دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های زیستی، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی،
آزمایشگاه میکروبیولوژی

آزمایشگاه میکروب شناسی غذایی

مقدمه

نمونه برداری از مواد غذایی

تهیه کننده:سهیلا عباسی

جلسه اول: مقدمه

۱- مروری بر انواع محیط کشت ، کشت دادن میکروبی
۲- نمونه برداری جهت آزمایشهای میکروب شناسی مواد غذایی
۳- نگهداری و حمل نمونه ها
۴- تهیه و آماده کردن نمونه یکنواخت ماده غذایی
۵- روشهای عمومی شمارش میکروارگانیسمها
الف- شمارش میکروارگانیسم های زنده، هوازی و مزوفیل
ب- تخمین تعداد احتمالی میکروارگانیسمها
ج- شمارش مستقیم میکروسکوپی(بار میکروبی ماده غذایی)
د- فیلتر های غشایی

بررسی میکروبی مواد غذایی به چند دلیل ضروری به نظر میرسند؟

۱- برآورد طول عمر ماندگاری ماده غذایی یا مناسب بودن آن جهت مصرف انسان

۲- بررسی تعداد کل ارگانیسم های زنده و مهمتر بررسی جزء خاصی از فلور میکروبی

مثل کپک در غلات ،سایکرو تروف ها در محصولاتی که باید در یخچال نگهداری شود، بیهوازیها در مواد غذایی بسته بندی در خلا ،مخمر ها در نوشیدنی های میوه ای و...

۳- بررسی اینکه آیا ماده غذایی با استانداردهای میکروبی مطابقت دارد یا نه ؟

۴- شمارش کل ارگانیسم مزوفیل عمدتا به عنوان شاخص کیفیت میکروبی بار میکروبی مورد استفاده است.

۵- شناسایی عوامل ایجاد فساد یا تعیین حضور پاتوژن در موارد بروز بیماری از طریق غذا .

انواع محیط کشت :

- ۱- محیط کشت عمومی (Nutrient agar ,plate count agar باکتریها) و Malt extract agar Potato/dextrose agar قارچها که جهت رشد میکروارگانیسم ها ی کم توقع و هتروتروف بکار رفته و فاقد ترکیبات باز دارنده می باشد.
- ۲- محیط کشت انتخابی selective: دارای یک یا چند ترکیب است که برای اکثر میکروارگانیسم باز دارنده بوده اما بر روی یک گونه یا گروهی از آنها باز دارنده نیست. مثل SSA و Beard parker
- ۳- محیط های گزینشیSelective غنی شده: بدون مواد باز دارنده هستند اما طوری طراحی شده اند که موجب رشد سریع گونه یا گروهی از میکروارگانیسم نسبت به سایرآنها میشود. مثلا در دمای ۴۳ cooked meat broth بعد از ۶-۸ ساعت Cl.perfrigenesغالب میشود.
- ۴- محیط های افتراقی Diagnostic: آنزیم واکنش متابولیک

انواع کشت میکروبی

۱-کشت جامد که خود به روشهای زیر انجام میشود:

- کشت عمقی در لوله یا Stab (۵-۱۰ میلی لیتر محیط کشت) - کشت شیبداردر لوله یا Slant

- Shake culture کشت در داخل محیط جامد در لوله(مخلوط کردن نمونه با آگار مذاب و بستن محیط)

- کشت خطی در سطح محیط کشت جامد در پتری دیش (streak plate)

- کشت سطحی در پتری دیش (spread plate)کشت در سطح محیط جامد :مایعات با میله شیشه با سوآپ

- کشت دو لایه یا over lay - کشت اختلاطی یا pour plate

سوال – بررسی کنید هر کدام از کشت های فوق به چه منظوری و برای چه میکروارگانیسم های استفاده میشوند؟

(ارائه پاسخ در گزارش کار الزامیست)

نمونه برداری جهت آزمایش های میکروبی مواد غذایی

از نظر آزمایشگاه میکروب شناسی مواد غذایی، شرایط و ویژگی های نمونه ای که برای آزمایش انتخاب میشود اهمیت ویژه ای دارد. نمونه باید نماینده بهر (Lot) ماده غذایی باشد تا بتوان از بررسی یک نمونه کوچک برای یک بهربزرگ تصمیم گرفت. یعنی اگر نمونه برداری یا حمل و نقل آن صحیح انجام نشود قضاوت آزمایشگاه در مورد آن قابل اطمینان نیست.

بدین منظور بایستی:

۱ -روش معین و یکنواختی برای مواد غذایی که درحجم زیاد (مثلا برای صادرات) آزمایش میگردد،مورد استفاده قرارگیرد.

۲ -طبق استاندارد قانونی هرکشور وجود میکروارگانیسم های بیماریزایاسموم درماده غذایی منجربه ضبط وتوقیف محموله میشود.

پس نمونه برداشت شده تا حد امکان باید نماینده ای از کل ماده غذایی باشد.

۳ - تعداد واحدهای (units)برداشت شده از نظر آماری معنی دار باشد.

۴ -ترکیب و ماهیت ماده ی غذایی در یکنواختی و همگونی کل موثر است و در مقع برداشت نمونه بردار باید مشخص کند که نمونه جامد، نیمه جامد، مایع و یا ویسکوز است.

۵- در صورت امکان باید بسته بدون باز شدن در ظرف اصلی خود به آزمایشگاه منتقل شود

۶- اگر نمونه در حجم بزرگ و بسته بندی فله ای باشد نمونه برداری بایستی از قسمتهای مختلف آن انجام شود و در ظرف استریل و تحت شرایط استریل به آزمایشگاه منتقل شود.

۷- برای برداشت نمونه از چاقوی یک تکه از جنس استیل(فولاد زنگ نزن)، پنس ، قاشقک و قیچی استفاده میشود. (پس از پایان کار بسادگی شسته وبا پارچه تمیز خشک شده سپس با چراغ الکلی شعله داده میشود و قبل از استفاده نیز خنک میگردد اما فرو بردن لوازم در الکل اثر بخشی زیادی ندارد.)

۸- ظروف نمونه برداری معمولا دهان پهن و تمیز-خشک و غیر قابل نفوذ و قابل سترون شدن هستندو درآن نیزحتما بسته شود (ظروف شیشه ای قابل شکستن هستند و نمونه را آلوده میکنند و خیلی مناسب نیستند).

۹- برای مواد غذایی خشک از قوطیهای فلزی ، کیسه یا پاکتهای مناسب سترون که در آنها بسته میشود نیز استفاده میشود. کیسه و بطریهای پلاستیکی برای نمونه هایی که پوشش دارند مناسب است

۱۰- هر واحد نمونه بایستی بوسیله برچسب مخصوص در روی ظروف آن به طور وضوح و کامل مشخص گردد .

نکته: نبایستی از ماژیک ، مدادرنگی که در بسته نفوذ میکنند استفاده کرد.

۱۱- مقدار نمونه حداقل ۱۰۰ گرم باشد ودر شرایط اولیه سریعا به آزمایشگاه تحویل گردد.

۱۲- در شرایط اولیه سریعا آماده سازی شده و مورد آزمون قرار گیرد

۱۳- موقع تحویل نمونه به آزمایشگاه بایستی شرح نمونه، نام نمونه بردار، نام و نشانی تولید کننده ،واسطه یا توزیع کننده ، تاریخ، محل، زمان نمونه برداری و علت نمونه برداری ضمیمه گردد.

نمونه برداری از سطوح

از آنجا که بهداشت سطوح ، اصلی مهم در نگهداری مواد غذایی است برای شناسایی میکروارگانیسم های آن از روشهای زیر استفاده میشود:

۱-تست سوآب (swab test) جهت مطالعه سطوح نا هموار با آلودگی بالا مناسب است روشی سریع و ساده و ارزان می باشد و قابلیت جداسازی میکروبها توسط آن بطور متوسط ٪ ۷۵ که بستگی به بافت سطح، نوع و طبیعت میکروب دارد.

سوال: سواب چیست و چگونه بوسیله آن از سطح نمونه برداری میشود؟

۲- کشت سطحی یا RODAC(The Replicate organism direct agar contact)

جهت ارزیابی سطوح صاف ، محکم و بدون منفذ مناسب بوده برای سطوح با آلودگی پایین استفاده میشودو قابلیت جداسازی میکروارگانیسم های آن پایین و حدود ۰/۱٪ است.

سوال: روش آزمون کشت RODAC را بیابید و در گزارش کار بنویسید.

۳- روش سرنگ آگار /سوسیس آگار Agar syringe/agar sausage

در این روش سوزن انتهایی یک سرنگ ۱۰۰ میلیلیتری را جدا کرده، سلندر حاصله را پر از آگار نموده سپس برای بررسی سطح مورد نظر آگار موجود در سرنگ را به سطح یاد شده تزریق میکنند و بعد آنرا در پتری دیش ریخته و انکوبه میکنند. تنها تفاوت سوسیس آگار با این روش اینست که بجای سرنگ از لوله پلاستیکی استفاده میشود.

۴- کشت سطحی مستقیم Direct surface

روال کار به این ترتیب است که آگار مذاب روی سطح یا ظرف می پاشند و پس از سفت شدن آگار، آن را به پتری دیش به منتقل کرده و انکوبه می کنند. از این روش بطور موثری برای جداسازی اسپور های کلستریدیوم اسپوروژنزدر سطوح فولادی ضد زنگ استفاده میشود.

۵ -روش فیلم چسبناک Sticky film

در این روش ابتدا فیلم چسبناک را با فشار بر روی سطوح مورد نظر قرار داده سپس آنرا به همین صورت بر روی محیط کشت قرار میدهند و پس از انکوباسیون کلنی را بررسی و شمارش می کنند .این روش کارایی بالایی در تعیین میکروارگانیسم سطح گوشت دارد. در حالیکه برای سطوح چوبی سواب مناسبتر است.(نوار چسب برای پوست انسان مناسب است)

۶ +ولترا سونیک در واقع برای جدا شدن میکروارگانیسم از سطح مورد نظر مثل سواب پنبه ای و وارد شدن آن به ماده رقیق کننده آن را تحت لرزش صوتی در صوتهای با فرکانس بالا قرار میدهند.

۷ - تلمبه بارانی Spray gun در این روش، ابتدا یک محلول شستشو دهنده با فشاربه سطح محدودی پاشیده میشود و سپس آن را جمع آوری کرده ودر محیط مناسب کشت میدهند. در آزمایش سطحی گوشت این روش مناسبتر از تست سوآب است.

نکته: برای برش از سطوح از تیغ استریل خصوصا برای پوست ماکیان استفاده میشود و بعد رقت ۰/۱ تهیه میشود.

نکته :برای سوسیس ،میوه های خشک و سبزیجات قسمتی از نمونه بریده توزین و رقت ۰/۱ از آن تهیه میشود ، سپس در آب غوطه ور و بشدت تکان داده و مخلوط میشود.

نگهداری و حمل نمونه ها

اغلب لازم است نمونه ها قبل از حمل نگهداری شود درجه حرارت نگهداری منجمد ها ۲۰- و مواد غذایی فاسد شدنی صفرتا ۴/۴ درجه سانتیگراد نگهداری میشود. مواد غذایی فاسد شدنی نبایستی بیش از ۳۶ ساعت نگهداری شوند.

اگر نمونه خشک یا کنسرو باشد نیاز به نگهداری در سرما را ندارد.

نمونه هایی که بایستی دریخچال نگهداری شوند بهتراست در شرایط سرد به آزمایشگاه منتقل شوند(از یخ خشک یا یخ بسته بندی شده استفاده میشود)

وظیفه آزمایشگاه هنگام دریافت نمونه

- بررسی مشخصات برچسب و انجام اولویت آزمایش در صورت ضرورت
- مواد غذایی فاسد شدنی در یخچال و در ظروف ۳۶ ساعت آزمایش شوند
- نمونه های منجمد تا زمان آزمایش در حالت انجماد نگهداری شود
- نمونه های خشک یا کنسروی در دمای آزمایشگاه یا در صفرتا ۴/۴ درجه سانتیگراد قرار میگیرد
- نمونه ها از نظر شکل فیزیکی و ظاهر نمونه از نظر وجود پارگی بسته یا درز و... بررسی و یادداشت شود.(به دلیل امکان نشت و آلودگی (cross contamination))
- وجود تورم و تشکیل گاز در بسته ها بررسی شود و یادداشت شود.
- ظروف نیز از نظر امکان تجزیه و فساد روکش یا پوشش ظرف کنترل شود.

تهیه و آماده سازی نمونه یکنواخت ماده غذایی

-باز کردن نمونه بایستی تحت شرایط سترون انجام شود

- منجمد ها بایستی در یخچال از حالت انجماد خارج شوند البته میتوان از حرارت بالا تر در زمان کوتاهتر استفاده کرد تا میکرواگانیسم بیماریزا ی احتمالی ماده غذایی نابود نشوند (کمتر از۴۵ به مدت کمتر یا مساوی ۱۵). همچنین از ازدیاد تعداد میکرواگانیسم ها نیز بایستی درحین رفع انجماد جلوگیری کرد بدین منظور با استفاده از حمام آب دارای همزن و ترموستات(جهت کنترل حرارت) میتوان به رفع انجاد سرعت بخشید. نمونه برداری در شرایط انجماد بوسیله اره برقی، دریل الکتریکی بدون نیاز به یخ زدایی انجام میشود .

-مواد غذایی خشک باید با یک اسپاتول یا قاشق سترون مخلوط شود(از نواحی مختلف برداشته میشود.)

- برای گوشت و ماهی باید از عمق و از سطح نمونه برداشت(طوریکه حداقل آلودگی از سطح به عمق منتقل شود)

-رقت اولیه با توزین هر نمونه به طور سترون در داخل شیشه دهان گشاد سترون که دارای در است انجام شده و به آن محلول رقیق کننده سترون اضافه میشود.(برای مواد غذایی پروتئینی که نسبتا غیر قابل حل هستند مثل شیر خشک از محلول سیترات سدیم۱/۲۵ ٪ یا آب پپتونه ۰/۱ ٪ به عنوان رقیق کننده استفاده میشود)

- نمونه ها قبل از توزین کاملا هم زده شوند
- مقدار نمونه جهت آزمایش بستگی به یکنواختی ماده غذایی دارد و حد اقل بایستی ۱۰ گرم باشد (ترجیحا مقادیر ۳۵ تا ۵۰ گرم توصیه میشود)
- اگر نمونه یکنواخت نباشد (مثل نمونه های منجمد)بایستی ۵۰ گرم نمونه نماینده از قسمت خیس خورده از تمام بسته ها برداشت شود یا قسمتهای مختلف به طور مجزا آزمایش شود در صورت لزوم میتوان از استوماکر جهت یکنواختی نمونه ها استفاده کرد
- – در هر نمونه رقت 10^{-1} تهیه و بر حسب ماهیت نمونه سایر رقت ها را تهیه میگردد.

جهت مخلوط کردن رقت تهیه شده : تکانهای افقی یا عمودی به تعداد ۲۵ بار در یک قوس ۳۰ سانتی متری به مدت ۷ ثانیه یا میتوان با محلول رقیق کننده به یک مخلوط کن منتقل و به مدت ۲ دقیقه در ۸۰۰۰ دور دقیقه (معمولا سرعت کم) مخلوط کنید

فاصله زمانی همزن و خارج کردن نمونه مورد آزمایش نباید از ۳ دقیقه تجاوز کند زمان تهیه اولین رقت و رقتهای بعدی و کشت نمونه در آنها از ۱۰ دقیقه تجاوز نکند.

THANK YOU

تهیه کننده : سهیلا عباسی