارگانیسم برای اینکه بتواند رشد کند به یکی از این مکانیسم ها نیاز دارد.

تخمیر: در تخمیر تولید ATP با انتقال الکترون همراه نیست مشخصه تخمیر فسفوریلاسیون سوبسترا میباشد که یک پیوند پیروفسفات از یک واسطه متابولیک فسفریله مستقیما به ADP اضافه میشود.واسطه متابولیسم فسفریله از تغییر آرایش اتم های مواد قابل تخمیر مانند گلوکز ولاکتوز یا آرژنین بوجود می آید.

تنفس: شامل احیای شیمیایی یک ماده اکسیدان(دریافت کننده الکترون) از طریق یکسری ناقلین الکترون در غشا، نیرو ی محرکه پروتون را در غشا باکتری ایجاد میکند ماده احیاکننده (دهنده الکترون)ممکن است آلی یا غیر آلی باشدبرای مثال اسید لاکتیک بعنوان یک ماده احیا کننده برای بعضی از ارگانیسم ها عمل میکندو گاز هیدروژن ، اکسیژن، دی اکسید کربن ، SO_4^{-2}؛ No_3^- به عنوان یک ماده اکسیدان عمل میکنند.

فتوسنتز: از این جهت مشابه تنفس است که احیای یک ماده اکسیدان از طریق ناقلین الکترون نیروی محرکه پروتون را تولید میکند. تفاوت این دو مواد احیا و اکسید کننده بوسیله انرژی نورانی که توسط رنگدانه ها موجود در غشا جذب میشود بصورت فتو شیمیایی ایجاد میشود. بنابراین فتوسنتز تا زمانی ادامه دارد که یک منبع انرژی نورانی وجود داشته باشد.

تغذیه: مواد موجود در محیط کشت باید تمام عناصر ضروری برای تولید زیستی ارگانیسم ها را داشته باشد احتیاجات غذایی در ۴ دسته تقسیم بندی میشوند:

۱-ماکرومولکولها : که به مقدار خیلی زیاد نیاز است مانند پروتئین و قند که در اثر انزیم دکربوکسیلاز به دی اکسید کربن تبدیل میشود و جذب باکتری میشود.

۲- میکرومولکولها : به مقدار کم لازم هستند مانند آهن که بوسیله آنزیم سیتوکروم اکسیداز جذب میشود و پتاسیم وکلسیم که در اسپور زایی نقش دارد سدیم در انتقال مواد و پمپ یونی نقش دارد.

۳- Treace element : به مقدار خیلی کم مورد نیاز سلول هستند مثل کبالت ، ویتامین B ، مولیبدم .

۴- :growth factor : فاکتور هایی که برای باکتری های مشکل پسند (fastidus) لازم است این باکتری ها همه چیز را نمیتوانند بسازند باید بصورت آماده به محیط اضافه کنیم به این فاکتور ها growth factor میگویند مثل آمینو اسید ها ،بازهای آلی نیتروژن دار.

نامگذاری براساس کربن:

۱-Autotroph به باکتری هایی میگویند که قادرند از انرژی فتوسنتز برای احیای دی اکسید کربن استفاده کنند

۲-کمولیتوتروف: از سوبسترای غیر آلی مانند هیدروژن بعنوان احیا کننده و دی اکسید کربن بعنوان منبع کربن استفاده میکنند.

۳-هتروتروف: به کربن آلی برای رشد نیاز دارندکه این کربن باید به شکلی باشد که برای میکروارگانیسم قابل جذب باشد مثلا گلوکز میتواند رشد تنفسی یاتخمیری تعدادی از ارگانیسم هارا تعیین نماید

میکروارگانیسم ها برای رشد احتیاجات غذایی و محیطی دارند. در محیط کشت ها این نیاز ها را فراهم میکنند. محیط کشت دارای شناساگر ها ست که نباید نقش غذایی داشته باشند. ژلاتین بعنوان ماده جامد کننده است بهترین جامد کننده اگار است پلی ساکاریدی است که از جلبک استخراج میشود. در دمای ۴۵ درجه مذاب است مواد احیا کننده برای میکروب های بی هوازی، مواد انتخاب کننده که محیط را برای عده ای از باکتری ها انتخاب میکند مثل متیلن بلو و کریستال ویوله که گرم مثبت ها به آن حساس اما گرم منفی ها رشد میکنند. مواد باز دارنده(Inhibitor) مثل سیکلو هگزان که جلو رشد قارچ ها را میگیرد.

طبقه بندی محیط کشت:

طبقه بندی محیط کشت بر اساس کاربرد : General media محیطی که حداقل مواد لازم برای رشد میکروارگانیسم را دارد و اکثر میکروارگانیسم ها در ان رشد میکنند مثل اگار خوندار و مولر هینتون اگار که فاقد بازدارنده هستند (محیط اولیه) .

محیط کشت افتراقی(Differential media) : در این محیط ها به دلیل افزودن یک ترکیب خاص (رنگ و معرف و انتی بیوتیک) فقط گروهی از باکتری ها رشد میکنند وبعنوان محیط ثانویه کاربرد دارند مثل محیط EMB به دلیل ماده ائوزین که مانع رشد گرم مثبت ها میشود

محیط کشت غنی شده (Enrichment) : با استفاده از این محیط ها رشد گروه خاصی از از میکروبها افزایش میابد که به علت وجود مواد خاص رشد برخی تشدید میشود مثل محیط مایع سلنیت.

محیط کشت انتخابی (selective): برخی ترکیبات خاص از رشد باکتری رقیب جلوگیری میکند مثل فنیل اتیل اگار (PEA) مانع رشد باکتری گرم منفی میله ای هوازی شده و شرایط را برای گرم مثبت کوکسی مهیا میکند.

محیط نگهدارنده (supportive media): انواع میکروب ها رشد میکنند بدون اینکه تاثیری بر یکدیگر داشته باشند مثل BHI و اگار مغذی طبقه بندی محیط کشت بر اساس حالت فیزیکی : محیط مایع : بدون جامد کننده برای غنی سازی است تبادل مواد در ان راحتر است و باعث تسریع رشد میشود محیط کشت نیمه مایع : ۰/۲٪ اگار داردکه نقش اگار جلو نفوذ اکسیژن را میگیرد . محیط نیمه جامد: ۰/۵٪تا ۰/۷٪ اگار دارد کاملا جامد نیست و در لوله ساخته میشود برای تشخیص حرکت باکتری استفاده میشود محیط جامد :۱,۵٪ تا ۱,۲۵٪ اگار دارد که هدف مشاهده کلنی میکروبهاست.

رشد بقا و مرگ میکروارگانیسم:

فعالیت های حیاطی هر موجود به حفظ حالت دینامیک یا موازنه آن کمک میکند حفظ تعادل درون سلولی بوسیله عمل آنزیم های مختلف صورت میگیرد هر انزیم تحت کنترل یک ژن است . ژن و انزیم بستگی به شرایط درو ن سیتوپلاسم دارد هرگونه اختلال در تعادل سلولی به مرگ سلول می انجامد آسیب برگشت پذیر باعث توقف رشد سلول میشود نه مرگ سلول (باکتریواستاتیک). آسیب برگشت ناپذیر باعث مرگ سلول میشود (باکتریوساید) تفاوت بین این دو کمی است مثلا ۰/۳٪

فنل رشد *E.coli* را متوقف میکند اگر به محیط دیگری sub cultur دهیم دوباره رشد میکند اما ۱٪ فنل باعث مرگ سلول میشود. جمعیت میکروبها در محیط نسبتا ثابت است رشد با مرگ در حال تعادل قرار دارد رشد، افزایش در مجموع تمام اجزای یک ارگانیسم است بنابراین افزایش اندازه سلول بعلت جذب آب یا رسوب چربی رشد واقعی نیست در ارگانیسم های تک سلولی رشد منجر به افزایش تعداد افراد ایجاد یک جمعیت یا کشت ارگانیسم میشود اگر سلول های میکروبی که تا حد اشباع رشد کرده اند به داخل یک محیط مایع تلقیح شوند بصورت یک منحنی که دارای ۴ مرحله است میتوان رشد ان را نشان داد:

مرحله تاخیری (lag phase): نشاندهنده زمانی است که سلولها بعلت قرار گرفتن در محیط قبلی و شرایط نامساعد از متابولیتها و آنزیمها تخلیه شده وبا محیط جدید سازش میابند در این مرحله انزیم ها و مواد واسطه ای تشکیل و ذخیره میشوند.

مرحله تصاعدی یا لگاریتمی(Exponential): سلولها در یک وضعیت ثابت هستند مواد سلولی جدید با سرعت ثابت تولید میشوند و توده سلولی بصورت تصاعده افزایش میابد این روند ادامه میابد تا اینکه تمام شدن یک یا چند ماده غذایی در محیط کشت یا جمع شدن مواد زائد سمی و مهار روند رشد رخ دهد.

مرحله ثبات در حداکثر میزن رشد یا مرحله رکود(stationary phas) : در نهایت با تمام شدن مواد مغذی یا تجمع مواد سمی ، رشد میکروب متوقف میشود. در این مرحله تولید وتخریب نیز ادامه دارد یعنی از دست دادن سلولها بعلت مرگ با تولید از طریق رشد وتقسیم سلولی متعادل است.

مرحله مرگ (Death): پس از گذشت یک دوره زمانی سرعت مرگ افزایش میابد تا به یک سطح ثابت برسد پس از مرگ اکثر سلولها تا سالها زنده مانده و از سلول مرده ولیز شده استفاده میکند. مرگ یک میکروب به معنای از دست دادن توانایی تکثیر (رشد و تقسیم) بصورت غیرقابل برگشت میباشد .

انواع آسیب های سلولی:

۱.آسیب دیدن غشای سلول : هر عاملی که تراوایی غشای سیتوپلاسمی را مختل کند و جذب مواد ضروری و دفع مواد زائد را دگرگون سازد موجب ورود مواد سمی به سلول و اجزای سلول به بیرون تراوش میکند مثل شوینده ها که موانع اسموتیک را در هم شکسته و موجب نشت اجزای سلول از نظر متابولیکی به خارج میشود.

۲. اسیب دیدن هسته و ژن ها: برخی از عوامل تمایل خاصی به هسته و ژن ها دارند نظیر رنگ بازی کریستال ویوله که با اسید نوکلئک واکنش میدهد. گرم مثبت ها حساس ترندچرا؟

۳.متوقف شدن عمل انزیم ها : آنزیم ها ساختمان پروتئینی داشته و بوسیله الکل ها، فنل، فلزات سنگین متوقف میشوند این پدیده ها غیر قابل برگشتند.

۴.سترون کردن و ضد عفونی کردن: به معنای نابود کردن همه موجودات زیان آور و بی زیان میباشد که این عمل بوسیله پالایش ، آتش، حرارت، پرتو ها، مواد شیمیایی انجام میشود.

تعیین حداقل تراکم متوقف کننده : برای سنجش فعالیت ضد میکروبی یک ماده شیمیایی از MIC استفاده میکنند، MIC را با تهیه رقت هایی از یک ماده شیمیایی در محیط کشت و وارد کردن مقدار معینی از میکروب در هر یک از آنها و سنجش رشد میکروب بوسیله سنجش تیرگی محیط پس از مدت مناسب تعیین مینمایند پایین ترین تراکمی که از پیدایش کدورت در محیط جلوگیری میکند MIC مینامند . میزان MIC تحت تاثیر ماهیت و تعدادمیکروب مورد آزمایش و ترکیب کشت و Ph آن درجه حرارت و زمان اتوگذاری قرار میگیرد.

آزمایش در محیط آگار: برای سنجش قدرت متوقف کنندگی مواد شیمیایی ، پمادها، آنتی بیوتیک ها بکار میرود. باکتری را روی محیط جامد کشت و در سطح آگار چاهک ایجاد کرده ومواد مورد نظر را در آن ریخته یا دیسک های کاغذی استریل را در ماده شیمیایی فرو برده و روی سطح آگار میگذارند. بعداز ۲۴ ساعت اینکوبیت هاله های توقف رشد هویدا میشود. قطر هاله ها به قدرت نفوذ مواد شیمیایی و قدرت ضد میکروبی آن بستگی دارد.

آنتی بیوتیک ها: اصطلاح انتی بیوز ، Antibiosis اول بار در ۱۸۸۹ بوسیله ویلمن برای توجیه ماهیت رقابتی جوامع بیولوژیک که در آن قوی ترین و اصلح ترین زنده میمانند مورد استفاده قرار گرفت . انتی بیوتیک فراورده های حاصل از فعالیت میکروب هاست که بطور اختصار رشد عده ای از میکروب عا را متوقف میکند یا میکشد

مکانیسم عمل داروها ی ضد میکروبی عبارتند از: ۱. مهار وتولید دیواره سلولی (باسیتراسین – پنی سیلین – وانکومایسین) ۲. جلوگیری از عملکرد غشای سلولی (ایمدازول – تریازول – پلی مکسین) ۳. مهار سنتز پروئین (جلوگیری از ترجمه و نسخه برداری مثل کلرامفنیکل ، تتراسایکلین). ۴-مهار سنتز اسید نوکلئیک (ریفامپین ، سولفانامید). مقاومت به دارو های ضد میکروبی از طریق تولید آنزیم ، تغییر نفوذ پذیری ، تغییر هدف ساختمانی ، تغییر مسیر متابولیسم، تغییر آنزیم های متابولیکیایجاد میشود.

تاثیر عوامل محیطی روی میکروارگانیسم ها:۱-(Heat): مهمترین عامل که در رشد و مرگ میکروب ها موثر است. میکروبهایی که دمای رشدشان پایین است psychrophilos (سرمادوست) گویند (۲۰ درجه) عامل فساد مواد غذایی یخچالی هستند میکروبهایی که دارای حرارت بهینه رشد ۲۰-۵۰درجه هستند مزوفیل گویند اغلب پاتوژن ها جز اینها هستند باکتری هایی که بهینه رشد بالایی دارند ترموفیل گویند.

۲-پتانسیل احیا Eh: توانایی ارگانیسم ها در انجام واکنش اکسیداسیون –احیا. Eh+ نشاندهنده اکسیداسیون و شرایط هوازی و Eh- نشاندهنده احیا و شرایط بی هوازی است .

۳- نیاز آبی aw: میکروبها جهت رشد نیاز به آب دارند. ۴-فشار (pressure): این فشار در رابطه با ستون هوا در سطح زمین است میکروب هایی که فشار را تحمل میکنند باروفیل Barophiles گویند. ۵-pH : بشترین تاثیر pH روی پروتئن و آنزیم هاست که رشد میکروب ها را تحت تاثیر قرار میدهد. ۶-خاصیت آهن ربایی Magnetism : گرایش باکتری ها بطرف آهن ربا ، که قادر به تولید fe3o4 و fe3s4 میباشد ۷-تشعشعات که DNA دو زنجیره وتک زنجیره رامیشکند اشعه گاما ، UV ، مادون قرمز که میتوانند عامل موتاسیون شوند. ۸- مواد غذایی شامل ترکیبات آلی و معدنی است.

۴-غلظت یون H :اکثر ارگانیسم ها در محدوده باریکی از Ph بصورت بهینه رشد میکند.به باکتری هایی که در محیط اسیدی حدود سه رشد میکند اسیدوفیل ها و در حدود ۶-۸ باکتری نوترالوفیل و در محدوده ۱۰,۵ باکتری آلکالوفیل گویند.

۵-هوا :نقش اکسیژن به عنوان یک پذیرنده هیدروژن است در باکتری های هوازی، اما بی هوازی های اجباری به ماده دیگری غیر از اکسیژن به عنوان پذیرنه هیدروژن نیاز دارند و نسبت به اکسیژن حساسند هوازی ها و بی هوازی های اختیاری دارای آنزیم سوپراکسیددسموتاز و کاتالاز هستند. بی هوازی ها فاقد این دو هستند که بسته به این موارد برای کشت بی هوازی ها از پارافین ،سدیم تیوگلیکولیت ، کندل جار، دسی کاتور استفاده میشود

.

راهنمای عملی سیستماتیک باکتریولوژی برگی (Bergy s Manual) در ۴جلد در ۱۹۸۴ چاپ شد که بر اساس ویژگی دیواره سلولی به ۴ گروه:

۱- یوباکترهای گرم منفی که دیواره سلولی دارند

۲- باکتری های گرم مثبت که دیواره سلولی دارند

۳- یوباکترها ی فاقد دیواره سلولی

۴- وارکئو باکتریها تقسیم بندی نمود

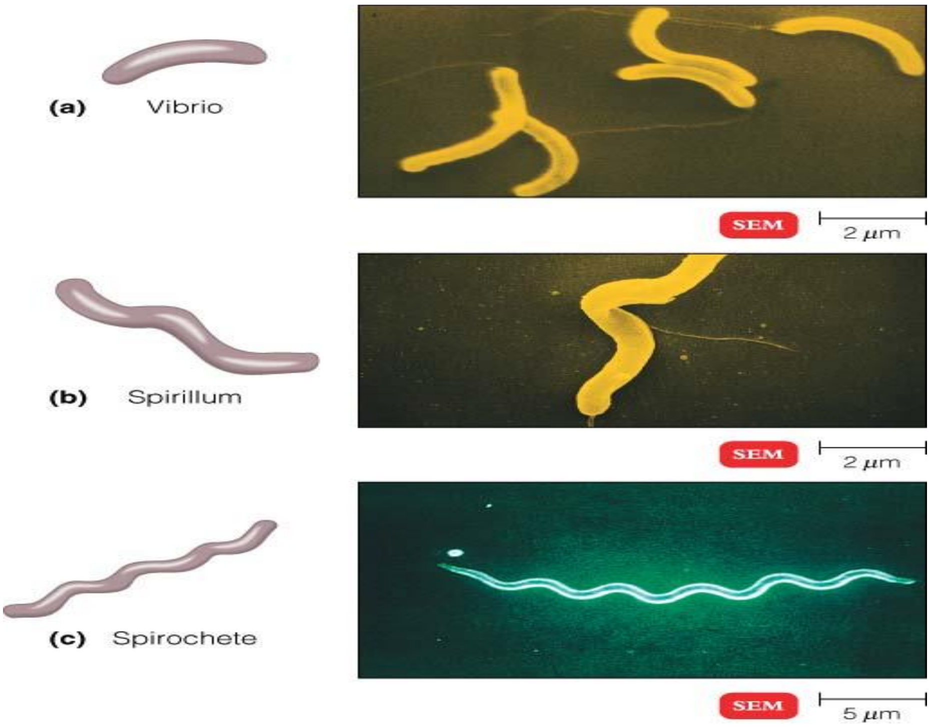
اسپیروکت ها:

در آبهای الوده ، فاضلاب ، خاک وجود دارند. مواد آلی در حال پوسیدن ودر بدن انسان و حیوان یافت میشود شکل مارپیچی دارند هوازی و بی هوازی بوده و با شکاف عرضی تقسیم میشوند.

سه جنس بیماریزا *Treponema* که مولد سفلیس که از راه آمیزش جنسی منقل میشود ، *Borrelia* عامل تب راجعه که بوسیله کنه و شپش منتقل میشود *leptospira*عامل لپتوسپیروز که از راه اب آلوده ، ادرار حیوانات سگ و گربه و خوک به انسان انتقال میابد و بصورت عفونت کلیه نمایان میشود.

باکتری های مارپیچی خمیده:

فاقد رشد محوری بوده و دارا ی تاژک هستند و بصورت ماپیچ های سخت و میله ای میباشد اکثرا بی آزار و آبزی هستند فقط کمپیلوباکتر فیتوس سپتی سمی و بیماری ناشی از مواد غذایی الوده ایجاد مینماید



کوکوسها و باسیل های گرم منفی هوازی :

جنس سودوموناس مهمترین است که عامل عفونت مجاری ادراری ، سوختگی، آبسه ، مننژیت است روی محلول های ضد عفونی ، و در حمام دیده میشود.   *Brucella*کوکوباسیل غیر متحرک ،انگل اجباری پستانداران است. از راه فراورده های شیر و لاشه آلوده حیوان وارد بدن انسان میشود وتب نوسانی پدید میاورد . *Brodetella* باسیل غیر متحرک ،دارای کپسول ، منحصر بدن انسان است ، بوردتلا پرتئوسیس عامل اصلی سیاه سرفه است.   *Francisella*:باکتری های پلی مورف هستند فرانسیسلا تولارسیس عامل تولارمیا یا تب خرگوش است که از طریق تماس مستقیم با خرگوش و گزش مگس گوزن منتقل میشود

باسیل های گرم منفی بی هوازی اختیاری:

در این گروه دو زیر گروه انتروباکتریاسه و ویبریوناسه وجود دارد.

الف-باکتری های روده ای:ساکن روده انسان و حیوانات است گلوکز و کربوهیدرات را تخمیر میکند با آزمایش استاندارد IMViCشناسایی میشوند. انواع متحرک و غیر متحرک دارند . توکسین هایی بنام باکتریوسین تولید میکند

E.coli: ساکن اصلی روده مختص کارهای ژنتیکی است وجود این باکتری در آب و غذا معرف آلودگی مدفوعی است میتواند عفونت مجرای ادراری و اسهال ایجاد کند.

سالمونلا: همه باکتری این جنس بیماریزا است سالمونلا تایفی ، تب تیفوئید با تب بالا،لکه قرمز رو ی شکم ، سینه ، و گاستروانتریت ایجاد میکند. سالمونلا تایفی موریوم که عامل سردرد ،لرز ، استفراغ ، اسهال و تب است.

شیگلا: عامل اسهال خونی یا شیگلوز ، اسهال خفیف ، شکم درد ، چرک و خون در مدفوع میشود.

کلبسیلا: عامل اصلی سپتی سمی در کودکان و ذات الریه است.

سراشیا: سراشیا مارس سا نس پیگمان قرمز تولید میکند برای سنجش باکتری ها از راه هوا،در جنگ بیولوژیک بکار میرود. موجب پیدایش عفونت ادراری میشود.

یریسنیا : یرسینیا پستیس عامل طاعون خیارکی و طاعون ششی است در عقده های لنفاوی نفوذ کرده و انرا حجیم میکند .

اروینیا : بماریزای گیاهی است اروینیا هربی کولا هنگامیکه وارد محلول های درون سیاهرگی گردد عفونت عمومی تولید میکند .

ب- خانواده ویبریوناسه :

گرم منفی بی هوازی اختیاری خمیده هستند جنس ویبریو کلرا(*Vibrio cholera*)عامل وبا است که با اسهال ابکی همراه است. *V.parahemolyticus*عامل گاستریت بوده و بوسیله صدف های خوراکی به انسان منتقل میشود.

کوکوس های گرم مثبت : شامل دو جنس استافیلوکوکوس و استرپتوکوکوس است *staph* در زیر میکروسکوپ خوشه ای بی حرکت و بدون اسپور ،کاتالاز + ،هوازی، روی بلاد آگار کلنی طلایی میدهد ، در برابر حرارت خشکی و مواد شیمیایی مقاوم است و اختلالات گوارشی ایجاد میکند. کواگولاز+ ، است که پلاسمای خون را منعقد میکند فیبرین حاصل بافت آلوده را احاطه و باکتری از تهاجم فاگوسیت ها در امان میماند st.a عفونت پوستی ، دمل، کورک، کفیرک، زرد زخم ، ذات الریه ، مننژیت ، و آبسه مغزی ایجاد میکند.

استرپتوکوک : همولیزین آلفا ، بتا ، گاما ایجاد میکند موجب اریتم پوست ، همولیز گویچه های قرمز و آنزیم های هیالورونیداز ، پروتئناز، استرپتوکیناز، تولید میکند که باعث انتشار عفونت میشود. باعث تب زایمان ، باد سرخ ع تب مخملک ، گلو درداسترپتوکوکی ع تب روماتیسمی میشود وعامل پوسیدگی دندان میباشد.

باسیل ها و کوکوس اسپور دار : تشکیل اندوسپور از نظر پزشکی و غذایی حائز اهمیت است زیرا در برابر حرارت مقاوم است اکثرا گرم مثبت هوازی و بی هوازی هستند دو.جنس مهم اسپوردار دارند

باسیلوس آنتراسیس : عامل سیاه زخم که در گاو ، گوسفند ، اسب بیماری ایجاد و به انسان منتقل میشود.

کلاستردیوم : بی هوازی اجباری است ، کلاستردیوم تتانی عامل کزاز، کلستردیوم بوتولینوم عامل بوتولیسم ، کلستردیوم پرفرنجنس قانقرن گازی ایجاد میکند.

باکتری های میله ای گرم مثبت بدون اسپور:

لاکتوباسیلوس که اسید لاکتیک تولید میکند ودر محیط اسیدی رشد میکند در پوسیدگی دندان نقش دارد برای تولید کلم شور ، دوغ و ماست استفاده میشود. باکتری بیماریزای این جنس لیستریا مونوسایتوجنز است که در تولید آبسه ، اندوکاردیت مشارکت دارد.

ریکتسیاها :

شامل ریکتسیا و کلامیدیا است انگل اجباری درون سلولی وشبیه ویروس ها هستند میله ای و کوکوباسیل گرم منفی بیحرکت وتقسیمشان دوتایی ، بوسیله حشرات به انسان منتقل میشوند. کوکسیلا برونتئی عامل تب Q که مشابه انفولانزا و هپاتیت است که از راه هوا یا مواد غذایی و حشرات منتقل میشود. ریکتسیا عامل تیفوس همه گیر *R.prowasekii* که بوسیله شپش منتقل میشود. تیفوس موشی بومی به وسیله کک موش منقل میشود. *R.rickettsii تب* خالدار کوهای راکی بوسیله کنه منتقل میشود.

.

باسیل ها و و کوکوس اسپور دار :

تشکیل اندوسپور از نظر پزشکی و غذایی حائز اهمیت است زیرا در برابر حرارت مقاوم است اکثرا گرم مثبت هوازی و بی هوازی هستند دو.جنس مهم اسپوردار دارند

باسیلوس آنتراسیس : عامل سیاه زخم که در گاو ، گوسفند ، اسب بیماری ایجاد و به انسان منتقل میشود.

کلستردیوم : بی هوازی اجباری است ، کلاستردیوم تتانی عامل کزاز، کلستردیوم بوتولینوم عامل بوتولیسم ، کلستردیوم پرفرنجنس قانقرن گازی ایجاد میکند.

قارچ ها:

قارچ ها همگی هتروتروفند برای رشد به ترکیبات آلی برای اخذ انرژی و کربن نیاز دارند قارچ ها هوازی هستندساپروفیت ودر خاک و اب بسر میبرند که در گردش عناصر در طبیعت دخالت دارند علم مطالعه قارچ شناسی Mycology و قارچ شناسی پزشکی Medical mycology مینامند. قاچ ها شامل مخمر ها (Yeast) کپک ها و قارچ های گوشتی است. مخمر ها قارچ هایی تک سلولی بوده و کپک ها پر سلولی و رشته ای هستند (سفیدک ، زنگ و سیاهک) . قارچ های گوشتی شامل قارچ چتری کلاواریا و پاف باله میباشد. ریسه کپک یا قارچ عبارت است از رشته های مرکب از سلول های پشت سر هم که انرا Hypha مینامند .

مخمر قارچهای تک سلولی فاقد ریشه بوده و به شکل کروی یا بیضوی دیده میشود این دسته از قارچ ها مانند کپک ها درطبیعت انتشار وسیع داشته و روی میوه ها و برگ ها بصورت پوشش سفید پودر مانند پیدا میشود مخمر ها با جوانه زدن تکثیر میابند و به طریق بی هوازی اختیاری رشد مینمایند که از اکسیژن یا ترکیبات آلی بعنوان پذیرنده نهایی eاستفاده میکنند در برابر اکسیژن هیدرات کربن را تخمیر کرده اتانول و دی اکسید کربن تولید میکند این فرایند اساس صنایع تهیه مشروبات الکلی و شیرینی پزی است ساکارومیسز برای تهیه اتانول و دی اکسید کربن جهت ور امدن نان بکار میرود. برخی

از قارچ ها دو شکلی هستند این قبیل قارچ ها اغلب بیماریزا و قادرند بصورت کپک یا به حالت مخمر رشد نماید این پدیده تابع درجه حرارت محیط میباشد قارچ در ۳۷ درجه مخمر در ۲۵ درجه بشکل کپک دیده میشود.

پروتوزوئر ها :

جانداران یوکاریوت تک سلولی هستند که به قلمرو آغازیان تعلق دارد اینها ساکن آب ، خاک بوده و از ذرات مواد غذایی و باکتری ها تغذیه میکند عده ای از آنها فلور طبیعی بدن جانداران هستند . در دستگاه گوارش موریانه و گاو به هضم سلولز کمک میمند و عده ای کیست تولید میکنند انتاموبا هیستولایتیکا باعث آلودگی آب میشود.