जीवाणु विज्ञान का परिचय

टोम्स सी. जोसफ

सूक्ष्मजीवों में अलग-अलग कोशिक और कॉलोनी आकारिकी होते हैं और यह एक प्रजाति की विशेषता होती है।

कोशिकीय आकृति विज्ञान

बैक्टेरिया विभिन्न आकार में आते हैं। बैक्टेरिया के सामान्य आकार हैं:

कोकाई - गोलाकार

कोक्कोबैसिलस - बैक्टेरियल आकार का जो कोकाई और बैसिलाई के बीच मध्यवर्ती है

बैसिलस - रॉड आकार के फिलामेंटस - कोशिकाएं जो फिलामेंट्स से मिलती हैं

स्पैरोकेटट- कुंडलित, सर्पिलाकार की कोशिकाएं

विब्रियो - घुमावदार रॉड या अल्पविराम आकार

कॉलोनी आकारिकी

कॉलोनी आकारिकी प्रजातियों के बीच काफी भिन्न होती हैं और अक्सर बैक्टेरिया की प्रारंभिक पहचान में उपयोग की जाती है।

आमतौर पर कॉलोनी आकारिकी का वर्णन करने के लिए उपयोग किए जाने वाले शब्द नीचे दिए गए हैं।

संरचना कॉलोनी का रूप, या उसका समग्र स्वरूप का वर्णन करता है। सामान्य आकृतियाँ गोलाकार, प्रकंद, अनियमित, तंतुमय और धुरी होती हैं।

ऊंचाई ऊंचाई का वर्णन –प्रत्येक दिशा से देखनेवाला । ऊंचाई को फ्लैट, बढा हुआ, उत्तल (घुमावदार सतह), पल्विनेट (कुशन के आकार का), और एंबोनेट के रूप में वर्णित किया गया है।

आकार एक कॉलोनी के आकार को पंचीफॉर्म (एक बिंदु की तरह का आकार), छोटे, मध्यम या बड़े के रूप में वर्णन किया जा सकता है और अक्सर पहचान के लिए एक उपयोगी विशेषता के रूप में उपयोग किया जाता है।

दिखावट कॉलोनी की सतह की दिखावट, अक्सर वर्णन करती है कि कॉलोनी चमकदार या सुस्त (धुंधली) है।

प्रकाशीय गुण इसमें उपनिवेशों की अपारदर्शिता का वर्णन किया गया है। कॉलोनियों को अक्सर अपारदर्शी (प्रकाश संचारित नहीं करता है), पारभासी (प्रसार के माध्यम से प्रकाश देता है) या पारदर्शी के रूप में वर्णित किया जाता है (प्रकाश को बिना किसी व्यवधान के गुजरने की अनुमति देता है)।

बनावट यह कॉलोनी की स्थिरता का वर्णन करता है। खुरदुरी कोलनियां अक्सर विरुलेंस के खोने के साथ जुडी होती है और इनकी सतह दानेदार, चपटी होती है। कॉलोनी की बनावट का वर्णन

करने के लिए इस्तेमाल किए जाने वाले शब्दों में म्यूकोइड (चिपचिपा), ब्यूटायरस (मक्खन जैसे बनावट) या सूखी (भंगुर या पाउडरदार कॉलोनियां) शामिल हैं।

वर्णक: पिगमेंट (रंजक) बैक्टेरिया द्वारा उत्पादित होते हैं जो पानी या वसा में घुलनशील हो सकते हैं। पिगमेंट का उत्पादन कॉलोनी की पर्यावरणीय स्थितियों या उम्र के आधार पर भिन्न प्रकार के हो सकता है।

संवर्धन तकनीक

संवर्धन मीडियम पोषक तत्वों का एक मिश्रण है जो सूक्ष्मजैविक विकास के लिए आवश्यक है। संवर्धन मीडिया को उनकी संरचना या उपयोग के आधार पर कई समूहों में वर्गीकृत किया जा सकता है जिनमें परिभाषित, जटिल, चयनात्मक और संवर्धन मीडियम शामिल हैं।

- **सामान्य प्रयोजन के मीडिया / बेसल मीडिया**

ये मीडिया विभिन्न प्रकार के जीवाणुओं की वृद्धि में सहयोग करते हैं। ट्रिप्टिकेज़ सोया अगार (TSA) और पोषक तत्व अगार (NA) को बेसल मीडियम माना जाता है। ये मीडिया आमतौर पर सूक्ष्मजीवों के प्राथमिक अलगाव के लिए उपयोग किया जाता है।

- **आवश्यक मीडिया**

आवश्यक मीडिया वे हैं जिनके बारे में सटीक रासायनिक संरचना ज्ञात है। ये मीडिया शुद्ध जैव रासायनिक तत्वों से बना है और इन मीडिया का उपयोग करके किसी सूक्ष्मजीव की आवश्यक पोषक तत्व का अध्ययन किया जा सकता है।

- **जटिल मीडिया**

एक जटिल मीडियम की रासायनिक संरचना ज्ञात नहीं है। इस मीडिया में अक्सर एक जैविक मूल के अभिकर्मक होते हैं, जैसे कि यीस्ट एक्स्ट्रेक्ट और पेप्टोन, जहां सटीक रासायनिक संरचना अज्ञात है। जटिल मीडिया में विभिन्न घटक होते हैं जो आमतौर पर विकास कारकों की एक बड़ी श्रृंखला प्रदान करते हैं जो अज्ञात और तेज़ बैक्टेरिया प्रजातियों की पालन में मदद करते हैं।

- **चयनात्मक मीडिया**

चयनात्मक मीडियम एक ऐसा मीडिया है जो कुछ जीवाणु प्रजातियों के विकास को बाधित करने और / दूसरी विशिष्ट प्रजाति के विकास को बढ़ावा देने के लिए तैयार किया जाता है। इन मीडिया में अतिरिक्त चयनात्मक अभिकर्मक होते हैं, जैसे कि उच्च नमक सघनता को हैलोफाइल के चयन करने के लिए, या चयनात्मक वृद्धि की स्थिति के तहत उपयोग किया जा सकता है। टी.सी.बी.एस. अगार एक चयनात्मक मीडिया है जिसका उपयोग

वी.कोलेरे का पता करने के लिए किया जाता है, जिसका पी.एच. 8.5 - 8.6 का होता है, और अधिकांश अन्य जीवाणुओं को विकसित होने से रोकता है।

- **समृद्ध मीडिया (पौष्टिक मीडिया)**

समृद्ध मीडियम विशिष्ट जीवाणु प्रजातियों की वृद्धि के लिए भी अनुमति देता है; हालाँकि, समृद्ध मीडिया ऐसे अभिकर्मकों के साथ पूरक है जो किसी विशेष प्रजाति के विकास की अनुमति देता है जैसे क्षारीय पेप्टोन जल (APW) एक समृद्ध मीडिया है जिसका उपयोग *विब्रियो* प्रजातियों से संबंधित जीवाणुओं के संवर्धन के लिए किया जाता है।

सूक्ष्मजीवविज्ञान में प्रयुक्त जल

मीडिया और घोल तैयार करने के लिए केवल विआयनीकृत और शुद्ध जल का ही उपयोग किया जाना चाहिए। उपयोग किए जाने वाली पानी, पोषक तत्वों एवं विषाक्त पदार्थों से मुक्त होना चाहिए और साथ ही इसमें कम सूक्ष्मजैविक सामग्री होनी चाहिए। साबुन और पानी से धोने के बाद सूक्ष्मजीवविज्ञान में उपयोग किए जाने वाले सभी कांच के बर्तनों (ग्लासवेयर) को आरओ के पानी से अच्छी तरह से धोना चाहिए।

बैक्टेरियल संवर्धन मीडिया में आम तौर पर प्रोटीन, कार्बोहाइड्रेट, एमिनो एसिड लवण और ट्रेस तत्वों का मिश्रण होता है। इन घटकों की उपस्थिति और मात्रा प्रत्येक बैक्टेरिया के सूक्ष्म और स्थूल पोषक तत्वों की आवश्यकताओं के आधार पर मीडिया के बीच महत्वपूर्ण रूप से भिन्न हो सकती है।

बैक्टेरिया के उपभेदों को कैसे संवर्धन किया जाता है, यह भी बैक्टेरिया के बीच व्यापक रूप से भिन्न होता है। तरल मीडिया का उपयोग शुद्ध बैच पालन की वृद्धि और गुणन के लिए किया जाता है, जबकि ठोस अगार आधारित मीडिया का उपयोग शुद्ध संवर्धन को अलग करने के लिए किया जाता है।

सभी संवर्धन मीडिया को उपयोग से पहले जीवाणुनाशन करना चाहिए। यह अक्सर एक आटोक्लेव के अंदर उच्च तापमान पर मीडिया को गर्म करके पूरा किया जाता है। यह उपकरण भाप के दबाव की वजह से प्रति वर्ग इंच 15 पाउंड प्रदान करता है, जिससे तापमान 121 ^{o}C तक पहुंचने और बनाए रखने की अनुमति मिलती है। ऑटोक्लेव के दबाव को बराबर करने और ऑटोक्लेव से संदूषण को रोकने के लिए जीवाणुनाशन से पहले सभी मीडिया को ढकना चाहिए।

तैयार मीडिया का भंडारण (रखरखाव)

मीडिया और ब्रोथ युक्त ट्यूबों को अगार प्लेटें 2 ^{o}C - 8 ^{o}C पर रेफ्रिजरेटर में भंडारण किया जा सकता है। ऊष्मा के नुकसान से बचने के लिए अगार प्लेट्स को अच्छी तरह से बंद पोलिथीन बैग में भंडारित किया जाना चाहिए। संग्रहीत मीडिया के उपयोग की तुलना में ताजा मीडिया तैयार करना हमेशा बेहतर होता है। एक लेबल से

मीडिया की तैयारी की तारीख का संकेत दिया जा सकता है। यदि अगार प्लेट्स अपनी नमी खो देती हैं, तो मीडिया की वृद्धि में सहयोग करने के लिए मीडिया की क्षमता कम हो जाती है।

ब्रोथ संवर्धन

ब्रोथ संवर्धन तरल रूप में एक पोषण का मीडियम है जिसका उपयोग टेस्ट ट्यूब या फ्लास्क में जीवित सूक्ष्मजीवों के लिए किया जाता है। संवर्धन का यह रूप कई सूक्ष्मजीवों के तेजी से विकास की अनुमति देता है, और अक्सर इसका उपयोग क्रायो पृज़र्वेशन के लिए नमूनों को तैयार करने या सूक्ष्मजीव संवर्धन के बड़े संस्करणों को बढाने के लिए किया जाता है।

अगार स्लांट

स्लांट दृढ मीडिया का एक रूप है जो ब्रोथ अगार डालने से बनता है। बोथ संवर्धन में अगार मिलाकर अगार स्लांट तैयार किया जाता है, फिर अगार के विलयन के लिए और मीडिया के जीवाणुनाशन हेतु ऑटोक्लेव किया जाता है। यह माध्यम फिर 42 °C पर जम जाता है। अगार स्लांट का उपयोग अस्थायी रूप से सक्रिय संवर्धकों को भंडारण करने के लिए किया जाता है। अगार स्लांट सूक्ष्मजीवों के विकास के लिए बड़े सतह क्षेत्र प्रदान करते हैं।

अगार स्टैब

अगार - स्टैब का इस्तेमाल अर्द्ध ठोस मीडियम को संरोपण तकनीक के रूप में किया जाता है और इसका इस्तेमाल मोटिलिटी या ऑक्सीजन के इस्तेमाल के विश्लेषण के लिए किया जाता है। अगार स्टैबिंग का उपयोग सीमित ऑक्सीजन आवश्यकताओं से युक्त सूक्ष्मजीव संवर्धन के लिए किया जा सकता है।

स्ट्रीक प्लेट

मिश्रित आबादी से बैक्टेरिया की शुद्धीकरण करने के लिए स्ट्रीक प्लेट तकनीक का उपयोग किया जाता है। बैक्टेरिया की एक संरोप (इनोकुलम) को अगर सतह पर अंकित किया जाता है ताकि बैक्टेरिया की संख्या कई स्ट्रीकिंग के बाद कम हो जाए। इस तकनीक में जीवाणु कोशिकाएं एक दूसरे से अच्छी तरह से अलग हो जाती हैं। जीवों की संख्या कम हो जाती है क्योंकि मूल नमूना क्रमिक चतुर्थांश पर स्ट्रीकिंग से कम होता है। केवल कुछ जीवों को तीसरे या चौथे चतुर्थांश में स्थानांतरित किया जाता है और वह कॉलोनी बनाने वाली इकाइयाँ देता है।

स्प्रेड प्लेट

स्ट्रीक प्लेट तकनीक के समान, स्प्रेड प्लेट संरोपण (इनोक्युलेशन) का दूसरा रूप है जो एक संवर्धन से शुद्ध कालोनियों को अलग करने के लिए उपयोग किया जाता है। स्प्रेड प्लेट विधि मुख्य रूप से एक नमूने में सूक्ष्मजीवों की संख्या निर्धारित करने के लिए उपयोग किया जाता है।

पौर प्लेट

पौर प्लेट विधि एक नमूने में सूक्ष्मजैवक संख्या का पता लगाने के लिए उपयोग की जाने वाली विधि है। इस विधि में, ब्रोथ / नमूने को जीवाणुरहित पिपेट का उपयोग करके जीवाणुरहित पेट्री डिश के केंद्र में इनोकुलेट किया जाता है। पिघले हुए ठंडे अगार (बिना जमा हुआ लगभग 15 - 20 मि.ली.) को पेट्री डिश में डाला जाता है जिसमें संरोप (इनोकुलम) होता है और अच्छी तरह से मिश्रित किया जाता है। अगार के जमने के बाद प्लेट को उल्टा करके 37 °C पर 24 - 48 घंटों के लिए इंक्युबेशन किया जाता है, ताकि इनोकुलेट किए गए जीवाणुओं का विकास हो सकें।

संवर्धन स्थिति

बैक्टेरिया के विकास के लिए आवश्यक इष्टतम विकास तापमान प्रजातियों के बीच काफी भिन्न होता है क्योंकि बैक्टेरिया विकसित हो सकते हैं और विभिन्न प्रकार के वातावरण में पनप सकते हैं। शरीर के तापमान (37 °C) के पास अधिकांश रोगजनक या कमेन्सल बैक्टेरिया अच्छी तरह से बढ़ सकते हैं, जबकि पर्यावरणीय उपभेद 25 °C से 30 °C की सीमा तक बढ़ता है।

विकास के लिए आवश्यक तापमान के आधार पर, बैक्टेरिया को विभिन्न वर्गों में वर्गीकृत किया जाता है;

साइक्रोफाइल्स (0 °C से 20 °C)
मेसोफाइल्स (25 °C से 40 °C)
थर्मोफाइल्स (45 °C से 122 °C)

हालाँकि जीवाणुओं के विकास और प्रजनन के लिए इष्टतम तापमान की आवश्यकता होती है, अधिकांश जीवाणु उपभेद तापमान में काफी गिरावट बाद भी जीवित रह सकते हैं और 4 °C पर कई दिनों तक जीवित रह सकते हैं। इन कम तापमान पर बैक्टेरिया का विकास और उपापचय (मेटाबोलिसम) काफी कम हो जाता है।

आवश्यक इष्टतम तापमान के अलावा, बैक्टेरिया श्वसन के लिए ऑक्सीजन की उनकी आवश्यकता में भी भिन्न होते हैं। बैसिलस प्रजाति जैसे एरोबिक जीवों द्वारा श्वसन के दौरान ऑक्सीजन को टर्मिनल इलेक्ट्रॉन स्वीकर्ता के रूप में उपयोग किया जाता है। इसी तरह, माइक्रोएरोफिल्स को भी अपने विकास और गुणन के लिए ऑक्सीजन की आवश्यकता होती है, लेकिन पर्यावरण में स्वाभाविक रूप से होने वाली तुलना में कम स्तर पर होती है। जबकि एनारोबिक सूक्ष्मजीव नाइट्रेट या सल्फेट जैसे इलेक्ट्रॉन स्वीकर्ता का उपयोग करते हैं। इस अजैविक यौगिक में ऑक्सीजन की तुलना में कम रिडक्शन पोटेंश्यल है और इसलिए कम कुशल श्वसन है। अवायवीय या एनरोबिक जीवों द्वारा ऑक्सीजन और अजैविक यौगिकों की आवश्यकता प्रजातियों के बीच बहुत भिन्न हो सकती है। क्लोस्ट्रीडियम प्रजाति जैसे एनारोबेस का पालन करें, केवल ऑक्सीजन की अनुपस्थिति में जीवित और पुन: उत्पन्न कर सकते हैं। ये जीव अक्सर ऑक्सीजन की उपस्थिति से मारे जाते हैं। इसी तरह,

एयरोटोलरेंट एनारोबेस, जैसे लैक्टोबैसिलस प्रजातियां, श्वसन के दौरान ऑक्सीजन का उपयोग नहीं करती हैं; हालांकि, सख्त अवायवीय के विपरीत, ये सूक्ष्मजीव कम समय के लिए ऑक्सीजन को सहन कर सकते हैं।

फेकल्टेटीव एनेरोब्स ऑक्सीजन की उपस्थिति और अनुपस्थिति दोनों में जीवित रह सकते हैं। उदा: *एस्चेरिचिया कोलाई* और *स्टैफिलोकोकस* प्रजाति। इन जीवों को, अगर एक विकल्प दिया जाता है, तो श्वसन के दौरान ऑक्सीजन का उपयोग पसंद करेंगे क्योंकि इसमें अन्य इलेक्ट्रॉन स्वीकर्ता की तुलना में सबसे ज़्यादा रिडक्शन पोटेंश्यल है। अवायवीय संवर्धनों के साथ काम करने पर ऑक्सीजन के संपर्क से बचा जा सकता है।

एनारोबिक बैक्टेरिया आमतौर पर अवायवीय गैसों के मिश्रण (80% N_2, 10% CO_2, और 10% H_2) में वृद्धि होता हैं जो एनारोबिक बैक्टेरिया के विकास के लिए उपयोगी होता है। अवायवीय जीवाणुओं की वृद्धि के लिए अवायवीय परिस्थितियाँ अवायवीय गैस कक्ष के उपयोग द्वारा प्राप्त की जाती हैं।

इस प्रणाली में पॉली कार्बोनेट जार, हवा के प्रवाह को रोकने के लिए एक ढक्कन, एक मेथिलीन ब्लू पट्टी और एक थैली होती है जिसमें सोडियम बोरोहाइड्राइड, सोडियम बाइकार्बोनेट, साइट्रिक एसिड और एक पैलेडियम उत्प्रेरक होता है। जब थैली में पानी डाला जाता है, तो सोडियम बोरोहाइड्राइड, सोडियम बाइकार्बोनेट, साइट्रिक एसिड हाइड्रोजन तथा कार्बन डाइऑक्साइड बनने के लिए प्रतिक्रिया करते हैं। जार के भीतर पैलेडियम द्वारा हाइड्रोजन और ऑक्सीजन के बीच एक प्रतिक्रिया उत्प्रेरित होती है। मेथिलीन नीला, अवायवीय वातावरण में बेरंग है लेकिन ऑक्सीजन की उपस्थिति में नीला है। जब अवायवीय जार में ऑक्सीजन पानी और संघनन रूपों में परिवर्तित हो जाता है, तो संकेतक पट्टी नीले से सफेद हो जाएगी।

प्रयुक्त मीडिया का निपटान

प्रयुक्त मीडिया में बैक्टेरिया की उच्च मात्रा हो सकती है जो संभावित रूप से खतरनाक होते हैं और उन्हें सुरक्षित रूप से निपटाया जाना चाहिए। सभी संवर्धन मीडिया जिन्हें संरोप किया जाता है उन्हें केवल योग्य कर्मियों द्वारा ही नियंत्रित किया जाना चाहिए जिन्होंने सूक्ष्मजीवविज्ञानी प्रक्रियाओं में प्रशिक्षण प्राप्त किया है। यह माना जाना चाहिए कि सभी इस्तेमाल किए गए मीडिया में रोगजनक बैक्टेरिया होते हैं और इसलिए इसे फेंकने से पहले ऑटोक्लेव करए इसका विनाश सुनिश्चित किया जाना चाहिए ताकि किसी को संक्रमित न करें।

****

सूक्ष्मजीवविज्ञान प्रयोगशाला प्रथाएं और सुरक्षा

टोम्स सी. जोसफ

सूक्ष्मजीवों से युक्त और सूक्ष्मजीवों के साथ काम करने वाले व्यक्तियों की ठीक से रक्षा करने के लिए एक सूक्ष्मजीवविज्ञान प्रयोगशाला में विशेष प्रथाओं और सुविधाओं की आवश्यकता होती है जो निम्नलिखित है:

- प्रयोगशाला में आने और प्रयोगशाला छोड़ने से पहले कीटाणुनाशक साबुन से हाथ धोएं।
- प्रयोगशाला में रहते हुए, चेहरे या आंखों को न छूएं। जब आप प्रयोगशाला में हों तो मोबाइल फोन,पर्स आदि का उपयोग न करें क्योंकि वे दूषित हो सकते हैं।
- प्रयोगशाला में भोजन, पेय या च्यूयिंग गम की अनुमति नहीं है। मुंह में कोई भी चीज जैसे पेंसिल, कलम या अंगुलियां न डालें।
- जिस फ्रिज में सूक्ष्मजीवों को रखा जाता है, उसमें भोजन, पीने के लिए पानी और शीतल पेय पदार्थ न रखें।
- प्रयोगशाला में प्रयोगशाला कोट पहनें। प्रयोगशाला में ही यह कोट छोड़ दें और गैर प्रयोगशाला क्षेत्रों में इसे न पहनें।
- प्रयोगशाला में ढीले कपडे न पहनें। जूते पहनना अनिवार्य है। प्रयोगशाला में सैंडल पहनना सख्त मना है।
- कार्यक्षेत्र को सभी अनावश्यक सामग्रियों से मुक्त रखें। बैकपैक्स, बैग, पर्स और कोट को प्रयोगशाला में नहीं रखना चाहिए।
- इथेनॉल 70% या ताजा 10% ब्लीच से कार्य क्षेत्रों को प्रयोग आरंभ करने से पहले तथा बाद में कीटाणुरहित करें।
- यदि आपकी आंखें सूक्ष्मजीवों या हानिकारक रसायनों के संपर्क में आती हैं, तो पानी के साथ 15 मिनट के लिए अपनी आँखें धो लें और तुरंत चिकित्सीय सावधानी बरतें।
- सभी अभिकर्मकों, मीडिया, रसायनों आदि को स्पष्ट रूप से चिन्हित एवं तैयारी की तारीख इंगित करें।
- इनोकुलेट किए गए लूप्स और सुइयों को पुनरुपयोग करने से पहले हर बार बन्सन बर्नर की लौ में जीवाणुनाशन किया जाना चाहिए।
- उपयोग में न होने पर बन्सन बर्नर को बंद कर दें।
- खासकर जब बन्सन बर्नर उपयोग में हों तो बालों को बांधके रखना चाहिए।
- जब आप अल्कहॉल के साथ जीवाणुरहित करते हैं, तो सुनिश्चित करें कि आपके पास कोई कागज या रुई नहीं है।
- सभी सूक्ष्मजीवों को संभावित रोगजनकों के रूप में समझें और इसलिए उचित देखभाल करें।
- संभावित संक्रामक रोगाणुओं या नमूनों के साथ काम करते समय डिस्पोजेबल दस्ताने पहनें।

- मुंह से कभी पिपेट न करें। एक माइक्रोपिपेट, पिपेटिंग सहायक या समायोज्य मात्रा पिपेटेर्स का उपयोग करें।
- सब कुछ एक जैव-जोखिम के रूप में देखें। सिंक के नीचे कुछ भी न डालें। तरल पदार्थ, पेट्री डिश और ब्रोथ संवर्धनों को त्याग ने से पहले उन्हें ऑटोक्लेव में जीवाणुमुक्त करें।
- सभी ठोस अपशिष्ट पदार्थों को एक बायोहज़ार्ड बैग में निपटाया जा सकता है और नियमित कूड़ेदान में छोड़ने से पहले ऑटोक्लेव किया जाना चाहिए।
- गिराव और दुर्घटनाओं की सूचना अतिशीघ्र प्रयोगशाला प्रभारी को दी जानी चाहिए। देखभाल के साथ छोटे गिराव की साफ सफाई सावधानी पूर्वक करें।

जैविक सुरक्षा कैबिनेट

जैव सुरक्षा कैबिनेट कार्यक्षेत्र हैं जो प्रयोगशाला प्रक्रियाओं के दौरान प्रयोगशाला कर्मियों और सामग्रियों को संदूषण होने से बचाने के लिए डिज़ाइन की गई हैं। हेपा (HEPA) फिल्टर का उपयोग जैव सुरक्षा कैबिनेट में किया जाता है जो हवा से हानिकारक रोगाणुओं को हटाता है।

जैविक सुरक्षा कैबिनेट के प्रकार

वर्ग I:

ये जैविक सुरक्षा कैबिनेट हेपा निस्पंदन सिस्टम के साथ ओपन-फ्रंट सिस्टम हैं। जो प्रयोगशाला कर्मियों और पर्यावरण के लिए सुरक्षा प्रदान करती हैं, लेकिन उत्पाद को सुरक्षा प्रदान नहीं करता है। इन कैबिनेटों का उपयोग विशिष्ट उपकरण रखने या प्रक्रियाओं के लिए उपयोग किया जाता है जो संभावित खतरनाक एरोसोल उत्पन्न कर सकते हैं।

वर्ग II:

ये जैविक सुरक्षा कैबिनेट जिसमें आगे का हिस्सा खुला, हवादार, लामिना-प्रवाह कैबिनेट हैं। हेपा फ़िल्टर किए गए, पुनः प्रसारित हवा के प्रवाह को इन कैबिनेट द्वारा कार्य स्थान के भीतर प्रदान किया जाता है। वर्ग II के कैबिनेट प्रयोगशाला के कर्मियों, पर्यावरण और उत्पादों को कीटाणुरहित हवा से संरक्षण प्रदान करती हैं जिन्हें संभाला जा रहा है।इन कैबिनेटों का उपयोग आमतौर पर संभावित संक्रामक एजेंटों (जैवसुरक्षा लेवल 1 या 2) के साथ काम करने वाले सूक्ष्मजीवविज्ञान प्रयोगशालाओं में किया जाता है क्योंकि वे बाहरी वायुजनित दूषित पदार्थों से निहित सामग्रियों की रक्षा करते हैं।

वर्ग III:

वर्ग III जैविक सुरक्षा कैबिनेट पूरी तरह से बंद होते है एवं बाहरी प्रभावों से मुक्त निर्माण के साथ हवादार प्रणाली में बनाए होते है। हवा की आपूर्ति को हेपा फ़िल्टर के माध्यम से कैबिनेट के अंदर खींचा जाता है, और निकास हवा को एक श्रृंखला में स्थापित दो हेपा फ़िल्टर द्वारा फ़िल्टर किया जाता है। इस जैवसुरक्षा कैबिनेट प्रणाली का उपयोग आमतौर पर एरोसोल के पलायन को रोकने के लिए उच्च-जोखिम वाले संक्रामक एजेंटों (जैवसुरक्षा लेवल 3 या 4) के साथ किया जाता है।

गैर संक्रामक सामग्री के साथ काम करते समय वर्ग I या वर्ग II जैव सुरक्षा कैबिनेट का सदुपयोग करने के लिए निम्नलिखित सुझाव है:

- उपयोग से पहले और बाद में एक उचित कीटाणुनाशक के साथ सतहों को साफ करें।
- यदि जैव सुरक्षा कैबिनेट कीटाणुनाशक यूवी रोशनी से सुसज्जित है, तो यूवी प्रकाश को चालू करके उपयोग करने से पहले और बाद में कार्य क्षेत्रों को कीटाणुरहित करें। कभी भी यूवी लाइट का उपयोग न करें जब जैव सुरक्षा कैबिनेट उपयोग में हो।
- जैव सुरक्षा कैबिनेट से उपयोग किए गए टिप्स, पिप्पेट्स सहित किसी भी बायोहज़ार्ड कचरे को नियमित रूप से हटा दें।
- जैव सुरक्षा कैबिनेट में रखने से पहले सभी पिपेट, पिपेट टिप बक्से, मीडिया, सामग्री, आदि की बाहरी सतह को एक उचित कीटाणुनाशक का उपयोग करके मिटा दें।
- हमेशा स्वच्छ प्रयोगशाला कोट और जीवाणुरहित दस्ताने पहनें जब एक जैव सुरक्षा कैबिनेट में काम कर रहे हों।

जैव सुरक्षा कैबिनेट का सही उपयोग कैसे करें

- उपयोग करने से 15 मिनट पहले जैव सुरक्षा कैबिनेट चालू करें।
- केवल अनुशंसित स्तर पर जैव सुरक्षा कैबिनेट सैश को उठाएं, इससे वायु प्रवाह में व्यवधान कम होगा और साथ ही वायुजनित दूषित पदार्थों के प्रवेश को रोकने में सहायता मिलेगी।
- कैबिनेट के चारों ओर गति की मात्रा सीमित हो सकती है। इसके अतिरिक्त, जैव सुरक्षा कैबिनेट के आसपास के क्षेत्र तक प्रवेश को सीमित करें। इससे वायु प्रवाह में व्यवधान कम होगा।

****

जीवाणुनाशन और कीटाणुनाशन तकनीक

टोम्स सी. जोसफ

कीटाणुनाशन और जीवाणुनाशन शुद्धीकरण प्रक्रियाएं है। हालांकि कीटाणुनाशन और जीवाणुनाशन के बीच अलग-अलग अंतर हैं। कीटाणुनाशन निर्जीव वस्तुओं और सतहों से हानिकारक सूक्ष्मजीवों को समाप्त करता है या कम करता है, जबकि जीवाणुनाशन बैक्टीरियल बीजाणुओं (जो अत्यधिक प्रतिरोधी हैं) सहित सभी सूक्ष्मजीवों को मारता है। कीटाणुनाशन आमतौर पर फेनोलिक कीटाणुनाशक, हैलोजेन (जैसे क्लोरीन), भारी धातुओं, अल्कहॉल, ब्लीच, हाइड्रोजन पेरोक्साइड, डिटर्जेंट के साथ किया जाता है। ताप और पाश्चुरीकरण का उपयोग भी कीटाणुनाशन के लिए किया जाता है, जबकि गर्मी, रसायन, विकिरण, उच्च दबाव और निस्पंदन का उपयोग जीवाणुनाशन के लिए किया जाता है।

जीवाणुनाशन के 3 प्रकार के हैं जो निम्नलिखित है:

क) भौतिक **ख)** मैकेनिकल **ग)** रसायनिक

क) भौतिक

I. ऊष्मा

ऊष्मा जीवाणुनाशन एंजाइमों और अन्य आवश्यक कोशिका घटकों के विनाश द्वारा किया जाता है और जीवाणुनाशन का सबसे व्यापक रूप से इस्तेमाल होनेवाला और विश्वसनीय तरीका है और यह निम्नलिखित द्वारा किया जा सकता है:

1. शुष्क इंक्युबेशन:

क) लाल ऊष्मा या ज्वलंत (भस्मीकरण)

लाल ऊष्मा का उपयोग स्पैटुला, वायर लूप, सुई, संवर्धन ट्यूब के मुंह, ग्लास स्लाइड आदि के जीवाणुनाशन के लिए किया जा सकता है।

ख) गर्म हवा ऑवन

गर्म हवा ऑवन का उपयोग ग्लास पेट्री डिश, ग्लास पिपेट, ग्लास फ्लास्क, ड्राई ग्लास वेयर, मापने वाले सिलिंडर, सभी ग्लास सिरिंजों की जीवाणुनाशन के लिए किया जा सकता है। धातु के उपकरण और तेल और ग्रीस को भी इस विधि के द्वारा जीवाणुरहित किया जा सकता है।

गर्म हवा ऑवन में (क) इलेक्ट्रिक हीटर युक्त एक ऊष्मारोधित कक्ष (ख) पंखा (ग) अल्मारियां (घ) थर्मोकपल (ङ) तापमान संवेदक होता है।

गर्म हवा ऑवन में जीवाणुनाशन के लिए उपयोग किया जाने वाला तापमान 160 °C - 180 °C है। गर्म हवा ऑवन द्वारा जीवाणुनाशन की स्थिति : 60 मिनट के लिए 160 °C और 30 मिनट के लिए 180 °C पर रखा जाता है।

2. नम ऊष्मा

जीवाणुनाशन के लिए नम ऊष्मा सबसे प्रभावी विधि है। दबाव के तहत भाप के रूप में नम ऊष्मा का उपयोग किया जाता है। नमी के उपस्थिति ऊष्मा का स्थानांतरण तेजी से होता है। भाप द्वारा जीवाणुनाशन के लिए अलग - अलग तरीके हैं।

1. कई बार के लिए 100 °C पर आंतरायिक संसर्ग (टैंडलाईज़ेशन): इस विधि का उपयोग ऊष्मा प्रतिरोधी एंडोस्पोर को मारने के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञान प्रयोगशाला में किया जाता है। टैंडलाईज़ेशन में सामग्री को तीन दिनों तक, हर रोज़ पूर्ण रूप से उबालने के बाद 15 मिनट तक जारी रखना होता है। प्रत्येक इंक्युबेशन के बाद, जो बैक्टेरिया बच गए हैं वे जीवाणु कोशिकाओं में अंकुरित होंगे। इन कोशिकाओं को अगले दिन के इंक्युबेशन से मार दिया जाएगा।
2. पास्तुरीकरण (पाश्चराइजेशन) का उपयोग आमतौर पर 100 °C से कम गर्मी के साथ शोधन करके, रोगजनकों को खत्म करने और कुछ खाद्य पदार्थों जैसे कि दूध और फलों के रस की शेल्फ लाइफ को बढ़ाने के लिए किया जाता है। पास्तुरीकरण जीवाणुनाशन का एक तरीका नहीं है बल्कि यह दूध और अन्य दूध उत्पादों के संरक्षण के लिए खाद्य उद्योगों में मुख्य रूप से इस्तेमाल की जाने वाली प्रक्रिया है। इस प्रक्रिया में उत्पाद को 30 मिनट के लिए 63 °C या 15 सेकंड के लिए 72 °C के तापमान पर रखना और फिर इसे शीघ्र ही ठंडा करना होता हैं।
3. तापमान को 100 °C से ऊपर संतृप्त भाप के द्वारा दबाव को बढ़ाकर आटोक्लेव द्वारा जीवाणुनाशन के लिए दबाव का उपयोग किया जाता है। यह प्रक्रिया संवर्धन मीडिया, लैब कोट और जलीय घोल के लिए उपयुक्त है। ऑटोकैवलिंग के लिए तापमान 15 पी.एस.आई (पाउंड / इंच) पर 15 मिनट के लिए 121 ^{O}C है।

सूक्ष्मजीवों को नष्ट करने के लिए आटोक्लेव में दबावयुक्त भाप का उपयोग किया जाता है, और इसका उपयोग प्रयोगशाला मीडिया और अपशिष्ट के परिशोधन और प्रयोगशाला ग्लासवेयर, मीडिया और अभिकर्मकों की जीवाणुनाशन के लिए किया जाता है। प्रभावी ऊष्मा हस्तांतरण के लिए, हवा को आटोक्लेव कक्ष से बाहर प्रवाहित किया जाना चाहिए। आटोक्लेव की दक्षता को समय-समय पर जैविक संकेतक जैसे *बेसिलस स्टीयरोथर्मोफिलस* के बीजाणु के साथ जांच किया जाना चाहिए। आटोक्लेव का उपयोग कई धातु और कांच की वस्तुओं की जीवाणुनाशन के लिए किया जा सकता है, लेकिन रबर, प्लास्टिक और उच्च तापमान से क्षतिग्रस्त होने वाले उपकरणों के लिए इस्तेमाल नहीं किया जा सकता है।

II. विकिरण

जीवाणुनाशन के लिए विद्युत चुम्बकीय विकिरण (इलेक्ट्रोमैग्नेटिक रेडिएशन) (जैसे गामा किरणों और यूवी लाइट), पार्टिकुलेट रेडिएशन (जैसे त्वरित इलेक्ट्रॉनों) सहित विकिरण का उपयोग किया जाता है। विकिरण सूक्ष्मजैविक डीएनए को लक्षित करता है। जबकि गामा किरणों और इलेक्ट्रॉनों के कारण मुक्त कण का उत्पादन और आयनीकरण होता है, यूवी प्रकाश उत्तेजना पैदा करता है। उच्च ऊर्जा गामा किरणों या त्वरित इलेक्ट्रॉनों के साथ विकिरण जीवाणुनाशन का उपयोग ऊष्मा संवेदनशील उत्पादों के औद्योगिक जीवाणुनाशन के लिए किया जाता है। विकिरण जीवाणुनाशन का उपयोग प्लास्टिक सिरिंजों और सूखी दवा उत्पादों की जीवाणुनाशन के लिए किया जाता है। 260 न.मी. के यूवी प्रकाश का उपयोग हवा की जीवाणुनाशन और काम के क्षेत्रों की सतह जीवाणुनाशन के लिए किया जा सकता है। यूवी प्रकाश में कम ऊर्जा भेदन क्षमता होती है। इसका उपयोग विनिर्माण ग्रेड के पानी के उपचार के लिए किया जा सकता है, लेकिन दवा खुराक रूपों से जीवाणुनाशन के लिए उपयुक्त नहीं है। आम तौर पर जीवाणुनाशन के लिए कोबाल्ट - 60 गामा किरणों का उपयोग किया जाता हैं।

ख) यांत्रिक विधि (निस्पंदन / फिल्ट्रेशन)

इस विधि द्वारा घोल और तरल पदार्थ को सूक्ष्मजीवों से मुक्त किए जा सकते हैं। ये घोल जीवाणुरहित होते है। फिल्ट्रेशन का उपयोग ऐसे तरल पदार्थ या घोल का जीवाणुनाशन करने के लिए किया जाता है जो ऊष्मा या रसायन के संपर्क में नहीं लाया जा सकते। व्यास में 0.2 µm के छिद्र आकार वाले फिल्टर बैक्टेरिया और सूक्ष्मजीवों को हटा देंगे, लेकिन वायरस को नहीं निकाल सकते। फिल्ट्रेशन का उपयोग जीवों के तरल पदार्थ जैसे कि सामान्य सेरा, विभिन्न शुगर मिश्रण, एंटीसेरा, एंजाइम युक्त घोल, सूक्ष्मजैविक विषाक्त पदार्थों और एंटीबायोटिक के घोल के लिए किया जाता है जिन्हें अन्य तरीकों से नहीं किया जा सकता।

ग) रासायनिक विधि

इस का उपयोग तब किया जाता है जब जीवाणुरहित की जाने वाली सामग्री भाप जीवाणुनाशन में इस्तेमाल होने वाली उच्च ऊष्मा के प्रति संवेदनशील होती है। कीटाणुनाशक रसायन वह होते हैं जिनका उपयोग निर्जीव सतहों से रोगजनक बैक्टेरिया को नष्ट करने के लिए किया जाता है। कुछ रसायनों को सुरक्षित रूप से त्वचा और श्लेष्म झिल्ली पर लागू किया जा सकता है जिन्हें एंटीसेप्टिक्स कहा जाता है। रासायनिक पदार्थ, रोगजनक और गैर-रोगजनक सूक्ष्मजीवों को मारता है, लेकिन बीजाणुओं को नहीं। कीटाणुनाशन रोगजनक बैक्टेरिया की संख्या को एक स्तर तक कम करने की प्रक्रिया है जिनसे रोग होने की संभावना कम हो जाती है। कीटाणुनाशकों की मात्रा निम्नानुसार है: मीथाइल अल्कहॉल (50 - 70%), फिनोल समूह (2 - 5%), क्लोरीन यौगिक 5%, फॉर्मालडिहाइड 37%।

****

बैक्टेरिया का ग्राम स्टेनिंग

आशीष कुमार झा

स्टेनिंग एक सूक्ष्मदर्शीय छवि की स्पष्टता को बढ़ाने के लिए उपयोग की जाने वाली तकनीक है जिसमें कोशिकाओं, ऊतकों या सूक्ष्मजीवों की सूक्ष्म संरचना की दृश्यता को बढ़ाने के लिए विभिन्न स्टेन और रंगों का उपयोग किया जाता है।

सूक्ष्मजीवविज्ञानीय जांच में सबसे अधिक इस्तेमाल की जाने वाली स्टेनिंग प्रक्रिया ग्राम स्टेनिंग है जिसका नाम डेनिश फिज़िश्यन हान्स क्रिस्ट्यन जोआचिम ग्राम के नाम पर रखा गया था जिन्होंने 1884 में इसकी खोज की थी। ग्राम स्टेनिंग एक भिन्नता दर्शानेवाली प्रक्रिया है जिसके द्वारा बैक्टेरिया को दो वर्गों में बदलता है यानी ग्राम पोज़िटीव और ग्राम निगटीव।

ग्राम स्टेनिंग का महत्व

1. बैक्टेरिया के प्रारंभिक लक्षणों का वर्णन और वर्गीकरण में ग्राम स्टेनिंग एक महत्वपूर्ण भूमिका निभाता है।
2. यह बैक्टेरिया के स्टेनिंग विशेषताओं के आधार पर उनकी पहचान करने में मदद करता है, जिससे हमें प्रकाश सूक्ष्मदर्शी के तहत बैक्टेरिया की जांच करने में सक्षम बनाता है।
3. यह बैक्टेरिया की आकार और संरचना को अध्ययन करने में मदद करता है।

ग्राम स्टेनिंग का मूल चरण

1. स्मीयर बनाना
2. स्मीयर का निर्धारण
3. प्राथमिक स्टेन का उपयोग
4. मॉर्डन्ट का उपयोग
5. विरंजीकरण (रंग हटाने की प्रक्रिया)
6. काउंटर स्टेनिंग

स्मीयर बनाना

स्टेनिंग के लिए स्लाइड की सतह पर बैक्टेरिया की एक पतली परत को बैक्टेरियल स्मीयर कहा जाता है। स्मीयर तैयार करते समय, साफ स्लाइड और धूल-ग्रीस से मुक्त होनी चाहिए। स्लाइड को साबुन और साफ पानी से साफ किया जाना चाहिए और अच्छे से सुखाया जाना चाहिए। आमतौर पर स्टेनिंग के लिए 16 - 24 घंटे पुराने बैक्टीरियल संवर्धन का उपयोग होता है।

क) ब्रोथ से: एक लूप ब्रोथ को एक साफ स्लाइड पर रखें और लगभग 1 से.मी. व्यास में फैलाएं।

ख) प्लेटेड मीडिया से: स्लाइड पर जीवाणुरहित पानी या सामान्य सलाईन की एक बूंद डालें,आवश्यक बैक्टेरियल कॉलोनी का चयन करें और कॉलोनी के शीर्ष केंद्र से बैक्टेरिया सेल को इकट्ठा करें।

ग) हवा में सुखाएं

घ) बन्सन बर्नर की नीली लौ में 3 - 4 बार (ऊपरी तरफ पर स्मीयर) स्लाइड पास करके स्मीयर को ठीक करें।

ङ) स्मीयर की मोटाई विरंजीकरण की डिग्री निर्धारित करती है और अंततः ग्राम स्टेनिंग के परिणाम को प्रभावित करती है।

स्मीयर का निर्धारण

बक्टेरियल संवर्धन सूक्ष्म स्लाइड पर या तो गर्मी से या मेथनॉल जैसे रसायनों के द्वारा निर्धारित किया जाता है। मेथनॉल निर्धारण परपोषी कोशिकाओं के रूप में अच्छी तरह से बैक्टेरिया की आकृति विज्ञान को बरकरार रखता है।

प्राथमिक स्टेन का अनुप्रयोग

क्रिस्टल वायलेट (सीवी) ग्राम स्टेन में उपयोग होने वाला प्राथमिक स्टेन है। जलीय घोल में क्रिस्टल वायलेट (CV) CV^+ और Cl^- आयनों में विघटित हो जाता है और ग्राम - पोज़िटीव और ग्राम - निगटिव बैक्टेरिया दोनों की कोशिका झिल्ली के माध्यम से प्रवेश करने में सक्षम होते है। ये CV^+ बैक्टेरिया की निगटिव चार्ज वाली कोशिका भित्ति के साथ प्रतिक्रिया करने के उपरांत पर्पिल स्टेन दिखाता है ।

मोर्डेंट का उपयोग

मोर्डेंट एक पदार्थ है जो स्टेन के लिए बैक्टेरिया की कोशिका भित्ति के आकर्षण को बढ़ाता है। ग्राम स्टेनिंग में मुख्यत: आयोडीन का उपयोग किया जाता है जो क्रिस्टल वायलेट-आयोडीन मिश्रण (सीवी-आई) बनता है और बैक्टेरिया की कोशिका भित्ति में फंस जाता है और फलस्वरूप बैक्टेरिया को बैंगनी रंग प्रदान करता है।

विरंजीकरण

यह चरण वास्तव में ग्राम - पोज़िटीव और ग्राम – निगटीव बैक्टेरिया को अलग करता है। स्टेनिंग प्रक्रिया के दौरान विरंजीकरण के लिए अल्कहॉल या एसीटोन का उपयोग किया जाता है। अल्कहॉल या एसीटोन ग्राम निगटिव बैक्टेरिया की मोटी लिपिड परत को भंग कर देता है, जिसके परिणाम स्वरूप पेप्टिडोग्लाइकन परत दिखाई देती है। इसके बाद सीवी-आई कॉम्प्लेक्स को पेप्टिडोग्लायन से हटाता है; अंततः ग्राम निगटिव बैक्टेरिया को बेरंग कर देता है। दूसरी ओर, अल्कहॉल और एसीटोन जैसे कार्बनिक विलायक (सोल्वेंट्स) ग्राम पोज़िटीव बैक्टेरिया के कोशिका से पानी को निकालते है, जो पेप्टिडोग्लाइकेन परत के सिकुडन के लिए कारण होता है, जो सीवी-I मिश्रण को कायम रखता है जिससे बैंगनी रंग को बरकरार रखता है।

काउंटर स्टेनिंग

काउंट रस्टेन का उपयोग ग्राम निगटिव बैक्टेरिया की रंगहीन कोशिकाओं को रंग प्रदान करने के लिए किया जाता है जो अन्यथा दिखाई नहीं देती है। सेफ्रानीन आमतौर पर उपयोग किया जानेवाला काउंटर स्टेन है। कभी-कभी क्षारीय फ़्यूचिन का उपयोग सेफ्रानीन के बजाय भी किया जाता है। सेफ्रानीन बैक्टेरिया की कोशिका को गुलाबी कर देता है। ग्राम पोज़िटीव बैक्टेरिया में गुलाबी रंग को क्रिस्टल वायलेट के बैंगनी रंग से दबा दिया जाता है, इसलिए ग्राम स्टेनिंग में ग्राम निगटिव बैक्टेरिया में गुलाबी रंग दिखता है और ग्राम पोज़िटिव बैक्टेरिया बैंगनी रंग का दिखता है।

ग्राम स्टेनिंग का कार्य विधि

- एक मिनट के लिए क्रिस्टल वायलेट स्टेनिंग अभिकर्मक की प्रचुर मात्रा के साथ बैक्टेरिया की कोशिकाओं वाले एयर ड्राइड में स्मीयर को निर्धारित करें।
- नल के पानी की पतली जलप्रवाह के द्वारा स्लाइड से अवशेष स्मीयर को धो लें।
- ग्राम आयोडीन में स्लाइड एक मिनट के लिए डुबाके रखें।
- नल के पानी की छोटी सी जलधारा में स्लाइड को धोएं।
- जब तक विरंजीकरण घोल पूर्णतया स्लाइड से निकाल न जाएं, तब तक स्लाइड को डीकलरैज़िंग एजेंट (95% इथेनॉल) से धोएं।
- काउंटरस्टैन, सेफ्रानीन के साथ स्लाइड्स को डुबाके रखें। लगभग एक मिनट तक प्रतीक्षा करें।
- स्लाइड को बहते पानी में तब तक धोएं जब तक कि स्लाइड से घोल पूर्णत: निकल न जाए। इसके बाद स्लाइड को सोखने वाले पेपर या हवा से सुखाएं।
- स्लाइड का निरीक्षण (100X) ओयिल इम्मेर्शन का उपयोग करके सूक्ष्म दर्शी से देखें।

ध्यान देने योग्य बातें :

- ग्राम स्टेनिंग, भिन्नता दर्शानेवाली प्रक्रिया है जो बैक्टेरिया को दो समूहों में विभाजित करती है जो कि कोशिका भित्ति की संरचना पर आधारित है।
- ग्राम पोज़िटिव बैक्टेरिया में मोटी कोशिका भित्ति होती है, जो मुख्य रूप से पेप्टिडोग्लाइकन परत (90%) से बनी होती है - यह बैंगनी रंग का होता है।
- ग्राम निगटिव बक्टेरिया में पतली कोशिका भित्ति होती है, जिसमें मुख्य रूप से लिपिड परत और बहुत पतली पेप्टिडोग्लाइकन परत (10%) होती है - यह गुलाबी से लाल रंग की होती है।
- ग्राम स्टेनिंग का उपयोग करके लगभग सभी बक्टेरिया की कल्पना की जा सकती है, लेकिन कुछ अपवाद हैं:
    - i) बक्टेरिया जो विशेष रूप से परपोषी कोशिकाओं में रहते हैं (इंट्रासेल्युलर बैक्टेरिया), उदाहरण के लिए क्लैमाइडिया नहीं देखे जा सकते हैं।
    - ii) ऐसे बैक्टेरिया जिनके पास कोशिका भित्ति नहीं है, ग्राम स्टेनिंग से नहीं देखे जा सकते। उदाहरण के लिए माइकोप्लाज़्मा

****

बैक्टीरियल संवर्धन की मोटिलिटी जांच

अशीष कुमार झा

जीव या बक्टेरियल कोशिका की स्वयं से गति करने की क्षमता को मोटिलिटी कहा जाता है। अधिकांश बैक्टेरिया फ्लैज्जेला के रूप में जानेवाले लोकोमोटर उपांग द्वारा मोटिलिटी दिखाते है जो बैक्टेरिया के लिए अद्वितीय है या विशेष फाइब्रिल्स द्वारा मोटिलिटी दिखाते हैं जो ग्लाइडींग मोटिलिटी का एक रूप है। बक्टेरियल फ्लैजेल्ला, एक धाग जैसा उपांग है जो प्लाज्मा झिल्ली और कोशिका भित्ति से बाहर की ओर फैले है। बैक्टेरिया में एकल या एकाधिक फ्लैजेल्ला होता है। मोटिलिटी जांच बैक्टेरिया के वर्गीकरण, प्रजातियों के भेदभाव और बैक्टेरिया के रोगजनक लक्षण वर्णन के लिए किया जाता है। सूक्ष्मजीवविज्ञान के क्षेत्र में शुरुआती दिनों से बैक्टेरिया की मोटिलिटी का उपयोग जीवों के भेदभाव और वर्गीकरण के साधन के रूप में किया गया है।

फ्लैजेल्ला की संख्या और स्थिति के आधार पर, बैक्टेरिया को 4 प्रमुख निम्नलिखित समूहों में वर्गीकृत किया गया है:

1. **मोनोट्राईकस:** कोशिका के एक छोर से एक एकल फ्लैजेल्लम का विस्तार। *(विब्रियो कोलेरे, कैम्पिलोबैक्टर प्रजाति)*
2. **एम्फिट्राईकस:** कोशिका के दोनों छोर से एक एकल फ्लैजेल्लम का विस्तार। *(आल्कलिजेंस फेकेलिस)*
3. **लोफोट्राईकस:** फ्लैजेल्ला जैसे कई गुच्छे कोशिका के एक या दोनों सिरों *(स्पिरिला* प्रजाति*)* से निकले होते हैं।
4. **पेरिट्राईकस:** बेक्टीरियल कोशिका में विभिन्न फ्लैजेल्ला फैले होते हैं। *(साल्मोनेला टाइफी, एस्चेरिचिया कोलाई, प्रोटीयस* प्रजाति*)*

मोटिलिटी जांच विधि

आम तौर पर मोटिलिटी जांच के लिए दो अलग-अलग तरीके उपयोग किए जाते हैं:

1. **स्लाइड विधि**
   - क) वेट माउंट विधि
   - ख) हैंगिंग ड्रॉप विधि

2. **सॉफ्ट अगार स्टैबिंग**

स्लाइड विधि का उपयोग आमतौर पर गैर-रोगजनक जीवों के लिए किया जाता है, जबकि अगार विधि का उपयोग रोगजनक जीवों के लिए किया जाता है।

वेट माउंट स्लाइड विधि

मोटिलिटी जांच के लिए सबसे सरल विधि है। इस पद्धति में लूप भर संवर्धन को साफ स्लाइड पर रखा जाता है और एक कवरस्लिप से ढक दिया जाता है। एक कवरस्लिप के चारों तरफ थोडा पेट्रोलियम जेली लगाएं, कवरस्लिप के केंद्र में संवर्धन की एक छोटी बूंद रखें, धीरे से कवरस्लिप पर एक सूक्ष्मदर्शीय स्लाइड रखें और मध्य स्थल को दबाए बिना सभी चार धारों को कसकर सील करें। ध्यान से स्लाइड को उल्टा घुमाएं और सूक्ष्मदर्शी के नीचे स्लाइड का निरीक्षण करें।

पूर्वोपाय:

ब्राउनियन गति को बैक्टेरिया कोशिका की मोटिलिटी के साथ भ्रमित नहीं करना चाहिए। ब्राउनियन गति, आसपास के पानी की बमबारी के कारण घटित जीव की एक अनियमित उछलन है।

लाभ

- यह सरल है तथा इसका आकार एवं कोशिक संरचना एक हद तक सुरक्षित है।

नुकसान

- यह तरीका जोखिम भरा है इसलिए केवल गैर-रोगजनक बैक्टेरिया के लिए ही उपयोग किया जाना चाहिए।

हेंगिंग ड्रॉप तरीका

जब बैक्टेरिया एक साथ जुडे रहते हैं तब उनके सामान्य आकार और बेक्टीरियल कोशिका की संरचना को देखने में यह विधि उपयोगी है ।

प्रक्रिया

- एक कवरस्लिप लें, कवरस्लिप के धार पर पेट्रोलियम जेली की पतली परत लगाएं।
- लूप भर संवर्धन को कवरस्लिप के केंद्र में रखें तथा जीवाणुरहित पानी की एक बूंद डालें।
- गढ्ढा युक्त स्लाइड लें। इसे ड्रॉप के ऊपर इस तरह रखें कि स्लाइड का अवतल भाग ड्रॉप पर पड़े।
- किनारे को धीरे से दबाकर कवरस्लिप पर स्लाइड को रखें।
- बूंदों को हिलाए बिना शीघ्र ही स्लाइड को उल्टा करें।
- स्लाइड को सूक्ष्मदर्शी में रखने के बाद निरीक्षण करें।

लाभ

- इस विधि में बैक्टीरियल कोशिकाओं के आकार और संरचना को संरक्षित किया जाता है।
- सभी तरफ से सील करने के कारण सुखाने की प्रक्रिया भी धीमी हो जाती है।

नुकसान

- यह विधि रोगजनक बैक्टेरिया के लिए सुरक्षित नहीं है।

सॉफ्ट अगार स्टैबिंग (ट्यूब तरीका)

यह तुलनात्मक रूप से मोटिलिटी जांच का सुरक्षित तरीका है। इस विधि में बैक्टेरिया की मोटिलिटी को अर्द्ध ठोस अगार में निर्धारित किया जाता है। इस विधि के लिए उपयोग किया जाने वाला मीडियम मोटिलिटी जांच मीडियम है। मीडियम में ट्रिप्टोज होता है जो बैक्टेरिया के उपापचय के लिए आवश्यक पोषक तत्वों के स्रोत के रूप में कार्य करता है। सोडियम क्लोराइड मीडिया के ऑस्मोटिक संतुलन को बनाए रखता है। अगार की कम मात्रा अर्द्ध ठोस मीडियम बनाने में मदद करती है। ऊष्मायन (इंक्युबेशन) के बाद ट्यूबों की जांच से सीधे बैक्टेरिया की मोटिलिटी देखी जा सकती है। मीडियम के केंद्र में इनोकुलेशन (संरोपण), स्टैबिंग विधि द्वारा किया जाता है और इसे 18 - 40 घंटे के लिए अनुकूल तापमान पर इंक्युबेट करते हैं। सभी नॉन-मोटायिल जीव इनोकुलेशन रेखा के आसपास ही विकसित होंगे जबकि मोटायिल जीव इनोकुलेशन रेखा से दूर की ओर विकसित होंगे या पूरे मीडियम में फैल सकते हैं। सभी कमज़ोर मोटायिल जीव की मोटिलिटी की पुष्टि फ्लैजेल्लम स्टेन या हेंगिंग ड्रॉप विधि द्वारा की जानी चाहिए।

विधि की सीमाएँ

- यदि गर्मी या शारीरिक दुर्व्यवहार के कारण बेक्टीरियल फ्लैजेल्ला क्षतिग्रस्त हो जाता है, तो जांच गलत परिणाम देगा।
- कम मोटायिल जीव गलत परिणाम भी दे सकते हैं।
- अर्द्ध ठोस मीडिया में संरोपित लूप को हिलाए बिना सीधा निकालना जरूरी है अन्यथा फैनिंग मोशन में स्टेब लाइन के साथ विकास हो सकती है जो गलत पोज़िटिव परिणाम देती है।

बैक्टेरिया का वृन्द गति (स्वार्मिंग)

स्वार्मिंग अत्यंत गतिमान जीवाणुओं द्वारा जीवाणुओं के संचलन का प्रकार है। पोषक तत्व खोजने के लिए ये बैक्टेरिया ठोस अगार पर भी जा सकते हैं। अगर इस प्रकार की बैक्टेरिया संवर्धन को अगार प्लेट के केंद्र में संरोप किया जाता है और प्लेट को इंक्युबेट किया जाता है, तो बैक्टेरिया परिधि की ओर बढ़ने लगते हैं। इस गति के दौरान प्रत्येक बैक्टेरिया पोषक तत्वों को अवशोषित करते हैं और आकार में वृद्धि करते हैं और निश्चित दूरी पर जाने के बाद वे विभाजित होने लगते हैं जिससे नया जीव बनता है।इस तरह के गति से अगार प्लेट पर ज़्यादा संख्या होने का कारण बनता है, अन्यथा स्वार्म के रूप में जाना जाता है। इस विधि का उपयोग उत्पादन के समय का अनुमान लगाने के लिए भी किया जा सकता है। *प्रोटियस* प्रजाति बैक्टेरिया इस प्रकार का आम उदाहरण है।

****

सूक्ष्मजैविक मापदण्डों के लिए समुद्री खाद्य के नमूनों का चयन

रम्या एस

परिचय

नमूने की पर्याप्तता और स्थिति परीक्षा के लिए बहुत ही महत्वपूर्ण हैं। यदि नमूने सही तरीके से एकत्र एवं रखरखाव नहीं किए गए हैं तो प्रयोगशाला में सूक्ष्मजैविक मापदण्डों का परिणाम अर्थहीन होंगे। चूँकि समुद्री खाद्य की एक बड़ी मात्रा की व्याख्या अपेक्षाकृत कम नमूने पर आधारित होती है, इसलिए स्थापित नमूनों की प्रक्रियाओं को समान रूप से लागू किया जाना चाहिए। एक प्रतिनिधि नमूना बहुत ही आवश्यक है जब रोगजनकों या विषाक्त पदार्थों को भोजन के भीतर पाया जाता है या खाद्य शिपमेंट का निपटारा कानूनी मानक के संबंध में प्रदर्शित बैक्टीरियल सामग्री पर निर्भर करता हो।

नमूना चयन (सैम्प्लिंग)

- यदि नमूने के लिए कोई विशिष्ट अंतरराष्ट्रीय या कानूनी मानक नहीं हैं, तो यह निर्णय लिया जा सकता है कि संबंधित प्रयोगशाला और पार्टी के पूर्व समझौते के अनुसार नमूना लें।
- ऐसे मामलों में, आईएसओ के प्रासंगिक मानकों और कोडेक्स एलेमेंट्रिस के दिशानिर्देशों का उपयोग संदर्भ विधियों के रूप में किया जाना चाहिए, जैसे कोडेक्स एलीमेंट्रिअस: नमूने पर सामान्य दिशानिर्देश, सीएसी / जीएल 50 - 2004; आईएसओ 7218, एनएमकेएल (फूड एनालिसिस पर नॉर्डिक कमेटी) प्रक्रिया संख्या 12: खाद्य पदार्थों के विश्लेषण के लिए नमूनाकरण पर गाइड (www.nmkl.org)। आईएसओ 18593 प्रसंस्करण क्षेत्रों और उपकरणों के नमूने के लिए यूरोपीय संघ संदर्भ नमूना विधि उपस्थित है।

नमूना चयन (सैम्प्लिंग) की विधि

- नमूने को इस तरह से संभाला और चिन्हित किया जाना चाहिए, ताकि उनकी कानूनी और विश्लेषणात्मक वैधता की गारंटी हो।
- आधिकारिक नियंत्रण के लिए, यह महत्वपूर्ण है कि प्रयोगशाला, उत्पाद का एक यथार्थ प्रतिनिधित्व करने वाला नमूना प्राप्त करती है जो परिवहन या भंडारण के दौरान क्षतिग्रस्त या परिवर्तित नहीं हुआ है।
- गलत नमूना लेने से गलत निगटिव या गलत पोज़िटीव परिणाम हो सकते हैं।
- जब भी संभव हो, नमूनों को असली बंद कंटेनरों में ही जांच प्रयोगशाला में जमा करना चाहिए या प्रतिनिधि भागों को जीवाणुमुक्त परिस्थितियों में जीवाणुरहित कंटेनरों में स्थानांतरित किया जाना चाहिए।
- नमूना लेना हमेशा जीवाणुरहित सैंप्लिंग उपकरण और जीवाणुमुक्त तकनीक के उपयोग से होता है।

- नमूने में उपयोग किए जाने वाले कंटेनरों को साफ, सूखा, रिसाव-प्रूफ, चौड़े मुंह वाला तथा जीवाणुरहित होना चाहिए एवं उत्पाद के नमूनों के लिए उपयुक्त आकार का होना चाहिए।
- जीवाणुरहित प्लास्टिक की थैलियाँ (केवल सूखी, अनफ्रोज़ेन सामग्री के लिए) या प्लास्टिक की बोतलें, लाइन नमूनों के लिए उपयोगी कंटेनर हैं।
- प्रत्येक नमूना इकाई का पहचान चिह्नित पट्टी के मास्किंग टेप की आधार पर किया जाना चाहिए।
- जब भी संभव हो, प्रत्येक नमूना इकाई के लिए कम से कम 100 ग्राम प्राप्त किया जाना चाहिए।
- प्लास्टिक पर मार्कर का इस्तेमाल न करें क्योंकि स्याही कंटेनर में फैल सकती है।
- नमूनों को प्रयोगशाला में तुरंत पहुंचाया जाना चाहिए, जहां तक संभव हो मूल भंडारण की स्थिति बनी रहे।
- नमूनों के परिवहन के लिए, उन्हें ऐसी स्थिति में रखा जाना चाहिए, जो मौजूद सूक्ष्मजीवों की संख्या में परिवर्तन को रोकते हैं।
- परिवहन के सबसे तेज साधनों को प्राथमिकता दी जानी चाहिए।
- हिमीकृत या प्रशीतित उत्पादों को अनुमोदित ऊष्मारोधित दृढ कंटेनरों में ही ले जाएं, ताकि वे बिना परिवर्तन के प्रयोगशाला में पहुंचें।
- जमे हुए नमूनों को प्री-चिल्ड (पहले से ही ठंडा किया हुआ) कंटेनरों में एकत्र किया जाना चाहिए।
- प्रशीतित नमूनों को 0 - 4 °C पर बर्फ में ठंडा किया जाना चाहिए, और प्रयोगशाला में आगमन तक 0 - 4 °C पर नमूना बनाए रखने में सक्षम परिवहन का चयन करना चाहिए।
- तरल नमूने एकत्र करते समय, तापमान नियंत्रण के रूप में एक अतिरिक्त नमूना लिया जाना चाहिए।
- कंट्रोल नमूने का तापमान संग्रह के समय और प्रयोगशाला में प्राप्त होने पर जांच करना चाहिए।
- संग्रह के समय और प्रयोगशाला में सभी नमूनों के आगमन की तारीखें दर्ज की जानी चाहिए।
- सूखे या कैन्ड खाद्य पदार्थ, जो खराब नहीं होते हैं और परिवेश के तापमान पर एकत्र किए जाते हैं, को प्रशीतित करने की आवश्यकता नहीं होती है।
- नमूनों का भंडारण निम्नलिखित तापमान पर रखा जाना चाहिए :
    - ताजा और प्रशीतित उत्पाद- 0 और 4 °C के बीच,
    - हिमीकृत या अति हिमीकृत उत्पाद- -18 °C से कम,
    - ताजा मछली और संवेदनशील उत्पाद - 0 और 2 °C के बीच,
    - स्थिर इकाइयाँ और बंद पैकेजिंग में परिवहन - 0 और 4 °C के बीच ।

नमूने की प्राप्ती और संचालन

- प्रयोगशाला में प्राप्त होने के उपरांत नमूने की वास्तविक स्थिति की जाँच की जानी चाहिए।
- यदि नमूने अपर्याप्त हैं या उनकी स्थिति असंतोषजनक है, तो प्रयोगशाला को नमूनों को जांच करने से मना कर देना चाहिए।
- स्वीकृत नमूने प्रलेखित करें।
- भंडारण की प्रतीक्षा कर रहे नमूनों को ऐसे भंडारण करना चाहिए जिससे उसमें मौजूद सूक्ष्मजीवों की संख्या में कोई भी परिवर्तन न हो।
- उचित भंडारण तापमान और परीक्षा की समय सीमा का ध्यान रखना बहुत महत्वपूर्ण है, उदा: प्राप्ती के बाद 24 घंटे के पहले ताजा और प्रशीतित उत्पादों का जांच करें; अब लंबी भंडारण अवधि के लिए -18 ^{o}C पर तुरंत नमूना भंडारण करें।
- जमे हुए नमूनों को जांच करने तक -20 ^{o}C पर भंडारण किया जाना चाहिए।
- खराब होने वाले नमूने 0 - 4 ^{o}C पर प्रशीतित करें(36 घंटे से अधिक नहीं)।
- विश्लेषण तक सामान्य तापमान पर कैन्न्ड, या कम नमी वाले खाद्य पदार्थों को संग्रहीत किया जाता है।
- कंटेनर को एक फ्रीजर में रखें ताकि उन्हें अच्छी तरह से ठंडा किया जा सके।
- हिमीकृत नमूनों को हर समय ठोस रूप से जमे हुए स्थिति में रखें।
- प्रशीतित उत्पादों को फ्रीज न करें।
- जब कोई निर्देश नहीं दिया जाता है, तो उस प्रशीतित नमूनों का विश्लेषण 36 घंटे के पहले किया जाना चाहिए।

नमूना की तैयारी

नमूना तैयार करना उचित हिस्सों (मछली और समुद्री भोजन पर लागू) के अनुसार किया जाना चाहिए:

- **ईएन आईएसओ 6887-1**: खाद्य और पशु आहार सामग्री का सूक्ष्मजीवविज्ञान - सूक्ष्मजीवविज्ञानी जांच के लिए प्रारंभिक सस्पेंशन और डेसिमल डायल्यूशन के जांच के नमूने की तैयारी - भाग 1: प्रारंभिक सस्पेंशन और डेसिमल डायल्यूशन की तैयारी के लिए सामान्य नियम
- **आईएसओ 6887-3**: खाद्य और पशु आहार सामग्री का सूक्ष्मजीवविज्ञान - सूक्ष्मजीवविज्ञानी जांच के लिए जांच के नमूने, प्रारंभिक सस्पेंशन और डेसिमल डायल्यूशन की तैयारी - भाग 3: मछली और मत्स्य उत्पादों की तैयारी के लिए विशिष्ट नियम
- **आईएसओ 7218**: खाद्य और पशु आहार सामग्री का सूक्ष्मजीवविज्ञान- सूक्ष्मजीवविज्ञानी जांच के लिए सामान्य आवश्यकताएं और मार्गदर्शन।
- उत्पाद को संभालते समय, जीवाणुमुक्त तकनीक का उपयोग हमेशा किया जाता है।

- नमूने का संचालन या विश्लेषण करने से पहले, कार्य क्षेत्र एवं उसके आसपास के क्षेत्रों को साफ करना चाहिए।
- इसके अलावा, वाणिज्यिक रोगाणुनाशक पदार्थ से कार्य क्षेत्र को जीवाणुमुक्त किया जाना चाहिए।
- अधिमानतः, हिमीकृत नमूनों का विश्लेषण पिघलने के तुरंत बाद करना चाहिए।
- यदि आवश्यक हो, तो एक विश्लेषणात्मक हिस्से को प्राप्त करने के लिए हिमीकृत नमूने को पिघलाने के लिए, इसे मूल कंटेनर में या उस कंटेनर में पिघलना चाहिए जिसमें इसे प्रयोगशाला में प्राप्त किया गया था।
- संभव हो, नमूना को पिघलने के लिए दूसरे कंटेनर में स्थानांतरित नहीं करना चाहिए।
- समान्यत:, हिमीकृत नमूने 18 घंटे के भीतर 2-5°C पर पिघला जाता है।
- किसी भी खाद्य नमूने में विभिन्न श्रेणी की सूक्ष्मजीवों के असमान वितरण की उम्मीद की जाती है।
- अधिक समान वितरण सुनिश्चित करने के लिए, तरल नमूनों को अच्छी तरह से हिलाया जाना चाहिए और यदि संभव हो तो,सूखे नमूनों को 100 ग्राम या अधिक के नमूने से विश्लेषणात्मक इकाई को वापस लेने से पहले जीवाणुरहित चम्मच या अन्य बर्तनों का उपयोग करके अच्छे से मिलाया जाना चाहिए।
- तरल या सूखे खाद्य की 50 ग्राम का विश्लेषणात्मक इकाई का उपयोग एरोबिक प्लेट काउंट और कोलिफॉर्म के एम.पी.एन. को निर्धारित करने के लिए किया जाता है।
- विशिष्ट रूप से किए जानेवाले विश्लेषण के आधार पर अन्य विश्लेषणात्मक इकाई की मात्रा की सिफारिश की जा सकती है (जैसे, साल्मोनेला के लिए 225 ग्राम)।
- उपयोग में विधि द्वारा अनुशंसित एक विश्लेषणात्मक इकाई की मात्रा और डायल्युएंट की मात्रा का उपयोग करें।
- अगर पैकेज की सामग्री एकरूप नहीं है, तो पैकेज की संपूर्ण सामग्री को ब्लेंडर स्टोमकर से मिलाएं और जांच के उद्देश्य के आधार पर, विश्लेषणात्मक इकाई को अलग करें, या, अधिमानतः, प्रत्येक अलग-अलग खाद्य भाग का विश्लेषण करें।
- यदि पूरा नमूना आवश्यक मात्रा से कम है, तो नमूने के आधे हिस्से का वज़न करें और उसके अनुसार डायल्युएंट या ब्रोथ की मात्रा को समायोजित करें।

संदर्भ

1. खाद्य पदार्थों के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञानी मानदण्डों पर 15 नवंबर 2005 की आयोग विनियमन(ईसी) संख्या 2073/2005।
2. वालेस एच. एंड्रयूज़ और थॉमस एस. हैमैक. 2003. अध्याय 1. खाद्य नमूनाकरण और होमोजेनेट नमूना की तैयारी। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल (BAM)। यूएसएफडीए (खाद्य एवं औषधि प्रशासन)।

****

प्लेटिंग विधि द्वारा सूक्ष्मजीवों की गणना

अशीष कुमार झा

स्वच्छता, खाद्य या मत्स्य उत्पादन के साथ-साथ प्रसंस्करण प्रणाली में भी महत्वपूर्ण भूमिका निभाती है। बैक्टेरिया, वायरस, यीस्ट, मोल्ड्स आदि सूक्ष्मजीव भोजन को खराब कर सकते हैं और मानव स्वास्थ्य के लिए जोखिम पैदा कर सकते हैं। भोजन या मछली में विशिष्ट बैक्टेरिया और उनकी मात्रा की उपस्थिति को सुरक्षा के खतरों का आकलन और नियंत्रण करने के लिए एवं उनकी खराब करने की क्षमता और उत्पादों की वांछित गुणवत्ता सुनिश्चित करने के लिए निर्धारित किया जाना चाहिए।

खाद्य सूक्ष्मजीवविज्ञान में, बैक्टेरिया को खाद्य जनित विष, सडने और प्रसंस्करण के कारण उत्पन्न संक्रामक एजेंट में विभाजित किया जाता है। किसी भी खाद्य पदार्थ में बैक्टेरिया की कुल संख्या गुणवत्ता प्रबंधन की कुंजी है। बैक्टेरिया की कुल संख्या ताजगी को इंगित करती है और खाद्य पदार्थ के शेल्फ जीवन को भी निर्धारित करती है।

बैक्टेरिया की गणना के निम्नलिखित विभिन्न तरीके हैं:

1. कोशिकाओं की प्रत्यक्ष गिनती
   क) गणना चेम्बर का उपयोग करके प्रत्यक्ष गणना
   ख) फ्लूरोसेन प्रकाश का उपयोग करके प्रत्यक्ष गणना
2. अप्रत्यक्ष गिनती
   क) व्यवहार्य गणना / कुल प्लेट गणना
   ख) सबसे संभावित संख्या (एम.पी.एन.)
3. सूक्ष्मजैविक द्रव्यमान का प्रत्यक्ष माप
4. सूक्ष्मजैविक द्रव्यमान का अप्रत्यक्ष माप

अलग-अलग प्लेटिंग विधियों का उपयोग सूक्ष्मजीवों के अलगाव और गणना के लिए किया जाता है। आमतौर पर इस्तेमाल की जाने वाली प्लेटिंग विधियां इस प्रकार हैं:

1. स्ट्रीक प्लेट प्रक्रिया
2. पोर प्लेट प्रक्रिया
3. स्प्रेड प्लेट प्रक्रिया
4. नरम (सोफ्ट) अगार ओवरले प्रक्रिया
5. रेप्लिका प्लेट प्रक्रिया

एरोबिक प्लेट काउंट (एपीसी) या मानक प्लेट काउंट को कुल व्यवहार्य गणना के रूप में भी जाना जाता है, कुल मेसोफिलिक गिनती या कुल बैक्टेरिया की गिनती भोजन के सूक्ष्मजीवविज्ञानी गुणवत्ता को इंगित करने के लिए लागू सबसे आम जांच विधि में से एक है।

कुल प्लेट गणना के लिए सबसे अधिक उपयोग की जाने वाली विधियां हैं

क) स्प्रेड प्लेट विधि
ख) पोर प्लेट विधि

स्प्रेड प्लेट विधि

इस विधि का उपयोग अगार प्लेट की सतह पर फैलकर छोटी मात्रा में निहित बैक्टेरिया को अलग करने के लिए किया जाता है। जब बैक्टेरिया की उचित प्लेटिंग किया जाता है, तो समान रूप से वितरित अलग कॉलोनियों का निर्माण होता है।

उपकरण और सामग्री

- लामिनार प्रवाह / जीवाणुरहित कार्य क्षेत्र।
- माइक्रोपिपेट जिसकी क्षमता 1 मि.ली. और 10 मि.ली. है और समान क्षमता के जीवाणुरहित पिपेट टिप्स या ग्लास पिपेट
- जीवाणुरहित चाकू, फॉर्क्स, स्पैटुला, फॉर्सेप्स, कैंची, बड़े चम्मच
- मोर्टार और पेस्टेल (पीसने की सामग्री) या स्टोमकर ब्लेंडर और बैग
- डायल्यूएंट्स (बटरफील्डस फॉस्फेट-बफर्ड डायल्यूशन जल)
- जीवाणुरहित प्लेट काउंट अगार (पी.सी.ए)
- (एल-आकार) स्प्रेडर
- इनक्यूबेटर, 35±1 °C
- इलेक्ट्रॉनिक तराजु (0.1 ग्राम की संवेदनशीलता)

डायल्यूएंट की तैयारी (बटरफील्डस फॉस्फेट-बफर्ड डायल्यूशन जल)

- पोटेशियम डाइहाइड्रोजेन फॉस्फेट (KH_2PO_4): 34 ग्राम
- शुद्ध जल: 500 मि.ली.
- 1N NaOH से पी.एच. (pH) को 7.2 तक लाएं
- शुद्ध जल से1 लीटर बनाएं
- ऑटोक्लेव द्वारा 121°C पर 15 मिनट के लिए जीवाणुमुक्त करें
- फ्रिज में भंडारण करें

- उपरोक्त स्टॉक के घोल में से 1.25 मि.ली. निकालें और शुद्ध जल मिलाके उसे 1 लीटर तक बनाएं।
- इस घोल को 90 ± 1 मि.ली. की बोतल / फ्लास्क में विभाजित करें
- ऑटोक्लेव द्वारा 121°C पर 15 मिनट के लिए जीवाणुमुक्त करें

पी.सी.ए अगार प्लेट की तैयारी

- उबलते वाटरबाथ में पी.सी.ए के दो फ्लास्क को पिघलाएं और 45 - 50 °C तक ठंडा करें
- पेट्री प्लेट (10 – 12 सं (प्रत्येक पेट्री प्लेट में लगभग 15-18 मि.ली.)) में डालें
- पी.सी.ए को सेट होने के लिए छोड दें
- ऑवन में पेट्री प्लेट को 56 °C पर उल्टा रखकर या एक लामिनार प्रवाह चेम्बर में 45 मिनट के लिए सीधा रखकर अगार को सुखाएं
- प्लेटों को सामान्य तापमान पर ठंडा करें

सैम्प्लिंग और नमूने की तैयारी

- स्वच्छ तरीके से जीवाणुमुक्त नमूना प्लेट में ठीक 50 ग्राम मछली / झींगा लें।
- लिए गए नमूने को स्टोमकर बैग में स्थानांतरित करें और 450 मि.ली. जीवाणुमुक्त डायल्यूएंट (बटर्फील्ड्स फॉस्फेट–बफर्ड डायल्यूशन जल) मिलाएं और 2 मिनट के लिए स्टोमकर में ब्लेंड करें। यह डायल्यूएंट 10^{-1} कहलाएगा।
- अलग जीवाणुमुक्त पिपेट का उपयोग करके, उपर्युक्त 10^{-1} डायल्यूशन से 10 मि.ली. लेकर 90 मि.ली. जीवाणुमुक्त डायल्यूएंट में मिलाएं और अच्छी तरह से मिलाएं। इससे 10^{-2} डायल्यूएंट प्राप्त होगा।
- फिर उपरोक्त 10^{-2} डायल्यूशन से 10 मि.ली. को 90 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट में स्थानांतरित करें और अच्छी तरह से मिलाएं। इससे 10^{-3} डायल्यूएंट प्राप्त होगा।
- इसी तरह नमूने के सूक्ष्मजैविक मात्रा के आधार पर आगे के डायल्यूशन (10^{-4} और 10^{-5} आदि) तैयार करें।

विधि

डुप्लिकेट में 3 पंक्तियों में छह प्री-सेट पी.सी.ए. प्लेटों को रखें। प्लेटों को उचित रूप से चिन्हित करें (नमूने का नाम, मीडिया, डायल्यूशन और तारीख)। डुप्लिकेट में अगार प्लेट की सतह के केंद्र पर वांछित डायल्यूशन (10^{-3}, 10^{-4} और 10^{-5}) से 0.5 मि.ली. पिपेट से निकालें। अल्कहॉल में डूबा हुआ एक जीवाणुरहित एल-आकार का ग्लास स्प्रेडर लें और इसे बन्सन बर्नर पर गरम करें। स्प्रेडर को हवा में ठंडा होने दें। ठंडा करने के लिए स्प्रेडर को हिलाएं नहीं। पेट्री डिश को घुमाकर जीवाणुरहित ग्लास स्प्रेडर का उपयोग करके समान रूप से अगारकी सतह पर नमूना फैलाएं। प्लेटको 48±2 घंटे के लिए 35 °C पर इंक्युबेट करें। क्यूबेक कॉलोनी काउंटर

का उपयोग करके कॉलोनियों की संख्या की गणना करें। डुप्लिकेट प्लेटों में कॉलोनियों की संख्या 10% से अधिक नहीं होनी चाहिए।

नोट: यदि लिया गया नमूना 0.5 मि.ली. है, तो कॉलोनियों की संख्या की गणना के दौरान, कॉलोनी की औसत गणना को दोगुना करना होगा।

स्प्रेड प्लेट विधि की सीमाएँ

1) एरोब्स आसानी से विकसित होता है, जबकि माइक्रोएरोफिलिक धीमी गति से विकसित होता है।

2) कभी-कभी अधिक कॉलोनियों की उपस्थिति के कारण गिनती करना कठिन हो जाता है।

पोर प्लेट विधि

इस विधि में ब्रोथ / नमूना से इनोकुलम (आमतौर पर 1 मि.ली.) की निश्चित मात्रा को जीवाणुमुक्त पिपेट का उपयोग करके जीवाणुमुक्त पेट्री डिश के केंद्र में रखा जाता है। पिघला हुआ ठंडा अगार (45 ^{o}C पर) लगभग 15 -18 मि.ली. तब इनोकुलम से युक्त पेट्री डिश में डाला जाता है और प्लेटों को घुमाकर मीडिया को अच्छी तरह मिलाएं और जमने के लिए छोड दें। इसके बाद अगार प्लेट को 48±2 घंटे के लिए 35 ^{o}C इंक्युबेट करें।

विधि

1) डुप्लिकेट में 6 पेट्री डिश को 3 पंक्तियों में रखें एवं चिन्हित करें।
2) जीवाणुमुक्त पेट्री प्लेटों के केंद्र में वांछित डायल्यूशन (10^{-3}, 10^{-4}और 10^{-5}) के 1 मि.ली.डालें।
3) नमूने युक्त पेट्री डिश में पिघले हुए ठंडे अगार (45±1 ^{0}C) की 15-18 मि.ली. डालें।
4) पिघला हुआ अगार को डालने के बाद, ढक्कन को रखें और नमूने को अगार के साथ आगे पीछे घुमाएं ताकि मीडियम के साथ अच्छे से मिश्रित हो जाए। इसके बाद समतल सतह पर जमने के लिए रखें।
5) जमे गए पेट्रि डिशों को पलटें, और 35±2 ^{0}C पर 48±2 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।

सीमाएं

1) तुलनात्मक रूप से गर्म अगार का उपयोग संवेदनशील बैक्टेरिया को मार सकता है।

2) छोटी कॉलोनियों को अनदेखा किया जा सकता है।

3) अगार की गहराई में बाध्य एरोब्स का कम वृद्धि दर।

पूर्वोपाय

पच्चीस और दो सौ पच्चास कॉलोनियों से युक्त अगार प्लेट का चयन करें जिसमें स्प्रेडर न हो। पिनपॉइंट के आकार सहित उन सभी कॉलोनी फॉर्मिंग यूनिट्स (CFU) की गणना करें। इस्तेमाल किया गया डायल्यूशन रिकॉर्ड करें और कुल कॉलोनियों की संख्या गिन लें।

आंकड़े के पूर्णांकन

प्लेट काउंट (APC / TPC) की गणना करते समय सटीकता में किसी भी गलत धारणा से बचने के लिए, यह ध्यान में रखना अनिवार्य है कि तीसरा अंक 6,7,8 या 9 होने पर दूसरा उच्चतम अंक बढ़ाना यानि 10.6 के लिए 11 और तीसरा अंक 1, 2, 3 या 4 दूसरा उसमें कोई परिवर्तन नहीं होगा यानि 10.4 के लिए 10 डालना उचित है।

परिकलित गणना	टीपीसी / एपीसी
1,57,000	1,60,000
1,54,000	1,50,000
1,55,000	1,60,000
1,45,000	1,40,000

गणना

1. जब डुप्लिकेट प्लेट की गिनती 25-250 के दायरे में आती है
   APC/g की गणना निम्नलिखित सूत्र से की जाती है।

APC/g नमूना (N)= $\dfrac{\Sigma C}{1([Xn0.1) + (1Xn (2X(d)]}$

जहां

N = नमूना प्रति ग्राम / मि.ली. की कॉलोनी बनाने वाली इकाइयों की संख्या

ΣC = सभी प्लेटों पर सभी कॉलोनियों का योग

n_1 = पहले डायल्यूशन में प्लेटों की संख्या

n_2 = दूसरे डायल्यूशन में प्लेटों की संख्या

d = डायल्यूशन जिसमें से पहली गिनती प्राप्त की गई थी

उदाहरण

1:100	1:1000	1:10000
TNTC	220	30
TNTC	230	35

ΣC= 220+230+30+35=515; **n_1**= 2; **n_2**= 2; **d**= 1:1000 (10^{-3})

$$\frac{515}{[(1X2) + (0.1X\ 2)\ X\ (10^{-3})]} = \mathbf{2,34,090 \approx 2,30,000}$$

2. जब सभी प्लेटों की गिनती 25 सीएफयू से कम हो।

जब दोनों डायल्यूशन प्लेटें 25 सीएफयू से कम हो जाती हैं, तब प्रत्येक वास्तविक प्लेट की गिनती रिकॉर्ड करें लेकिन 25x1/d से कम की गिनती को रिकॉर्ड करें जहां डी-डायल्यूशन फैक्टर है जहां से पहली गिनती प्राप्त की गई थी।

उदाहरण

1:100	1:1000	अनुमानित एरोबिक प्लेट गिनती(EAPC)
12	4	**<250**
16	2	

3. **जब सभी प्लेटों की गिनती 250 सीएफयू से अधिक हो।**

जब सभी डायल्यूशन की प्लेटों में 250 सीएफयू से अधिक (लेकिन 100 / से.मी.^{2} से कम) का उत्पादन होता है, तो प्लेट की गिनती (EAPC) को 250 के करीब से अनुमानित किया जाना चाहिए और डायल्यूशन से गुणा करना चाहिए।

उदाहरण

1:100	1:1000	1:10000	अनुमानित एरोबिक प्लेट गिनती (EAPC)
TNTC	700	290	**280,0000**
TNTC	650	280	

4. **जब सभी प्लेटें स्प्रेडर से युक्त हो तो इसे एसपीआर के रूप में सूचित करना चाहिए।**

5. **जब सभी प्लेटें 100 प्रति वर्ग से.मी या अधिक सीएफयू के औसत के साथ हो।**

जब सभी प्लेटों में 100 सीएफयू/ से.मी.^{2} कॉलनियां होता है तब उनकी गिनती सबसे अधिक डायल्यूशन प्लेट के क्षेत्र की 100 गुना अधिक माना जाता है।

उदाहरण: प्रति से.मी.^{2} 120 कॉलोनी की औसत संख्या दिखाने वाले प्लेट्स

1:100	1:1000	अनुमानित एरोबिक प्लेट गिनती (EAPC)
TNTC	7800[(a)]	>6500000
TNTC	7080[(b)]	>5900000

[a] 65 से.मी.^{2} के प्लेट क्षेत्र के आधार पर;[b] 59 से.मी.^{2} के प्लेट क्षेत्र के आधार पर

****

समुद्री खाद्य से *एस्चेरिचिया कोलाई,* कुल एंटरोबैक्टेरियेसिये और फैकल स्ट्रेप्टोकोकाई की अलगाव और पहचान

अनुपमा टी. के

1. *एस्चेरिचिया कोलाई*

एस्चेरिचिया कोलाई, जिसे मूल रूप से बैक्टेरिया*कोलाई* समूह के रूप में जाना जाता है, जो 1885 में जर्मन बाल रोग विशेषज्ञ -थियोडोर एस्चेरिच द्वारा पहचाना गया था। ई. *कोलाई* मुख्यत: मनुष्यों और गर्म रक्त वाले पशुओं की आंत में पाया जाता है। यह *एंटरोबैक्टेरिया* परिवार का एक सदस्य है, जिसमें कई ज्ञात रोगजनक जैसे *साल्मोनेला, शिगेला और यर्सिनिया* शामिल हैं। ई. *कोलाई* के अधिकांश उपभेदों को रोगजनकों के रूप में नहीं माना जाता है; वे अवसरवादी रोगज़नक़ हो सकते हैं जो इम्यूनोकॉम्प्रोमाइज़ किए गए परपोषी में संक्रमण का कारण बनते हैं। ई. *कोलाई* के रोगजनक उपभेद भी हैं जो जब अंतर्ग्रहण किए जाने पर स्वस्थ मनुष्यों में गैस्ट्रोइंटेस्टाइनल बीमारी का कारण बनते हैं। ई. *कोलाई* मानव और पशु मल में प्रचुर मात्रा में होता है और खासतौर पर अन्य जगहों में नहीं पाया जाता है। इसलिए, भोजन में ई. *कोलाई* की उपस्थिति को मल संदूषण का सूचक माना जाता है।

क) झींगा / मछली के नमूने के डायल्यूशन की तैयारी

- एक लामिनार चेम्बर में बंसन बर्नर के लौ के पास 25 ग्राम मछली / झींगा को छोटे छोटे टुकडों में जीवाणुमुक्त नमूना डिश में रखें।
- एक स्टोमकर बैग में 25 ग्राम के नमूने को स्थानांतरित करें और एक स्टोमकर ब्लेंडर का उपयोग करके 225 मि.ली.जीवाणुरहित डायल्युएंट (बटरफील्डस फॉस्फेट-बफर डायल्यूशन जल) के साथ मिश्रित करें। यह सामग्री 1:10 डायल्यूशन कहलाएगी।
- अलग-अलग जीवाणुरहित पिपेट का उपयोग करके, पिछले डायल्यूशन के 1 मि.ली. को 9 मि.ली. डायल्यूएंट में स्थानांतरित करके उचित रूप से खाद्यमिश्रण के 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} और अन्य के दशमलव डायल्यूशन को तैयार करें।

ख) *ई.कोलाई* के लिए प्रकल्पित जांच

चरण 1:

इस्तेमाल किए जानेवाला मीडिया: टर्गिटोल -7 अगार

- वॉटर बाथ फ्लास्क में एक 100 मि.ली. टर्गिटोल -7 अगार (टी -7) को पिघलाएं और 50 ºC तक ठंडा करें।
- टी-7 अगार में जीवाणुरहित 1% (2,3,5 - ट्राइफीनाईल टेट्राजोलियम क्लोराइड (टीटीसी) घोल के 0.3 मि.ली. मिलाएं।
- जीवाणुरहित पेट्री डिश (प्रत्येक में 15-20 मि.ली.) में डालें और सेट होने के लिए छोड दें।

- पेट्री डिश को 45 मिनट के लिए 56 ºC पर सुखाएं और सामान्य तापमान पर ठंडा करें।
- अलग-अलग स्थानों पर टी-7अगार की सतह पर वांछित डायल्यूशन में से प्रत्येक में 0.5 मि.ली. डालें।
- एक जीवाणुरहित बेंट ग्लास रॉड का उपयोग करके अगार की सतह पर फैलाएं।
- प्लेट को 18 - 24 घंटे के लिए 37 ºC पर इंक्युबेट करें।
- टी-7 प्लेटों पर ई. *कोलाई* की विशिष्ट कॉलोनियां निम्बू के पीले रंग के रूप में दिखाई देती हैं, जहां कभी-कभी जंग के भूरे रंग के केंद्र और चारों ओर एक पीले क्षेत्र के साथ दिखाई देती हैं (टिप्पणी: पीली, उभरी हुई या उत्तल कॉलनियां को ई.*कोलाई* कालोनियों के रूप में नहीं माना जाता है)। डुप्लिकेट प्लेटों का औसत लें।

गणना

ई.*कोलाई*/ग्राम = औसत गिनती x डायल्यूशन कारक x 2

चरण 2: *ई.कोलाई* की पुष्टिकरण जांच

ई.*कोलाई* पुष्टि के लिए, निम्नलिखित प्रक्रिया का पालन करना होगा

1. ईओसिन-मिथाइलीन ब्लू (ईएमबी) अगार पर स्ट्रीक करें

- ई.एम.बी अगार की एक 100 मि.ली. फ्लास्क को पिघलाएं, 50 ºC तक ठंडा करें, जीवाणुरहित पेट्री डिश में डालें और 45 मिनट के लिए 56 ºC पर सूखने दें। सामान्य तापमान तक ठंडा करें।
- एक जीवाणुरहित लूप से टी-7 प्लेटों से ठीक पीले रंग की कॉलोनियों को उठाएं और स्ट्रीक डायल्यूशन की विधि द्वारा ई.एम.बी प्लेटों पर स्ट्रीक करें; 18-24 घंटे के लिए 35°C ± 0.5°Cपर इंक्युबेट करें।
- ई.एम.बी अगार पर कॉलोनियां2-3 मि.मी. व्यास की परावर्तित प्रकाश में हरे रंग की धात्विक चमक और प्रेषित प्रकाश में केंद्र मेंबैंगनी रंग दिखाई देती हैं।
- प्रत्येक ई.एम.बी प्लेट से 5 संदिग्ध कॉलोनियों को चुनें और पी.सी.ए स्लांट पर स्ट्रीक करें और 18-24 घंटे के लिए 35 °C ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें।

1. <u>IMViC जांच</u>

उपयुक्त पी.सी.ए स्लांट से, निम्नलिखित मीडिया में इनोकुलेट करें:

क) ट्रिप्टोन ब्रोथ: संवर्धन को ट्रिप्टोन ब्रोथ में इनोकुलेट करें और 35 °C ± 0.5 °C पर 24±2 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।

ख) एमआर-वीपी मीडियम: प्रत्येक संवर्धन को एमआर-वीपी मीडियम की 2 ट्यूबों में इनोकुलेट करें और 48 ± 2 घंटे के लिए 35 °C± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें।

ग) साइमंस सिट्रेट अगार : साइमंस सिट्रेट अगार स्लांट में संवर्धन को स्ट्रीक करें और इन्हें भी 48-96 घंटे के लिए 35 °C ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें।

परिणाम

क) ट्रिप्टॉन ब्रोथ

कोवैक्स इंडोल अभिकर्मक के 0.2-0.3मि.ली.डालकर इंडोल उत्पादन की जांच करें। ऊपरी सतह पर एक लाल या गुलाबी रंग की उत्पत्ति पोज़िटीव जांच को इंगित करती है। इंडोल कोवैक्स अभिकर्मक के पेरा-डायमिथाइल एमिनो बेन्ज़ेल्डिहाइड के साथ प्रतिक्रिया करके एक लाल रंग बनाता है।

ख) एमआर-वीपी मीडियम

एमआर जांच: एक ट्यूब में, मिथाइल रेड संकेतक की 5 बूंदें डालें। एक लाल रंग पोज़िटीव एमआर जांच को इंगित करता है। ई. *कोलाई* एसिड का उत्पादन करने के लिए ग्लूकोज़ का किण्वन करता है, जो मीडियम के पी.एच. को 4.4 से कम करता है जो कि मिथाइल रेड संकेतक के लाल रंग से इंगित करता है। यदि रंग नारंगी है, तो पी.एच. 5.0 - 5.8 है और यदि पीला है, तो पी.एच. 6.0 से अधिक है।

वीपी जांच: इस जांच में दूसरी ट्यूब से संवर्धन के 1 मि.ली. का उपयोग करके, α-naphthol घोल के 0.6 मि.ली. और 40% KOH के 0.2 मि.ली. मिलाकर करते हैं। क्रिएटिन के कुछ क्रिस्टल मिलाएं। अच्छी तरह से हिलाएं और इसे 2 घंटे के लिए छोड दें। ईओसिन गुलाबी रंग पोज़िटीव परिणाम को इंगित करता है।

4. **साइमंससिट्रेट अगार:** मीडियम के रंग में हरे से नीले रंग में परिवर्तन होना बैक्टीरियल संवर्धन द्वारा सिट्रेट के उपयोग के लिए एक पोज़िटीव परिणाम देता है। ई.*कोलाई* सिट्रेट का उपयोग नहीं करता हैं और इसलिए एक निगटीव प्रतिक्रिया देता हैं।

निम्नलिखित परिणाम देने वाली संवर्धन की पुष्टि ई.*कोलाई* के रूप में की जाती है

इंडोल	पोज़िटीव
मिथाइल रेड	पोज़िटीव
वीपी	निगटीव
सिट्रेट	निगटीव

IMViC: + + - -

2. कुल *एंटरोबैक्टेरियेसिये* गणना

एंटरोबैक्टेरियेसिये, जिसमें *क्लेबसिएला, साल्मोनेला, शिगेला और ई.कोलाई* शामिल हैं, बाहरी संदूषक हैं, जो जानवरों, पक्षियों और मनुष्यों के संदूषण के परिणाम स्वरूप उत्पादों पर होते हैं। वे महीनों तक उत्पादों और प्रसंस्करण क्षेत्रों में लंबे समय तक भी जीवित रह सकते हैं। प्रमुख संदूषण मार्ग मछली, बर्तन और उपकरणों के अस्वास्थ्य संचालन या पानी या बर्फ जैसे जल पर्यावरण से होते हैं।*एंटरोबैक्टेरियेसिये* संदूषण के नियंत्रण में खाद्य संचालकों के लिए स्वच्छता के प्रति जागरूकता के साथ अच्छा स्वच्छंद व्यवहार और उपकरणों का रखरखाव अति आवश्यक है।

विधि

इस्तेमाल किए जानेवाला मीडिया: वायलेट रेड बाइल ग्लूकोज़ अगार (VRBGA)

- प्राप्त नमूने से मछली / झींगा का 25 ग्राम को जीवाणुमुक्त तरीके से काट कर स्टोमकर या मोर्टार और पेस्टिल में 225 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट (बटरफिल्ड फॉस्फेट-बफर पतला पानी) के साथ मिलाएं। आवश्यकतानुसार अनुक्रमिक डायल्यूशन बनाएं। इसमें पोर प्लेट विधि का पालन किया जाता है।
- जीवाणुरहित पेट्री प्लेटों पर 10^{-2} और 10^{-3} डायल्यूशन में से 1 मि.ली. को डालें और 18-20 मि.ली. पिघला हुआ वीआरबीजीए (VRBGA) डालें एवं सेट होने के लिए छोड दें।
- प्लेटों को 18 - 24 घंटे के लिए 37 ºC पर उल्टा करके इनक्यूबेट करें।
- *एंटरोबैक्टेरियेसिये* कॉलोनियों के रूप में लाल, छोटे (2 - 4 मि.मी. व्यास) कॉलोनियों की गणना करें। डुप्लिकेट प्लेटों की औसत गिनती लें।
  - **कुल एंटरोबैक्टेरियेसिये गणना / ग्राम = औसत गिनती X डायल्यूशन कारक**

3. *फीकल स्ट्रेप्टोकोकाई* (Faecal *Streptococci*)

फीकल स्ट्रेप्टोकोकाई को मल संदूषण का संकेतक माना जाता है।

विधि

मीडिया: केनर फीकल स्ट्रेप्टोकोकस अगार (KF)

- प्राप्त मछली / झींगा नमूने से 25 ग्राम को जीवाणुमुक्त तरीके से काट कर स्टोमकर या मोर्टार और पेस्टिल में 225 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट(बटरफिल्ड फॉस्फेट बफर) के साथ मिलाएं। आवश्यकतानुसार अनुक्रमिक डायल्यूशन बनाएं। पोर प्लेट विधि का पालन किया जाता है।
- जीवाणुरहित पेट्री प्लेटों पर 10^{-2} और 10^{-3} डायल्यूशन में से 1 मि.ली. को डालें और पिघले हुए के.एफ.के 18 - 20 मि.ली.डालें। (नोट: पिघले हुए के.एफ.को 45 ºC तक ठंडा करने के बाद, प्लेटिंग से पहले 100 मि.ली. मीडियम में 1 मि.ली. का ट्राइफिनाइल टेट्राज़ोलियम क्लोराइड (TTC) (0.1%) मिलाएं)।
- प्लेटों को सेट होने के बाद 36 - 48 घंटे के लिए 37 ºC पर इनक्यूबेट करें।
- फीकल स्ट्रेप्टोकोकाई के रूप में सभी सतही और उप-सतही लाल से गुलाबी कॉलोनियों की गणना करें (इसमें कुछ सफेद मार्जिन के साथ भी उपस्थित हो सकती हैं) ।

फीकल स्ट्रेप्टोकोकाई (Faecal *Streptococci*) गणना/ग्राम= औसत गिनती X डायल्यूशन कारक

यदि कुल प्लेट की गणना, जैसे *ई.कोलाई*, कुल *एंटरोबैक्टेरियेसिये* और फैकल स्ट्रेप्टोकोकाई (Faecal *Streptococci*) की गिनती एक ही नमूने से करनी है, तो केवल एक ही डायल्यूशन बनाएं।

समुद्री खाद्य से कोलीफॉर्म और *ई.कोलाई* के अलगाव और पहचान के लिए एम.पी.एन विधि

- ब्लेंडर जार में 50 ग्राम मछली लें।
- जमे हुए नमूनों को 2 - 5 °C पर <18 घंटे के लिए भंडारण करके नरम किया जा सकता है, लेकिन पिघलना नहीं है।
- बटरफील्ड्स फॉस्फेट-बफर जल के 450 मिलीलीटर मिलाके **2** मिनट तक मिश्रण करें।
- बटरफील्ड्स फॉस्फेट डायल्यूएंट से दशमलव डायल्यूशन तैयार करें
- कम से कम **3** लगातार डायल्यूशन का उपयोग करते हुए, 3 ट्यूब एम.पी.एन विश्लेषण के लिए **3** एल.एस.टी. (लॉरिल ट्रिप्टोस ब्रोथ) ट्यूबों में **1** मिलीलीटर एलिक्स्वोट्स इनोकुलेट करें। लैक्टोज ब्रोथ (LB) का उपयोग भी किया जा सकता है।

चरण 1: एम.पी.एन. - कोलीफॉर्म के लिए प्रकल्पित जांच

- तीन ट्यूब एम.पी.एन. विश्लेषण के लिए प्रत्येक डायल्यूशन से 1 मि.ली. एलिक्वोट को 3 एल.एस.टी. ट्यूब में इनोकुलेट करें
- एल.एस.टी. ट्यूबों को 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें
- गैस के लिए ट्यूब और रिकॉर्ड प्रतिक्रियाओं को 24 ± 2 घंटों में जांच करें,
- निगटीव ट्यूबों को अगले 24 घंटे तक पुन: इंक्युबेट करें एवं जांच करके प्रतिक्रियाओं को पुन: रिकोर्ड करें
- सभी प्रकल्पित सकारात्मक (गैस) ट्यूब पर पुष्टि जांच करें।

चरण 2: एम.पी.एन. - कॉलिफॉर्म के लिए पुष्टि जांच

- लूप भर एल.एस.टी सस्पेंशन या लैक्टोस ब्रोथ को बी.एल.जी.बी (ब्रिल्यंट ग्रीन लैक्टोस बाईल ब्रोथ 2%) ब्रोथ में स्थानांतरित करें (स्थानांतरण के लिए जीवाणुमुक्त लकडी के एप्लिकेटर स्टिक का उपयोग किया जा सकता है)
- बी.जी.एल.बी ट्यूबों को 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें और गैस उत्पादन के लिए 48 ± 3 घंटे पर जांच करें
- निम्नलिखित एम.पी.एन. सारणी से 3 डायल्यूशन के लिए पुष्टीकृत एल.एस.टी. ट्यूब के अनुपात के आधार पर कॉलिफ़ॉर्म की संभावित संख्या (एम.पी.एन.) की गणना करें।

चरण 3 एम.पी.एन. - फीकल कोलिफॉर्म्स एवं *ई.कोलाई* के लिए पुष्टीकृत जांच

- प्रत्येक पोज़िटीव एल.एस.टी. या लैक्टोज ब्रोथ ट्यूब में, लूपभर ई.सी. ब्रोथ को स्थानांतरित करें (स्थानांतरण के लिए जीवाणुमुक्त लकडी के एप्लिकेटर स्टिक का उपयोग किया जा सकता है) ।

- ई.सी. ट्यूब्स को 24 ± 2 घंटों के लिए 44.5 °C पर इंक्युबेट करें और गैस उत्पादन के लिए जांच करें
- अगर निगटीव है तो पुन: इंक्युबेट करें और 48 ± 2 घंटों के लिए जांच करें
- यह परिणाम फीकल कॉलिफॉर्म की गणना के लिए प्रयुक्त करें

चरण 4 एम.पी.एन. - *ई.कोलाई* के लिए संपूर्ण जांच

- ई.कोलाई के संपूर्ण जांच हेतु, गैस उत्पादित ई.सी. ट्यूब को धीरे से हिलाएं, लूप भर ब्रोथ को निकालें और अलगाव के लिए एल.ई.एम.बी (लेवाइन इओसिन मीथाईलीन ब्लू) अगार प्लेट पर स्ट्रीक करें
- इसे 18 – 24 घंटे के लिए 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें
- संदिग्ध ई. कोलाई कॉलोनियों के लिए प्लेटों की जांच करें, यानी धात्विक चमक के साथ या बिना और काले रंग का मध्य भाग एवं चपटा रूप
- प्रत्येक एल.ई.एम.बी. प्लेट से पी.सी.ए. (प्लेट काउंट अगार) में 5 सदिग्ध कॉलोनियों को स्थनांतरित करें और उसे 18 – 24 घंटे के लिए 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें और आगे के जांच के लिए उपयोग करें

चरण 5 – *ई. कोलाई* के लिए IMViC जांच के अनुसार पुष्टीकरण जांच

सारणी : 95% कॉन्फिडेंस इंटेर्वेल पर 0.1, 0.01 एवं 0.001 ग्राम इनोकुला से युक्त 3 ट्यूब एम.पी.एन

पॉज़िटीव ट्यूब्स				पॉज़िटीव ट्यूब्स			
0.10	0.01	0.001	एम.पी.एन. प्रति ग्रा	0.10	0.01	0.001	एम.पी.एन. प्रति ग्रा
0	0	0	< >	2	2	0	21
0	0	1	3.0	2	2	1	28
0	1	0	3.0	2	2	2	35
0	1	1	6.1	2	3	0	29
0	2	0	6.2	2	3	1	36
0	3	0	9.4	3	0	0	23
1	0	0	3.6	3	0	1	38
1	0	1	7.2	3	0	2	64
1	0	2	11	3	1	0	43
1	1	0	7.4	3	1	1	75
1	1	1	11	3	1	2	120
1	2	0	11	3	1	3	160

1	**2**	**1**	**15**	**3**	**2**	**0**	**93**
1	**3**	**0**	**16**	**3**	**2**	**1**	**150**
2	**0**	**0**	**9.2**	**3**	**2**	**2**	**210**
2	**0**	**1**	**14**	**3**	**2**	**3**	**290**
2	**0**	**2**	**20**	**3**	**3**	**0**	**240**
2	**1**	**0**	**15**	**3**	**3**	**1**	**460**
2	**1**	**1**	**20**	**3**	**3**	**2**	**1100**
2	**1**	**2**	**27**	**3**	**3**	**3**	**>1100**

संदर्भ

1. फेंग, पी., वीअगंट, एस डी., ग्रांट, एम. ए .और बुर्कहार्ट, डब्ल्यू. (2002)। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 4, यूएसएफडीए।
2. सुरेंद्रन, पी.के., तम्पुरान, एन., नांबियार, वी. एन., ललिता, के.वी. और जोसेफ, टी. सी., 2013, समुद्री भोजन की सूक्ष्मजीवविज्ञानी परीक्षा के लिए प्रयोगशाला तकनीक। चौथा संस्करण, केंद्रीय मात्स्यिकी प्रौद्योगिकी संस्थान, कोचीन -682029, भारत। 48 पृ.
3. फेंग, पी., वीअग्रेट, एस डी., ग्रांट, एम. ए., बुर्कहार्ट, डब्ल्यू., शेलफिश, एम., और वॉटर, बी (**2018**)। बी.ए.एम.: एस्चेरिचिया कोलाई और कोलिफॉर्म बैक्टेरिया की गणना (अध्याय **4**)। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल। **2018**।

****

पानी में कोलिफॉर्म की संभावित संख्या (एम.पी.एन.) होने की गणना विधि

अनुपमा टी. के

यह एक सांख्यिकीय विधि है, जिसके द्वारा पानी में उपस्थित कोलिफॉर्म की संख्या को दर्शाता है; जिसमें अनुमानित संख्या, इनका पुष्टिकरण और पूर्णावस्था जैसे बहु-चरणों में परखा जाता हैं। इस जांच में, एक नमूने के अनुक्रमिक डायल्यूशन को ब्रोथ मीडिया में डाला जाता है। गैस पोज़िटीव (लैक्टोज के किण्वन) ट्यूबों की संख्या को गिना जाता है, जिसमें से जांच के अन्य 2 चरण किए जाते हैं और फिर उपस्थित जीवों की संख्या का अनुमान लगाने के लिए एक सांख्यिकीय सारणी से मिलान करने के लिए पोज़िटीव परिणामों के संयोजन का उपयोग किया जाता है। आमतौर पर, कोलिफॉर्म और फीकल कोलिफॉर्म विश्लेषण में केवल पहले 2 चरण ही किए जाते हैं, लेकिन ई.*कोलाई* का पता लगाने के लिए तीसरा चरण भी किए जाते हैं। इस 3-ट्यूब एम.पी.एन. जांच का उपयोग अधिकांश खाद्य पदार्थों के जांच के लिए किया जाता है जबकि 5-ट्यूब एम.पी.एन का उपयोग पानी, शेलफिश (झींगा, केंकडा आदि) और इनके फसल के लिए प्रयुक्त जल की जांच के लिए किया जाता है।

5 ट्यूब एम.पी.एन. विधि

चरण 1: कुल कोलिफॉर्म के लिए अनुमानित जांच

आवश्यक मीडिया:

क) द्विशक्ति (Double Strength) मैककोंकी ब्रोथ -1 फ्लास्क - 50 मि.ली.; फ्लास्क में डरहम्स ट्यूब को उल्टा रखें

ख) द्विशक्ति मैककोंकी ब्रोथ - 5 ट्यूब - 10 मि.ली.; प्रत्येक ट्यूब में डरहम्स ट्यूब को उल्टा रखें

ग) सामान्य मैककोंकी ब्रोथ -10 ट्यूब -10 मि.ली.; प्रत्येक ट्यूब में डरहम्स ट्यूब को उल्टा रखें

घ) सभी को अच्छी तरह से चिन्हित करके 121^{o}C ऑटोक्लेव करें

विधि:

- विश्लेषण के लिए पानी के नमूनों को जीवाणुमुक्त विधि से एकत्र करें।
- पच्चास मि.ली. द्विशक्ति मैककोंकी ब्रोथ वाले फ्लास्क में 50 मि.ली. पानी के नमूने को स्थानांतरित करें; द्विशक्ति मैककोंकी ब्रोथ के 5 ट्यूबों में 10 मि.ली. पानी का नमूना डालें; सामान्य मैककोंकी ब्रोथ के 5 ट्यूबों में प्रत्येक में 1 मि.ली. पानी डालें। जीवाणुमुक्त डायल्यूएंट के 9 मि.ली. पानी में 1 मि.ली. पानी डालकर पानी के नमूने का एक क्रमिक डायल्यूशन बनाएं और पहली डायल्यूशन (मूल नमूने के 0.1 मि.ली. के बराबर) के 1 मि.ली. को सामान्य मैककोंकी ब्रोथ के अगले पाँच ट्यूबों में मिलाएं।
- उचित रूप से चिन्हित करें। फ्लास्क और ट्यूबों को 35±2 ^{o}C पर इंक्युबेट करें।
- वृद्धि और गैस के गठन के लिए 24±2 घंटे के बाद ट्यूबों की जांच करें। यदि ट्यूब 24 घंटे में निगटिव हैं, तो अगले 24 घंटों के लिए ट्यूब को फिर से इंक्युबेट करें और गैस के लिए फिर से जांच करें। यदि एसिड (पीला

रंग) और गैस उत्पादन (डरहम्स ट्यूब में बुलबुले) को देखा जाता है, तो प्रतिक्रिया पोज़िटीव के रूप में नोट की जाती है।

- प्रत्येक सेट के 50 मि.लि., 10 मि.लि. और 1 मि.लि.और 0.1 मि.ली. ट्यूबों में आए हुए पोज़िटीव की संख्या को नोट करें।
- मानक 5 ट्यूब एम.पी.एन. सारणी के साथ परिणामों की तुलना करें और सभी पोज़िटीव ट्यूबों की पुष्टि के लिए जांच करें।

चरण II: कोलिफॉर्म के लिए पुष्टिकृत जांच

आवश्यक मीडिया: प्रत्येक टेस्ट ट्यूब में 5 मि.ली. ब्रिलियंट ग्रीन लैक्टोज बाईल ब्रोथ (बी.जी.एल.बी.2%); प्रत्येक ट्यूब में डरहम्स ट्यूब को उल्टा रखें

- ➢ मैककोंकी ब्रोथ के पोज़िटीव ट्यूबों से बिना झिल्ली को लिए हुए लूपभर सस्पेंशन को बी.जी.एल.बी. ब्रोथ की ट्यूब में स्थानांतरित करें। (इन हस्थातरणों के लिए एक जीवाणुमुक्त लकड़ी के एप्लिकेटर स्टिक का भी उपयोग किया जा सकता है)।
- ➢ बी.जी.एल.बी. ट्यूब को 35 °C पर इंक्युबेट करें और 48±3 घंटे के बाद गैस की जांच करें।
- ➢ प्रत्येक सेट के 50 मि.लि., 10 मि.लि. और 1 मि.लि. और 0.1 मि.ली. ट्यूबों में आए हुए पोज़िटीव की संख्या को नोट करें।
- ➢ संभावित संख्या (एम.पी.एन.) के लिए 5 ट्यूब एम.पी.एन. सारणी से कोलिफॉर्म की गणना करें। इसे प्रति 100 मि.लि. एम.पी.एन. कॉलिफॉर्म्स के रूप में व्यक्त करें।

चरण III: फीकल कोलिफॉर्म के लिए पुष्टिकृत जांच

आवश्यक मीडिया: ई.सी.ब्रोथ, 5 मि.ली. प्रत्येक टेस्ट ट्यूब में; प्रत्येक ट्यूब में डरहम्स ट्यूब को उल्टा रखें।

- ➢ प्रत्येक पोज़िटीव बी.जी.एल.बी.ट्यूबों में से ई.सी. ब्रोथ में लूपभर सस्पेंशन को स्थानांतरित करें। उचित रूप से चिन्हित करें।
- ➢ सभी ई.सी. ट्यूब को 44.5 °C पर 24±2 घंटे के लिए इंक्युबेट करें और गैस उत्पादन के लिए जांच करें।
- ➢ प्रत्येक सेट के 50 मि.लि., 10 मि.लि. और 1 मि.लि.और 0.1 मि.ली. ट्यूबों में आए हुए पोज़िटीव की संख्या को नोट करें।
- ➢ फीकल कोलिफॉर्म एम.पी.एन. की गणना करने के लिए इस जांच के परिणामों का उपयोग करें और परिणाम को 100 मि.ली. प्रति फीकल कोलिफॉर्म एम.पी.एन. के रूप में व्यक्त करें।

नोट: खाद्यजांच के लिए 45.5 °C पर फैकल कोलिफॉर्म विश्लेषण किया जाता है; पानी, शेलफिश और शेलफिश फसल के पानी के विश्लेषण के लिए 44.5 °C का उपयोग करते हैं।

चरण IV: *ई.कोलाई* होने की अंतिम जांच

आवश्यक मीडिया:

क) इओसिन-मिथैलिन ब्लू (EMB) अगार

ख) ट्रिपटोन (ट्रिप्टोफैन) ब्रोथ

ग) एमआर-वीपी ब्रोथ

घ) कोसेर्स सिट्रेटब्रोथ/ साइम्मंस सिट्रेट अगार

ङ) प्लेट काउंट अगार (पी.सी.ए)

विधि:

- ई.एम.बी.अगार के 100 मि.ली. पिघलाकर 45 – 50 °C तक ठंडा करें, पेट्री डिश में डालें और सेट होने दें, प्लेटों को 45मिनट के लिए 56 °C पर सुखाएं और सामान्य तापमान तक ठंडा करें।
- ई.एम.बी. अगार प्लेट पर ईसी ब्रोथ की पोज़िटीव ट्यूबों से लूपभर संवर्धन को स्ट्रीक करें और 18 - 24 घंटे के लिए 35 °C ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें।
- *ई.कोलाई* की संदिग्ध कॉलोनियां धात्विक चमक से युक्त काले रंग का मध्य भाग एवं चपटा रूप में होता है। प्रत्येक ई.एम.बी. प्लेट से 5 संदिग्ध कॉलोनियों को पी.सी.ए स्लांट्स में स्थानांतरित करें एवं 35 °C ± 0.5 °C पर 18-24 घंटे के लिए उन्हें इंक्युबेट करें और आगे के जांच के लिए उपयोग करें।

चरण V: इम्विक (IMViC) जांच

क) इंडोल उत्पादन: ट्रिप्टोइन ब्रोथ में संदिग्ध *ई.कोलाई* को इंनोकुलेट करें और 35 °C ±0.5°C पर 48±2 घंटे इंक्युबेट करें। इसमें 0.2 - 0.3 मि.ली. कोवैक्स अभिकर्मक को मिलाकर इंडोल की उपस्थिति के लिए जांच करें। ऊपरी परत में अलग लाल रंग की उपस्थिति पोज़िटीव जांच है।

ख) वोगस प्रोस्कौर (VP) जांच: एमआर-वीपी ब्रोथ में संदिग्ध *ई.कोलाई* को इनोकुलेट करें और 35 °C ± 0.5 °C पर 48±2 घंटे इंक्युबेट करें। 1 मि.ली. इनक्यूबेट के हुए संवर्धन को 13 × 100 मि.मी. ट्यूब में स्थानांतरित करें। 0.6 मि.लि.α-naphthol का घोल (Reagent) एवं 0.2 मि.ली. 40% KOH डालें और अच्छे से हिलाएं। क्रिएटिन के कुछ क्रिस्टल मिलाएं। हिलाएं और 2 घंटे के लिए छोड दें। इओसिन गुलाबी रंग विकसित होने पर जांच को पोज़िटीव व्यक्त करें।

ग) मिथाइल रेड जांच: संदिग्ध *ई.कोलाई* को एमआर-वीपी ब्रोथ में डालें और 48±2 घंटे 35 °C± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें। प्रत्येक ट्यूब में मिथाइल रेड संकेतक की 5 बूंद डालें। विशिष्ट लाल रंग पोज़िटीव जांच व्यक्त करते है। पीला निगटिव प्रतिक्रिया है।

घ) साइम्मंस सिट्रेट अगार: सिट्रेट अगार स्लांट में संवर्धन की थोड़ी सी मात्रा को स्ट्रीक करें और 48 - 96 घंटे के लिए 37 °C पर इंक्युबेट करें। वृद्धि कोहरे से नीले रंग के माध्यम के रंग में परिवर्तन से इंगित किया जाता है। *ई.कोलाई* सिट्रेट का उपयोग नहीं करते हैं और इसलिए निगटिव प्रतिक्रिया देते हैं।

व्याख्या: ++-- के IMViC परीक्षणों को *ई.कोलाई* माना जाता है।

पांच ट्यूब एम.पी.एन. सारणी से *ई.कोलाई* के एम.पी.एन. की गणना करें और प्रति 100 मि.ली. *ई.कोलाई* एम.पी.एन.के रूप में परिणाम व्यक्त करें।

सारणी: पानी के नमूनों के लिए 5 ट्यूब एम.पी.एन. सारणी

पोज़िटीव प्रतिक्रिया देने वाली ट्यूब्स की संख्या			एम.पी.एन. प्रति 100 मि.ली. पानी
50 मि.ली. का 1 में से	10 मि.ली. का 5 में से	1 मि.ली. का 5 में से	
0	0	0	<1
0	0	1	1
0	0	2	2
0	1	0	1
0	1	1	2
0	1	2	3
0	2	0	2
0	2	1	3
0	2	2	4
0	3	0	3
0	3	1	5
0	4	0	5
1	0	0	1
1	0	1	3
1	0	2	4
1	0	3	6
1	1	0	3
1	1	1	5
1	1	2	7
1	1	3	9
1	2	0	5
1	2	1	7
1	2	2	10
1	2	3	12
1	3	0	8
1	3	1	11
1	3	2	14
1	3	3	18
1	3	4	21
1	4	0	13
1	4	1	17
1	4	2	22
1	4	3	28
1	4	4	35

1	4	5	43
1	5	0	24
1	5	1	35
1	5	2	54
1	5	3	92
1	5	4	161
1	5	5	>180

सारणी: पानी के नमूनों के लिए 5 ट्यूब एम.पी.एन. सारणी

पोज़िटीव प्रतिक्रिया देने वाली ट्यूब्स की संख्या			एम.पी.एन. प्रति 100 मि.ली. पानी
10 मि.ली. का 5 में से	1 मि.ली. का 5 में से	0.1 मि.ली. का 5 में से	
0	0	0	0
0	0	1	2
0	0	2	4
0	1	0	2
0	1	1	4
0	1	2	6
0	2	0	4
0	2	1	6
0	3	0	6
1	0	0	2
1	0	1	4
1	0	2	6
1	0	3	8
1	1	0	4
1	1	1	6
1	1	2	8
1	2	0	6
1	2	1	8
1	2	2	10
1	3	0	8
1	3	1	10
1	4	0	11
2	0	0	5
2	0	1	7
2	0	2	9
2	0	3	12
2	1	0	7
2	1	1	9
2	1	2	12
2	2	0	9

2	**2**	**1**	**12**
2	**2**	**2**	**14**
2	**3**	**0**	**12**
2	**3**	**1**	**14**
2	**4**	**0**	**15**
3	**0**	**0**	**8**
3	**0**	**1**	**11**
3	**0**	**2**	**13**
3	**1**	**0**	**11**
3	**1**	**1**	**14**
3	**1**	**2**	**17**
3	**1**	**3**	**20**
3	**2**	**0**	**14**
3	**2**	**1**	**17**
3	**2**	**2**	**20**
3	**3**	**0**	**17**
3	**3**	**1**	**20**
3	**4**	**0**	**20**
3	**4**	**1**	**25**
3	**5**	**0**	**25**
4	**0**	**0**	**13**
4	**0**	**1**	**17**
4	**0**	**2**	**20**
4	**0**	**3**	**25**
4	**1**	**0**	**17**
4	**1**	**1**	**20**
4	**1**	**2**	**25**
4	**2**	**0**	**20**
4	**2**	**1**	**25**
4	**2**	**2**	**30**
4	**3**	**0**	**25**
4	**3**	**1**	**35**
4	**3**	**2**	**40**
4	**4**	**0**	**35**
4	**4**	**1**	**40**
4	**4**	**2**	**45**
4	**5**	**0**	**40**
4	**5**	**1**	**50**
4	**5**	**2**	**55**
5	**0**	**0**	**25**
5	**0**	**1**	**30**
5	**0**	**2**	**45**

5	**0**	**3**	**60**
5	**0**	**4**	**75**
5	**1**	**0**	**35**
5	**1**	**1**	**45**
5	**1**	**2**	**65**
5	**1**	**3**	**85**
5	**1**	**4**	**115**
5	**2**	**0**	**50**
5	**2**	**1**	**70**
5	**2**	**2**	**95**
5	**2**	**3**	**120**
5	**2**	**4**	**150**
5	**2**	**5**	**175**
5	**3**	**0**	**80**
5	**3**	**1**	**110**
5	**3**	**2**	**140**
5	**3**	**3**	**175**
5	**3**	**4**	**200**
5	**3**	**5**	**250**
5	**4**	**0**	**130**
5	**4**	**1**	**170**
5	**4**	**2**	**225**
5	**4**	**3**	**275**
5	**4**	**4**	**350**
5	**4**	**5**	**425**
5	**5**	**0**	**250**
5	**5**	**1**	**350**
5	**5**	**2**	**550**
5	**5**	**3**	**900**
5	**5**	**4**	**1600**
5	**5**	**5**	**>1800**

10 ट्यूब एमपीएन कोलीफॉर्म जांच - पानी के लिए प्रकल्पित और पुष्टिकृत प्रक्रिया

विधि : यूएसएफडीए बी.ए.एम: 2018

चरण 1: कोलीफॉर्म के लिए प्रकल्पित जांच

- डबिल लौरिल ट्रिप्टोस ब्रोथ / लैक्टोज़ ब्रोथ (एल.बी.) (10 मि.ली. मीडियम) के 10 मि.ली. के 10 ट्यूब को अनडायल्यूटड नमूने के साथ इनोकुलेट करें
- ट्यूबों को 35 ^{o}C पर इंक्युबेट करें

- वृद्धि एवं ट्यूब को हिलाने से गैस की उपस्थिति से मीडियम के विस्थापन के लिए 24 ± 2 घंटों के बाद निरीक्षण करें
- अगर 24 घंटे में निगटीव परिणाम है तो अगले 24 घंटों के लिए पुन: इंक्युबेट करें और गैस के लिए जांच करें

चरण 2: एम.पी.एन. - कॉलिफॉर्म के लिए पुष्टि जांच

- प्रत्येक एल.एस.टी. ट्यूब को धीरे से हिलाएं और 3.0 – 3.5 मि.मी. जीवाणूमुक्त लूप से एक या अधिक लूप भर सस्पेंशन को बी.जी.एल.बी ब्रोथ में स्थानांतरित करें
- स्थानान्तरण के लिए जीवाणुमुक्त लकडी के एप्लिकेटर स्टिक को ब्रोथ संवर्धन में 2.5 से.मी. तक डालकर प्रयोग कर सकते है
- बी.जी.एल.बी. ट्यूब को **48** ± 2 घंटों के लिए **35 °C** के लिए इंक्युबेट करें. गैस उत्पादन के लिए निरीक्षण करें और रिकॉर्ड करें
- 10 ट्यूब एम.पी.एन. सारणी का उपयोग करके एम.पी.एन**.** की गणना करें

चरण 3: एम.पी.एन. - फीकल कॉलिफॉर्म केलिए पुष्टीकृत जांच

- प्रत्येक पोज़िटीव एल.एस.टी. या लैक्टोज ब्रोथ ट्यूब में, लूपभर ई.सी. ब्रोथ को स्थानांतरित करें (स्थानांतरण के लिए जीवाणुमुक्त लकडी के एप्लिकेटर स्टिक का उपयोग किया जा सकता है)।
- ई.सी. ट्यूब्स को 24 ± 2 घंटों के लिए 44.5 °C पर इंक्युबेट करें और गैस उत्पादन के लिए जांच करें
- अगर निगटीव है तो पुन: इंक्युबेट करें और 48 ± 2 घंटों के लिए जांच करें
- यह परिणाम फीकल कॉलिफॉर्म की गणना के लिए प्रयुक्त करें

चरण 4: एम.पी.एन. - *ई.कोलाई* के लिए संपूर्ण जांच

- ई.कोलाई के संपूर्ण जांच हेतु, गैस उत्पादित ई.सी. ट्यूब को धीरे से हिलाएं, लूप भर ब्रोथ को निकालें और अलगाव के लिए एल.ई.एम.बी (लेवाइन इओसिन मीथाईलीन ब्लू) अगार प्लेट पर स्ट्रीक करें
- इसे 18 – 24 घंटे के लिए 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें
- संदिग्ध ई. कोलाई कॉलोनियों के लिए प्लेटों की जांच करें**,** यानी धात्विक चमक के साथ या बिना और काले रंग का मध्य भाग एवं चपटा रूप
- प्रत्येक एल.ई.एम.बी. प्लेट से पी.सी.ए. (प्लेट काउंट अगार) में 5 सदिग्ध कॉलोनियों को स्थनांतरित करें और उसे 18 – 24 घंटे के लिए 35 ± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें और आगे के जांच के लिए उपयोग करें

सारणी : 95% कॉन्फिडेंस इंटेर्वेल पर 0.1, 0.01 एवं 0.001 ग्राम इनोकुला से युक्त 3 ट्यूब एम.पी.एन

पॉज़िटीव ट्यूब्स			एम.पी.एन. प्रति ग्रा	पॉज़िटीव ट्यूब्स			एम.पी.एन. प्रति ग्रा
0.1	0.01	0.001		0.1	0.01	0.001	
0	0	0	< >	8	2	0	17
0	0	1	0.9	8	2	1	19
0	0	2	1.8	8	2	2	21
0	1	0	0.9	8	2	3	23
0	1	1	1.8	8	3	0	19
0	2	0	1.8	8	3	1	21
0	2	1	2.7	8	3	2	24
0	3	0	2.7	8	3	3	26
1	0	0	0.94	8	4	0	22
1	0	1	1.9	8	4	1	24
1	0	2	2.8	8	4	2	26
1	1	0	1.9	8	4	3	29
1	1	1	2.9	8	5	0	24
1	1	2	3.8	8	5	1	27
1	2	0	2.9	8	5	2	29
1	2	1	3.8	8	5	3	32
1	3	0	3.8	8	6	0	27
1	3	1	4.8	8	6	1	30
1	4	0	4.8	8	6	2	33
2	0	0	2	8	7	0	30
2	0	1	3	8	7	1	33
2	0	2	4	8	7	2	36
2	1	0	3	8	8	0	34
2	1	1	4	8	8	1	37
2	1	2	5	9	0	0	17
2	2	0	4	9	0	1	19
2	2	1	5	9	0	2	22
2	2	2	6.1	9	0	3	24
2	3	0	5.1	9	1	0	19
2	3	1	6.1	9	1	1	22
2	4	0	6.1	9	1	2	25
2	4	1	7.2	9	1	3	28
2	5	0	7.2	9	1	4	31
3	0	0	3.2	9	2	0	22
3	0	1	4.2	9	2	1	25
3	0	2	5.3	9	2	2	28
3	1	0	4.2	9	2	3	32
3	1	1	5.3	9	2	4	35
3	1	2	6.4	9	3	0	25
3	2	0	5.3	9	3	1	29
3	2	1	6.4	9	3	2	32
3	2	2	7.5	9	3	3	36
3	3	0	6.5	9	3	4	40

3	3	1	7.6	9	4	0	29
3	3	2	8.7	9	4	1	33
3	4	0	7.6	9	4	2	37
3	4	1	8.7	9	4	3	41
3	5	0	8.8	9	4	4	45
4	0	0	4.5	9	5	0	33
4	0	1	5.6	9	5	1	37
4	0	2	6.8	9	5	2	42
4	1	0	5.6	9	5	3	46
4	1	1	8.8	9	5	4	51
4	1	2	8	9	6	0	38
4	2	0	6.8	9	6	1	43
4	2	1	8	9	6	2	47
4	2	2	9.2	9	6	3	53
4	3	0	8.1	9	7	0	44
4	3	1	9.3	9	7	1	49
4	3	2	10	9	7	2	54
4	4	0	9.3	9	7	3	60
4	4	1	11	9	8	0	50
4	5	0	11	9	8	1	55
4	5	1	12	9	8	2	61
4	6	0	12	9	8	3	68
5	0	0	6	9	9	0	57
5	0	1	7.2	9	9	1	63
5	0	2	8.5	9	9	2	70
5	0	3	9.8	10	0	0	23
5	1	0	7.3	10	0	1	27
5	1	1	8.5	10	0	2	31
5	1	2	9.8	10	0	3	37
5	1	3	11	10	1	0	27
5	2	0	8.6	10	1	1	32
5	2	1	9.9	10	1	2	38
5	2	2	11	10	1	3	44
5	3	0	10	10	1	4	52
5	3	1	11	10	2	0	33
5	3	2	13	10	2	1	39
5	4	0	11	10	2	2	46
5	4	1	13	10	2	3	54
5	4	2	14	10	2	4	63
5	5	0	13	10	3	0	40
5	5	1	14	10	3	1	47
5	6	0	14	10	3	2	56
6	0	0	7.8	10	3	3	66
6	0	1	9.2	10	3	4	77
6	0	2	11	10	3	5	89
6	0	3	12	10	4	0	49
6	1	0	9.2	10	4	1	59
6	1	1	11	10	4	2	70

6	1	2	12	10	4	3	82
6	1	3	14	10	4	4	94
6	2	0	11	10	4	5	110
6	2	1	12	10	5	0	62
6	2	2	14	10	5	1	74
6	2	3	15	10	5	2	87
6	3	0	12	10	5	3	100
6	3	1	14	10	5	4	110
6	3	2	15	10	5	5	130
6	4	0	14	10	5	6	140
6	4	1	15	10	6	0	79
6	4	2	17	10	6	1	94
6	5	0	16	10	6	2	110
6	5	1	17	10	6	3	120
6	5	2	19	10	6	4	140
6	6	0	17	10	6	5	160
6	6	1	19	10	6	6	180
6	7	0	19	10	7	0	100
7	0	0	10	10	7	1	120
7	0	1	12	10	7	2	140
7	0	2	13	10	7	3	150
7	0	3	15	10	7	4	170
7	1	0	12	10	7	5	190
7	1	1	13	10	7	6	220
7	1	2	15	10	7	7	240
7	1	3	17	10	8	0	130
7	2	0	13	10	8	1	150
7	2	1	15	10	8	2	170
7	2	2	17	10	8	3	200
7	2	3	19	10	8	4	220
7	3	0	15	10	8	5	250
7	3	1	17	10	8	6	280
7	3	2	19	10	8	7	310
7	3	3	21	10	8	8	350
7	4	0	17	10	9	0	170
7	4	1	19	10	9	1	200
7	4	2	21	10	9	2	230
7	4	3	23	10	9	3	260
7	5	0	19	10	9	4	300
7	5	1	21	10	9	5	350
7	5	2	23	10	9	6	400
7	6	0	21	10	9	7	460
7	6	1	23	10	9	8	550
7	6	2	25	10	9	9	610
7	7	0	23	10	10	0	240
7	7	1	26	10	10	1	290
8	0	0	13	10	10	2	350
8	0	1	15	10	10	3	430

8	**0**	**2**	**17**	**10**	**10**	**4**	**540**
8	**0**	**3**	**19**	**10**	**10**	**5**	**700**
8	**1**	**0**	**15**	**10**	**10**	**6**	**920**
8	**1**	**1**	**17**	**10**	**10**	**7**	**1200**
8	**1**	**2**	**19**	**10**	**10**	**8**	**1600**
8	**1**	**3**	**21**	**10**	**10**	**9**	**2300**
				10	**10**	**10**	**>2300**

संदर्भ

1. फेंग, पी., वीअगंट, एस डी., ग्रांट, एम. ए .और बुर्कहार्ट, डब्ल्यू.(2002)। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 4, यूएसएफडीए।
2. सुरेंद्रन, पी.के., तम्पुरान, एन., नांबियार, वी. एन., ललिता, के.वी. और जोसेफ, टी. सी., 2013, समुद्री भोजन की सूक्ष्मजीवविज्ञानी परीक्षा के लिए प्रयोगशाला तकनीक। चौथा संस्करण, केंद्रीय मात्स्यिकी प्रौद्योगिकी संस्थान, कोचीन -682029,भारत।55 पृ.
3. फेंग, पी।, वीअग्रेट, एस डी।, ग्रांट, एम। ए।, बुर्कहार्ट, डब्ल्यू।, शेलफिश, एम।, और वॉटर, बी (**2018)**। बम: एस्चेरिचिया कोलाई और कोलिफॉर्म बैक्टेरिया का अध्याय **4)**। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल। **2018**।

****

समुद्री खाद्य से *स्टैफिलोकोकस ऑरियस* का अलगाव और पहचान

रम्या एस

परिचय

- ग्राम पोज़िटीव गोलाकार (कोकल) जीवाणु
- **"अंगूर के गुच्छे"** के रूप में दिखाई देते हैं
- परिणामी अवायवीय, जो ऑक्सीजन की आवश्यकता के बिना बढ़ सकता है
- मानव शरीर की प्राकृतिक फ्लोरा के सदस्य
- अक्सर नाक, श्वसन पथ और त्वचा पर पाया जाता है
- तापीय उपचार और लगभग सभी सैनिटाइजिंग एजेंटों द्वारा इसका विनाश किया जा सकता है।
- इसलिए, प्रसंस्कृत खाद्य पदार्थों में या खाद्य प्रसंस्करण के उपकरण पर इस जीवाणु या इसके एंटेरोटॉक्सिन की उपस्थिति आम तौर पर खराब स्वच्छता का संकेत देती है।
- यह एक महत्वपूर्ण मानव रोगज़नक़ है जो त्वचा और श्वसन संक्रमण का कारण बनता है।
- यह एंटरोटॉक्सिन और अन्य सुपरएंटीजेन्स के उत्पादन के माध्यम से घातक खाद्य विषाक्तता का कारण बन सकता है।
- *एस. ऑरियस* के द्वारा एंटीबायोटिक-प्रतिरोधी उपभेदों का उभरना जैसे मेथिसिलिन-प्रतिरोधी *एस. ऑरियस* **(MRSA)** नैदानिक चिकित्सा में वैश्विक समस्या है।

डायरेक्ट प्लेट काउंट विधि (स्रोत: बैक्टेरियोलॉजिकल एनालिटिकल मैनुअल, अध्याय 12, 2016,यू.एस.एफ.डी.ए)

- यह विधि खाद्य पदार्थों के विश्लेषण के लिए उपयुक्त है जिसमें 100 से अधिक *एस. ऑरियस* कोशिका / ग्राम अपेक्षित हैं।

मीडिया एवं अभिकर्मक

1. बेयर्ड-पार्कर (बीपी) मीडियम
2. ट्रिप्टिकेस सोया अगार (टीएसए)
3. ब्रेन हार्ट इंफ्यूशन (बी.एच.आई) ब्रोथ
4. ई.डी.टी.ए.के साथ कोएग्युलेज़ प्लाज्मा (खरगोश)
5. टोल्यूडीन ब्लू-डी.एन.ए. अगार
6. लाइसोस्टाफिन

7. ट्रिप्टोन यीस्ट एक्सट्रैक्ट अगार

8. पैराफिन तेल (जीवाणुमुक्त)

9. 0.02 m फॉस्फेट-सलाइन बफर जिसमें 1% NaCl होता है

10. कैटलेज़ जांच

प्री-सेट बेयर्ड-पार्कर (बीपी) प्लेटों की तैयारी

बेसल माध्यम

ट्रिप्टोन	10 ग्राम
बीफ एक्स्ट्राक्ट	5 ग्राम
यीस्ट एक्स्ट्राक्ट	1 ग्राम
सोडियम पाइरूवेट	10 ग्राम
ग्लाइसिन	12 ग्राम
लिथियम क्लोराइड · $6H_2O$	5 ग्राम
अगार	20 ग्राम

- मीडियम को 15 मिनट के लिए 121 °C पर ऑटोक्लेव करें।
- पी.एच., 7.0 ± 0.2 निश्चय करें।
- यदि तत्काल उपयोग का इरादा है, तो संवर्धन को मिलाने से पहले 48 – 50 °C पर पिघले हुए मीडियम को बनाए रखें।
- यदि नहीं, तो जमे हुए मीडियम को 4 ± 1 °C पर 1 महीने तक भंडारण कर सकते हैं। वाटरबाथ पर भंडारित बीपी मीडियम के 100 मि.ली. फ्लास्क को पिघलाएं।
- लगभग 50 °C तक ठंडा करें।

उपजाऊ और संपूर्ण मीडियम

- जीवाणुमुक्त तरीके से 95 मि.ली. पिघले आधार में 5 मि.ली. गरम (45 – 50 °C) बैक्टो ई.वी. (अंडे की पीतक) टेल्लुराइट उपजाऊ मिलाएं।

* वैकल्पिक रूप से, 1 मि.ली. जीवाणुरहित 1% पोटेशियम टेलराइट घोल मिलाएं, इसके बाद 50 प्रतिशतवाली 5 मि.ली. अंडे की पीतक को मिलाएं।

- अच्छी तरह से मिश्रण (बुलबुले बनने से रोके) करें और जीवाणुरहित पेट्री डिश में डालें। मीडियम घनी अपारदर्शी होना चाहिए।

- मीडियम को सेट होने के लिए छोड दें और बाद में 45 मिनट के लिए 56 °C पर सूखने दें।
- सामान्य तापमान पर ठंडा करें ।
- तैयार प्लेटों को 20 - 25 °C पर 5 दिनों तक भंडारण करें।

बीपी मीडियम के लिए जीवाणुरहित अंडे की पीतक (50 %) की तैयारी

- मुर्गी के अंडों की 5 संख्या लें और अच्छे से धोएं।
- पोंछने और सूखने के बाद, अंडे को अल्कहॉल से युक्त 1 लीटर बीकर में 2 घंटे के लिए (रेक्टिफाइड स्प्रिट) डुबाके रखें।
- अल्कहॉल से अंडे को एक-एक करके बाहर निकालें।
- एक जीवाणुमुक्त स्केलपेल का उपयोग करके अंडे के एक छोर पर एक छोटा सा छिद्र करें और सभी एग वाइट को ध्यान से बाहर निकालें।
- शेल को थोड़ा और सावधानी से तोड़ें और अंडे की पीतक को एक जीवाणूमुक्त शंक्वाकार फ्लास्क में स्थानांतरित करें।
- प्रत्येक अंडा लगभग 15 मि.ली. का पीतक प्रदान करता है।
- जीवाणुमुक्त सामान्य सलाइन की एक समान मात्रा को मिलाएं, अच्छी तरह से हिलाएं और ऐसे ही रखें।
- पिपेट से 5 मि.ली. अंडे की पीतक सलाइन को जीवाणुमुक्त जांच ट्यूबों में डालें, जीवाणुमुक्त रूई से ढकें और एक रेफ्रिजरेटर में रखें।

बटरफील्डस फॉस्फेट-बफर डायल्यूएंट की तैयारी

- पोटेशियम डाइहाइड्रोजेन फॉस्फेट (KH_2PO_4): 34 ग्राम
- शुद्ध जल: 500 मि.ली.
- 1 एन NaOH से पी.एच. को 7.2 तक लाएं।
- शुद्ध जल से1 लीटर की मात्रा बनाएं।
- 121°C पर 15 मिनट के लिए ऑटोक्लेव करें।
- फ्रिज में भंडारण करें।
- 1.25 मि.ली. उपरोक्त स्टॉक के घोल में से लें और शुद्ध जल मिलाकर मात्रा को 1 लीटर तक बनाएं।
- बोतलों में 90 या ± 1 मि.ली.तक भरें।
- 121°C पर 15 मिनट तक जीवाणुनाशन करें।

एस. ऑरियस के अलगाव और गणना

- मछली के 50 ग्राम का नमूना लें
- जीवाणुरहित बटरफीस्डस फॉस्फेट-बफर डायल्यूशन के 450 मि.ली. मिलाएं

- ब्लेंडर जार में 2 मिनट के लिए ब्लेंड करें। इसके परिणाम स्वरूप 10^{-1} का डायल्यूशन प्राप्त होगा

*जीवाणुरहित डायल्यूएंट का 90 मि.ली. के साथ 10 मि.ली. पिछले डायल्यूशन मिलाकर सभी दशमलव डायल्यूशन बनाएं

- उपर्युक्त से 10 मि.ली. + 90 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट (10^{-2})
- उपर्युक्तसे 10 मि.ली.+ 90 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट (10^{-3})
- प्रत्येक डायल्यूशन से, कीटाणुमुक्त तरीके से 3 बीपी प्लेटों में 0.3, 0.3 और 0.4 मि.ली. नमूना स्थानांतरण करें (3 बीपी प्लेटों में 1 मि.ली. इनोकुलम (संरोप) वितरण करना)।

*अगार प्लेट की सतह पर कीटाणुमुक्त कांच के स्ट्रीकिंग रॉड का उपयोग करके इनोकुलम को फैला दें।

*जब तक इनोकुलम अगार (उचित रूप से सूखे प्लेटों पर लगभग 10 मिनट) द्वारा अवशोषित नहीं किया जाता है, तब तक सीधी स्थिति में प्लेटें रखें।

*यदि इनोकुलम आसानी से अवशोषित नहीं होता, तो प्लेटों को इनक्यूबेटर में लगभग 1घंटे के लिए सीधा रखें।

- प्लेटों को पलटें और इसके बाद 35 – 37 °C पर 45 - 48 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।
- उन प्लेटों का चयन करें जिसमें 20 - 200 कॉलोनियां हो, जिसमें कम डायल्यूशन (>200 कॉलोनियों) की प्लेटों में एस ऑरियस की विशिष्ट उपस्थिति से युक्त कॉलोनियां हों।
- अपारदर्शी क्षेत्र से घिरे ऑफ-व्हाइट मार्जिन से युक्त काली कालोनियों की गणना करें

**एस. ऑरियस* की कॉलोनियां गोलाकार, चिकनी, उत्तल (convex), नम, 2 - 3 मि.मी. व्यास की अनियंत्रित प्लेटों पर, ग्रे से जेट-ब्लैक तक, अक्सर ऑफ-व्हाइट मार्जिन के साथ होती हैं, जो कि अपारदर्शी क्षेत्र से घिरा होता है और अक्सर एक स्वच्छ बाहरी क्षेत्र के साथ; इनोकुलेंटिंग सुई के साथ छूने पर कॉलोनियों में चिपचिपी स्थिरता होती है।

गणना

एस. ऑरियस / ग्राम की संख्या = पोज़िटीव कॉलोनियों की संख्या x डायल्यूशन कारक

*ट्रिपलेट प्लेटों में उपस्थित कुल कोएग्युलेज़ पोज़िटीव कालोनियों की संख्या को जोड़ें और नमूना डायल्यूशन कारक के साथ गुणा करें। इस संख्या को खाद्य में उपस्थित एस. ऑरियस / ग्राम की संख्या के रूप में व्यक्त करें।

कोएग्युलेज़ जांच

- इस जांच का उपयोग एस.ऑरियस की पहचान के लिए किया जाता है, जो एंजाइम कोएग्युलेज़ का उत्पादन करता है।
- संदिग्ध एस. ऑरियस कॉलोनियों को 0.2 - 0.3 मि.ली. बी.एच.आई (ब्रेन हार्ट इन्फ्यूशन) ब्रोथ वाले छोटे ट्यूबों में स्थानांतरित करें और अच्छी तरह से ब्लेंड करें।
- लूप भर बी.एच.आई सस्पेंशन को उपयुक्त रखरखाव मीडियम, जैसे, टीएसए (ट्रिप्टिकेस सोया अगार) पर इनोकुलेट करें।

- बी.एच.आई संवर्धन सस्पेंशन और अगार स्लांट को एक साथ 35°C -37 °C पर 18 - 24 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।
- बी.एच.आई. संवर्धन में 0.5 मि.ली. ई.डी.टी.ए. के साथ पुनर्गठित कोएग्युलेज़ प्लास्मा (खरगोश से प्राप्त) मिलाएं और अच्छी तरह से मिश्रित करें।
- इसे 35°C -37 °C पर इंक्युबेट करें और समय-समय पर 6 घंटे तक **क्लोट गठन / जमावट / जेल गठन** की निरीक्षण करें।
- केवल फर्म और पूर्ण रूप से जमे हुए क्लॉट जो ट्यूब के झुकाने पर या उलटा करने पर भी वही जगह पर होता है, तब इसे पोज़िटीव माना जाता है।

कोएग्युलेज़ जांच का सिद्धांत

- इस प्रक्रिया में कोएग्युलेज़ फ़िब्रिनोजेन को फाइब्रिन में परिवर्तित करके प्लाज्मा को जमाता है।
- एस. ऑरियस के अधिकांश उपजाति द्वारा दो प्रकार के कोएग्युलेज़ का उत्पादन किया जाता है।
- फ्री कोएग्युलेज़, जो प्लाज्मा में उपस्थित कोएग्युलेज़ -प्रतिक्रियात्मक कारक को सक्रिय करके फाइब्रिनोजेन को फाइब्रिन में बदल देता है जो कि टेस्ट ट्यूब में क्लॉटिंग करके फ्री कोएग्युलेज़ का पता लगाया जाता है।
- बाउंड कोएग्युलेज़ (क्लंपिंग कारक), जो कोएग्युलेज़ - प्रतिक्रियात्मक कारक की आवश्यकता के बिना फाइब्रिनोजेन को सीधे फाइब्रिन में परिवर्तित करता है। त्वरित (रैपिड) स्लाइड जांच में बैक्टेरिया की कोशिकाओं के क्लंपिंग से इसका पता लगाया जा सकता है।

वैकल्पिक जांच

1. **कैटलेज़ जांच**

- बैक्टेरिया को अलग करने के लिए उपयोग किया जाता है, जो स्ट्रेप्टोकोकस जैस कैटलेज़ उत्पादन करनेवाले बैक्टेरिया को स्टेफिलोकोकस जैसे गैर-कैटलेज़ उत्प्रेरक बैक्टीरिया से अलग करता है।
- ग्लास स्लाइड परउत्प्रेरित (कैटलेज़) जांच के लिए टीएसए स्लांट से ताज़े संवर्धन का उपयोग करें और गैस बुलबुले के उत्पादन का निरीक्षण करने के लिए ठीक से प्रकाश दें।

सिद्धांत

- कैटलेज़ जांच में हाइड्रोजन पेरोक्साइड का ऑक्सीजन और पानी में विघटन करने के लिए उत्प्रेरक (कैटालेस)के रूप में कार्य करता है। एक जीव को हाइड्रोजन पेरोक्साइड के संपर्क में लाकर कैटलेज़ उत्पादन के लिए जांच किया जाता है। यदि जीव एक कैटलेज़ उत्पादक है, तो ऑक्सीजन के बुलबुले निकलते हैं। संवर्धन 24 घंटे से अधिक पुरानी नहीं होनी चाहिए।

2. ग्लूकोज का अवायवीय उपयोग

3. मैनिटोल का अवायवीय उपयोग
4. लाइसोस्टाफिन संवेदनशीलता
5. थर्मोस्टेबल न्यूक्लियस उत्पादन

एस. ऑरियस की विशिष्ट गुण

विशेषता	***एस.ऑरियस***
कोएग्युलेज़ उत्पादन	+
कैटलेज़ गतिविधि	+
ग्लूकोज का अवायवीय उपयोग	+
मैनिटोल का अवायवीय उपयोग	+
लैसोस्टाफिन संवेदनशीलता	+
थर्मोस्टेबल न्यूक्लियस उत्पादन	+

* +, अधिकांश (90% या अधिक) स्ट्रेन पोज़िटीवहैं

कोएग्युलेज़ -पोज़िटीव स्टैफिलोकोकाई - स्टैफिलोकोकस ऑरियस और अन्य प्रजातियां
खाद्य और पशु आहार सामग्री का सूक्ष्मजीवविज्ञान -कोएग्युलेज़ –पोज़िटीव स्टेफिलोकोकाई (स्टेफिलोकोकस ऑरियस और अन्य प्रजातियों) की गणना के लिए होरिज़ोंडल विधि: बेयर्ड-पार्कर अगार मीडिया की प्रयुक्त तकनीक- भाग 1

नमूने की तैयारी

जांच हेतु लिए गए इकाई के 50 ग्राम को एक ब्लेंडर जार में स्थानांतरित करें तथा बफ़र्ड डायल्यूशन डालें। इसके बाद 2 मिनट के लिए मिश्रण करें।

- सभी दशमलव डायल्यूशन तैयार करें।
- यदि संभव हो, तो ऐसे डायल्यूशन का चयन किया जाना चाहिए जिससे प्रति प्लेट 10 और 300 कॉलोनियों के बीच कॉलोनी की संख्या आएं।

इनोकुलेशन

- उपयुक्त डायल्यूएंट के दशमलव डायल्यूशन से, 0.1 मि.ली. के विभाज्य प्रत्येक उपयुक्त डायल्यूशन के दो बेयर्ड-पार्कर अगार प्लेटों की सतह पर फैलाएं।

- अगर कोएग्युलेज़ पोज़िटीव स्टैफिलोकोकाई की कम संख्या की गणना की आवश्यकता होती है, तो तरल जांच के नमूने का 1 मि.ली. एक बड़ी (140 मि.मी.) अगार प्लेट में या तीन 90 मि.मी. की अगार प्लेट के सतह पर डुप्लिकेट में या सस्पेंशन फैलाया जा सकता है।
- प्लेटों को प्रयोगशाला तापमान पर ढक्कन के साथ 15 मिनट के लिए सुखाएं।

इंक्युबेशन

- प्लेटों को 24 घंटे (±2 घंटे) के लिए 35°C या 37 °C पर इंक्युबेट करें।
- इस समय के बाद, किसी भी विशिष्ट कॉलोनियों को दिखाने के लिए प्लेटों के नीचे चिह्नित किया जाता है।
- प्लेटों को अगले 24 घंटे (±2 घंटे) के लिए 35 °C या 37 °C पर फिर से इंक्युबेट करें और किसी भी नए कॉलोनियों को चिह्नित करें।
- इस समय सामान्य कॉलोनियों को भी चिह्नित किया जाना चाहिए।

प्लेटों का चयन और व्याख्या / विवेचन

- विशिष्ट कॉलोनियां काले या भूरे, चमकदार और उत्तल होती हैं और एक स्पष्ट क्षेत्र से घिरी होती हैं जो आंशिक रूप से अपारदर्शी हो सकते हैं।
- इंक्युबेशन के 24 घंटे के बाद, कॉलोनी के चारों ओर एक ओपलेसेंट रिंग दिखाई दे सकती है।
- कॉलोनियां 24 घंटे के बाद व्यास में 1 - 1.5 मि.मी., और 48 घंटे इंक्युबेशन के बाद 1.5 - 2.5 मि.मी. व्यास की होती हैं।
- विशिष्ट कॉलोनियों का आकार सामान्य कॉलोनियों के समान होता है, लेकिन एक संकीर्ण सफेद अग्र के साथ या बिना, चमकदार काली कालोनियां हो सकती हैं, स्पष्ट क्षेत्र अनुपस्थित या मुश्किल से दिखाई देता है और ओपलेसेंट रिंग अनुपस्थित या शायद ही दिखाई देती है, या ग्रे कॉलनियां बिना स्पष्ट क्षेत्र के दिखाई देती है।
- कॉलोनियों को केवल दो क्रमिक डायल्यूशन पर 150 विशिष्ट और / या सामान्य कालोनियों के साथ अधिकतम 300 कॉलोनियों वाले प्लेटों पर गिना जाना चाहिए।
- एक प्लेट में कम से कम 15 कॉलोनियां होनी चाहिए।
- यदि केवल विशिष्ट कॉलोनियों हो तो पांच विशिष्ट कॉलनी का चयन करें, केवल सामान्य हो तो पांच सामान्य कॉलनियां और प्लेट में यदि दोनों प्रकार की कॉलोनियां हो तो प्रत्येक प्लेट से दोनों प्रकार की पांच – पांच कॉलोनियों का पुष्टि के लिए चयन करें।

पुष्टीकरण (कोएग्युलेज़ जांच)

- एक जीवाणुमुक्त तार लूप से, प्रत्येक चयनित कॉलोनी को सतह से हटा दें और ब्रेन हार्ट इंफ्यूशन ट्यूब पर स्थानांतरण करें।
- इसे 35 °C या 37 °C पर 24 घंटे (±2 घंटे) के लिए इंक्युबेट करें।
- इंक्युबेशन के बाद, जीवाणुमुक्त हेमोलिसिस ट्यूबों में 0.3 मि.ली. राबिट प्लाज्मा में प्रत्येक संवर्धन के 0.1 मि.ली.मिलाएं और 35 °C या 37 °C पर इंक्युबेट करें।
- ट्यूब झुकाकर 4 - 6 घंटे इंक्युबेशन के बाद जमावट के लिए प्लाज्मा की जांच करें।
- यदि कोई पोज़िटिव प्रतिक्रिया नहीं है, तो 24 घंटे इंक्युबेशन के बाद ट्यूब की फिर से जांच करें।
- राबिट प्लाज्मा के आपूर्तिकर्ता के निर्देशों का पालन करें।
- जांच तब पोज़िटीव होगा यदि जमावट की मात्रा तरल के आधे से अधिक मूल मात्रा में रहती है।
- राबिट प्लाज्मा की अनुशंसित मात्रा में जीवाणुमुक्त ब्रेन हार्ट इंफ्यूशन मिलाकर एक निगटिव नियंत्रण रखना चाहिए।

संदर्भ

1. रेजिनाल्ड डब्ल्यू. बेनेट और गेय्ल ए. लानसेट. 2016. अध्याय 12. *स्टेफिलोकोकस ऑरियस*. जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल (BAM)। यूएसएफडीए (खाद्य एवं औषधि प्रशासन)।

2. खाद्य और पशु आहार सामग्री का सूक्ष्मजीवविज्ञान – कोएग्युलेज़ - पोज़िटीव स्टैफिलोकोकी (स्टेफिलोकोकस ऑरियस और अन्य प्रजातियों) की गणना के लिए होरिज़ोंडल विधि - भाग 1:बेयर्ड-पार्कर अगार मीडियम की प्रयुक्त तकनीक। आईएसओ 6888-1: 1999 / आमद। 1: 2003।

3. एओएसी इंटरनेशनल। 1995. विश्लेषण के आधिकारिक तरीके, 16वें संस्करण।

****

समुद्री खाद्य से *साल्मोनेला* की अलगाव और पहचान

रम्या एस

परिचय

- *साल्मोनेला* का नाम अमेरिकन वेटनरी सर्जन **डी.ई. सैल्मन** के नाम पर रखा गया है।
- *साल्मोनेला* एक दंड के आकार का जीवाणु है जो *एंटरोबैक्टेरियेसिये* परिवार से संबंधित है।
- ग्राम-निगटिव जीव।
- परिणामी अवायवीय जीवाणु।
- कुछ अपवादों के साथ, परीट्राइकस फ्लैजेल्ला के कारण मोटाइल होता है।
- ये H_2S का उपादन करते है जिनसे से कॉलोनियां काला पड जाती हैं और "कैट-आई" जैसी दिखती है।
- *साल्मोनेला* गर्म और ठंडे खून वाले पशुओं के आंतों में पाया जाता है।
- *साल्मोनेला* की दो प्रजातियां *साल्मोनेला एंटरिका* और *साल्मोनेला बोंगोरी* हैं।
- *एस. एंटरिका* एक प्रकार की प्रजाति है और इसे छह उप-प्रजातियों में विभाजित किया गया है जिसमें 2,600 से अधिक सेरोटाइप / सेरोवार शामिल हैं, जिन्हें सोमाटिक ओ और फ्लैजेलर एच एंटीजन के आधार पर परिभाषित किया गया है।
- *एस. एंटरिका* की छह उप-प्रजातियाँ *एस.ई.एंटरिका*, *एस.ई.सलामी*, *एस.ई.एरीज़ोना*, *एस.ई.डायरिज़ोना*, *एस.ई.हौटेने* और *एस.ई.इंडिका* हैं।
- मनुष्यों में, साल्मोनेला दो बीमारियों का कारण बनता है। साल्मोनेलोसिस: एंटरिक फीवर (टाइफाइड), जिसके परिणाम स्वरूप रक्तप्रवाह और बैक्टीरियल गैस्ट्रोएंटेराइटिस के जीवाणु आक्रमण होते हैं, जिसके परिणाम स्वरूप एक खाद्य जनित संक्रमण / विषाक्तता होता है।
- साल्मोनेला खाद्य विषाक्तता के सबसे लगातार स्रोत पोल्ट्री, मांस, दूध, क्रीम और अंडे हैं।

साल्मोनेला की खोज

1. गैर-चयनात्मक उपजाऊ (पूर्व उपजाऊ): लैक्टोस ब्रोथ
2. चयनात्मक उपजाऊ: *टेट्राथयोनेट (TT)* ब्रोथ और राप्पपोर्ट –वसिलियडिस*(RV)*मीडियम
3. चयनात्मक प्लेटिंग: *XLD, HEA*और *BSA*
4. शुद्धिकरण : मैककोंकी अगार
5. बायोकेमिकल जांच
6. *सीरोलॉजिकल पहचान*: *पॉलीवलेंट सोमैटिक (ओ) एंटीसेरा*

साल्मोनेला के अलगाव के लिए नमूने की तैयारी

- कीटाणुमुक्त रूप से जीवाणुरहित ब्लेंडिंग कंटेनर में 25 ग्राम नमूने का वज़न करें।

- नमूने को 225 मि.ली. जीवाणुरहित लैक्टोज ब्रोथ के साथ मिलाएं और 2 मिनट के लिए ब्लेंड करें।
- होमोजेनाइस्ड मिश्रण को जीवाणुरहित, चौड़े मुंह, स्क्रू-कैप जार / फ्लास्क (500 मि.ली.) या अन्य उपयुक्त कंटेनर में स्थानांतरित करें और सामान्य तापमान पर 60 ± 5 मिनट तक रहने दें।
- इसको 35 °C पर 24 ± 2 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।

लैक्टोज ब्रोथ: पूर्व-उपजाऊ

- पूर्व-उपजाऊ मीडियम इंक्युबेशन के बाद गैर-साल्मोनेला बैक्टेरिया की तुलना में साल्मोनेला का उच्च अनुपात में प्रदान करता है।
- लैक्टोज ब्रोथ *साल्मोनेला* को निकालने के लिए अनुकूल वातावरण प्रदान करता है।
- मीडिया क्षतिग्रस्त कोशिकाओं को पुनर्प्राप्त करने की अनुमति देता है, विषाक्त पदार्थों को कम करता है और अन्य प्रजातियों पर साल्मोनेला के विकास के लिए अनुकूलता प्रदान करता हैं।
- अधिकांश गैर-साल्मोनेला बैक्टेरिया लैक्टोज को किण्वित करते हैं, जबकि साल्मोनेला नहीं करता है।
- जब लैक्टोज-किण्वन करने वाले बैक्टेरिया मीडियम में लैक्टोज को उपापचय करते हैं, तो पी.एच. कम हो जाता है, जिससे प्रतिस्पर्धा वाले सूक्ष्मजीवों पर एक बैक्टीरियोस्टेटिक प्रभाव पैदा होता है।

साल्मोनेला का अलगाव

चयनात्मक उपजाऊ

- धीरे से इंक्युबेट किए गए नमूना को हिलाएं।
- उसमें से 0.1 मि.ली. मिश्रण को 10 मि.ली. राप्पपोर्ट –वसिलियडिस *(RV)* मीडियम और एक अन्य 1मि.ली. मिश्रण को 10 मि.ली. *टेट्राथयोनेट (TT)* ब्रोथ में स्थानांतरित करें।
- इसको मिश्रित करें। इसके बाद 24 ± 2 घंटे के लिए 42 °C ± 0.2 °C (परिसंचारी, थर्मास्टाटिक रूप से नियंत्रित, वाटरबाथ) पर राप्पपोर्ट –वसिलियडिस मीडियम को इंक्युबेट करें तथा *टेट्राथयोनेट (TT)* ब्रोथ को 24 ± 2 घंटे के लिए 35 °C ± 2.0 °C पर इंक्युबेट करें।

चयनात्मक प्लेटिंग

- बिस्मुत सल्फाइट (बीएस) अगार, क्सैलोस लाइसिन डीऑक्सिकोलेट (XLD) अगार, और हेक्टोएन एंटेरिक (HE) अगार पर लूपभर 3 मि.मी. (10 μl) इंक्युबेट किए गए टीटी ब्रोथ को मिश्रित करें (ट्यूब अच्छे से घुमाकर हिलाएं) और स्ट्रीक करें।
- स्ट्रीकिंग से एक दिन पहले बी.एस. प्लेट तैयार करें और स्ट्रीक होने तक सामान्य तापमान पर अंधेरे में भंडारण करें।
- लूपभर 3 मि.मी. आर.वी मीडियम (10μl) के साथ दोहराएं।

- प्लेटों को 24 °C पर 24 ± 2 घंटे इंक्युबेट करें।
- कॉलोनियों की उपस्थिति के लिए प्लेटों की जांच करें जो *साल्मोनेला* हो सकती हैं।

विशिष्ट *साल्मोनेला* कॉलोनी का लक्षण

- इंक्युबेशन के 24 ± 2 घंटे के बाद प्रत्येक चयनात्मक अगार से साल्मोनेला की 2 या अधिक कालोनियों को चुनें।
- विशिष्ट कॉलोनियों का निम्नलिखित विशेषताएं है:

बिस्मुथ सल्फाइट (BS) अगार: भूरी, कोरे या काले कॉलोनियां; कभी उनमें धात्वीय चमक होती है। आसपास का माध्यम आमतौर पर पहले भूरा होता है, लेकिन ऊष्मायन के समय में बढोतरी के साथ काला हो सकता है, जिससे तथाकथित प्रभामंडल प्रभाव पैदा होता है।

हेकटन एंटरिक (HE)अगार: नीले – हरे रंग से नीले कॉलोनियों के साथ या बिना काले केंद्रों का दिखाई देता है। साल्मोनेला की कई संवर्धन बड़े, चमकदार काले केंद्रों से युक्त कॉलनियों का निर्माण कर सकती हैं या लगभग पूरी तरह से काली कॉलनियों के रूप में प्रकट हो सकती हैं।

क्सैलोस लैसिन डीसोक्सिकोलेट (XLD) अगार: गुलाबी कॉलनियों के साथ या बिना काले केंद्रों के। साल्मोनेला की कई संवर्धन बड़े, चमकदार काले केंद्रों से युक्त कॉलनियों का निर्माण कर सकती हैं या लगभग पूरी तरह से काली कॉलोनियों के रूप में प्रकट हो सकती हैं।

जैव रासायनिक जांच: साल्मोनेला के रूप में वर्गीकृत, उन संवर्धनों को, जो कई जांचों द्वारा विशिष्ट साल्मोनेला का पहचान किया जाता हैं, जो नीचे दी गई सारणी में दिखाए गए हैं।

साल्मोनेला की जैव रासायनिक और सीरोलॉजिकल प्रतिक्रियाएं			
टेस्ट या सब्सट्रेट	**परिणाम**		***साल्मोनेल्ला* प्रजाति की प्रतिक्रिया (a)**
	पोज़िटीव	**निगटिव**	
ग्लूकोज़ (टीएसआई)	पीला बट्ट	लाल बट्ट	+
लैसिन डीकार्बोक्सिलेस (LIA)	बैंगनी बट्ट	पीला बट्ट	+
H_2S (टीएसआई एवं एलआईए)	कालापन	कालापन नहीं है	+
युरीस	बैंगनी – लाल रंग	रंग में बदलाव नहीं है	–
लैसिन डीकार्बोक्सिलेस ब्रोथ	बैंगनी रंग	पीले रंग	+
फिनोल रेड डल्सिटोल ब्रोथ	पीले रंग एवं / या वातक	कोई वातक नहीं; रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	+ (b)

केसीएन ब्रोथ	वृद्धि	कोई वृद्धि नहीं	–
मालोनेट ब्रोथ	नीला रंग	रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	– (c)
इंडोल जांच	सतह पर बैंगनी रंग	सतह पर पीले रंग	–
पॉलिवालेंट फाजेल्लर जांच	एग्लुटिनेशन	कोई एग्लुटिनेशन नहीं	+
पॉलिवालेंट सोमैटिक जांच	एग्लुटिनेशन	कोई एग्लुटिनेशन नहीं; रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	+
फिनल रेड लैक्टोस ब्रोथ	पीले रंग एवं / या वातक	कोई वातक नहीं; रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	– (c)
फिनल रेड सक्रोस ब्रोथ	पीले रंग एवं या वातक	कोई वातक नहीं; रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	–
वेगस-प्रोस्कौर जांच	गुलाबी से लाल रंग	रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	–
मीथैल रेड जांच	बिखरा हुआ लाल रंग	बिखरा हुआ पीला रंग	+
साइम्मंस सिट्रेट	वृद्धि; नीला रंग	कोई वृद्धि नहीं; रंग में कोई परिवर्तन नहीं है	V
[a] +, 1 या 2 दिनों में 90% या अधिक पोज़िटीव; -, 1 या 2 दिनों में 90% या अधिक निगटिव ; v, परिवर्तनशील। [b]एस. एरिज़ोना संवर्धनों का बहुमत निगटिव है और एस. एरिज़ोना संवर्धनों का बहुमत पोज़िटीव हैं।			

संदर्भ

1. वालेस एच. एंड्रयूज, हुआ वैंग, एंड्रयू जैकबसन और थॉमस हैमैक. 2019. अध्याय 5. *साल्मोनेला*। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल (BAM)। यूएसएफडीए (खाद्य एवं औषधि प्रशासन)।
2. खाद्य श्रृंखला की माइक्रोबायोलॉजी- *साल्मोनेला* की पहचान, गणना और सीरोटाइपिंग के लिए होरिज़ोंटल विधि। आईएसओ 6579-1: 2017 (ई)
3. एओएसी इंटरनेशनल। 2000. विश्लेषण के आधिकारिक तरीके, 17 वें संस्करण।, तरीके 967.25-967.28, 978.24, 989.12, 991.13, 994.04 और 995.20। एओएसी इंटरनेशनल, गेथर्सबर्ग, एमडी।

****

समुद्री खाद्य से *विब्रियो कोलेरे* का अलगाव और पहचान

अनुपमा टी.के

वी.कोलेरे, वंश विब्रियो की प्रजाति है जो कोलेरा के प्रकोप और महामारी का प्रेरक कारक है। कोलेरा एंटरोटॉक्सिन (सीटी) कोलेरा रोग का महत्वपूर्ण विषाणुजनित कारक है। महामारी कोलेरा के मामलों से निकाले गए *वी.कोलेरे* के उपभेदों में एक सामान्य सोमैटिक एंटीजेन होता है और इसमें ओ1 सेरोग्रुप शामिल होता है। अभी तक 150 से अधिक ज्ञात सोमैटिक एंटीजेन प्रकारों की पहचान की गई है। *वी.कोलेरे* के उपभेद जो जैव रासायनिक विशेषताओं में समान या बारीकी से मिलते-जुलते हैं, रोगाणुजनक उपभेद हैं, लेकिन एंटी-ओ1 / ओ139 सीरा में एग्लूटिनेट करने में विफल रहते हैं, जिन्हें कोलेरे गैर-ओ 1 / ओ 139 के रूप में संदर्भित किया जाता है। सिरोलोजिकली विविधता से युक्त ये उपभेद समुद्री मुहाने के वातावरण में प्रचुर मात्रा में पाया जाता हैं। कोलेरा के कुछ गैर - ओ1 / ओ139 उपजाति से डायेरिया जैसे बीमारी होती है, इसका प्रादुर्भाव बहुत कम होता है। उच्च ताप पर भी यह स्थिर होता है एवं मनुष्य में रक्त प्रवाह संबंधित (सेप्टिसेमिया) संक्रमण का कारण बन सकता हैं। कोलेरा के अधिकांश उपभेदों में कॉलेरा विष का उत्पादन नहीं होता है, और वह महामारी *वी.कोलेरे* ओ1 / ओ139 के बीच महत्वपूर्ण अंतर को दर्शाता है।

वी.कोलेरे ओ 1 के संक्रमण का मुख्य स्रोत कॉलेरा से संक्रमित रोगियों का मल है। यह बीमारी दूषित पानी और भोजन से फैलती है। प्रत्यक्ष व्यक्ति-से-व्यक्ति फैलाव सामान्य नहीं है। गैर- ओ1 / ओ139 प्रजातियों को आमतौर पर समुद्री मुहाने के पानी और झींगा जैसे शेलफिश से पृथक किया जाता है। अध्ययनों में पाया गया है कि *वी.कोलेरे* ओ1 खारे पानी, समुद्री मुहाने, और तटीय क्षेत्रों के नमक दलदल के स्वयंसिद्ध फ्लोरा का एक घटक है, जो सार्वजनिक स्वास्थ्य के लिए गंभीर खतरा है।

मीडियम और अभिकर्मक

1. क्षारीय पेप्टोन जल (APW)
2. आर्जिनिन ग्लूकोज स्लांट्स (AGS)
3. मूटिलिटी जांच मीडियम -1% NaCl
4. ऑक्सीडेज अभिकर्मक (1% N, N, N, N'-टेट्रामीथैल-पी-फिनाइलिंडाईएमैन.2HCl dH_2O में)
5. फॉस्फेट बफर्डसलाइन (पी.बी.एस)
6. ट्रिप्टिकेस सोय अगर (TSA)
7. सामान्य डायल्यूएंट–शुद्ध जल में 0.85% (NaCl)
8. सोडियम डीसॉक्सीकोलेट - जीवाणुरहित जल में 0.5% (NaCl)
9. थायोसल्फेट सिट्रेट बाईल सॉल्ट सुक्रोज (टी.सी.बी.एस.) अगार
10. T_1N_0, T_1N_1 और T_1N_3 ब्रोथ (T_1N_0 के लिए ट्रिप्टोन1% और NaCl 0%; T_1N_1 के लिए ट्रिप्टोन 1% और NaCl 1% और T_1N_3 के लिए NaCl 3% और ट्रिप्टोन 1%)

11. *वी.कोलेरे* पॉलीवलेंट ओ1 और ओ139 एंटीसेरम

प्रक्रिया

क. उपजाऊ और प्लेटिंग

- एक स्टोमकर बैग में 25 ग्राम नमूना लें।
- इसमें 225 मि.ली. APW मिलाएं और स्टोमकर ब्लेंडर से 2 मिनट मिश्रण करें और 500 मि.ली. जीवाणुरहित शंक्वाकार फ्लास्क में स्थानांतरित करें।
- इसे 6 से 8 घंटे के लिए 35 ±2 °C पर इंक्युबेट करें।
- टी.सी.बी.एस. अगार की सूखी प्लेटें तैयार करें।
- APW संवर्धन के ऊपरी सतह से झिल्ली को 3 मि.मी. लूप से सूखे टी.सी.बी.एस. प्लेट पर स्थानांतरित करें और ऐसे स्ट्रीक करेंताकि अलग-अलग कालोनियों का उत्पादन हो सके।
- रात भर (18 से 24 घंटे) टी.सी.बी.एस. प्लेट को 35 ± 2 °C पर इंक्युबेट करें।
- टी.सी.बी.एस. अगार पर *वी.कोलेरे* की विशिष्ट कालोनियां (2 से 3 मि.मी.) बड़ी, चिकनी, पीली और अपारदर्शी केंद्रों और पारभासी परिधियों से थोड़ी चपटी होती हैं।
- जैव रासायनिक पहचान के लिए, भरे हुए प्लेटों की कॉलोनियों को शुद्धीकरण के लिए एक गैर-चयनात्मक अगार (T_1N_1, T_1N_3 या TSA-2% NaCl) में स्ट्रीक करें और 35 ±2 °C पर रात भर इंक्युबेट करें और उस संवर्धन का उपयोग करके आगे की जांच करें।

ख. स्क्रीनिंग और पुष्टिकरण

- **आर्जिनिन ग्लूकोज स्लांट (AGS) -** प्रत्येक संदिग्ध T_1N_1 संवर्धन को ए.जी.एस के बट्ट में स्टैबिंग तथा स्लांट पर स्ट्रीक करें। इसे रात भर 35°C ±2°C पर ढक्कन को ढीला करके इंक्युबेट करें। *वी.कोलेरे* में क्षारीय स्लांट (बैंगनी रंग) और एसिड बट्ट (पीला) होगा, क्योंकि आर्जिनिन हाइड्रोलाइज्ड नहीं होता है। कोई गैस या H_2S उत्पन्न नहीं होता है।
- **नमक के प्रति सहनता-** T_1N_1 संवर्धन से, T_1N_0 और T_1N_3 ब्रोथ को हल्का सा इनोकुलेट करें। 35 °C ±2 °C पर रात भर ट्यूब को इक्युबेट करें। *वी.कोलेरे* NaCl के बिना बढ़ेगा।
- **स्ट्रिंग जांच** – इस जांच में संदिग्ध *वी.कोलेरे* के लिए उपयोगी अनुमानिक जांच है क्योंकि सभी उपभेद पोज़िटीव होता हैं। जीवाणुरहित dH_2O में 0.5% सोडियम डीसॉक्सीकोलेट की एक छोटी बूंद में T_1N_1 अगार संवर्धन से एक बड़ी कॉलोनी का मिश्रण करें। इससे 60 सेकंड में, कोशिकाएं विभाजित हो जाती है और लूप से उठाते है, तो DNA (2 से 3 से.मी. तक) स्लाईड पर दिखने लगता है।
- **ऑक्सीडेज प्रतिक्रिया -** एक प्लैटिनम तार (नैक्रोम तार का उपयोग नहीं करें) या वुडेन एप्लिकेटर छड़ी (स्टिक) का उपयोग करके रात भर रखे गए T_1N_1 उपज को ऑक्सीडेज अभिकर्मक (1% एन, एन, एन, एन^1-टेट्रामीथैल-पी-फेनिलेनेडयामाइन 2HCl) के साथ संतृप्त फिल्टर पेपर पर स्थानांतरित करें। यह 10

सेकंड के भीतर विकसित होने वाला गहरा बैंगनी रंग पोज़िटीव जांच वृद्धि का संकेत देता है। *वी.कोलेरे* ऑक्सीडेज पोज़िटीव होता है।

- **सेरोलोजिक एग्लूटिनेशन जांच** -संदिग्ध *वी.कोलेरे* का स्ट्रिंग जांच या सेरोटाइपिंग करने से सीरोटाइप महामारी विज्ञान का महत्वपूर्ण सबूत देता है। सेरोग्रुप ओ1, के दो प्रमुख सीरोटाइप, ओगावा और इनाबा और सेरोग्रुप ओ139 को मानव रोगजनकों के रूप में पहचाना जाता है। ओ1के दो सेरोटाइप (ओगावा और इनाबा) *वी.कोलेरे* और ई1 टोर बायोटाइप में देखे जाते हैं जबकि ओ139 सेरोग्रुप केवल ई1 टोर बायोटाइप में ही देखा जाता हैं ।

  क) प्रत्येक संवर्धन के लिए, कांच के पेट्री डिश के अंदर 1 × 2 से.मी. या 2 × 3 इंच की कांच की स्लाइड पर तीन खंडों (मोम पेंसिल के साथ) को चिह्नित करें जिसके निचले हिस्से पर 0.85 % सलाइन की एक बूंद डालें। एक जीवाणुरहित हस्तांतरण लूप या सुई के साथ, एक खंड में सलाइन में T_1N_1संवर्धन को मिश्रित करें, और दूसरे खंडों के लिए भी दोहराएं। एग्लूटिनेशन के लिए जाँच करें।

  ख) मिश्रित संवर्धन के एक भाग में पॉलीवलेंट *वी.कोलेरे* ओ 1 एंटिसेरम की एक बूंद डालें और एक जीवाणुरहित लूप या सुई से मिश्रित करें। एक अलग भाग में एंटी-ओ 139 की एक बूंद मिलाएं। (तीसरा खंड)

  ग) एक मिनट के लिए मिश्रण को आगे और पीछे हिलाएं और एक गहरे पृष्ठभूमि में निरीक्षण करें। एक पोज़िटीव प्रतिक्रिया स्पष्ट पृष्ठभूमि में तेज, मजबूत एग्लूटिनेशन से व्यक्त किया जाता है।

  घ) यदि पोज़िटीव है, तो ओगावा और इनाबा एंटीसेरा के साथ अलग-अलग से जांच करें। हिकोजिमा सीरोटाइप दोनों एंटीसेरा के साथ प्रतिक्रिया करता है।

क) जैव रासायनिक जांच

वी.कोलेरे उपजातियों की पहचान करने के लिए आवश्यक न्यूनतम विशेषताएं निम्न सारणी में प्रस्तुत है। एक प्रतिशत ट्रिप्टोन में NaCl के मिलाए बिना *वी.कोलेरे* की विकसित होने की क्षमता इसे अन्य सुक्रोज पोज़िटीव विब्रियोज़ से अलग करती है।

सारणी: *वी.कोलेरे* उपस्थिति की पुष्टि के लिए जैव रासायनिक जांच

	जैव रासायनिक जांच	***विशेषताएं***
1.	टी.सी.बी.एस. अगार	चिकनी पीली, 2-3 मि.मी. व्यास की कॉलोनियाँ; पारभासी परिधि और अपारदर्शी केंद्र के साथ थोडी चपटी हुई

2.	ए.जी.एस(AGS)		K/A
3.	ऑक्सिडेस		+
4.	आर्जिनैन डायहैड्रोलेस (Arginine dihydrolase)		-
5.	ऑर्निथीन डीकार्बोक्सिलेस (Ornithine decarboxylase)		+
6.	लाईसिन डीकार्बोक्सिलेज (Lysine decarboxylase)		+
7.	**वृद्धि (w/v)में:**	0% NaCl	+
8.		3% NaCl	+
9.	**42°C पर वृद्धि**		+
10.		सुक्रोस (Sucrose)	+
11.		डी – सेल्लोबयोस (D-Cellobiose)	-
12.	**एसिड:**	लैक्टोस (Lactose	-
13.		एर्राबिनोस (Arabinose)	-
14.		डी – मेन्नोस (D-Mannose)	+
15.		डी – मेन्निटॉल (D-Mannitol)	+
16.		ओ.एन.पी.जी (ONPG)	+
17.		वॉगस – प्रोस्कर (Voges-Proskauer)	V

संदर्भ

कैसनर, सी. ए. और देपौला, जूनियर ए (2004) जीवाणुविज्ञान विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 9, यूएसएफडीए।

****

मत्स्य और मात्स्यिकी उत्पादों से *वी .पेराहीमोलैटीकस* का अलगाव और पहचान

टोम्स सी. जोसफ

विब्रियो पेराहीमोलैटीकस एक घुमावदार, छड़ के आकार का, ग्राम-निगटिव बैक्टेरिया है जो खारे जल के वातावरण में पाया जाता है। जब ये बैक्टेरिया मनुष्य के अंदर जाता है, तो यह मनुष्यों में गैस्ट्रोइंटेस्टाइनल बीमारी का कारण बनता है। *वी. पेराहीमोलैटीकस* ऑक्सीडेज पोज़िटीव है, अवसरवादी एरोबिक है और बीजाणु नहीं बनाता है। यह बैक्टेरिया विब्रियो वंश के अन्य सदस्य की भांति एकल ध्रुवीय फ्लैजेलम से गतिशील होता है। *वी. पेराहीमोलैटीकस* के अधिकांश क्लीनिकल आइसोलेट्स को थर्मोस्टेबल डायरेक्ट हीमोलैसिन (TDH), (कनागावा प्रतिभास) का उत्पादन करने की उनकी क्षमता के कारण पर्यावरणीय उपभेदों से अलग किया जा सकता है।

अलगाव के विधि

विब्रियो की प्रजातियां मुख्य रूप से अवसरवादी अवायवीय हैं और क्षारीय वातावरण में इसका अच्छा विकास होता हैं। बाईल सॉल्ट की अधिकता में इसका उच्च मात्रा का विकास होता है।। खाद्य पदार्थों से *विब्रियो* प्रजातियों के अलगाव के लिए प्रयुक्त क्षारीय पेप्टोन जल का पी.एच. क्षारीय होना उचित है। आमतौर पर क्षारीय पेप्टोन जल *विब्रियो* को अलग करने के लिए उपजाऊ मीडिया के रूप में किया जाता है। *वी. पेराहीमोलैटीकस* के अलगाव और जैव रासायनिक प्रतिक्रियाओं के लिए प्रयुक्त मीडिया में 2% या 3% NaCl होना चाहिए। टी.सी.बी.एस.अगार एक ऐसा मीडियम है, जो खासतौर पर समुद्री खाद्य से *वी.कोलेरे, वी. पेराहीमोलैटीकस* एवं विब्रियो के अन्य प्रजातियों के अलगाव के लिए प्रयुक्त होता है। यह मीडियम अधिकांश गैर-विब्रियोस को बाधित करते हुए *विब्रियो* की अधिकांश प्रजातियों की अच्छी वृद्धि का समर्थन करता है।

उपकरण और सामग्री

1. जैव सुरक्षा कैबिनेट / लामिनार प्रवाह
2. पेट्री डिश
3. माइक्रोपिपेट – 1 मि.ली. और 10 मि.ली. और समान क्षमता के जीवाणुरहित पिपेट टिप्स या ग्लास पिपेट
4. मोर्टार और पेस्टिल या स्टोमकर ब्लेंडर और बैग
5. 35±1 ^{0}C पर रखे हुए इनक्यूबेटर
6. जीवाणुरहित फॉर्सेप्स, कैंची
7. इलेक्ट्रॉनिक तराजु (0.1 ग्राम की संवेदनशीलता)

मीडिया और अभिकर्मक

1. 3% NaCl के साथ क्षारीय पेप्टोन जल(APW)
2. ऑक्सीडेज अभिकर्मक (1% N, N, N, N'-टेट्रामीथाईल-पेरा फिनिलिनडायएमाईन. 2HCl dH2O में)
3. फॉस्फेट बफर्ड सलाइन (पी.बी.एस)
4. थायोसल्फेट सिट्रेट बाईल सलाईन सुक्रोज (टी.सी.बी.एस.) अगार
5. T_1N_1 और T_1N_3अगार (1% ट्रिपटोन और 1% या 3% NaCl)
6. T_1N_0, T_1N_3, T_1N_6, T_1N_8, T_1N_{10} ब्रोथ
7. यूरिया ब्रोथ या क्रिस्टेसेन के यूरिया अगार के साथ मिलाया हुआ NaCl (2%)

क. समुद्री खाद्य के नमूने: समृद्धन, अलगाव और गणना।

1. एक ब्लेंडर या मोर्टार और पेस्टिल में 50 ग्राम समुद्री खाद्य का नमूना (चमडी, गलफड़ और मछली की आंत) लें। शेलफिश के नमूनों के लिए मांस और तरल अवशेष को लिया जा सकता है। आम तौर पर 12 मत्स्य को एकत्र किया जा सकता है और ब्लेंडर या मोर्टार और पेस्टिल में 90 सेकंड के लिए मिश्रित करें। उनमें से विश्लेषण के लिए नमूने के पचास ग्राम लें। झींगा जैसे क्रस्टेशियंस के लिए, यदि संभव हो तो संपूर्ण हिस्से का उपयोग करें; यदि यह बहुत बड़ा है, तो केवल गलफड और आंत सहित केंद्रीय भाग (आंत्रिक हिस्सा) का उपयोग करें।
2. एक जीवाणुरहित 500 मि.ली. फ्लास्क में जीवाणुरहित ब्लेंडर या स्टोमकर ब्लेंडर में 225 मि.ली. क्षारीय पेप्टोनजल के साथ 3% नमक मिलाके नमूना मिश्रित करें और 35 ± 2 °C पर रात भर इंक्युबेट करें।
3. इंक्युबेट किए हुए APW ट्यूबों के ऊपरी भाग से (1 से.मी. तक) 3 मि.मी.लूप के द्वारा टी.सी.बी.एस. (3%) पर तीन उच्चतम डायल्यूशन में स्ट्रीक करें ।
4. रात भर 35±2 °C पर टी.सी.बी.एस. प्लेट को इंक्युबेट करें। *वी. पेराहीमोलैटीकस,* टी.सी.बी.एस. अगार पर गोल, अपारदर्शी, हरे या नीले रंग की कॉलोनियों के रूप में 2 से 3 मि.मी. व्यास के रूप में दिखाई देते हैं। हस्तक्षेपपूर्ण, प्रतिस्पर्धी *वी. अल्जिनोलैटिकस* की कॉलोनियां बड़ी, अपारदर्शी और पीली होती हैं।

ग. स्क्रीनिंग और पुष्टिकरण

1. आइसोलेट्स की जैव रासायनिक पहचान। जब तक अन्यथा निर्दिष्ट नहीं किया जाता है, तब तक इस खंड के सभी मीडिया में 2% या 3% NaCl शामिल होना चाहिए। यहां एपीआई 20 ई डायग्नोस्टिक स्ट्रिप को वैकल्पिक रूप में प्रयुक्त किया जा सकता है। एपीआई 20 ई के लिए 2% NaCl में संदिग्ध संवर्धनों का सेल सस्पेंशन तैयार करें।

3% नमक के साथ ट्रिपल शुगर अयेर्न अगार (TSI + N3)

स्लांट को स्ट्रीक करें, बट्ट को स्टैब करें और रात भर 35±2 °C पर इंक्युबेट करें। *वी. पेराहीमोलैटीकस* एक क्षारीय (लाल) स्लांट और एक एसिड (पीला) बट का उत्पादन करता है, लेकिन कोई H_2S उत्पादन नहीं करता है।

टी.एस.आई. + N3 और T_1N_0 and T_1N_3 का उपयोग करके *वी. पेराहीमोलैटीकस* के संदिग्ध संवर्धन की जांच करें। ट्यूबों को 35 ±2 °C पर 18 - 24 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।

ख) एक सुई के साथ टी.सी.बी.एस. अगार से दो या दो से अधिक संदिग्ध कॉलोनियों को आर्जिनिन ग्लूकोज स्लांट (एजीएस) में स्थानांतरित करें। स्लांट को स्ट्रीक करें, बट्ट को स्टैब करें और 35±2 °C पर रात भर इंक्युबेट करें। *वी. पेराहीमोलैटीकस* एक क्षारीय (बैंगनी) स्लांट और एक एसिड (पीला) बट्ट (आर्जिनिन डाइहाइड्रोलेज़ निगटीव) का उत्पादन करता है, लेकिन ए.जी.एस में कोई गैस या H_2S का उत्पादन नहीं होता है।

ग) टी.एस.बी. एवं टी.एस.ए. स्लांट के लिए दोनों मीडियम को रात भर 35 ±2 °C पर इंनोकुलेट करें। ये संवर्धन ग्राम स्टेन और सूक्ष्मदर्शी जांच के लिए सामग्री एवं अन्य जांच के लिए इनोकुला प्रदान करती हैं। *वी. पेराहीमोलैटीकस* ऑक्सीडेज पोज़िटीव, ग्राम-निगटीव, बहु - रूपी जीव हैं, जो पोलार फ्लैजेल्ला के साथ घुमावदार या सीधी रॉड के आकार का होता है।

घ) मोटिलिटी मीडियम में लगभग 5 से.मी. की गहराई तक स्टैब करें तथा 35 ±2 °C पर रात भर इंक्युबेट करें। स्टैब की रेखा के चारों ओर एक गोलाकार फैलाव होना पोज़िटीव जांच की पुष्टि देता है । *वी. पेराहीमोलैटीकस* मोटाइल है।

ङ) *वी. पेराहीमोलैटीकस* केवल T_1N_3 में बढ़ेगा लेकिन T_1N_0 में नहीं। केवल नमक की आवश्यकता वाले संवर्धनों को आगे की जांच करने की आवश्यकता है। केवल मोटाइल, ग्राम-निगटीव रॉड जो ए.जी.एस. पर एक एसिड बट और एक क्षारीय स्लांट पैदा करते हैं, H_2S या गैस का निर्माण नहीं करते और इसे नमक की आवश्यकता होती है, उनकी आगे की जांच के लिए आवश्यकता है।

च) *वी. पेराहीमोलैटीकस* की पहचान की विशेषताएँ सारणी में प्रस्तुत की गई हैं। जैव रासायनिक रूप से, *वी. पेराहीमोलैटीकस* और *वी. वल्निफिकस* रूप से समान हैं, लेकिन इन्हें ओ.एन.पी.जी., नमक-सहिष्णुता, सेलोबयोस और लैक्टोज प्रतिक्रियाओं (सारणी) के अंतर से अलग किया जा सकता है। चयनित जैव रासायनिक लक्षणों का उपयोग करके, *वी. पेराहीमोलैटीकस* और *वी. वल्निफिकस* को सबसे अधिक दखल देने वाले समुद्री विब्रियोस और अन्य समुद्री सूक्ष्मजीवों से अलग किया जा सकता है।

सभी *वी. पेराहीमोलैटीकस* आइसोलेट्स को यूरिएस की उपस्थिति के लिए जांच किया जाना चाहिए, या तो 2% NaCl के साथ पूरक यूरिया ब्रोथ का उपयोग करके या क्रिस्टेंसन के यूरिया अगार NaCl के साथ पूरक, 2% अंतिम सांद्रण से या एपीआई 20 ई का उपयोग करके भी जांच कर सकते है। यूरिएस उत्पादन tdh और / या trh जीन की उपस्थिति के साथ सहसंबद्ध है। संभावित रोगजनक उपभेदों (स्ट्रेन) के लिए यूरिएस प्रतिक्रिया एक महत्वपूर्ण जांच है।

यूरिया ब्रोथ -3% NaCl को संवर्धन के भारी इनोकुलम के साथ इनोकुलेट करें या क्रिस्टेंसन-यूरिया-NaCl अगार प्लेट या स्लांट की सतह में संवर्धन को स्पॉट करें। इसे 35 ±2 °C पर 18-24 घंटे के लिए इंक्युबेट करें। यूरिएस का उत्पादन माध्यम के गुलाबी (क्षारीय) रंग द्वारा निर्धारित किया जाता है। निगटिव संवर्धनों को दुर्लभ, धीमी गति से यूरिया उत्पादन करने के लिए अतिरिक्त 24 घंटे इंक्युबेट करें।

***विब्रियो पेराहीमोलिट्कस* की जैव रासायनिक पहचान**

	जांच / प्रतिक्रिया	***Vibrio parahaemolyticus***
1.	टी.सी.बी.एस.अगार (agar)	हरे / नीले रंग के साथ हरे / हरे नीले केंद्र से युक्त 3 - 5 मि.मी. कालोनियां
2.	टीएसाईए एवं केआईए (TSIA & KIA)	क्षारीय (लाल) स्लांट एवं एसिड (पीला) बट्ट. कोई H_2S नहीं
3.	एजीएस (AGS)	क्षारीय (बैंगनी) स्लांट एवं एसिड (पीला) बट्ट.कोई H_2S नहीं
4.	ग्राम स्टेन एवं मोटिलिटी	ग्राम निगटिव छोटा और घूमावदार रॉड, मोटाइल
5.	कैटलेज़ (Catalase)	+
6.	ऑक्सिडेस (Oxidase)	+
7.	आर्जिनिन डायहैड्रोलेस (Arginine dihydrolase)	−
8.	ऑर्निथैन डीकार्बोक्सिलेस (Ornithine decarboxylase)	+
9.	लैसिन डीकार्बोक्सिलेस (Lysine decarboxylase)	+
10.	वृद्धि (w/v): 0% NaCl	−
11.	3% NaCl	+
12.	6% NaCl	+
13.	8% NaCl	+

14.		10% NaCl	−
15.	42°C में वृद्धि		+
16.	एसिड:	सुक्रोस (Sucrose)	−
17.		डी – सेल्लोबयोस (D-Cellobiose)	V
18.		लैक्टोस (Lactose)	−
19.		अरबिनोस (Arabinose)	+
20.		डी – मन्नोस (D-Mannose)	+
21.		डी – मन्निटॉल (D-Mannitol)	+
22.		ओएनपीजी (ONPG)	−
23.		वॉग्स -प्रोस्कौर (Voges-Proskauer)	−
24.	संवेदनशील :	10 µg O/129	R
25.		150 µg O/129	S
26.		जेलाटिनेस (Gelatinase)	+
27.		यूरिएस (Urease)	V

संदर्भ

जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल, 8 वां संस्करण, संशोधन ए, 1998।

****

समुद्री खाद्य से *लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स* का अलगाव और पहचान

रेणुका वी

लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स एक ग्राम-पोज़िटीव, साइकोट्रॉफ़िक विशेषताओं के साथ कैटलेज़, गतिशील, फाकल्टेटीव अवायवीय बैक्टेरिया है। यह लिस्टेरियोसिस का प्रेरक एजेंट है, उच्च अस्पताल में भर्ती होने और घातक दर के साथ एक गंभीर बीमारी है। यह समुद्री खाद्य संस्थाओं के समुद्री खाद्य संपर्क सतहों में बायोफिल्म बनाने की क्षमता रखता है। लिस्टेरिया वंश के प्रमुख 6 निम्नलिखित प्रजातियां होते है:

- *लिस्टेरिया मोनोसैटोजेंस (Listeria monocytogenes)*
- *लिस्टेरिया इवानोवी (Listeria ivanovii)*
- *लिस्टेरिया इनोकुआ (Listeria innocua)*
- *लिस्टेरिया वेल्शिमेरी (Listeria welshimeri)*
- *लिस्टेरिया सीलिगेरी (Listeria seeligeri)*
- *लिस्टेरिया ग्रेयी (Listeria grayi)*

नमूना उपचार (रखरखाव):

ताजा समुद्री खाद्य के नमूनों को 4 ^{o}C पर संग्रहीत किया जाना चाहिए। हालांकि, जमे हुए नमूनों को विश्लेषण तक पिघलना नहीं चाहिए।

पूर्व – समृद्धन एवं समृद्धन

बी.एल.ई.बी. ब्रोथ के 225 मि.ली. (Buffered Listeria Enrichment Broth) में 25 ग्राम के समुद्री खाद्य नमूने को ब्लेंड करें और 4 घंटे के लिए 30 ^{o}C पर इंक्युबेट करें है। बी.एल.ई.बी. में चयनात्मक एजेंट के रूप में कीटाणुरहित तरीके से, 10 मि.ग्रा. / लि एक्रिफ्लेविन, 40 मि.ग्रा. / लि सैक्लोहेक्सीमैड और 50 मि.ग्रा. / लि सोडियम नालिडिक्सिक एसिड मिलाएं और 48 घंटों तक इंक्युबेट करें।

अलगाव की प्रक्रिया

बी.एल.ई.बी. समृद्धन को 2 अलग-अलग बेस अगार पर स्ट्रीक करें

- एस्कुलिन आधारित *लिस्टेरिया* चयनात्मक अगार
- क्रोमोजेनिक आधारित अगार

एस्कुलिन आधारित चयनात्मक अगार

1. ऑक्सफोर्ड अगार (OXA) / संशोधित ऑक्सफोर्ड आगर (MOX)

बी.एल.ई.बी. ब्रोथ नमूने को OXA अगार / MOX अगार में स्ट्रीक करें और 35 °C पर 24 घंटों के इंक्युबेट करें। कॉलोनियां 1 मि.मी. व्यास वाली काले प्रभामंडल से घिरे कोरे (grey) से काले कॉलोनियां है। अडतालीस घंटों के इंक्युबेशन के बाद काली कॉलोनियां लगभग 2-3 मि.मी. व्यासवाली धंसी हुई काले प्रभामंडल से युक्त हो जाती है।

2. एस्कुलिन और Fe3 + के साथ समृद्धन किए हुए एल.पी.एम

इंक्युबेशन तापमान (24 घंटे के लिए 30 °C) के अलावा लिस्टेरिया प्रजातियों की कॉलोनियां ऑक्सफ़ोर्ड अगार के समान होता हैं।

3. PALCAM अगार

प्लेट की पृष्ठभूमि का रंग लाल होने के अलावा लिस्टेरिया प्रजाति की कॉलोनियां की इंक्युबेशन की स्थिति और उपस्थिति ऑक्सफ़ोर्ड अगार के समान होती हैं।

क्रोमोजेनिक आधारित अगार

1. आर एंड एफ लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स क्रोमोजेनिक प्लेटिंग मीडियम (R&F LMCPM)

इसको 35 °C पर 24 घंटों के इंक्युबेशन करने के बाद, *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल. इवानोवी* 1-3 मि.मी. व्यास वाली, चिकनी, उत्तल, नीले / हरे रंग की कॉलोनी और छोटे नीले / हरे प्रभामंडल का उत्पादन करते हैं। अन्य सभी लिस्टेरिया प्रजातियां 1-2 मि.मी., चिकनी, उत्तल सफेद कॉलोनी का निर्माण करती हैं, जिसमें कोई प्रभामंडल नहीं होता है।

2. RAPID L. (त्वरित) मोनो अगार

इसको 35 °C पर 24 घंटों के इंक्युबेशन करने के बाद, *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल. इवानोवी* 1 - 3 मि.मी. व्यास वाली, चिकनी, उत्तल, नीले / हरे रंग की कॉलोनी का उत्पादन करते हैं। विशिष्ट कॉलोनियां RAPID L. मोनो एकल संवर्धन की लाल पृष्ठभूमि में गहरे नीले / हरे रंग दिखाई देती हैं।

3. Ottaviani (ऑट्टावियानी) और Agosti (अगोस्ती) (ALOA) या Oxoid Chromogenic *Listeria* अगार (ऑक्सोइड क्रोमोजेनिक लिस्टेरिया) (OCLA) के अनुसार लिस्टेरिया अगार

इसमें 35 °C पर 24 घंटों के इंक्युबेशन करने के बाद,सभी लिस्टेरिया प्रजातियां 1-3 मि.मी. व्यास वाली नीली / हरी कॉलोनियों के रूप में दिखाई देती हैं। इसके अतिरिक्त, *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल. इवानोवी* की कॉलोनी के आसपास एक अपारदर्शी सफेद प्रभामंडल होता है।

4. क्रोम लिस्टेरिया अगार

पृष्ठभूमि की प्लेट का रंग हल्का नीला होने के अलावा लिस्टेरिया कॉलोनियों की इंक्युबेशन की स्थिति और उपस्थिति ALOA के समान होता हैं।

R & F LMCPM और **RAPID** ***'एल. मोनोसाइटोजेन्स*** **अगार,** क्रोमोजेन अगार आधारित विधि है, जिसमें *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल. इवानोवी* में फोस्फेटीडाइलइनोसिटोल-विशिष्ट फोस्फोलाइपज़- सी (PI-PLC) की गतिविधि के कारण नीला-हरा दिखाई देता है जबकि अन्य सभी लिस्टेरिया प्रजातियों की कॉलोनियां नीले-हरे रंग का विकास नहीं करेगा अर्थात सफेद रंग में दिखाई देती है।

ALOA और **CHROMagar** के स्थिति में, सभी प्रजातियां नीली-हरी कॉलोनियों के रूप में दिखाई देता हैं। *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल. इवानोवी* को कॉलोनी के आसपास के अतिरिक्त अपारदर्शी सफेद प्रभामंडल के साथ नीली-हरी कॉलोनियों द्वारा निर्धारित किया जाता है।

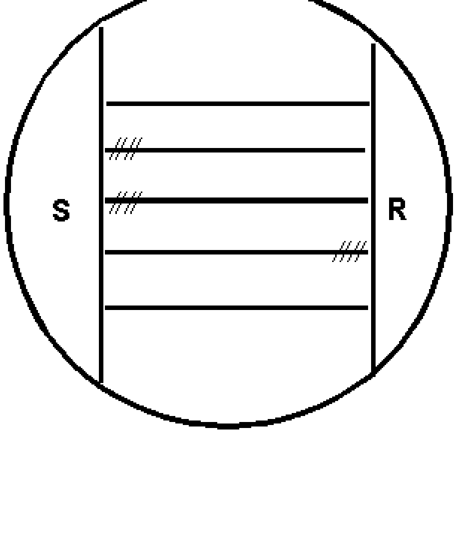
पहचान की प्रक्रिया

1. प्रत्येक एस्कुलीन आधारित अगार से 5 विशिष्ट कालोनियों का चयन करें और 0.6% यीस्ट एक्स्ट्राक्ट वाले (TSAYE) के साथ ट्रिप्टीकेस सोय अगार पर स्ट्रीक करें और 24 - 48 घंटे के लिए 30 °C पर प्लेटों को इंक्युबेट करें। विशिष्ट कालोनियाँ 1-3 मि.मी. व्यास वाली चिकनी उत्तल श्वेत कॉलनियां हैं।
2. एस्कुलिन आधारित अगार या क्रोमोजेनिक आधारित अगार से अलग की गई कॉलोनियों को 5% भेड़ की रक्त से बनी अगार प्लेट में स्टैब करें और 24 - 48 घंटे के लिए 35 °C पर इंक्युबेट करें।

हेमोलिसिस जांच

एल. मोनोसाइटोजेन्स बीटा हैमोलाइटिक प्रतिक्रिया देता है। अलग किए गए कॉलोनियों को प्लेटों में 5% भेड़ के रक्त से युक्त अगार पर स्टैब करके इनोकुलेट करें। प्लेट तल पर 20-25 स्थानों का ग्रिड बनाएं। प्रति ग्रिड जगह में प्रत्येक संवर्धन को स्टैब करें।अगार परत के नीचे और वहां छुए बिना स्टैबिंग करना चाहिए। प्लेटों को 35°C पर 24-48 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।*एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल.सेलीगेरी* स्टैब के चारों ओर एक हल्का साफ क्षेत्र दिखाई देगा। *एल.इनोक्युआ* हेमोलिसिस नहीं करता है, जबकि *एल. इवानोवी* स्टैब के आसपास एक अच्छी तरह से स्पष्ट क्षेत्र का उत्पादन करता है। यदि मिश्रित संवर्धन TSAYE प्लेट पर दिखता है, तो अलग किए हुए कॉलोनी के साथ हेमोलिसिस की पुन: जांच करें।

क्रिस्टी-एटकिंस-मंच-पीटरसन (CAMP) जांच



CAMP जांच 5% भेड़ रक्त अगार का उपयोग करके किया जाता है। *स्टैफिलोकोकस ऑरियस* (*Staphylococcus aureus*) (एफडीए स्ट्रेन एटीसीसी 49444 या एटीसीसी 25923) और रोडोकोकस इक्वी (*Rhodococcus equi*)

(एटीसीसी 6939) के स्ट्रेन भेड़ की रक्त अगार प्लेट पर सीधा लटके होते हैं। इस जांच में *लिस्टेरिया* प्रजाति के स्ट्रेन को *एस.ऑरियस* और *आर. इक्वी* के बीच बिना छुए समानांतर रेखा में स्ट्रीक करें। (चित्र 1 CAMP प्लेट पर संवर्धन स्ट्रीक की विधि को दिखाया गया है)। CAMP प्लेट को 35 °C पर 24 - 48 घंटे के लिए इंक्युबेट करें। *एस.ऑरियस* स्ट्रीक के पास *एल. मोनोसाइटोजेन्स* और *एल.सेलीगेरी* के हेमोलिसिस की प्रक्रिया अधिक दिखती है जबकि*एल. इवानोवी* के हेमोलिसिस *आर. इक्वी* स्ट्रीक के पास अधिक पायी जाती है।

लिस्टेरिया की जैवरासायनिक जांच

ग्राम स्टेनिंग	ग्राम पोज़िटीव शोर्ट रॉड्स
मोटिलिटी	मोटाईल
मीथैल रेड जांच	पोज़िटीव
वोग़्स प्रोस्कौर जांच	पोज़िटीव
यूरीएस जांच	निगटिव
कैटलेज़जांच	पोज़िटीव(O_2 गैस धीरे से उत्पन्न होता है, इसलिए सूक्ष्मदर्शी से निरीक्षण करें)
साईटोक्रोम ऑक्सिडेस जांच	निगटिव
एस्कुलिन हाईड्रॉलैसिस	पोज़िटीव
ग्लूकोज़ से एसिड	पोज़िटीव (केवल एसिड. कोई गैस का उत्पादन नहीं)
सालिसिन से एसिड	पोज़िटीव

मोटिलिटी जांच

बी.एच.आई ब्रोथ में इनोकुलेट करें और 28 ± 2 ^{O}C पर इंक्युबेट करें। एक सूक्ष्मदर्शीय स्लाइड पर संवर्धन की एक बूंद लें और से अंधेरे में उच्च शक्तिवाले (40X) सूक्ष्मदर्शी से निरीक्षण करें। लिस्टेरिया की मोटिलिटी लुढकते हुए दिखाई देता है।

वैकल्पिक रूप से, प्रकल्पित लिस्टेरिया संवर्धन को अम्ब्रेला मॉटिलिटी मीडियम में स्टैब करके 36 - 48 घंटे के लिए 25 - 30 ^{O}C पर इंक्युबेट करें। लिस्टेरिया एक छाते जैसे विकास को दिखाता है।

लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स की पुष्टि के लिए जांच

नाइट्रेट रिडक्शन जांच	निगटिव
डी-मैंन्निटॉल से एसिड	निगटिव
एल-रैम्नोस से एसिड	पोज़िटीव

डी-क्सैलोस से एसिड निगटिव

अल्फा मिथाइल-डी-मेन्नो-पैरानोसैड से एसिड पोज़िटीव

रक्त अगार पर बीटा - हेमोलैसिस पोज़िटीव

लिस्टेरिया प्रजातियों में विभेदन (differenciation)

प्रजाति	मैनिटॉल	रैम्नोस	क्सैलोस	विरुलेंस	β-हेमोलिसिस	एस.ऑरियस के साथ हेमोलिसिस	रोडोकोक्कस के साथ हेमोलिसिस समृद्धन
एल. मोनोसाइटोजेन्स	-	+	-	+	+	+	-
एल. इवानोवी	-	-	+	+	+	-	+
एल. इनोक्युआ	-	V	-	-	-	-	-
एल. वेल्शिमेरी	-	V	+	-	-	-	-
एल. सेलिगेरी	-	-	+	-	+	+	-
एल. ग्रेयी	+	V	-	-	-		

- **V – परिवर्तनशील प्रतिक्रिया (Variable reaction)**

<u>सूक्ष्मजीवविज्ञानीय मीडिया</u>

बफर्ड लिस्टेरिया समृद्धन ब्रोथ (बी.एल.ई.बी.*)*

ट्रिप्टिकेस सोय ब्रोथ	30 ग्राम
यीस्ट एक्स्ट्राक्ट	6 ग्राम
मोनोपोटास्यम फोस्फेट (अन्हैड्रस)	1.35 ग्राम/लीटर
डायसोडियम फोस्फेट (अन्हैड्रस)	9.6 ग्राम/लीटर
सोडियम पैरुवेट (सोडियम सॉल्ट)	1.11 ग्राम/लीटर
आसुत जल	1 लीटर
अंतिम पी.एच.	7.3 ± 0.1

टिप्पणी: वैकल्पिक रूप से एक फ़िल्टर-स्टेरिलाइज़्ड 10% (w / v) सोडियम पाइरूवेट घोल को आटोक्लेविंग (11.1मि.लि. / ली) के बाद मिलाया जा सकता है।

ऑक्स्फॉर्ड अगार (OXA)

कॉलम्बिया रक्त अगार आधार	39.0 ग्राम
एस्कुलिन	1.0 ग्राम
फेरिक अम्मोनियम सिट्रेट	0.5 ग्राम
लिथियम क्लॉरैड	15.0 ग्राम
सैक्लोहेक्सिमैड	0.4 ग्राम
कॉलिस्टिन सल्फेट	0.02 ग्राम
अक्रिफ्लेविन	0.005 ग्राम
सेफोटेटान	0.002 ग्राम
फोस्फोमैसिन	0.010 ग्राम
शुद्ध जल	1 लीटर

संशोधित ऑक्स्फोर्ड अगार (एमओएक्स अगार)

कॉलम्बिया रक्त अगार आधार (ब्रांड पर निर्भर)	39.0-44.0 ग्राम
अगार	2.0 ग्राम
एस्कुलिन	1.0 ग्राम
फेरिक अम्मोनियम सिट्रेट	0.5 ग्राम
लिथियम क्लोराइड (सिग्मा एल0505 गुणवत्ता एवं ततुल्य)	15.0 ग्राम
बफर्ड कॉलिस्टिन मीथैन सल्फोनेट (1 % w/v) घोल	1.0 मि.ली.
आसुत जल	1.0 लीटर
पी.एच.(pH)	7.2± 0.1

एस्कुलिन एवं $Fe3^{+}$से समंद्धन किया हुआ LPM

फिनाइलाइथेनोल अगार (Difco)	35.5 ग्राम
ग्लैसिन अन्हैड्रिड (टिप्पणी: ग्लैसिन)	10 ग्राम

लिथियम क्लोरैड	5 ग्राम
मोक्सालाक्टम भंडारण घोल, फोस्फेट बफेरमें 1% , पी.एच.6.0	2 मि.ली.
आसुत जल	1 लीटर
एस्कुलिन	1.0 ग्राम
फेरिक अमोनियम सिट्रेट	0.5 ग्राम

PALCAM अगार

पेप्टोन	23 ग्राम
स्टार्च	1 ग्राम
NaCl	5 ग्राम
कोलम्बिया अगार	13 ग्राम
मन्निटॉल	10 ग्राम
फेरिक अमोनियम सिट्रेट	0.5 ग्राम
एस्कुलिन (aesculin)	0.8 ग्राम
डेक्स्ट्रोस (ग्लूकोज़)	0.5 ग्राम
लिथियम क्लोरैड	15.0 ग्राम
फिनोल रेड	0.08 ग्राम
आसुत जल	1000 मि.ली.
पी.एच. (pH)	7.2 ± 0.1

चयनात्मक अभिकरण

पॉलिमैक्सिन बी सल्फेट	10 मिग्रा
एक्रिफ्लेविन	5 मिग्रा
सेफ्टाज़ैडीन	20 मिग्रा
आसुत जल	2 मि.ली.

R&F *Listeria monocytogenes* क्रोमोजेनिक प्लेटिंग माध्यम (R&F LMCPM) – वाणिज्यिक रूप से उपलब्ध

RAPID एल. मोनो अगार

पेप्टॉन	30 ग्राम
मीट एक्स्ट्राक्ट	5 ग्राम
यीस्ट एक्स्ट्राक्ट	1 ग्राम
लिथियम क्लोरॉड	9 ग्राम
चयनात्मक परिशिष्ट	20 मि.ली.
डी-क्सैलोस	10 ग्राम
फिनोल लाल	0.12 ग्राम
अगार आधार	13 ग्राम
क्रोमोजेनिक सबस्ट्रेट	1 मि.ली.
शुद्ध जल	1000 मि.ली.
पी.एच. (pH)	7.3 ± 0.1

Ottaviani और Agosti (ALOA) या Oxoid Chromogenic Listeria अगार (OCLA) के अनुसार अगर लिस्टेरिया

मांस पेप्टोन	18 ग्राम
ट्रिप्टॉन	6 ग्राम
यीस्ट एक्स्ट्राक्ट	10 ग्राम
सोडियम पैरुवेट	2 ग्राम
ग्लूकोज़	2 ग्राम
मैग्नेश्यम ग्लैसेरोफॉस्फेट	1 ग्राम
मैग्नेश्यम सल्फेट	0.5 ग्राम
सोडियम क्लोरैड	5 ग्राम

लिथियम क्लोरैड	10 ग्राम
डैसोडियम हैड्रोजेन फोस्फेट आनहैड्रस	2.5 ग्राम
5-ब्रोमो-4-क्लोरो-3-इंडोलिल-β-डी-ग्लुकोपैरानोसैड	0.05 ग्राम
अगार, जमाना शक्ति के अनुसार	12 ग्राम से 18 ग्राम
जल, कवकनाशक पूरक की मात्रा के अनुसार	925-930 मि.ली.
पी.एच. (pH)	7.2 ± 0.2.

0.6% यीस्ट एक्स्ट्राक्ट से युक्त ट्रिप्टिकेस सोय अगार (TSAYE)

ट्रिप्टिकेस सोय अगार	40 ग्राम
यीस्ट एक्स्ट्राक्ट	6 ग्राम
आसुत जल	1 लीटर
पी.एच. (pH)	7.3 ± 0.2

संदर्भ

हिचिंस, ए. डी., जिनमैन, के और चेन, वाई (2017)। खाद्य पदार्थों और पर्यावरण नमूनों में लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स का पता लगाना, और खाद्य पदार्थों से लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स की गणना। जीवाणुविज्ञान विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 10।

****

यीस्ट और मोल्ड्स की गणना

टोम्स सी. जोसफ

वे कवक जो बहुकोशिकीय फिलामेंट्स से बने होते हैं, उन्हें मोल्ड्स कहा जाता है जबकि यीस्ट ऐसे कवक है जो एकल-कोशिका से बने होते हैं। अधिकांश मोल्ड्स एवं यीस्ट एरोबिक हैं जो 2 और 9 के बीच पी.एच.के स्थिति में जीवित रह सकते हैं। मोल्ड्स उन खाद्य पदार्थों में विकसित हो सकते हैं जैसे कम नमीवाली सूखी मछली (0.85 या उससे कम जल गतिविधि (a_w)), जबकि यीस्ट को विकास के लिए उच्च जल गतिविधि की आवश्यकता होती है। यीस्ट और मोल्ड्स के विकास में गुणवत्ता में कमी हो सकती है और इसके परिणाम स्वरूप प्रसंस्करकों और उपभोक्ताओं को बडा आर्थिक नुकसान हो सकता है। मछली में मोल्ड्स का विकास विभिन्न आकारों और विरंजीकृत, सफेद कपास जैसे या रंगीन मायसेलियम के रूप में प्रकट होगा। मत्स्य और मत्स्य उत्पाद कवक से मुक्त होते हैं, लेकिन इसका होना या न होना माइकोलॉजिकल जांच के बाद ही निर्धारित किया जा सकते हैं।

खाद्य पदार्थों के कई मोल्ड्स और यीस्ट, मानव या पशु स्वास्थ्य के लिए भी हानिकारक हो सकते हैं क्योंकि उनमें से कई में मायकोटॉक्सिन के रूप में जाने वाले विषाक्त चयापचयों का उत्पादन करने की क्षमता होती है। हालांकि जो जीव विष का उत्पादन करते हैं वे खाद्य प्रसंस्करण द्वारा या खाना पकाने के दौरान मारे जा सकते हैं, अधिकांश मायकोटॉक्सिन स्थिर यौगिक हैं जो गर्मी से नष्ट नहीं होते हैं। कुछ खाद्य पदार्थों के मोल्ड्सऔर यीस्ट एलर्जी का कारण हो सकते हैं।अधिकांश कवक गैर-संक्रामक होते हैं, लेकिन प्रजातियों में से कुछ वृद्ध आबादी, एचआईवी संक्रमित व्यक्तियों और कीमोथेरेपी वाले व्यक्तियों में संक्रमण का कारण बन सकते हैं।

आमतौर पर जीवाणुरोधी विकास को बाधित करने के लिए एंटीबायोटिक्स माइकोलॉजिकल मीडिया (मोल्ड्स और यीस्ट की वृद्धि के लिए इस्तेमाल किया जाने वाला मीडिया) में मिलाए जाते है। क्लोरैमफेनिकॉल सबसे अधिक इस्तेमाल किया जाने वाला एंटीबायोटिक है क्योंकि यह आटोक्लेव स्थितियों में भी स्थिर है। इस एंटीबायोटिक मीडियम की अनुशंसित मात्रा 100 मि.ग्राम / लीटर है। शुद्ध जल के 40 मि.ली. में 0.1 ग्राम क्लोरैमफेनिकॉल को मिलाके स्टॉक मिश्रण तैयार करें। इस मिश्रण को आटोक्लेविंग से पहले 960 मि.ली. मीडियम मिश्रण में मिलाएं।

सैम्प्लिंग और नमूना समरूपता की तैयारी

- जीवाणुमुक्त तरीके से जीवाणूरहित नमूना डिश में 50 ग्राम मछली लें।
- इसे स्टोमकर बैग में स्थानांतरित करें और 450 मि.ली.जीवाणुरहित डायल्यूएंट (0.1% पेप्टोन जल) डालें और 2 मिनट के लिए स्टोमकर में ब्लेंड करें। यह 10^{-1}डायल्यूशन कहलाता है। वैकल्पिक रूप से, मोर्टार और पेस्टिल का इस्तेमाल नमूने को समरूप बनाने के लिए किया जा सकता है।

- अलग जीवाणुमुक्त पिपेट का उपयोग करके, ऊपर के 10^{-1} डायल्यूशन से 10 मि.ली. को 90 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट में स्थानांतरित करें। यह 10^{-2} डायल्यूशन कहलाता हैं।
- फिर उपरोक्त 10^{-2} डायल्यूशन से 10 मि.ली. को 90 मि.ली. जीवाणुरहित डायल्यूएंट में स्थानांतरित करें और अच्छी तरह से मिलाएं। यह 10^{-3} डायल्यूशन कहलाता हैं।
- इसी तरह नमूने में अनुमानित सूक्ष्मजैविक मात्रा के आधार पर आगे के डायल्यूशन (10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} आदि) तैयार करें।

नमूने का प्लेटिंग और इंक्युबेशन

➢ स्प्रेड प्लेट विधि

प्रत्येक डायल्यूशन से 0.1 मि.ली. जीवाणुमुक्त तरीके से ट्रिपल डी.आर.बी.सी. अगार प्लेटों पर पिपेट करें और इनोकुलम को एक जीवाणूमुक्त, कांच की छड़ से फैलाएं। जब विश्लेषण किए गए नमूने की जल गतिविधि 0.95 से कम होती है, तो DG18 मीडिया को प्राथमिकता दी जाती है।

➢ पोर प्लेट विधि

प्रत्येक डायल्यूशन की एक मि.ली. जीवाणुमुक्त पेट्री प्लेटों पर पिपेट करें और अच्छे से उबाले हुए DG18 अगार को 45 °C पर लाएं जिसमें से 20 - 25 मि.ली. प्लेट में डालें। डिश के ढक्कन पर टपकने से बचने के लिए संभालते हुए धीरे-धीरे प्लेटों को घुमाकर सामग्री मिलाएं, फिर वामावर्त करें। प्रत्येक डायल्यूशन को तीन प्रतियों में प्लेट किया जा सकता है।

यीस्ट और मोल्ड्स की गणना के लिए, स्प्रेड प्लेटिंग़ को पोर प्लेट विधि से बेहतर माना जाता है। नीचे के तुलना में कवक की कॉलनियों की विकास सतह की ऊपर तेज़ी से होता है जिसके कारण सतह के नीचे की कॉलोनियां स्पष्ट रूप से दिखाई नहीं देती हैं। डी.आर.बी.सी. अगार का उपयोग केवल स्प्रेड प्लेटों के लिए किया जाना चाहिए। प्लेट को 25° C पर अंधेरे में इंक्युबेट करें। प्लेटों को उल्टा न करें और गिनती करने तक प्लेटों को न हिलाएं।

प्लेट की गिनती

कॉलोनियों की गिनती इंक्युबेशन के 5 दिनों के बाद करें। पांच दिनों में वृद्धि नहीं होने पर, पुन: 48 घंटे के लिए इंक्युबेट करें। इंक्युबेशन अवधि से पहले कॉलोनियों की गणना के बाद भी बीजाणु से माध्यमिक विकास हो सकता है जो निकाला जाएगा और इस तरह अंतिम गणना अमान्य हो सकती है। ऐसे प्लेटों की गिनती करें जिसमें 10 - 150 कॉलोनियों उपस्थित हो। ट्रिपल प्लेटों की औसत गणना ली जा सकती है और परिणाम कॉलोनी बनाने वाली इकाइयों CFU / g में व्यक्त की जा सकते हैं। मोल्ड्स और यीस्ट की गणना को सबसे कम डायल्यूशन के 1 गुना से कम बताया जा सकता है, जब सभी डायल्यूशन की प्लेटों में कोई कॉलोनियां नहीं होती हैं।

मीडिया

डायक्लोरन 18%ग्लिसरोल (DG18) अगार

अभिकर्मक	**मात्रा**
ग्लूकोज़	10.0 ग्राम
पेप्टोन	5.0ग्राम
KH_2PO_4	1.0 ग्राम
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 ग्राम
डायक्लोरन (एथनॉल में 2,6-डायक्लोरो -4-नैट्रोअनिलीन) मिश्रण (0.2% (w/v))	1.0 मि.ली.
क्लोरैमफेनिकॉल	0.1 ग्राम
अगार	15.0 ग्राम
शुद्ध जल	800 मि.ली.

अगार को घुलने के लिए उबलते वाटरबाथ में उपरोक्त सभी चीज़ों को मिश्रित और गर्म किया जाता है। फिर शुद्ध जल के साथ 1000 मि.ली. मात्रा तक लाएं। ग्लिसरोल की 220 ग्राम (विश्लेषणात्मक अभिकर्मक ग्रेड) मिलाने के बाद 15 मिनट के लिए 121 °C पर ऑटोक्लेविंग द्वारा जीवाणुरहित किया जाएं। मीडियम को 45 °C तक ठंडा करें और प्लेट को जीवाणुमुक्त तरीके से पोर (pour) करें। इस मीडियम का जल गतिविधि (a_w) 0.955 है।

DG18 अगार को मोल्ड्स की गणना के लिए उपयोग किया जाता है और इसे तब किया जाता है जब विश्लेषण किए गए भोजन का a_w 0.95 से कम हो। मीडियम में कम पानी होने से बैक्टेरिया और तेजी से बढ़ती कवक का हस्तक्षेप कम हो जाता है। जब यीस्ट और मोल्ड्स दोनों की गणना करनी होती है, तो डी.आर.बी.सी. अगार का उपयोग किया जाना चाहिए।

डायक्लोरन रोस बंगाल क्लोरैमफेनिकॉल (DRBC) अगार

अभिकर्मक	**मात्रा**
ग्लूकोज़	10.0 ग्राम
बाक्टीरियोलोजिकल पेप्टॉन	5.0 ग्राम
KH_2PO_4	1.0 ग्राम
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5 ग्राम
रोस बंगाल (5% जलीयघोल, w/v)	0.5 मि.ली.
डायक्लोरन (एथनॉल में 0.2% w/v)	1.0 मि.ली.

अभिकर्मक	**मात्रा**
क्लोरैमफेनिकोल	0.1 ग्राम
अगार	15.0 ग्राम
शुद्ध जल	1.0 लीटर

पी.एच. (pH) = 5.6

सामग्री को मिश्रित करें, अगार को घुलने हेतु गरम करें और 15 मिनट के लिए 121 °C पर ऑटोक्लेव द्वारा जीवाणुमुक्त करें। एक वाटरबैथ में 45 °C तक ठंडा करें और प्लेटों में पोर (pour) करें।

DRBC अगार में डायक्लोरन और रॉस बंगाल की उपस्थिति तेजी से बढ़ने वाली कवक के विकास को कम कर देता है और चूंकि प्रभावी ढंग से जोड़ा गया है, अत: इसे विशेष रूप से "स्प्रेडर" मोल्ड्स (जैसे *Mucor, Rhizopus*, आदि) के नमूनों का विश्लेषण करने के लिए उपयोग किया जाता है, आसानी से अन्य यीस्ट और मोल्ड्सप्रजनक का पता लगाने की अनुमति देता है, जिनकी विकास दर कम होती है।

रोस बंगाल से युक्त मीडिया प्रकाश-संवेदनशील होते हैं; प्रकाश के अपेक्षाकृत कम संपर्क के परिणाम स्वरूप निरोधात्मक यौगिकों का निर्माण होता है। इन मीडिया को इस्तेमाल होने तक अंधेरे से युक्त ठंडी जगह पर रखें। डी.आर.बी.सी. अगार का उपयोग केवल स्प्रेड प्लेटों के लिए किया जाना चाहिए।

संदर्भ

टूर्नस, वी., स्टैक, एम. ई., मिस्लीवेक, पी. बी., कोच, एच, ए और बैंडलर, आर (2001)। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 18, यूएसएफडीए।

सुरेंद्रन, पी.के., थमपुरन, एन., नंबियार, वी. एन., ललिता, के.वी. और जोसेफ, टी. सी., 2013, *समुद्री खाद्य की सूक्ष्मजीवविज्ञानी परीक्षा के लिए प्रयोगशाला तकनीक*। चौथा संस्करण, केंद्रीय मात्स्यिकी प्रौद्योगिकी संस्थान, कोचीन -682029, भारत. 117-120पृ।

****

बैक्टेरियल पहचान के लिए जैवरासायनिक जांच

अनुपमा टी. के

बैक्टेरिया की पहचान के लिए जैव रासायनिक जांच सबसे महत्वपूर्ण विधि हैं। आमतौर पर इस्तेमाल किए जाने वाले जैव रासायनिक जांच का उल्लेख नीचे किया गया है।

1. कार्बोहाइड्रेट किण्वन (fermentation) जांच

कार्बोहाइड्रेट किण्वन (fermentation) जांच का उपयोग यह निर्धारित करने के लिए किया जाता है कि क्या जीवाणु एक विशिष्ट कार्बोहाइड्रेट का उपयोग कर सकते हैं। बैक्टीरियल समूहों या प्रजातियों को अलग करने के लिए कार्बोहाइड्रेट किण्वन के पैटर्न उपयोगी होते हैं।

- सभी कार्बोहाइड्रेट मीडिया (ग्लूकोज, फ्रुक्टोज, माल्टोज, लैक्टोज, सुक्रोज आदि जैसे विशिष्ट शुगर पदार्थ युक्त) के प्रत्येक ट्यूब में लूप से इनोकुलेट करें।
- यह सुनिश्चित करें कि इनोकुलम ट्यूब के नीचे तक जाता है।
- इसे 35 °C – 37 °C पर 24 - 48 घंटे तक इंक्युबेट करें।
- रंग परिवर्तन से एसिड उत्पादन का संकेत मिलता है और उल्टे डरहम्स ट्यूब में बुलबुले होने से गैस के गठन का संकेत देता है।
- साथ में पोज़ितटीव कंट्रोल रखें (पोज़िटीव और निगटिव संवर्धन)।

2. कैटलेज़ जांच

कैटलेज़ एंजाइम का उत्पादात्मक सूक्ष्मजैविक क्षमता को पता करने के लिए कैटलेज़ जांच किया जाता है।

- साफ ग्लास स्लाइड या स्पॉट प्लेट पर तार लूप से ताज़ा संवर्धन रखें।
- संवर्धन पर 30% हाइड्रोजन पेरोक्साइड की 2 - 3 बूंदें मिलाएं। संवर्धन से गैस की उत्पत्ति पोज़िटीव प्रतिक्रिया दर्शाता है।

3. सिट्रेट जांच

सिट्रेट जांच का उपयोग बैक्टेरिया द्वारा सोडियम सिट्रेट से कार्बन का उपयोग करने की क्षमता को निर्धारित करने के लिए किया जाता है।

- नुकूले सुई की नोक से18-24 घंटे पुराने एक कॉलोनी को सैम्मंस सिट्रेट अगार में इनोकुलेट करें।
- इसे 18 - 24 घंटे के लिए 35 °C पर इंक्युबेट करें। कुछ जीवों को सिट्रेट मीडियम पर उनकी कम विकास दर के कारण 7 दिनों तक इंक्युबेट करने की आवश्यकता होती है।
- नीले रंग के विकास को ध्यान से देखें, जो कि क्षारीकरण को दर्शाता है।

4. डीकार्बोक्सिलेस जांच

डीकार्बोक्सिलेस जांच का उपयोग एक जीव में डीकार्बोक्सिलेस एंजाइम की क्षमता को मापने के लिए किया जाता है, ताकि एक एमाइन के रूपायन हेतु एक एमिनो एसिड को डीकार्बोक्सिलेट किया जा सके। एमिनो एसिड के डीकार्बोक्सिलेशन या हाइड्रोलिसिस, एक क्षारीय पी.एच. में बदलता है। मीडियम के बढ़े हुए पी.एच. का पता पी.एच. संकेतक ब्रोमोक्रेसोल पर्पिल और क्रैसोल रेड के रंग परिवर्तन से लगाया जाता है जिसके परिणाम स्वरूप नारंगी से बैंगनी रंग में परिवर्तन होता है।

- TSA स्लांट से ताज़ा संवर्धन के डीकार्बोक्सिलेस मीडियम (लैसिन, आर्जिनिन या ऑर्निथिन से युक्त) को इनोकुलेट करें।
- जीवाणुमुक्त तरल पाराफिन मिलाएं और 35±2 ºC पर इंक्युबेट करें।
- चार दिनों तक दैनिक जांच करें।
- एसिड उत्पादन के कारण मीडियम पहले पीला हो जाता है। बाद में अगर डीकार्बोक्सिलेशन होता है, तो मीडियम क्षारीय (बैंगनी) में बदल जाता है।
- नियंत्रण ट्यूब पूरे समय एसिड (पीली) रहती हैं।

5. हाइड्रोजेन सल्फाइड का उत्पादन

इस जांच का उपयोग किसी जीव द्वारा हाइड्रोजन सल्फाइड (H_2S) गैस के उत्पादन का पता लगाने के लिए किया जाता है और इसका उपयोग मुख्य रूप से *एंटरोबैक्टेरियाचेसीये* के सदस्यों की पहचान के लिए किया जाता है। H_2S कुछ बैक्टेरिया द्वारा सिस्टीन, मेथिओनिन जैसे एमिनो एसिड युक्त सल्फर की रिडक्शन या थियोसल्फ़ेट्स, सल्फेट्स या सल्फाइट जैसे अजैविक सल्फर यौगिकों के रिडक्शन के माध्यम से उत्पन्न होता है। हाइड्रोजन सल्फाइड के उत्पादन में लोहे से युक्त एक भारी धातु नमक को शामिल करके या सल्फर सबस्ट्रेट्स के रूप में सिस्टीन और सोडियम थायोसल्फेट्स वाले पोषक तत्व संवर्धन के लिए H_2S संकेतक के रूप में नेतृत्व किया जाता है। सूक्ष्मजीव द्वारा उत्पादित हाइड्रोजन सल्फाइड, धातु नमक के साथ प्रतिक्रिया करके फेर्रस सल्फाइड के अघुलनशील काले परत का निर्माण करता है।

- टीएसआई (ट्रिपल शुगर आयरन) स्लांट के बट्ट में स्टैब और स्लॉप को स्ट्रीक करके ताज़ा संवर्धन को इनोकुलेट करें।
- इसे 35±2 ºC पर 24 - 48 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।
- स्टैब इनोक्यूलेशन की रेखा के साथ कालापन के लिए ट्यूबों का निरीक्षण करें।

6. इंडोल उत्पादन

इंडोल जांच का उपयोग इंडोल बनाने के लिए एमिनो एसिड ट्रिप्टोफैन को विभाजित करने हेतु एक जीव की क्षमता को निर्धारित करने के लिए किया जाता है। ट्रिप्टोफैन को बैक्टेरिया द्वारा उत्पादित **ट्रिप्टोफैनेस** द्वारा हाइड्रोलाइस्ड किया जाता है ताकि इंडोल का उत्पादन किया जा सके। इंडोल उत्पादन को कोवैक्स अभिकर्मक

द्वारा पता लगाया जाता है जिसमें पी-डायमीथाइलएमिनोबेंज़ाल्डिहाइड होता है, जो लाल रंग के यौगिक का उत्पादन करने के लिए इंडोल के साथ प्रतिक्रिया करता है।

- ट्रिप्टोन ब्रोथ में संदिग्ध संवर्धन को इनोकुलेट करें और 35 °C ± 0.5 °C पर 24 ± 2 घंटे के लिए इंक्युबेट करें।
- कोवैक्स अभिकर्मक के 0.2 - 0.3 मि.लि. को मिलाकर इंडोल की उत्पत्ति के लिए जांच करें।
- ऊपरी परत में स्पष्ट लाल रंग का दिखना पोज़िटीव होता है।

7. वोग्स-प्रोस्कौर (VP) जांच

वोग्स-प्रोस्कौर (VP) जांच का उपयोग ग्लूकोज किण्वन से बैक्टेरिया द्वारा एसिटाइलमेथाइल कारबिनॉल के उत्पादन को निर्धारित करने के लिए किया जाता है। एसिटाइलमेथाइल कारबिनॉल, यदि मौजूद है, तो α-naphthol, मजबूत क्षार (40% KOH), और वायुमंडलीय ऑक्सीजन की उपस्थिति में डायएसिटाइल में परिवर्तित हो जाता है।

8. मिथाइल रेड जांच

मिथाइल रेड (एमआर) जांच ग्लूकोज से स्थिर एसिड अंत उत्पादों (लैक्टेट, एसीटेट, सक्सेनेट और फॉर्मेट) का उत्पादन करने के लिए बैक्टेरिया की क्षमता निर्धारित करता है। एसिड अम्लीय पी.एच. प्राप्त करने के लिए मीडियम का कारण बनता है। मिथाइल रेड का उपयोग पी.एच.संकेतक के रूप में किया जाता है जो 4.4 या उससे कम के पी.एच. में लाल रंग का होता है।

- वीपी जांच के बाद, एमआर-वीपी ट्यूब को अतिरिक्त 48 ± 2 घंटे के लिए 35 °C± 0.5 °C पर इंक्युबेट करें।
- प्रत्येक ट्यूब में मिथाइल लाल घोल की 5 बूंदें डालें।
- विशिष्ट लाल रंग पोज़िटीव जांच है।
- पीला निगटिव प्रतिक्रिया है।

9. ऑक्सीडेज (साइटोक्रोम ऑक्सीडेज) जांच (कोवैक्स विधि)

कोवैक्स साइटोक्रोम ऑक्सीडेज अभिकर्मक:

ऑक्सीडेज टेस्ट का उपयोग बैक्टेरिया की पहचान करने के लिए किया जाता है जो साइटोक्रोम सी ऑक्सीडेज पैदा करता है, जो बैक्टेरिया इलेक्ट्रॉन परिवहन श्रृंखला का एक एंजाइम है। साइटोक्रोम सी ऑक्सीडेज जब बैक्टेरिया में मौजूद होता है, तो अभिकर्मक (टेट्रामेथाइल-पी-फेनिलिडेनमाइन) को इंडोफेनोल्स में ऑक्सीकरण करता है जो बैंगनी है। जब एंजाइम मौजूद नहीं होता है, तो अभिकर्मक कम रहता है और रंगहीन होता है।

N,N,N',N' -टेट्रा-मिथाइल-पी-फेनिलेनेडायमाइन डाइहाइड्रोक्लोराइड --- 0.25ग्राम

आसुत जल ------ 25 मि.ली.

रेफ्रिजेरेटर पर भंडारण करें और उपयोग करने से पहले ताजा घोल बनाना होगा।

एक ग्लास रॉड या प्लैटिनम लूप के साथ कुछ युवा संवर्धन को परिमार्जन करें और जांच पेपर (कोवैक के साइटोक्रोम ऑक्सीडेज अभिकर्मक के साथ पहले से लगाए गए फिल्टर पेपर का एक टुकड़ा) पर रगड़ें।

30-60 सेकेंड के भीतर नीले रंग का विकास एक पोज़िटीव जांच को इंगित करता है।

10. यूरिएस जांच

यूरिएस जांच का उपयोग यूरिएस उत्पादन में किसी जीव की क्षमता का निर्धारण करने के लिए किया जाता है। बैक्टेरिया द्वारा उत्पादित यूरिएस के परिणाम स्वरूप यूरिया के हाइड्रोलिसिस होगा और अमोनिया और कार्बन डाइऑक्साइड पैदा करेगा। अमोनिया का उत्पादन माध्यम को क्षारीय बनाता है, और मीडिया का पी.एच. 6.8 पर हल्के नारंगी से पी.एच. 8.1 से मैजेंता (गुलाबी) में बदल जाता है।

- जीवाणुमुक्त सुई के साथ, यूरिया ब्रोथ के ट्यूबों में टीएसआई (ट्रिपल शुगर आयरन) स्लांट संवर्धन से विकास को इनोकुलेट करें।
- इसे 35°C पर 24 ± 2 घंटे इंक्युबेट करें।
- यदि यूरिएस मौजूद है, तो यूरिया को अमोनिया में फैलाया जाता है, जो संकेतक के रंग को पीले से गुलाबी में बदल देता है।

संदर्भ

• फेंग, पी., वीएग्रेंट, एस. डी., ग्रांट, एम. ए. और बुर्कहार्ट, डब्ल्यू. (2002)। जीवाणुविज्ञानी विश्लेषणात्मक मैनुअल, अध्याय 4, यूएसएफडीए।

• केसरनर, सी. ए और देपोला, जूनियर ए (2004) बैक्टेरियोलॉजिकल एनालिटिकल मैनुअल, अध्याय 9, यूएसएफडीए।

• सुरेंद्रन, पी. के., थमपुरन, एन., नांबियार, वी. एन., ललिता, के.वी. और जोसेफ, टी.सी., (2013) समुद्री खाद्य की सूक्ष्मजीवविज्ञानी परीक्षा के लिए प्रयोगशाला तकनीक। चौथा संस्करण, केंद्रीय मत्स्य प्रौद्योगिकी संस्थान, कोचीन -682029, भारत ।31पृ /42 पृ

• एफएसएसएआई, (2012)। खाद्य के विश्लेषण के तरीकों का मैनुअल, अध्याय 4. P.98-102

****

सडे समुद्री खाद्य का सूक्ष्मजीवविज्ञान

रम्या एस

परिचय

- मछली एक अत्यधिक खराब होने वाला खाद्य पदार्थ है, जो उस समय खराब होना शुरु हो जाती है जब उन्हें पानी से निकाला जाता है।
- जैसे ही मछली मर जाती है, परिवर्तनों की एक श्रृंखला शुरू होती है, जिसे सामूहिक रूप से खराब होने के रूप में जाना जाता है।
- ऊतक के क्षरण को उस मछली के एंजाइमों और सूक्ष्मजीवों द्वारा हो जाता है, जो त्वचा की सतह पर, गलफड़ों पर और आंत में मौजूद होते हैं।
- सडन से मछली की शेल्फ लाइफ / गुणवत्ता कम हो जाता है।

मछली की 'ताजगी' को कैसे जांचा जाता है?

विशेषता	विवरण
आखें	उज्ज्वल और उभडी हुई, धँसी या मलिन नहीं
गलफड़	चमकीला लाल या गुलाबी
त्वचा	चमकीली
स्लाइम	त्वचा या गलफडों पर मौजूद हो सकता हैं। स्पष्ट या बेरंग होना चाहिए
गंध	गलफड का गंध तेज एवं समुद्री शैवाल जैसा होना चाहिए

मछली का सडना / मछली कैसे खराब होती है?

- सूक्ष्मजैविक सडन
- एंजाइमों द्वारा स्व-पाचन सडन / स्व-पाचन (ऑटोलिटिक परिवर्तन)
- रासायनिक विघटन (ऑक्सीकरण और हाइड्रोलिसिस)

मछली का सूक्ष्मजैविक सडन

- मछली पर पाए जानेवाले सभी बैक्टेरियाएं आपत्तिजनक विशेषताओं का उत्पादन नहीं करते हैं। बैक्टेरिया प्रजातियों का एक अल्पसंख्यक अक्सर खराब होने का कारण होता है, जिसे विशिष्ट सडन जीव (एसएसओ) कहा जाता है।
- मछली के सूक्ष्मजैविक नुकसान को आमतौर पर मोलस्कैन के अपवाद के साथ एक प्रोटियोलिटिक प्रक्रिया के रूप में वर्णित किया जाता है, इसलिए पी.एच. बढ़ जाता है।

बैक्टेरिया कहां से आते हैं?

- बैक्टेरिया प्रकृति में हर जगह पाए जाते हैं, उनमें त्वचा, गलफड़ और मछली की आंत शामिल हैं।
- ताज़ा पकड़े गई स्वस्थ मछली में जीवाणुरहित ऊतक होते हैं और बैक्टेरिया केवल त्वचा, गलफड़ों और आंतों में पाए जाते हैं।
- जब मछली जीवित होती है, तो उसके प्राकृतिक रक्षा तंत्र इन बैक्टेरिया का मछली के ऊतकों में आक्रमण करने से रोकते हैं। इसलिए, वे बिना किसी नुकसान के मछली की सतह से भोजन प्राप्त करते है, बढ़ते है एवं उनकी वृद्धि होती हैं। वास्तव में इनमें से कई, मछली के लिए उपयोगी हैं। उदाहरण के लिए, आंत में बैक्टेरिया मछली को उसके भोजन को पचने में मदद करते हैं।
- मछली और बैक्टेरिया संतुलन की स्थिति में मौजूद हैं, सतह पर जीवित रहते हुए भी केवल मृत्यु के बाद ही बैक्टेरिया ऊतकों पर आक्रमण कर सकते हैं और मछली को खराब कर सकते हैं।
- आंत से मांसपेशी का आक्रमण आंत एंजाइमों द्वारा लाए गए ऑटोलिसिस द्वारा आसान बना दिया जाता है।
- हाल ही में खाए हुए मछली के आंत में बैक्टेरिया की संख्या सबसे अधिक होती है।
- प्रदूषित जल से पकड़ी गई मछलियाँ स्वच्छ जल की मछलियों की तुलना में अधिक दूषित होती हैं।
- एक बार जब मछली पकड़ी जाती है, तो यह कुछ हद तक सभी सामग्रियों से दूषित हो जाएगी, जिसके साथ यह बर्फ, मछली के बक्से, नाव खुद और यहां तक कि चालक दल के संपर्क में आता है।

बैक्टेरिया क्या करते है?

- बैक्टेरिया, मछली का उपयोग खाद्य स्रोत के रूप में करते हैं और विभिन्न अपशिष्ट उत्पादों का उत्पादन करते हैं, जो बे-गंध और खराब स्वादों को जमा और उत्पादन करते हैं।
- पोषक तत्वों की तलाश में, बैक्टेरिया पहले सबसे सरल यौगिकों का उपयोग करते हैं और बरकरार प्रोटीन का उपयोग केवल तभी किया जा सकता है, जब उन्हें ऑटोलिटिक एंजाइमों द्वारा तोड़ दिया गया हो।
- जब वे संख्या में वृद्धि करते हैं, तो वे मछली की त्वचा और गलफड़ों पर एक मोटी स्लाइम पैदा करते हैं।

- अक्सर अमोनिया की एक मजबूत गंध के साथ, अप्रिय गंध भी उत्पन्न होते हैं।
- मांस नरम हो जाता है और बिना आंत वाली मछली में, आंत की दीवार अंततः फट जाती है।
- बैक्टेरिया द्वारा मृत ऊतकों के टूटने की इस प्रक्रिया को पुट्रिफाक्शन के रूप में जाना जाता है।

मछली के रासायनिक घटकों पर बैक्टेरिया की प्रतिक्रिया:

1. एमिनो एसिड का ह्रास: डीकार्बोक्सिलेशन और डीएमिनेशन

- एमिनो एसिड में कार्बोक्सिल और एमिनो समूह होते हैं

डीकार्बोक्सिलेशन: मूल एमैन और कार्बन डाइऑक्साइड का उत्पादन करने वाले एंजाइम एमिनो एसिड डीकार्बोक्सिलाइज़ का उपयोग करके एमिनो एसिड से कार्बोक्सिल समूह को हटाता है।

- सडे हुए मछली के मांस में मूल एमैन का संचयन होता है।
- उदाहरण: एमिनो एसिड हिस्टिडीन का हिस्टामाइन में और लाइसिन का केडावेरीन में रूपांतरण
- स्क्रोम्ब्रोइड मछली की विषाक्तता / हिस्टामाइन विषाक्तता: ट्यूना, बांगडा आदि जैसे स्क्रोम्ब्रोइड मछलियों की मांसपेशियों में हिस्टिडीन की उच्च मात्रा होती है। हिस्टिडाइन डीकार्बोक्सिलेस एंजाइम हिस्टिडाइन पर कार्य करता है और हिस्टामाइन का उत्पादन करता है, जो भोजन की विषाक्तता का कारण बनता है।
- डीएमिनेशन: एमिनो एसिड से एमिनो समूह को पृथक करना। अमोनिया, एमिनो एसिड के विघटन का उत्पाद है। यह खराब मछली में अमोनिया की गंध का कारण होता है।

2. ट्राइमीथाइलएमाइन ऑक्साइड (टी.एम.ए.ओ.) की रिडक्शन

- ताजा समुद्री मछली में 0.1% - 0.5% टी.एम.ए.ओ. उनकी मांसपेशियों में होता है।
- बैक्टेरिया ट्राइमीथाइल एमाइन ऑक्साइड (टी.एम.ए.ओ.) से ट्राइमेथाइलमाइन (TMA) को कम कर देता है।
- टीएमए समुद्री मछली की विशिष्ट गंध में योगदान देता है।

3. यूरिया पर क्रिया

बैक्टेरिया द्वारा एलास्मोब्रांचस में मौजूद यूरिया को अमोनिया में परिवर्तित किया जाता है।

4. वसा का सूक्ष्मजैविक रांसिडिफिकेशन

- माइक्रोबियल एंजाइम लिपॉक्सीडेज, लिपिड / वसा पर कार्य करता है और इसके परिणाम स्वरूप एल्डीहाइड और कीटोन्स का निर्माण होता है।

मछली के सडन की रोकथाम / नियंत्रण के उपाय

1. भोजन का तापमान कम करना

- तापमान को कम करने के द्वारा सडन में नियंत्रण एवं मछली को ताज़ा रखने का आम और व्यावहारिक तरीका है।
- उदाहरण: आइसिंग (द्रुतशीतन) और फ्रीज़िंग।
- जितना तापमान कम रहेगा, उतना अधिक मछली ताज़ा रहेगा।

चिलिंग / आइसिंग तापमान (0 °C (0-2 °C) के आसपास, लेकिन 0 से नीचे नहीं):

- मछलियों को लगभग 0 °C के तापमान पर रखा जाता है (लेकिन नीचे नहीं)।
- कम तापमान पर, कोशिका में एंजाइम कार्य नहीं कर सकते हैं और चूंकि पूरे कोशिका का चयापचय एंजाइम पर निर्भर करता है, इसलिए कोशिकाएं बढ़ने और विभाजित होने की प्रक्रिया धीमी हो जाती हैं।
- ठंड के तापमान पर, कई बैक्टेरिया निष्क्रिय हो जाते हैं, लेकिन साइक्रोफाइल्स/ साइकोट्रॉफ़ बढ़ सकते हैं।
- भोजन को संरक्षित करने में एक विशेष तापमान का प्रभाव कई कारकों पर निर्भर करेगी, जिसमें निम्नलिखित शामिल हैं;
  1. साइकोट्रॉफ़िक फ्लोरा का क्या अनुपात है
  2. दिए गए तापमान पर जीवों का वृद्धि दर
  3. मछली को दिया गया पिछला उपचार
- ठंडा भंडारित मछली की शेल्फ लाइफ की अवधि 5 से 15 दिनों की होती है
- चिलिंग को एक अल्पकालिक भंडारण विधि माना जाता है। हालांकि, यह 14 - 21 दिनों के बीच कुछ मछलियों का भंडारण जीवन बढ़ा सकता है।

फ्रीज़िंग (तापमान 0 °C से नीचे (0 से -20 °C)):

- मछली के संरक्षण की दीर्घकालिक विधि
- ठंड से प्राप्त होता है
त्वरित ठंड: जहां तापमान 30 मिनट के भीतर -20°C तक कम हो जाता है।
धीमी गति से ठंड: जहां तापमान 3 ~ 72 घंटों के भीतर -20°C तक कम हो जाता है।
- बर्फ़ीला पानी बर्फ के क्रिस्टल में परिवर्तित हो जाता है और पानी को बैक्टेरिया की कार्रवाई के लिए उपलब्ध नहीं बनाता है
- ज्यादातर मामलों में, विकास पूरी तरह से बंद हो जाता है और पानी की स्थिति में परिवर्तन अच्छी तरह से कोशिकाओं के एक बड़े हिस्से को मार सकता है।

- मृत्यु को यांत्रिक क्षति, निर्जलीकरण, सेलुलर घोल में सांद्रण, ठंड के झटके और चयापचय चोट सहित कई कारकों के लिए जिम्मेदार ठहराया जा सकता है।
- जमे हुए भंडारित मछली का शेल्फ लाइफ 6 से 8 महीने तक होता है।

2. भोजन की जल गतिविधि / नमी को कम करना

- **सुखाना**: वाष्पीकरण द्वारा मछली से पानी का एक बड़ा हिस्सा निकालना
- **सॉल्टिंग**: बैक्टेरिया के जैविक कार्यों के लिए पानी की उपलब्धता को कम करता है
- कोशिका में होने वाली सभी प्रतिक्रियाओं को उनके उचित कार्य के लिए एक जलीय वातावरण की आवश्यकता होती है। इस प्रकार, खाद्य पदार्थों में उपलब्ध पानी की मात्रा को कम करने से बैक्टेरिया के विकास की गति धीमी या पूर्ण रूप से रुक जाता है।
- पानी की मात्रा को आमतौर पर प्रतिशत नमी के रूप में दर्ज किया जाता है लेकिन, बैक्टेरिया के संदर्भ में, यह ‘free water’ है जो महत्वपूर्ण है।
- सूक्ष्मजीववैज्ञानिक जल सामग्री को जल गतिविधि (a_w) के रूप में मापते हैं, जो निम्न सूत्र से प्राप्त होती है:

Equilibrium relative humidity = 100 a_w

- निम्नलिखित सारणी में, जो न्यूनतम a_w है जिस पर सूक्ष्मजीवों के विभिन्न समूह विकसित हो सकते हैं, उसको दिखाया है:

जीव	a_w (जल गतिविधि)
सबसे खराब बैक्टेरिया	0.91
सबसे खराब यीस्ट	0.88
सबसे खराब मौल्ड्स	0.80
हालोफिलिक बैक्टेरिया	0.75
क्सीरोफिलिक मौल्ड्स	0.65
ऑस्मोफिलिक मौल्ड्स	0.60

- भोजन की जल गतिविधि को पानी को हटाने या एक विलेय को मिलाने से कम किया जा सकता है, जिससे पानी कोशिकाओं को उपलब्ध नहीं होता है।
- सोडियम क्लोराइड एक ऐसा विलेय है; नमक की विभिन्न सांद्रता के लिए प्राप्त aw निम्नल्खित सारणी में दिए गए हैं:

नमक प्रतिशत w/v	a_w(जल गतिविधि)
0.9	0.995
1.7	0.99

3.5	0.98
7.0	0.96
10.0	0.94
13.0	0.92
16.0	0.90
19.0	0.88
22.0	0.86

- यह स्पष्ट है कि हालांकि औसत पालेट के लिए 22% नमक घोल बहुत नमकीन है, फिर भी यह खराब होने वाले जीवों, विशेष रूप से मोल्ड्स और हेलोफिलिक बैक्टेरिया का पूर्ण नियंत्रण नहीं दे पाता है।
- भोजन को सर्वोत्तम सुरक्षा प्रदान करने के लिए, पानी को निकालना और नमक डालना सामान्य है।
- पानी का निष्कासन गर्मी के प्रत्यक्ष अनुप्रयोग द्वारा हो सकता है लेकिन एक अधिक दिलचस्प तकनीक खाद्य पदार्थों का स्मोकिंग है।

3. ऊष्मा प्रसंसकरण / तापीय प्रसंस्करण

केनिंग:

- ऊष्मा उपचार से भोजन में बैक्टेरिया नष्ट हो जाते हैं या बैक्टेरिया की संख्या कम हो जाती है।
- यह प्रक्रिया सभी व्यवहार्य रोगजनक और खराब जीवों को मारती है।
- बैक्टेरिया की संख्या कम होने से फ्लोरा में नुकसान होने की संभावना भी कम होता जाएगा।
- वाणिज्यिक रूप से जीवाणुरहित का उपयोग अक्सर कैन्ड (canned) खाद्य पदार्थों के लिए किया जाता है, जो कि संवर्धन के तरीकों से पता लगाने योग्य सूक्ष्मजीवों की अनुपस्थिति को इंगित करने के लिए या बचे हुए जीवों की संख्या इतनी कम होती है कि वे कैन्ड और भंडारण की स्थिति में कोई महत्व नहीं रखते हैं।
- कैन्ड मछली का शेल्फ लाइफ 2 वर्ष तक होती है।

पास्तुरीकरण (Pasteurisation):

- गर्मी के उपयोग से बैक्टेरिया का आंशिक विनाश।
- सभी रोगजनक सूक्ष्मजीवों को नष्ट करने और संभावित खराब होने वाले जीवों को कम करने के लिए कुछ मिनटों के लिए 60 ~ 80 °C की सीमा पर गर्मी का उपयोग करने को पास्तुरीकरण कहा जाता है।
- पास्तुरीकरण प्रक्रिया, जो आमतौर पर दूध संरक्षण में नियोजित होती है, को 30 मिनट तक 63 °C पर दूध गरम करके प्राप्त किया जा सकता है, जिसे कम तापमान लंबे समय (LTLT) प्रक्रिया कहा जाता है; या 15 सेकंड के लिए 72 °C, जिसे उच्च तापमान कम समय (HTST) प्रक्रिया कहा जाता है।

4. पर्यावरण के पी.एच.का परिवर्तन

- बैक्टेरिया के विकास को पर्यावरण के पी.एच. को परिवर्तन करके भी रोकथाम किया जा सकता है ताकि कोशिका के एंजाइम सक्षम रूप से कार्य न कर सकें। उदाहरण: अचार और मैरिनेड
- कई खराब जीवों को कम पी.एच. इतना प्रतिकूल लगता है कि वे भंडारण के दौरान मर जाते हैं।
  निम्न सारणी न्यूनतम और अधिकतम पी.एच. दिखाती है जिसमें कुछ सामान्य जीव जीवित रह सकते हैं।

जीव	**न्यूनतम pH**	**अधिकतम pH**
एस्चेरिचिया कोलाई	4.4	9.0
साल्मोनेला टाइफी	4.5	8.0
स्ट्रेप्टोकोकस लाप्टिस	4.3-4.8	-
लाक्टोबेसिलस प्रजाति	3.8-4.4	7.2
मोल्ड्स	1.5-2.0	11.0
यीस्ट	2.5	8.0-8.5

- यह स्पष्ट है कि चूंकि मछली के ऊतक का पी.एच. 5.6 या उससे अधिक है, इसलिए लगभग कोई भी सूक्ष्मजीव बढ़ सकता है और इसे खराब कर सकता है।
- कुछ बैक्टेरिया, विशेष रूप से *लैक्टोबैसिलस* प्रजाति की वृद्धि होते समय, कार्बोहैड्रेट से लैक्टिक एसिड का उत्पादन करके पी.एच. को कम करने की क्षमता रखते हैं। दक्षिण पूर्व एशिया के कई पारंपरिक किण्वित खाद्य पदार्थ इस तरह के एक तंत्र के लिए अपने लंबे शैल्फ लाइफ का श्रेय देते हैं।

5. विकिरण (Radiation) का उपयोग

- सूक्ष्मजीवों पर उनके विनाशकारी प्रभाव के कारण विकिरणों का खाद्य संरक्षण में संभावित अनुप्रयोग है।
- आमतौर पर, छोटी तरंग दैर्ध्य के विकिरण लंबे तरंग दैर्घ्य की तुलना में सूक्ष्मजीवों के लिए अधिक हानिकारक होते हैं।
- 2000 A° या उससे कम की तरंग दैर्ध्य के खाद्य संरक्षण आयनीकरण विकिरण महत्वपूर्ण हैं।
- इनमें बीटा किरणें, गामा किरणें और एक्स-किरणें शामिल हैं।
- आयनीकरण विकिरण अपने मार्ग पर अणुओं को आयनित करता है और इस तरह तापमान बढ़ाए बिना सूक्ष्मजीवों को नष्ट करता है।
- तापमान बढाये बिना विद्युत चुम्बकीय (electromagnetic) विकिरणों का उपयोग करने वाले खाद्य पदार्थों में सूक्ष्मजीवों की हत्या को cold sterilization या ठंड जीवाणुनाशन कहा जाता है।
- **विकिरण प्रकिया**: खाद्य पदार्थ को 3 प्रकार की विकिरण प्रकिया देते है.
    - ➢ रडाप्पेर्टेज़ेशन (Radappertization)

- ➢ राडिसिडेशन (Radicidation)
- ➢ राडुरैज़ेशन (Radurization)

6. रसायनों का प्रयोग

- बड़ी संख्या में रसायनों में खाद्य संरक्षक की क्षमता होती है क्योंकि सूक्ष्मजीवों के कारण खाद्य पदार्थों के खराब होने को रोकने / देरी करने की उनकी क्षमता होती है और इस प्रकार भोजन के शैल्फ लाइफ का विस्तार होता है।
- कई रासायनिक पदार्थों में से कुछ को खाद्य पदार्थों में उपयोग करने की अनुमति है क्योंकि प्रवर्तन एजेंसियों द्वारा सुरक्षा के सख्त नियमों और कुछ खाद्य पदार्थों में शामिल होने पर रोगाणुरोधी संपत्ति में परिवर्तन होता है।
- परिरक्षक प्रभाव वाले निम्नलिखित कुछ रसायनों को खाद्य पदार्थों में उपयोग करने की अनुमति है और आमतौर पर सुरक्षित (जीआरएएस) के रूप में पहचाना जाता है।
- बेंजोइक एसिड और पेराबेंस
- सोर्बिक एसिड और सोर्बेट्स
- प्रोपियोनेट्स
- सल्फर डाइऑक्साइड और सल्फाइट्स
- नाइट्राइटस और नाइट्रेटस

अच्छे आचरण

- **अलग-अलग समय पर मछली पकड:** अलग-अलग समय पर पकड़ी गई मछली खराब होने की स्थिति अलग होगी। अगर वे अलग न रखे तो पहले पकडे हुए मछलियाँ सबसे ताज़ी मछली को दूषित करेंगी।
- **बड़ी मछली से छोटी मछली को अलग रखें**: बड़ी मछली की तुलना में छोटी मछली तेजी से खराब होती है।
- **नरम पेट से युक्त मछली को अलग रखें:**" नरम पेट " खराब होने का संकेत है। तो, ये मछलियां दूसरों की तुलना में अधिक खराब हो जाएगा।
- **आंत और मछली को अलग करें:** बेशक, आंत में बड़ी मात्रा में बैक्टेरिया और एंजाइम होते हैं जो खराब होने का कारण होता हैं। तो, उन्हें मछली से अलग रखा जाना चाहिए।
- मछली के वितरण के लिए स्वच्छ, प्लास्टिक के बक्सों का उपयोग करें।
- वितरण के बाद मछली के बक्से में बचे अधिशेष बर्फ का पुन: उपयोग न करें।

- मछली को सीधे जमीन पर न रखें।
- वितरण या भंडारण के दौरान मछली की विभिन्न प्रजातियों को न मिलाएं।

मछली व्यापारियों और प्रसंस्करकों के लिए सुगम संचालन दिशानिर्देश

- सबसे अच्छी गुणवत्ता वाली मछली खरीदें।
- बाजार या अपने परिसर में आस-पास पड़ी मछलियों के बक्से न छोड़ें। उन्हें जल्दी से निकालें और उन्हें ठंडा रखें।
- सुनिश्चित करें कि सभी सतहों और उपकरणों को साफ और स्वच्छ रखा जाए।
- मछली पर फेंकना या चलना नहीं चाहिए। उन्हें भद्रता से संभालें।
- दूषण से बचने के लिए विभिन्न प्रकार के मछलियों को एक साथ न रखें।
- मछली को ठंडा करने के लिए चिल स्टोर्स का उपयोग न करें। वे इसके लिए डिज़ाइन नहीं किए गए हैं और वैसे भी बर्फ इसे बेहतर काम करता है।
- स्टॉक को ठीक से संचालन करें, मछली को अगले वितरण चरण में जल्दी से स्थानांतरित करने के लिए 'first in first out policy' का प्रयोग करें।
- मछली कार्य क्षेत्रों के पास अपशिष्ट और अपक्षय को जमा न होने दें। यह मक्खियों को प्रोत्साहित करेगा जो बीमारी को ले जा सकती हैं और मछलियों पर कीडा छोड सकती हैं।
- यह सुनिश्चित करें कि मछली को प्रेषण से पहले पर्याप्त रूप से आइस्ड किया जाए।
- बक्से को इतना भरा न रखें कि मछलियाँ कुचल जाएँ।

संदर्भ

1. के. के. बालचंद्रन.2001. जीवाणु विज्ञान। मछली और मछली उत्पादों की फसलोत्तर तकनीक। दया प्रकाशन हाउस, दिल्ली। पृ 29-57।
2. उष्णकटिबंधीय में मछली कानिपटान, संरक्षण और प्रसंस्करण: भाग 2 (आई. जे. क्लुकास द्वारा संकलित)। 1982. उष्णकटिबंधीय विकास और अनुसंधान संस्थान, लंदन द्वारा प्रकाशित।

****

सार्वजनिक स्वास्थ्य सूक्ष्मजीवविज्ञान

रेणुका वी

बैक्टेरिया जो मनुष्यों में बीमारी पैदा करते हैं उन्हें रोगजनक बैक्टेरिया माना जाता है। मछली में उच्चतर सूक्ष्मजैविक संख्या मुख्य रूप से गलफड, आंत और त्वचा में पाई जाती है। मछली से जुड़े अधिकांश बैक्टेरिया रोगजनक नहीं हैं। जब मछली या शंख को पकडने के दौरान,रोगजनक बैक्टेरिया निम्न स्तर पर मौजूद हो सकते हैं और उसके संचालन और प्रसंस्करण के दौरान या एकात्मक प्रथाओं द्वारा ये बक्टीरिया पेश आता है।

खाद्य से उत्पन्न रोगजनकों का जन्म जलीय वातावरण, सामान्य वातावरण या पशु / मानव जलाशय (सारणी 1) से हो सकता है। मत्स्य फसल के दौरान, स्थानीय जलीय बैक्टेरिया और सामान्य वातावरण के जीवाणु उपभोक्ताओं को खाद्य जनित बीमारी का कारण बन सकते हैं। जबकि, संचालन और प्रसंस्करण के दौरान, सामान्य वातावरण से या पशु / मानव जलाशय से बैक्टेरिया खाद्य जनित बीमारी का कारण हो सकता है। खाद्य जनित बीमारी को 2 अलग-अलग समूहों में वर्गीकृत किया गया है।

1. संक्रमण (जीवित रोगजनक जीव का अंतर्ग्रहण)
2. आविषांचन (भोजन में सूक्ष्मजीव द्वारा उत्पादित विष का अंतर्ग्रहण)

संक्रमण -बैक्टेरिया, वायरस या परजीवी के कारण हो सकता है।

सारणी 1: खाद्य जनित रोगजनक एवं उसके पर्यावरण

जलीय पर्यावरण	सामान्य पर्यावरण	पशु/ मानव जलाशय
क्लोस्ट्रिडियम बोटुलिनम गैर-प्रोटुलैटिक प्रकार - B, E, F	*क्लोस्ट्रिडियम बोटुलिनम* प्रोटुलैटिक प्रकार - A, B	*साल्मोनेला एंटेरिका*
विब्रियो कोलेरे सेरोवर ओ1 and ओ139	*क्लोस्ट्रिडियम पेर्फ्रिंजेस प्रकार A*	*शिगेल्ला प्रजाति*
विब्रियो पेराहेमोलिटिकस	*लिस्टेरिया मोनोसैटोजेंस*	*रोगजनक एस्चेरिचिया कोलाई (ईपीईसी, ईटीईसी, ईएईसी, ईआईईसी)*
विब्रियो वल्निफिकस	*बेसिलस सिरियस*	*काम्पैलोबैक्टर प्रजाति*
एरोमोनास प्रजाति		*एस. ऑरियस*
प्लेसियोमोनास शिजेलोय्डिस		

1. जीवाण्विक (बाक्टीरियल) संक्रमण

क) लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स

लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स एक ग्राम-पोज़िटीव, गतिशील बैक्टेरिया है। यह लिस्टेरियोसिस नामक दुर्लभ लेकिन जानलेवा खाद्य जनित बीमारी का कारण बनता है।

ख) *विब्रियो* प्रजाति

विब्रियो प्रजाति ग्राम-निगटीव बैक्टेरिया होते हैं। विब्रियो की 80 प्रजातियों में से 12 विब्रियो प्रजाति को मानव रोगजनकों के रूप में बताया गया। *विब्रियो पेराहेमोलिटिकस*, *विब्रियो वल्निफिकस* और*वी.कोलेरे* प्रमुख समुद्री खाद्य जनित बीमारी प्रजातियां हैं। इनमें से वी. पेराहीमोलैटीकस और वी.कोलेरे गैस्ट्रोइंटेस्टाइनल संबंधी रोग का कारण बनता है, जबकि *विब्रियो वल्निफिकस* सेप्टीसीमिया का कारण बनता है।

ग) साल्मोनेला

साल्मोनेला एक ग्राम-निगटिव बैक्टेरिया है। *साल्मोनेला* के साथ मानव संक्रमण कई नैदानिक स्थितियों जैसे टाइफाइड बुखार (आंत्र ज्वर), तीव्र आंत्रशोथ या प्रणालीगत गैर-टाइफाइड संक्रमण का कारण हो सकता है। टाइफाइड बुखार *एस.टाइफी*और *एस.पेराटाइफी* के कारण होता है।

घ) *क्लोस्ट्रीडियम* प्रजाति

क्लोस्ट्रीडियम प्रजाति एक ग्राम पोज़िटीव, बीजाणु रूपायित बैक्टेरिया है। यह न्यूरोटॉक्सिन का उत्पादन करता है। *सी. बोटुलिनम* के 3 समूहों को मान्यता दी गई है:

- समूह I - प्रोटियोलाईटिक बोटुलिनम विष प्रकार ए, बी और एफ
- समूह II - गैर-प्रोटीयोलाईटिक बोटुलिनम विष प्रकार बी, ई और एफ
- समूह III - बोटुलिनम विष प्रकार C और D

ङ) *ई. कोलाई*

ई. कोलाई एक ग्राम-निगटिव बैक्टेरिया है। सभी ई *कोलाई* रोगजनक नहीं हैं और केवल कुछ रोगजनक हैं। *ई. कोलाई* मुख्य रूप से गैस्ट्रोइंटेस्टाइनल बीमारी के क्लिनिकल सिंड्रोम से जुड़ा हुआ है। क्लिनिकल सिंड्रोम और वायरुलेंस गुणों के आधार पर, डायरियाजेनिक *ई. कोलाई* को इस प्रकार वर्गीकृत किया गया है: एंटरोपैथोजेनिक *ई. कोलाई* (EPEC), एंटरोटॉक्सिजेनिक *ई. कोलाई* (ETEC), एंटरोहामोरेजिक *ई. कोलाई* (EHEC), एंटरोइनवेसिव *ई. कोलाई* (EIEC), एंटरोअग्रिगेटीव *ई. कोलाई* (EAEC) और डिफ्यूसव एथेरिंग *ई. कोलाई* (DAEC)।

च) *स्टेफिलोकोकस ऑरियस* (*Staphylococcus aureus*)

स्टेफिलोकोकस ऑरियस एक ग्राम पोज़िटीव बैक्टेरिया है। यह एंटरोटॉक्सिन पैदा करता है और खाद्य जनित आविषांचयन का कारण बनता है। विष का रोग पैदा करने वाला स्तर तभी होता है जब *एस. ऑरियस* की व्यापक वृद्धि होती है, आम तौर पर भोजन में in $\geq 10^6$cfu/g के स्तर पर होता है।

छ) एरोमोनास और प्लेसिओमोनास

एरोमोनास ग्राम निगटिव अवसरवादी अवायवीय बैक्टेरिया है। *प्लेसियोमोनास शेजेलोटिड्स* यात्री के दस्त के साथ जुड़ा हुआ है। वर्तमान में, जीनस एरोमोनस के तहत 24 वैध रूप से प्रकाशित प्रजातियां हैं, जिसमें 11 जठरांत्र संबंधी बीमारी जैसे खाद्य जनित बीमारी के लिए जिम्मेदार हैं।

2. विषाणु संक्रमण

खाद्य जनित वायरस मानव जठरांत्र संबंधी मार्ग से प्राप्त होते हैं, और पानी और भोजन में उनकी उपस्थिति भोजन संचालकों द्वारा खराब स्वच्छता या संदूषण का एक परिणाम है। खाद्य जनित बीमारी वायरस सारणी 2 में उल्लिखित हैं।

सारणी 2: खाद्य जनित वायरस

वायरस का नाम	**रोग /लक्षण**
नोरोवारयस	महामारी गैस्ट्रोएंटेराइटिस
आस्ट्रोवारयस	गैस्ट्रोएंटेराइटिस
हेपटैटिस ए वायरस	लिवर का सूजन; हेपटैटिस
एंटरोवायरस (उदा. पोलियोवायरस, कोक्साकी ए, बी)	पोलियोमैलिटिस, मेंइंटिस,एंसिफालिटिस
रोटावायरस	गैस्ट्रोएंटेराइटिस
एडिनोवायरस	श्वसन, आंख और जठरांत्र संबंधी संक्रमण

3. परजीवी (Parasite) संक्रमण

मछली जनित पशुजन्य (zoonotic) परजीवी दुनिया के कई क्षेत्रों में प्रचलित हैं और मनुष्यों को संक्रमित करने वाले सभी पशुजन्य परजीवियों में सबसे महत्वपूर्ण हैं। मछली से पैदा होने वाले परजीवी मुख्य रूप से हेल्मिन्थ होते हैं, और इसमें नीमाटोड (गोल कीड़े), सिस्टोड (टैपवर्म) और टोड (फ्लूक) की प्रजातियां शामिल हैं।

****

समुद्री खाद्य की गुणवत्ता पर उसके संचालन, प्रसंस्करण, भंडारण और परिवहन का प्रभाव

रेणुका वी

परिचय

मछली में उपस्थित प्रोटीन के टूटने एवं सूक्ष्मजीवों के विकास से चयापचयों के निर्माण के कारण मनुष्य अपने इंद्रीयों से मछलियों के सडने का पता लगाया जा सकता है। मछली पकडने के तुरंत बाद खराब होना शुरू हो जाता है, जबकि कच्चा समुद्री खाद्य अत्यधिक खराब होता है। अधिकतम मूल्य प्राप्त करने के लिए मछली की ताजगी को बनाए रखना अतिआवश्यक है। मछली की त्वचा पर पाए जाने वाले बैक्टेरिया मांसपेशियों के ऊतकों पर आक्रमण करना शुरू कर देते हैं जिसके कारण समय के साथ, मछली का रंग, स्वाद और गंध बदल जाता है और मछली की गुणवत्ता खराब हो जाती है। अगर ठीक से संरक्षित नहीं किया जाता है , यह जल्द ही खराब हो जाएगा और खपत के लिए अनुपयुक्त हो जाएगा।

मछली खराब होने के प्रमुख कारण बैक्टेरिया और एंजाइम हैं। सूक्ष्मजीवों की अधिकतम मात्रा मुख्य रूप से गलफड, आंत और त्वचा में पाया जाता है। मछलियों के पेट में एंजाइम मौजूद होते हैं। मछली को कम तापमान (0 ^{o}C) पर रखना जो कि खराब होने वाले बैक्टेरिया के विकास को धीमा कर सकता है और स्वच्छ संचालन समुद्री खाद्य के खराब होने को कम करने की मूलभूत आवश्यकता है।

गुणवत्ता में गिरावट को कम करने के लिए फसल का अभ्यास

आइसिंग (Icing)

मछली के संरक्षण के लिए आइसिंग एक सरल, आर्थिक और प्रभावी तरीका है। भारत में विभिन्न प्रकार की बर्फ जैसे ब्लॉक आइस, फ्लेक आइस, ट्यूब आइस और ड्राई आइस का उपयोग किया जाता है। ब्लॉक आइस भारत में मछली के संरक्षण के लिए आमतौर पर इस्तेमाल की जाने वाली बर्फ है। मछली की सतह के साथ बेहतर संपर्क के लिए आइस क्रशर से ब्लॉक आइस को छोटे टुकड़ों में तोड दिया जाता है। मछली की सूक्ष्म गुणवत्ता की गिरावट को कम करने के लिए निम्नलिखित मुद्दों को याद किया जाना चाहिए:

- मछली को कम तापमान (0 ^{o}C) पर रखने और कुशल संरक्षण के लिए एक किलो मछली के लिए 1 किलो बर्फ की आवश्यकता होती है
- बर्फ के उत्पादन के लिए स्वच्छ पीने योग्य पानी का उपयोग किया जाना चाहिए
- आइसिंग के कारण मछली को होने वाले शारीरिक नुकसान को रोकने के लिए देखभाल की जानी चाहिए
- मछली के भंडारण के लिए उपयोग किए जाने वाले बक्से को ज़रूरत से ज़्यादा नहीं भरा जाना चाहिए
- सतह के संपर्क को बढ़ाने के लिए बर्फ और मछली को बारी बारी से रखना चाहिए

ऑनबोर्ड संचालन अभ्यास

आकार ग्रेडिंग और प्रजाति को अलग-अलग रखना और पकडे हुए मछली को धोना सूक्ष्मजैविक मात्रा को कम करने में प्रमुख भूमिका निभाता है। भारत में अधिकांश मत्स्यन जहाज ट्रॉलर, गिलनेटर्स और लोंग लाइनर हैं और सभी बड़े मत्स्यन जहाजों में फिश हॉल्ड मौजूद होता है। पकडी गई ताज़े मछलियों को आमतौर पर फिश हॉल्ड के प्लास्टिक कंटेनरों में रखा जाता है। मछली के उचित भंडारण के लिए आवश्यक मात्रा में बर्फ का उपयोग करना बहुत महत्वपूर्ण है।

खराब व्यक्तिगत स्वच्छता, सूक्ष्मजैविक संदूषण का एक सामान्य कारण है। मछली पकड़ने, संभालने, प्रसंस्करण, परिवहन और बिक्री के दौरान संचालन की जाती है। अच्छी स्वच्छता अभ्यासों का अनुकूलन सूक्ष्मजैविक संदूषण के जोखिम को कम करता है। मछली संचालकों को गुणवत्ता विनियमन प्रक्रिया और खाद्य सुरक्षा मुद्दों के बारे में पता होना चाहिए। मछली संचालकों को खराब व्यक्तिगत स्वच्छता और बैक्टेरिया पैदा करने वाली बीमारी के साथ मछली के संदूषण के बीच की कड़ी को समझना चाहिए। उन्हें व्यक्तिगत स्वच्छता के कदमों को भी जानना चाहिए जो मछली को दूषित होने से बचाने के लिए उठाए जा सकते हैं।

सारणी 1: ताजा समुद्री खाद्य श्रृंखला में की गई प्रक्रिया

फ्रेडरिकसेन (2002) के अनुसार

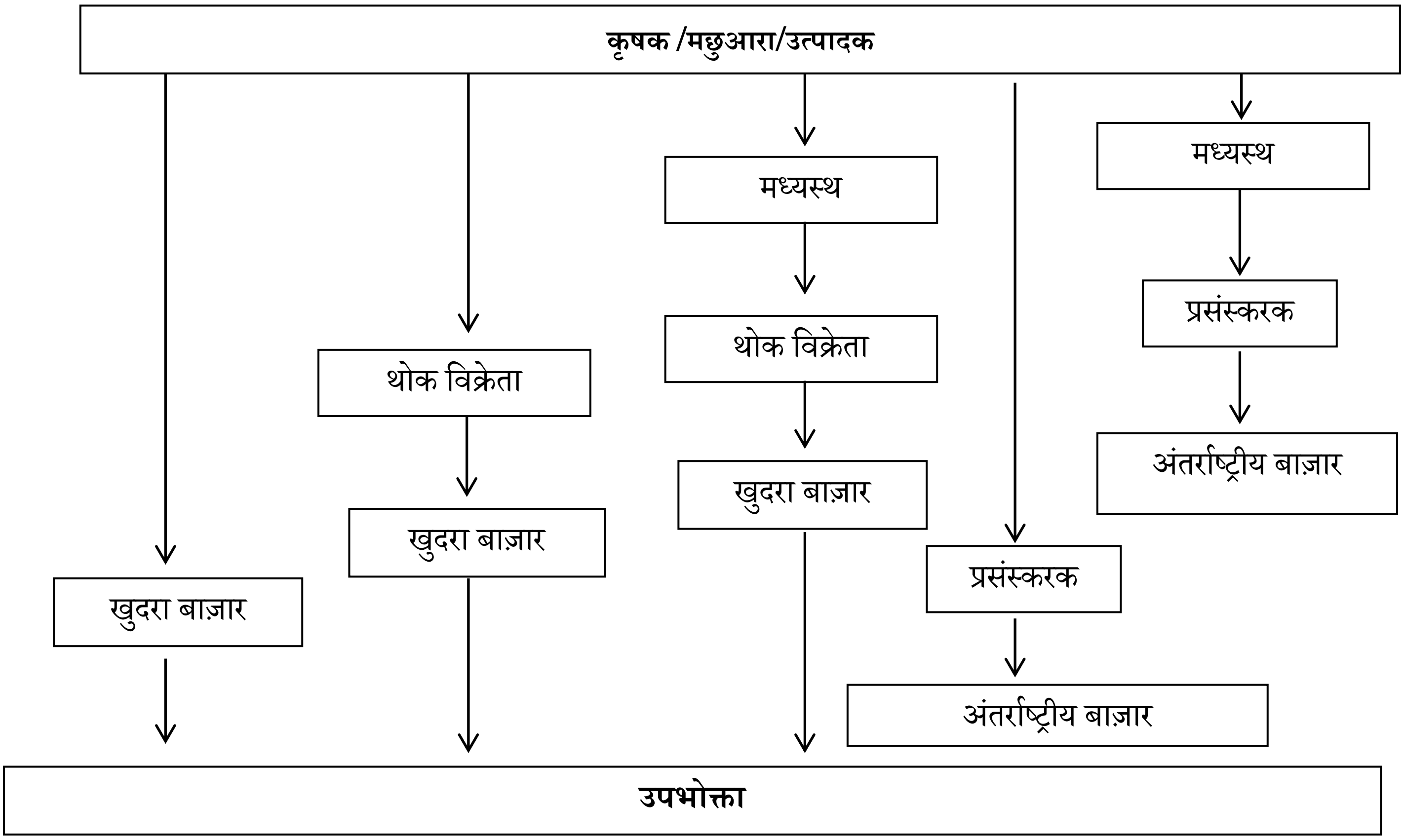
कदम	की गई प्रक्रिया
ताजा मत्स्यन के लिए मत्स्यन पोत	धोना, प्रजातियों में क्रमबद्ध, आकार ग्रेड, वजन, आइस पैक, भंडारण और अनलोड
संग्रहक	प्रजाति ग्रेड, आकार ग्रेड, आइसिंग, भंडारण और नीलामी में लाना
नीलामी	स्टोर और नीलामी (बेचना)
थोक विक्रेता / प्रसंस्करक	आकार ग्रेड, प्रक्रिया, वजन, आइस पैक, भंडारण और बिक्री। मछली आपूर्ति श्रृंखला में थोक विक्रेताओं / प्रसंस्करकों के एक या कई चरण हो सकते हैं।
ट्रांसपोर्ट कंपनियाँ	लोड(चढाना), भंडारण और अनलोड करना (उतरना)
खुदरा विक्रेता / बाजारों	प्रक्रिया, वजन, आइसपैक, भंडारण और बेचना

परिवहन और भंडारण अभ्यास

समुद्री खाद्य उद्योग में शीत श्रृंखला अंतिम उत्पाद की खाने की गुणवत्ता निर्धारित करती है। मछली पकड़े जाने पर शीत श्रृंखला प्रक्रिया शुरू होती है। अंतरराष्ट्रीय, राष्ट्रीय और खाद्य सुरक्षा नियमों के अनुसार, समुद्री खाद्य को समुद्र से उपभोक्ता तक 0 ^{o}C पर भंडारित किया जाना चाहिए। शीत श्रृंखला प्रक्रिया में उतार-चढ़ाव गुणवत्ता को प्रभावित कर सकता है, जो किसी भी कीमत पर पुन: प्राप्त नहीं कर सकते। परंपरागत रूप से,

भारतीय समुद्री खाद्य की प्रक्रिया उपभोक्ताओं तक पहुंचने के लिए एक लंबा विपणन चैनल का पालन करती है। कई परिहार्य और अपरिहार्य घटनाएं हैं जो शीत श्रृंखला में उतार-चढ़ाव का कारण बनती हैं।

समुद्री खाद्य की गुणवत्ता को बनाए रखने और सूक्ष्मजैविक संदूषण को कम करने के लिए सबसे अच्छा अभ्यास अच्छी स्वच्छ संचालन और समुद्री खाद्य प्रसंस्करण के प्रत्येक चरण में उत्पाद का तापमान कम से कम बनाए रखना चाहिए।



चित्र 1: भारतीय मत्स्य उद्योग में ताज़ा और हिमीकृत उत्पादों के लिए समुद्री खाद्य श्रृंखला

* कमीशन एजेंट और थोक विक्रेताओं की संख्या बाजार मूल्य और जगह पर निर्भर करती है

प्रसंस्करण कारखानों में निम्नलिखित सुविधाएं होना चाहिए:

- स्वच्छता प्राप्त करने के लिए उचित बुनियादी ढाँचा
- उचित प्रकाश व्यवस्था और वायु संचालन
- अच्छी जल आपूर्ति
- प्रसंस्करण के लिए 2 पी.पी.एम. से कम के अवशिष्ट स्तर का क्लोरीन युक्त पानी
- मत्स्य संचालन के लिए बर्तन
- 100 पी.पी.एम. के क्लोरीन युक्त पानी से बर्तन और खाद्य संपर्क सतहों की सफाई

- श्रमिक स्वच्छता और स्वास्थ्य की स्थिति
- कृतक (चूहा,कोक्रोच आदि) नियंत्रण के उपाय
- मक्खी नियंत्रण के उपाय
- उचित अपशिष्ट निपटान प्रक्रिया
- उचित शौचालय की सुविधा

संदर्भ

फ्रेडरिकसेन, एम. (2002)। मछली प्रसंस्करण में गुणवत्ता श्रृंखला प्रबंधन। भाग III - आपूर्ति श्रृंखला के भीतर गुणवत्ता में सुधार। अध्याय.15. इन: ब्रेमर, एच.ए. (इडी), मछली प्रसंस्करण में सुरक्षा और गुणवत्ता के मुद्दे। कैम्ब्रिज (इंग्लैंड): वुडहेड पब्लिशिंग लिमिटेड और सीआरसी प्रेस एलएलसी, 520 पृ।

एलेक्स ऑगस्टो गोनक्लेव्स, ए.ए और फ्रांसिस्को ब्लाहा, एफ. (2003)। समुद्री खाद्य उद्योग में शीत श्रृंगला।

****

समुद्री खाद्य की सूक्ष्मजैविक गुणवत्ता और एच.ए.सी.सी.पी. का कार्यान्वयन

रेणुका वी

खतरों को रोकने और खाद्य सुरक्षा और उपभोक्ता संरक्षण सुनिश्चित करने के लिए समुद्री खाद्य उद्योग में एच.ए.सी.सी.पी. लागू किया गया है। एच.ए.सी.सी.पी. खाद्य सुरक्षा प्रबंधन प्रणाली का अभिन्न अंग है। एच.ए.सी.सी.पी. एक प्रतिक्रियाशील के बजाय खतरे के नियंत्रण की एक निवारक प्रणाली है। खाद्य प्रसंस्करक उपभोक्ताओं के लिए सुरक्षित खाद्य उत्पादों को सुनिश्चित करने के लिए इसका उपयोग कर सकते हैं। एच.ए.सी.सी.पी. नियंत्रण प्रक्रियाओं की एक बड़ी प्रणाली का हिस्सा है।

एच.ए.सी.सी.पी. प्रणाली को उस समय से खाद्य से जुड़े खाद्य सुरक्षा खतरों को रोकने और नियंत्रित करने के लिए बनाया गया है जब उपभोक्ता को वितरण के लिए उत्पादन के माध्यम से माल की प्राप्ति होती है। एच.ए.सी.सी.पी. सिस्टम को मौजूदा अच्छी उत्पादन कार्यप्रणाली (जी.एम.पी.) और स्वच्छता नियंत्रण प्रक्रियाओं (एससीपी) की एक मजबूत नींव पर बनाया जाना चाहिए। जी.एम.पी. और स्वच्छता मानक संचालन प्रक्रिया (एसएसओपी) प्रसंस्करण पर्यावरण को प्रभावित करते हैं और एच.ए.सी.सी.पी. के लिए पूर्व-आवश्यक कार्यक्रम माना जाना चाहिए।

एच.ए.सी.सी.पी. प्रणाली विकसित करने में प्राथमिक बात प्रबंधन की प्रतिबद्धता है। कंपनी के मुख्य अधिकारियों जैसे कि प्रोपराइटर या निदेशक का समर्थन होना बेहद जरूरी है, जिसके बिना एच.ए.सी.सी.पी. कंपनी की प्राथमिकता नहीं बनेगी। एच.ए.सी.सी.पी. के प्रभावी कार्यान्वयन के लिए पर्याप्त रूप से प्रशिक्षित कार्यबल की उपलब्धता भी सुनिश्चित की जानी है। एच.ए.सी.सी.पी. को अक्सर इसके 7 बुनियादी सिद्धांतों के संदर्भ में सोचा गया है। एच.ए.सी.सी.पी. के 7 सिद्धांतों के अनुप्रयोग के साथ एच.ए.सी.सी.पी. योजनाओं की तैयारी से पहले, 5 प्रारंभिक कदम भी आवश्यक हैं। समुद्री खाद्य संस्था के लिए एच.ए.सी.सी.पी. के प्रभावी कार्यान्वयन में शामिल कदम इस प्रकार हैं

एच.ए.सी.सी.पी. के विकास में प्रारंभिक कदम

1. एच.ए.सी.सी.पी. टीम को एकत्र करें
2. उत्पाद का वर्णन करें
3. इच्छित उपभोक्ता उपयोग का वर्णन करें
4. कच्चे माल से शिपिंग के लिए प्रक्रिया प्रवाह का रूपरेख
5. प्रक्रिया प्रवाह का सत्यापन

एच.ए.सी.सी.पी. सिद्धांत

1. एक जोखिम विश्लेषण का संचालन

2. क्रिटिकल कंट्रोल पॉइंट्स (CCP) निर्धारित करें
3. क्रिटिकल लिमिट (सीएल) निर्धारित करें
4. निगरानी प्रक्रिया स्थापित करना
5. सुधारात्मक कार्रवाई प्रक्रियाओं की स्थापना
6. सत्यापन और मान्यता
7. अच्छे रिकॉर्ड रखने की स्थापना

1. **एच.ए.सी.सी.पी. टीम को एकत्र करें**

एच.ए.सी.सी.पी. टीम योजना विकसित करती है, एस.ओ.पी लिखती है, एच.ए.सी.सी.पी.को सत्यापित और कार्यान्वित करती है।

2. उत्पाद का वर्णन करें

टीम को तैयार किए गए उत्पादों की सभी सामग्रियों, पैकेजिंग और भंडारण की स्थिति को सूचीबद्ध करना चाहिए।

3. इच्छित उपभोक्ता उपयोग का वर्णन करें

इसके अंतर्गत लक्षित उपभोक्ता के प्रकार और उत्पाद को कैसे तैयार किया जाना है और कैसे उपयोग किया जाता है, शामिल है।

4. प्रक्रिया प्रवाह की रूपरेखा

प्रवाह की रूपरेखा सरल और स्पष्ट होनी चाहिए। प्रवाह की रूपरेखा को निर्माण प्रक्रिया में सभी विशिष्ट चरणों को उस समय से इंगित करना चाहिए जिसमें माल का उत्पादन से प्रेषित करने की श्रृंखला मौजूद होना चाहिए।

5. प्रक्रिया प्रवाह का सत्यापन

एच.ए.सी.सी.पी. के प्रभावी कार्यान्वयन के लिए प्रचालन घंटे के दौरान फाक्टरी पर जाकर फ़्लोचार्ट को भौतिक रूप से सत्यापित किया जाना चाहिए।

6. जोखिम विश्लेषण का आयोजन

एच.ए.सी.सी.पी. टीम को सभी भौतिक, रासायनिक और जैविक खतरों की सूची तैयार करना चाहिए, जो प्राथमिक उत्पादन, प्रसंस्करण, निर्माण और वितरण के प्रत्येक चरण में यथोचित रूप से होने की उम्मीद की जा सकती है।

जैविक जोखिम

जैविक खतरों में रोगजनक बैक्टेरिया, कवक, वायरस और परजीवी शामिल हैं जो उपभोक्ताओं को खाद्य जनित संक्रमण या आविषांचन पैदा कर सकते हैं।

मत्स्य और मस्त्य उत्पादों में सार्वजनिक स्वास्थ्य के महत्व के बैक्टेरिया में निम्नलिखित शामिल हैं

1. *एस्चेरिचिया कोलाई (ई. कोलाई)*
2. *साल्मोनेला प्रजाति*

3. *विब्रियो कोलेरे*
4. *वी.पेराहीमोलैटिकस*
5. *लिस्टेरिया मोनोसाइटोजेन्स*
6. *कैम्पिलोबैक्टर जेजुनी*
7. *बैसिलस सीरियस*
8. *क्लोस्ट्रीडियम बोटुलिनम*
9. *एरोमोनास प्रजाति*

नियंत्रण के उपायों का निर्धारण

एच.ए.सी.सी.पी. टीम को अब विचार करना चाहिए कि क्या नियंत्रण उपाय, यदि कोई हो, मौजूद है जो प्रत्येक खतरे के लिए लागू किए जा सकते है।

नियंत्रण उपायों के उदाहरण: -

जैविक जोखिम: समय / तापमान नियंत्रण और सूक्ष्मजैविक संदूषण को कम करने के लिए स्वच्छ व्यवहार। सूक्ष्मजैविक खतरों के लिए संदूषण के स्रोत हैं:

- प्रदूषित पानी से मत्स्यन।
- प्रसंस्करण के लिए दूषित पानी का उपयोग।
- मनुष्य और जानवरों के आंत्र पथ में जीव का प्राथमिक निवास स्थान।
- अनुचित व्यक्तिगत स्वच्छता।
- उन श्रमिकों द्वारा खाद्य सामग्री को संभालना जो *साल्मोनेला* के वाहक हैं।
- दूषित भोजन, व्यक्ति से व्यक्ति संपर्क, गंदी भोजन संपर्क सतह आदि द्वारा खाद्य से खाद्य संदूषण।

निवारक उपाय

- मछली संचालकों के स्वास्थ्य और स्वच्छता पर पर्याप्त नियंत्रण।
- संचालन और प्रसंस्करण के दौरान सामग्री के 4 ^{o}C से नीचे प्रशीतन (रेफ्रिजेरेशन)।
- खाना पकाने के बाद विशेष रूप से समुद्री खाद्य का समय / तापमान दुरुपयोग कम करें।
- प्रदूषित पानी से मत्स्यन न करें।
- तटीय / बंदरगाह के पानी से न धोएं।
- उन कर्मचारियों से बचें जो समुद्री खाद्य संचालन में दस्त / उल्टी से पीड़ित हैं।

रासायनिक जोखिम: कच्चे माल का जांच, खाद्य योजकों का अनुप्रयोग

भौतिक जोखिम: धातु डिटेक्टरों का उपयोग

3. क्रिटिकल कंट्रोल पॉइंट्स (CCP) का निर्धारण

सी.सी.पी. एक नियंत्रण प्रक्रिया का चरण है, जिससे खाद्य सुरक्षा खतरे को रोकने या समाप्त करने या स्वीकार्य स्तर तक इसे कम करने के लिए लागू किया जा सकता है।

यह सबसे अच्छा और उपयुक्त बिंदु है जिस पर एक महत्वपूर्ण खतरे को प्रभावी ढंग से नियंत्रित किया जा सकता है। सी.सी.पी. उत्पाद और प्रक्रिया विशिष्ट हैं। जैसे: कच्चा माल प्राप्त करने वाला कदम, खाना पकाने का चरण और मेटल डिटेक्शन चरण।

सूक्ष्मजैविक जोखिमों पर ठंड का प्रभाव

- *ई. कोलाई* ठंड और हिमीकृत भंडारण के लिए बहुत संवेदनशील है। -40 ^oC पर फ्रीज करके 95 % जीव को खत्म किया जा सकता है। *ई. कोलाई* का पूर्ण विनाश लगभग 3 महीने तक हिमीकृत भंडारण (-18±2 ^0C) से संभव है।
- साल्मोनेला के सभी सीरोटाइप - 40 ^oC पर ठंड के दौरान जीवित रह सकते हैं और प्रारंभिक भार के आधार पर -18 ^oC पर हिमीकृत स्थिति में महीनों तक एक साथ जीवित भी रह सकते हैं।

4. क्रिटिकल लिमिट (CL) का निर्धारण

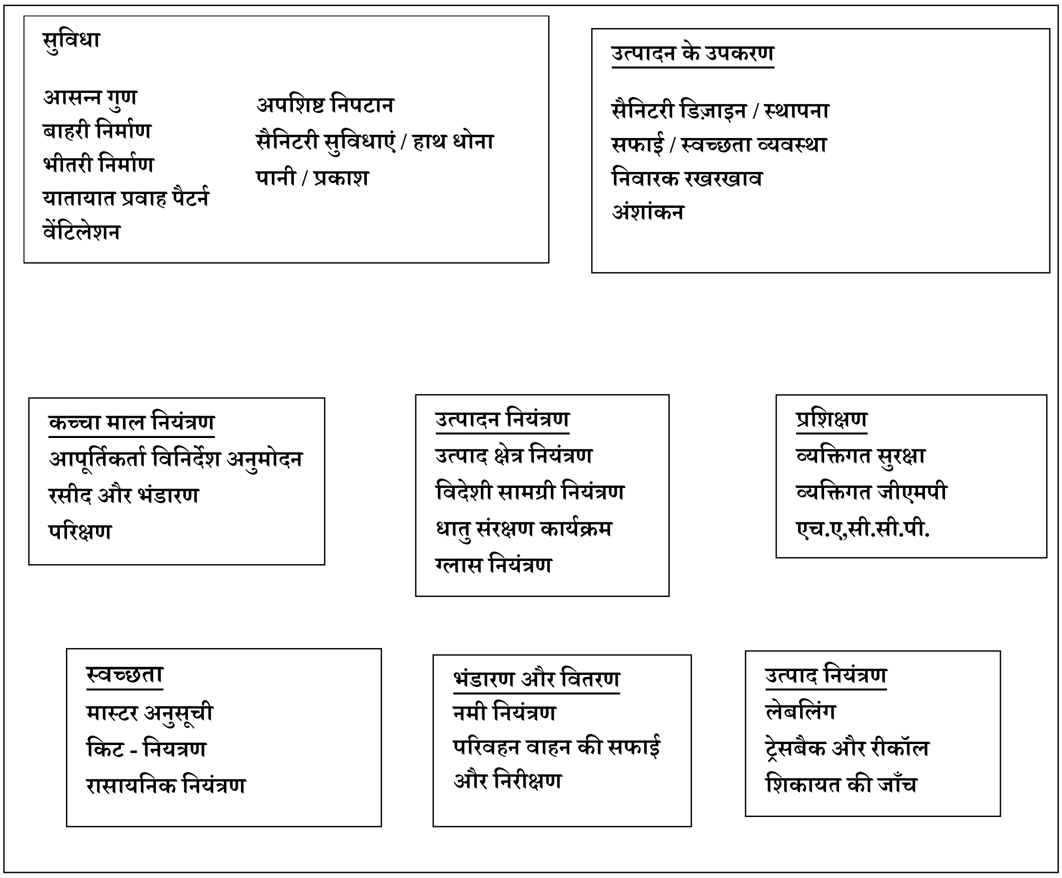
सी.एल. एक अधिकतम और / या न्यूनतम महत्व है जिसके लिए एक खाद्य सुरक्षा खतरा की घटना को रोकने, समाप्त करने या कम करने के लिए एक जैविक, रासायनिक या भौतिक पैरामीटर को एक सी.सी.पी. पर नियंत्रित किया जाता है। सी.एल. एक मानदंड है जो अस्वीकार्यता को स्वीकार्यता से अलग करता है।

5. निगरानी प्रक्रिया स्थापित करना

यह देखने के लिए कि सी.सी.पी. नियंत्रण में है और सत्यापन में भविष्य के उपयोग के लिए एक सटीक रिकॉर्ड उत्पाद है या नहीं, इसका आकलन करने के लिए टिप्पणियों या मापों का नियोजित अनुक्रम करें। निगरानी प्रक्रिया का उद्देश्य यह आकलन करना है कि सी.सी.पी. नियंत्रण में है या नहीं।

6. सुधारात्मक कार्रवाई प्रक्रियाओं की स्थापना

क्रिटिकल लिमिट का उल्लंघन होने पर सुधारात्मक कार्रवाई की जानी चाहिए। सुधारात्मक कार्य योजना पहले से तैयार और कार्यान्वित की जानी चाहिए, ताकि सुधारात्मक कार्रवाई करने में देरी न हो।



चित्र 1: पूर्व-आवश्यक कार्यक्रम एच.ए.सी.सी.पी. सहायक

7. सत्यापन और मान्यता

सत्यापन का उद्देश्य यह सुनिश्चित करने के लिए है कि एच.ए.सी.सी.पी. योजना ठोस वैज्ञानिक सिद्धांतों पर आधारित है, उत्पाद और प्रक्रिया से जुड़े खतरों को नियंत्रित करने के लिए पर्याप्त है और इसका पालन किया जा रहा है या नहीं। जैसा कि राज्यों की आवश्यकता है, सरकारी एजेंसियों या बाहरी एजेंसियों के सहयोग से आंतरिक या बाहरी रूप से सत्यापन किया जा सकता है।

8. अच्छा रिकॉर्ड रखने की प्रक्रियाओं को स्थापित करें

रिकॉर्ड महत्वपूर्ण उपकरण हैं जो एक प्रभावी एच.ए.सी.सी.पी. प्रणाली को संचालित करना संभव बनाते हैं।

क्रम सं	ब्योरा		अवलोकन			टिप्पणी
I.	**सुविधा में प्रयुक्त पानी और बर्फ**					
			पर्याप्त	उचित	कुशल	
1	जल स्रोत	बोरवेल का पानी / पानी के टैंकर				
2	नियंत्रण स्रोत	गु.नि. विभाग द्वारा स्रोत से कच्चे पानी की जांच बाहरी प्रदूषण और जांच से सुरक्षा				
3	पाइपलाइनों / होज़ों की साफ-सफाई और स्थिति	पानी के वितरण के लिए उपलब्ध कराए गए पाइप और होज़				
4	जल शुद्धीकरण प्रणाली	निस्पंदन संयंत्र में रेत सह कार्बन फिल्टर, सॉफ़्नर, ऑटो क्लोरीन डोजर होते हैं				
5	पुन: सफाई प्रणाली	दैनिक आवृत्ति पर स्वचालित पुन: सफाई प्रणाली				
6	पानी भंडारण टैंक	ग्राउंड और ओवरहेड वॉटर टैंक और उसी की स्वच्छता स्थिति				
7	पानी टंकी की सफाई	सफाई अनुसूची के अनुसार, भूमिगत टैंक और ओवरहेड टैंक के लिए महीने में एक बार				
8	पानी टंकियों की सफाई में आसानी	पानी टंकियों का डिज़ाइन इस तरह से हो ताकि आसानी से सफाई की जा सके। अंदर श्रमिकों के प्रवेश के लिए मैनहोल और सीढ़ी प्रदान की गई।				
9	क्लोरिनेशन	प्रसंस्करित पानी -2 पी.पी.एम. (स्वचालित क्लोरीन खुराक द्वारा) हैंड डिप - 20 पी.पी.एम.				

		फूट डिप 50 -100 पी.पी.एम. बर्तन धोने और फर्श धोने के लिए पानी - 50-100 पीपीएम (मैनुअल क्लोरीनेशन द्वारा)				
10	यूवी उपचार	शुद्धिकरण और वितरण से पहले यूवी विकिरण।				
11	क्रॉस संदूषण को रोकने के लिए नियंत्रण	केवल पीने योग्य पानी की लाइन। कहीं भी जल निकासी लाइन के साथ पार करने की संभावना नहीं है। पाइप लाइनें पूरी तरह से लीक प्रूफ हैं				
12	पाइपलाइनों का कलर कोडिंग	केवल पीने योग्य पानी की लाइन				
13	बैक सक्शन की रोकथाम	नली धारक और गैर-वापसी वाल्व प्रदान किए जाते हैं।				
14	गैर पीने योग्य पानी / सीवेज के संपर्क की संभावना	प्लम्बिंग लाइन का डिज़ाइन इस तरह से हो कि सीवेज लाइन के साथ कहीं भी मेल न करें।				
15	पानी के नल की संख्या	प्रत्येक भाग में क्रमिक रूप से क्रमांकित				
16	बर्फ बनाने के लिए पानी के स्रोत	परत बर्फ निर्माण इकाई एकीकृत है				
17	स्रोत नियंत्रण	जैसा कि स्वयं जांच प्रणाली मैनुअल के एस.एस.ओ.पी. भाग में निर्दिष्ट है				
18	मशीनरी से पार संदूषण की रोकथाम	सभी मशीनें बर्फ बनाने वाले खंडों से दूर स्थापित की गई (अलग क्षेत्र प्रदान)				
19	श्रमिकों से पार संदूषण	अच्छी स्वच्छता प्रथाओं और श्रमिकों की स्वच्छता और कर्मचारी प्रथाओं के दैनिक जांच का पालन				
20	संचालन के दौरान संदूषण	अच्छी संचालन प्रथाओं का पालन करके रोका गया				
21	भंडारण के दौरान संदूषण	सीधे फर्श पर बर्फ की परत न रखने के लिए दिए गए प्रावधान / सावधानियां				
22	पानी और बर्फ की जांच रिपोर्ट	ई.सी. निर्देश 98/83/ ई.सी. के अनुसार संतोषजनक				
23	निगरानी के परिणाम	संतोषजनक				

II. बर्तन, दस्ताने और बाहरी कपड़ों सहित खाद्य संपर्क सतहों की स्थिति और सफाई						
1	एफसीएस की डिजाइन, कारीगरी, सामग्री और रखरखाव	स्वच्छता को बनाए रखने के संबंध में भोजन या खाद्य संपर्क सतहों के संपर्क में आने वाले सभी उपकरणों या बर्तनों के लिए उपयोग की जाने वाली डिजाइन कारीगरी और सामग्री				
2	एफसीएस की स्थिति					
	क) दस्ताने	अंतिम उत्पाद को संभालने के लिए श्रमिकों द्वारा उपयोग किए जाने वाले दस्ताने की स्वच्छता की स्थिति और उपयोग				
	ख) बाहरी वस्त्र	श्रमिकों द्वारा पहने गए बाहरी परिधान की स्थिति और सफाई संतोषजनक पाई गई				
	ग) बर्फ का उत्पादन	बर्फ के संग्रह के लिए उपयोग किए जाने वाले उपकरणों की स्वच्छ स्थिति				
	घ) भंडारण और पैकिंग सामग्री	भंडारण के परिसर की स्थिति और भंडारण के दौरान पैकिंग सामग्री की स्थिति				
3	एफसीएस की स्वच्छता / स्वच्छता	कच्चे माल प्राप्त करने, पूर्व प्रसंस्करण, प्रसंस्करण और परिवहन के दौरान एफसीएस की स्थिति				
4	इस्तेमाल किए गए सैनिटाइजर के प्रकार और सांद्रण	तरल क्लोरीन (सोडियम हाइपोक्लोराइट घोल) 6.00% की सांद्रता				
5	प्रशिक्षण और शिक्षा	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के जीएमपी भाग में निर्दिष्ट प्रशिक्षण				
III. बर्तन, दस्ताने और अन्य बाहरी कपड़ों और कच्चे उत्पाद से लेकर पके हुए उत्पाद सहित खाद्य पदार्थों की पैकेजिंग सामग्री और अन्य खाद्य संपर्क सतहों पर पारगम्य वस्तुओं से पार संदूषण की रोकथाम।						
1	पार संदूषण (माध्यम)					
	क) श्रमिक हाथ, दस्ताने, बाहरी वस्त्र	हाथ धोने और स्वच्छता की सुविधा, अंतिम उत्पाद को संभालने के लिए एकल उपयोग डिस्पोजेबल दस्ताने का उपयोग। प्रत्येक प्रचालन के बाद वर्दी की धुलाई और इस्त्री।				

	ख) कचरे के संपर्क में आनेवाला एफसीएस	कचरे का पृथक्करण, संचालन और अपशिष्ट निपटान की आवृत्ति				
	ग) अपशिष्ट का तापमान	कचरे में बैक्टेरिया के गुणन को रोकने के लिए बर्फ के अलावा अपशिष्ट के तापमान को कम किया जाता है				
2	ब्लांच उत्पाद के लिए कच्चे उत्पाद के प्रवाह की दिशा	आर / एम प्राप्ति से ब्लांच्ड उत्पाद तक देशाहीन प्रवाह पाया गया				
3	कच्चे और ब्लांच्ड उत्पादों की पर्याप्त अलगाव	उच्च जोखिम और कम जोखिम वाला क्षेत्र कच्चे, हिमीकृत और ब्लांच्ड का पृथ्थकरण				
4	कर्मियों का प्रवाह	दिशाहीन				
5	जल निकासी का प्रवाह	उत्पाद के प्रवाह के विपरीत				
6	कर्मचारी प्रथाओं	कर्मचारी अभ्यास (जिम्मेदार व्यक्ति द्वारा निगरानी)				
7	सफाई अनुसूची	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल में वर्णित सफाई अनुसूची के अनुसार				
8	व्यक्तिगत स्वच्छता	उनके एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के जीएमपी और एसएसओपी भाग के अनुसार				
9	कर्मचारियों को भोजन से निपटने के तरीके	कर्मचारियों के कच्चे माल / तैयार उत्पाद के संचालन का अभ्यास				
10	एप्रन और अन्य कपड़ों को धोने की सुविधा	बाहरी व्यवस्था				
IV.	**हाथ धोने और सफाई और शौचालय सुविधाओं का रखरखाव**					
1	हाथ धोने की सुविधा	स्थान, डिजाइन और स्थिति				
2	सैनिटाइजर के उपयोग की सांद्रता	सोडियम हाइपोक्लोराइट घोल - 20 पीपीएम से कम				

3	नॉन हैंड ऑपरेटेड नलों की पर्याप्त संख्या	नॉन हैंड ऑपरेटेड नलों की संख्या और रखरखाव				
4	शौचालय सुविधाओं की संख्या	स्थान की पर्याप्तता और पहुंच				
5	शौचालय सुविधाओं की स्थिति	स्थान स्वच्छता / रखरखाव / फ्लाई प्रूफ व्यवस्था				
6	रखरखाव और मरम्मत	रखरखाव के लिए अभ्यास और अनुसूची				
7	प्रत्येक प्रवेश बिंदु पर पैर धोना	(फूट डिप्स) संख्या और स्थान				
8	हैंड डिप्स और फुट डिप्स में सैनिटाइजर की मजबूती	हैंड डिप्स के लिए 20 पीपीएम और फुट डिप के लिए 50 से 100 पीपीएम				
9	पानी के नल की संख्या	संतोषजनक				
10	नॉन हैंड ऑपरेशनल पानी के नल	सभी नॉन हैंड ऑपरेशनल पानी के नल का स्थान और कार्यकरण				
11	तरल साबुन डिस्पेंसर	श्रमिकों की ताकत के संबंध में संख्या और वॉश बेसिन की संख्या				
12	पेपर नैपकिन, तौलिए	जीवाणुमुक्त कागज और तौलियों की संख्या या मात्रा				
13	विशिष्ट निर्देश और साइन बोर्ड	सभी क्षेत्रों में प्रभावी रूप से हाथ धोने और सफाई के लिए हाथ धोने और साइन बोर्ड लगाने के निर्देश				
V. खाद्य, खाद्य संपर्क सतहों, ईंधन और स्नेहक, रसायन, कीटनाशकों, सफाई यौगिकों, सफाई एजेंटों, घनीभूत और अन्य रासायनिक भौतिक और जैविक दूषित पदार्थों से खाद्य पैकेजिंग सामग्री का संरक्षण। हवा जनित धूल और पानी और अन्य बाहरी पदार्थ						
1	ईंधन और स्नेहक	भंडारण और स्थान (एक जिम्मेदार व्यक्ति की देखरेख में खाद्य उत्पादन क्षेत्र से दूर)				
2	फ्लोर स्प्लैश, ड्रिप कंडेनसेट	फ्लोर स्प्लैश और ड्रिप कंडेनसेट की रोकथाम के लिए अभ्यास या संचालन संतोषजनक पाए गए हैं				

3	हवा जनित धूल	परिसर और परिसर की दीवार को समेटना				
4	खाद्य पैकेजिंग सामग्री और एफसीएस	संदूषण को रोकने के लिए पैकेजिंग सामग्री के भंडारण के दौरान उपाय और अभ्यास				
VI. विषाक्त यौगिकों का उचित लेबलिंग, भंडारण और उपयोग						
1	उपयोग किए गए यौगिकों की संख्या					
2	यौगिकों का स्रोत					
3	उपयोग करने की कानूनी अनुमति					
4	कंटेनरों की उचित लेबलिंग	यौगिकों की आसान पहचान के लिए कंटेनरों का उचित लेबलिंग				
	यौगिक का नाम					
	उचित उपयोग के लिए निर्देश					
	काम कर रहे कंटेनर लेबल					
5	विषैले यौगिकों का उचित भंडारण					
6	सीमित पहुंच के साथ कमरा	व्यक्तियों का प्रतिबंध				
7	विषाक्त यौगिकों का उचित उपयोग	कोई जहरीले यौगिकों का इस्तेमाल नहीं किया गया				
VII. कर्मचारी स्वास्थ्य स्थितियों का नियंत्रण, जिसके परिणाम स्वरूप भोजन, खाद्य पैकेजिंग सामग्री और खाद्य संपर्क सतहों के सूक्ष्मजीवविज्ञानी संदूषण हो सकते हैं						
1	कंपनी की नीति निर्धारित करें					
	क) स्वास्थ्य और कर्मियों की स्वच्छता	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के जीएमपी और एसएसओपी भाग के अनुसार प्रक्रिया या अभ्यास				
	ख) बीमार कर्मचारियों से निपटने के लिए	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के जीएमपी और एसएसओपी भाग के अनुसार प्रक्रिया या अभ्यास				

2	कर्मचारियों की स्वास्थ्य स्थिति	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के जीएमपी और एसएसओपी भाग के अनुसार प्रक्रिया या अभ्यास				
3	स्वास्थ्य की स्थिति का आकलन करने के लिए प्रोटोकॉल	चिकित्साकर्मी द्वारा प्रत्येक कर्मचारी के स्वास्थ्य कार्ड का पंजीकरण				
4	कर्मचारियों का प्रशिक्षण	गु. नि. प्रभारी द्वारा प्रत्येक श्रमिकों के घर प्रशिक्षण में				
5	कर्मचारियों के स्वास्थ्य की निगरानी	एच.ए.सी.सी.पी. मैनुअल के एस.एस.ओ.पी. भाग 7 के अनुसार प्रक्रिया या अभ्यास				
6	श्रमिकों की जिम्मेदारी	प्रत्येक श्रमिकों द्वारा बीमारी की स्वयं रिपोर्टिंग प्रणाली				
7	अच्छी सेहत बनाए रखें	अच्छी स्थिति में अपने स्वास्थ्य को बनाए रखने के लिए श्रमिकों की स्वयं की जिम्मेदारी				
VIII. खाद्य संयंत्र से कीटों का बहिष्कार						
1	बंदरगाह और आकर्षित क्षेत्रों का उन्मूलन	परिसर से स्क्रैप, मलबे और अन्य कचरे को निकालना				
2	बायट मैप्स	चारा नक्शे के अनुसार आवश्यक स्टेशनों पर चारा मानचित्रों का रखरखाव				
3	कीटों का बहिष्करण और निष्कासन	कीट / बंदरगाह / और उसी के प्रजनन क्षेत्रों के आकर्षण को रोकने के लिए रखरखाव				
4	सभी प्रविष्टियों					
	• हवा / पट्टी पर्दे दरवाजे और च्युट के लिए	कीटों और कृन्तकों के प्रवेश को रोकने के लिए सभी प्रविष्टियों या च्युट के दरवाजों पर पर्दे या हवाई पर्दे लगाएं				
	• कीटों के लिए मार्ग	सीलिंग, सभी छेदों की स्क्रीनिंग				
	• दरवाजे और खिड़कियां	अंतराल की रोकथाम और दरवाजों के ऑटोमाटिक का प्रावधान				
5	कीटनाशक का छिड़काव और फॉगिंग का	बाहरी कीट नियंत्रण एजेंसी द्वारा				

6	पक्षियों के घोंसले का क्षेत्र	बाहरी परिसर के आस-पास के स्थानों में पक्षियों के घोंसले वाले क्षेत्रों के लिए निवारक उपाय				
7	कृतंकनाशक का अनुप्रयोग	उसी के लिए प्रयुक्त रसायन				
8	चारा स्टेशनों / जाल को दिखाने वाला कृंतक मानचित्र	सबसे आवश्यक स्थानों में कृंतक जालों का रखरखाव				
9	फ्लाई कैचर का इलेक्ट्रोक्यूटिंग	सभी प्रवेश बिंदुओं के पास फ्लाई कैचर का निर्धारण और मृत मक्खियों को हटाना				
10	आसपास के लिए प्रभावी स्वच्छता कार्यक्रम	प्रभावी सफाई और स्वच्छता कार्यक्रमों के लिए नियोजित कार्यक्रम				

****

समुद्री खाद्य गुणवत्ता के मानक

आशीष कुमार झा

भोजन के लिए सूक्ष्मजीव या विषाक्त या अन्य चयापचय से मुक्त ऐसे मत्स्य एवं मात्स्यिकी उत्पाद का उपयोग करना चाहिए जो मानव स्वास्थ्य के लिए हानिकारक है। खाद्य उत्पादों की सुरक्षा केवल एच.ए.सी.सी.पी. के कार्यान्वयन जैसे निवारक उपाय करने से ही सुनिश्चि किया जा सकती है। मत्स्य व्यवसाय प्रचालक को मत्स्य एवं मात्स्यिकी उत्पाद से संबंधित सूक्ष्मजीवविज्ञानीय मानदंड का अनुपालन करना चाहिए। विभिन्न देशों ने खाद्य / मछली / मत्स्य उत्पादों में सूक्ष्मजीवों की उपस्थिति या अनुपस्थिति के लिए देशीय नियमों और विशिष्टताओं को निर्धारित किया है। भारत सरकार के खाद्य सुरक्षा और मानक प्राधिकरण (FSSAI) ने खाद्य सुरक्षा मानकों (खाद्य उत्पाद मानक और खाद्य योज्य) के तीसरे संशोधन विनियम, 2017 को पहले से मौजूद खाद्य सुरक्षा मानक विनियम 2011 को अधिसूचित किया। नया विनियमन मत्स्य एवं मात्स्यिकी उत्पादों के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञानी मानकों को परिभाषित करता है। ये नियम 1 जनवरी 2018 से लागू हुए।

नमूना लेने की योजना:

निम्नलिखित तालिका में प्रयुक्त शब्द n, c, m और M के निम्नलिखित अर्थ हैं

n = नमूना युक्त इकाइयों की संख्या

c = सूक्ष्मजीवविज्ञानीय मायने रखने वाली इकाइयों की अधिकतम स्वीकार्य संख्या जो m से अधिक है

m = सूक्ष्मजीवविज्ञानीय सीमा जो c इकाइयों की संख्या से अधिक हो सकती है

M = सूक्ष्मजीवविज्ञानीय सीमा जो कोई भी नमूना इकाई से अधिक नहीं है।

भारतीय मानक

मछली और मत्स्य उत्पादों के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञानीय अपेक्षाएं -स्वच्छता सूचक जीव

क्रम सं.	उत्पाद श्रेणी	एरोबिक प्लेट गिनती				कोएग्युलेज़ पोज़िटीव स्टेफिलोकोकाई				यीस्ट एवं मोल्ड			
		नमूना योजना		सीमाएं (cfu/g)		नमूना योजना		सीमाएं (cfu/g)		नमूना योजना		सीमाएं (cfu/g)	
		n	c	m	M	n	c	m	M	n	c	m	M
1.	शीतित / जमी हुई मछली	**5**	**3**	**$5x10^{5}$**	**$1x10^{7}$**								
2.	शीतित / जमी हुई क्रस्टेशियन	**5**	**3**	**$1x10^{6}$**	**$1x10^{7}$**								
3.	शीतित / जमी हुई सिफालोपोड्स	**5**	**2**	**$1x10^{5}$**	**$1x10^{6}$**								
4.	जीवित द्विकपाटीय मोलस्कन												
5.	शीतित / जमी हुई द्विकपाटीय	**5**	**2**	**$1x10^{5}$**	**$1x10^{6}$**								
6.	जमी हुई पकाई हुई क्रस्टेशियंस / जमी हुई हीट मोलस्क्स	**5**	**2**	**$1x10^{5}$**	**$1x10^{6}$**	**5**	**2**	**$1x10^{2}$**	**$1x10^{3}$**				
7.	सुखाया गया / नमकीन और सुखाया गया मत्स्य उत्पाद	**5**	**0**	**$1x10^{5}$**						**5**	**2**	**100**	**500**
8.	ताप प्रसंस्कृत मत्स्य उत्पाद	**व्यवसायिक रूप से जीवाणूरहित**											

9.	फिश मिंस / सुरिमी एवं अनलोग्स	**5**	**2**	**$1x10^5$**	**$1x10^6$**	**5**	**2**	**$1x10^2$**	**$1x10^3$**				
10.	मत्स्य अचार	**5**	**0**	**$1x10^3$**		**5**	**1**	**$1x10^2$**	**$1x10^3$**				
	जांच विधि	**IS:5402/ ISO4833**				**IS: 5887खंड 8 (धारा 2)/ ISO 6888-2**				**IS: 5403/ ISO21527**			

मछली और मत्स्य उत्पादों के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञानीय अपेक्षाएं –सुरक्षा सूचक जीव

क्रम सं	उत्पाद श्रेणी	*एस्चेरिचिया कोलाई*				*साल्मोनेला*				*विब्रियो कोलेरे* (O 1और O139)				*लिस्टेरिया मोनोसैटोजेंस*			
		नमूना योजना		**सीमाएं (एम.पी.एन / ग्रा)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**	
		n	c	m	M	n	c	m	M	n	c	m	M	n	c	m	M
1.	शीतित / जमी हुई मछली	**5**	**3**	**11**	**500**	**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**					
2.	शीतित / जमी हुई क्रस्टेशियन	**5**	**3**	**11**	**500**	**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**					
3.	शीतित / जमी हुई सिफालोपोड्स	**5**	**2**	**20**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**					
4.	जीवित द्विकपाटीय	**5**	**1**	**230/**	**700/**												

	मोलस्कन			**100 ग्राम**	**100 ग्राम**												
5.	शीतित / जमी हुई द्विकपाटी	**5**	**2**	**46**		**10**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**					
6.	जमी हुई एवं पकाई हुई क्रस्टेशियंस / फ्रोज़ेन हीट शक्ड मोलस्क्स	**5**	**2**	**1**	**10**	**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**				**25 ग्राम में अनुपस्थित**		5	0	**25 ग्राम में अनुपस्थित**	
7.	सुखाया गया / नमक युक्त और सुखी मत्स्य उत्पाद	**5**	**0**	**20**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**									
8.	किण्वित मत्स्य उत्पाद	**5**	**2**	**4**	**40**	**10**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**									
9.	फिश मिंस / सुरिमी एवं अनलोग्स	**5**	**0**	**20**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**		5	0	**25 ग्राम में अनुपस्थित**	
10.	मत्स्य अचार	**5**	**0**	**20**		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**									

भारतीय गज़ट से लिए हुए(778GI/2017)

यूरोपीय मानक

यूरोपीय संसद और परिषद ने खाद्य कानून के सामान्य सिद्धांतों और आवश्यकताओं को निर्धारित किया, यूरोपीय खाद्य सुरक्षा प्राधिकरण की स्थापना की और खाद्य पदार्थों के लिए सूक्ष्मजीवविज्ञानी मानदंडों के साथ विनियमन (ई.सी.) सं.178/2002 और आयोग विनियमन (ई.सी.) सं. 2073/2005 सौदों के माध्यम से खाद्य सुरक्षा के मामले में प्रक्रियाओं को निर्धारित किया।

यूरोपीय संघ के देशों द्वारा मछली और मत्स्य उत्पादों के लिए कुछ महत्वपूर्ण सूक्ष्मजीवविज्ञानी मानक

क्रम सं	**उत्पाद श्रेणी**	*एस्चेरिचिया कोलाई*				*साल्मोनेला*				*लिस्टेरिया मोनोसैटोजेंस*				*कोएग्युलेज़ पोज़िटीव स्टेफिलोकोकाई*			
		नमूना योजना		**सीमाएं (एम.पी.एन / ग्रा)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**	
		n	c	m	M	n	c	m	M	n	c	m	M	n	c	m	M
1.	शिशुओं के लिए और विशेष चिकित्सा उद्देश्य के अलावा अन्य एल.मोनोसाइटोजेनस की वृद्धि का समर्थन करने में असमर्थ रेडी टु ईट खाद्य पदार्थ									**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**					

2.	पकाए हुए क्रस्टेशियन और मोलस्क शेलफिश					**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**							
3.	पकाए हुए क्रस्टेशियन और मोलस्कान शेलफिश के शेल्ड एवं शक्ड उपाद	**5**	**2**	**1** cfu/g	**10** cfu/g							**5**	**2**	**100** cfu/g	1000 cfu/g
4.	जीवित द्विकपाटीय और जीवित मोलस्क और जीवित एक्काईनोडेर्म्स, ट्यूनिकेट्स और जठरपाद	**1**	**0**	मांस और इंट्रा वाल्वुलर तरल के 230 एम.पी.एन./100 ग्राम		**5**	**0**	**25 ग्राम में अनुपस्थित**							

चीन के मत्स्य एवं मात्स्यिकी उत्पादों का सूक्ष्मजैविक मानक

चीन के राष्ट्रीय स्वास्थ्य एवं परिवार योजना आयुक्त (NHFPC) ने प्रसंस्करित पशु जनित जलीय उत्पादों के लिए राष्ट्रीय खाद्य सुरक्षा मानक प्रकाशित किया। प्रस्तुत मानक जलीय पशु उत्पादों से निर्मित ताज़ा एवं जमी हुई जलीय उत्पादों के लिए लागू किया गया है।

सूक्ष्मजीवविज्ञानीय सीमाएं

क्रम सं	**उत्पाद श्रेणी**	**एरोबिक प्लेट गिनती**				**कॉलिफोर्म कॉलोनियां**			
		नमूना योजना		**सीमाएं (cfu/g)**		**नमूना योजना**		**सीमाएं (cfu/g)**	
		n	**c**	**m**	**M**	**n**	**c**	**m**	**M**
1.	पशु अधारित अलीय उत्पाद	5	2	$5x10^4$	$1x10^5$	5	2	10	10^2

****