



دانشگاه اصفهان

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



آزمایشگاه باکتری شناسی غذایی

بررسی میکروبی کنسروها



تهیه کننده: سهیلا عباسی



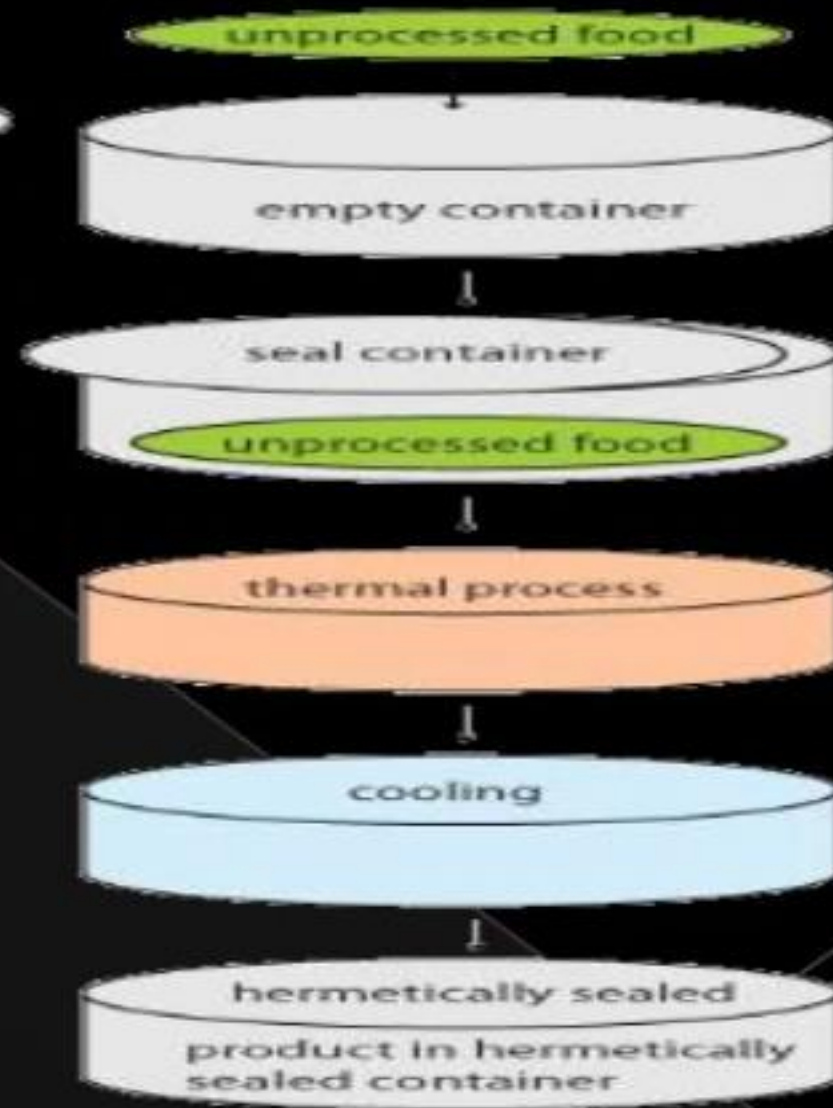
مقدمه :

آلودگی و فساد در بسته های کنسرو در اثر دو عامل مهم ممکن است اتفاق افتد؛ یکی در اثر عدم کفایت فرآیند دمایی که در این حالت فرم فعال یا اسپور میکرو ارگانیزم زنده مانده در بسته (کنسرو) فعالیت کرده و موجب فساد می شود.

دیگری آلودگی بعدی که بیشتر در اثر آلودگی آب برای سرد کردن کنسرو یا نشت کردن کنسروها در اثر زنگ زدگی یا عوامل مکانیکی اتفاق افتد.

Canning Process

1. Packing the product into the container.
2. Hermetically sealing the container
3. Thermally processing for product and the container together.
4. Cooling
5. Storage.



عوامل فساد در کنسروها

- فساد اکسیداتیو
- واکنش های آنزیمی
- واکنش مایلارد
- سوختگی انباری
- تشکیل رسوبات کریستالی
- خوردگی

فساد شیمیایی

فساد فیزیکی

- تو رفتگی قوطی
- برآمدگی قوطی
- تغییر شکل قوطی

- فساد قبل از عملیات حرارتی
- فساد قبل از عملیات حرارتی
- فساد ناشی از فرآیند حرارتی ناقص
- فساد ناشی از فرآیند حرارتی ناقص
- فساد ناشی از فرآیند حرارتی ناقص

فساد میکروبی

➤ بعد از فرایند حرارتی قوطی های کنسرو معمولا به وسیله آب خنک می شوند. در این مرحله امکان نفوذ آب از طریق درزهای قوطی بر اثر شوک ناگهانی خنک کردن موجود است.

➤ در چنین مواقعی امکان دارد کمی از آب مخصوص خنک کردن قوطی وارد آن شود. نتیجتا آب مورد مصرف باید دارای کیفیت مناسبی بوده و تعداد باکتری های موجود در آن نباید از ۱۰۰ عدد در میلی لیتر بیشتر باشد تا امکان آلودگی بعد از فرایند فراورده به حداقل کاهش یابد. آلودگی های بعد از فرایند اغلب شامل میکروارگانیسم های فلاوباکتریوم ، کوکوس ها و سایر باکتری های غیر هاگ زا است.

➤ روش های آزمایش غذا کنسرو شده شبیه به غذا های غیر کنسرو شده است.

➤ علاوه بر آن آزمایش های سترون بودن در مورد قوطی های کنسرو قبل و بعد از نگهداری آن ها در انبار نیز باید انجام گیرد. میکروارگانیسم های بیماری زا مثل کلستریدیوم بوتولینوم، کلستریدیوم پرفرینجس، استافیلوکوکوس آرتوس، سالمونلا و شیگلا مطلقا نباید در کنسرو وجود داشته باشند. شمارش مستقیم میکروسکپی خیلی بالا همراه با عدم وجود میکروارگانیسم های زنده نشان دهنده ی احتمال فساد فراورده قبل از کنسرو کردن آن است.

از موارد مهم استثنایی که ذکر گردید می توان فراورده های گوشت نمک سود را نام برد. این گونه مواد غذایی اگر حرارت زیادی ببینند، کیفیت خود را از دست می دهند. به همین جهت حرارت کمتری همراه با **افزودن نیتريت و نیترات و کلوروسدیم** به آن ها داده می شود لذا این فراورده های کنسرو شده باید در بخچال نگهداری شوند و قابلیت نگهداری آن ها نیز محدود است.

ممکن است در این کنسرو ها انواع مختلفی از باکتری های اسپورزا و یا حتی استرپتوکوک ها یافت شوند. ولی باکتری های گرم منفی وجود ندارند و بودن آن ها دلیل بر فرایند نامناسب یا آلودگی بعد از فرایند است.

از آن جایی که هاگ بعضی از میکروارگانیزم های عامل فساد که بیماری زا نیستند معمولا در غذا های کنسرو شده یافت می شود (باسیلوس / استئاروترموفیلوس) و مقاومت این ارگانیزم ها در برابر حرارت خیلی بیشتر از هاگ کلستریدیوم بوتولینوم است، آزمایش مواد غذایی جهت تشخیص این میکروارگانیزم ها می تواند در تعیین کفایت فرایند حرارتی کافی باشد.

نوع ماده غذایی و میکروارگانیسم موثر بر آن

مطالعات انجام شده نشان می دهد که بار میکروبی کنسروهایی که در اثر عدم کفایت فرآیند دمایی آلوده هستند تابع PH محیط است.

بنابراین با توجه به نوع محصول و نوع آلودگی، متخصصین، مواد غذایی را با توجه به اشکال مختلف طبقه بندی کرده اند.

در سال ۱۹۴۰ طبقه بندی مواد غذایی بر اساس PH توسط Esty و Cameron انجام شده بصورت زیر:
۱- غذاهای دارای خاصیت اسیدی زیاد :

تجزیه ی مواد غذایی در قوطی هایی که محتویات آن دارای خاصیت اسیدی زیاد ($pH=3.7$ یا کمتر) هستند (مانند خیار شور و یا برخی از آب میوه ها) به ندرت اتفاق می افتد.

۲- غذاهای دارای خاصیت اسیدی کم :

اگر pH ماده ی غذایی حدود $4/5$ الی $3/7$ باشد برخی از انواع هوازی و بی هوازی و انواع مولد اسپور باعث تجزیه ی ماده غذایی می شوند. این عمل به میزان خیلی کم در انواعی از مواد غذایی مانند برخی از آب میوه ها رخ می دهد. برخی از انواع لاکتوباسیل ها، لاکونوستوک ها و مخمرها در قوطی های واجد این گونه مواد غذایی یافت می شوند. اکثر باکتری ها به علت اسیدی بودن محیط به ندرت در آن رشد می کنند.

۳- غذا های دارای خاصیت اسیدی خیلی کم :

➤ اگر pH بیشتر ۴/۵ باشد، (مانند اکثر مواد غذایی موجود در قوطی ها که دارای pH نزدیک به ۵ هستند) در صورتی که مراحل مختلف تهیه قوطی ها با دقت توام نباشد، احتمال وجود یکی از انواع حرارت دوست زیر در قوطی موجود است:

➤ الف- باسیلوس استئاروترموفیلوس : که معمولا باعث ترش شدن ماده غذایی می شود.

➤ ب- کلستریدیوم ترموسا کارولیتیکوم : باعث باد کردن قوطی می شود.

➤ ج- کلستریدیوم نیگریفیکانس : باعث تولید بوی گوگرد در ماده غذایی می شود.

➤ د- باکتری های مزوفیل مولداسپور و باکتری های بی هوازی اختیاری در این گروه باعث فساد ماده غذایی می شوند.

➤ علاوه بر گروه های ذکر شده برخی از انواع گرم منفی، لوکونوستوکها، میکروکوک ها و استافیلوکوک ها (مخصوصا استافیلوکوکوس آرتوس) نیز در برخی از قوطی ها که به طریق صحیح تهیه نشده اند دیده می شوند.

➤ نظر به این که مواد غذایی کنسرو شده بنا به دلایلی ممکن است در معرض حرارت کافی، جهت نابود شدن کلیه ی میکروارگانیسم ها قرار نگیرند، لذا احتمال وجود تعداد زیادی از میکروب های مختلف در این گونه مواد غذایی وجود دارد.

Types of Spoilage Microorganisms

Types of Spoilage Microorganisms

Sulfide
Stinkers

Putrefactive
Anaerobes

Mesophilic
Anaerobic
Sporeformers

Mesophilic
Aerobic
Sporeformers

Non-
sporeformers

Heat-
Resistant
Molds

Aciduric Flat
Sour
Sporeformers

Thermophilic
Anaerobic
Sporeformers

Thermophilic
Flat Sour
Sporeformers

➤ ابتدا قوطی کنسرو و یا کمپوت را از نظر وضع ظاهری مورد بررسی قرار داده و آن ها را به سه دسته سالم، مشکوک و معیوب به شرح زیر تقسیم کنید.

➤ قوطی های سالم: قوطی هایی هستند که دارای ظاهر معمولی، با درز بندی سالم عاری از بادکردگی، زنگ زدگی و یا نشت کردگی می باشند.

➤ قوطی های مشکوک: چنانچه قوطی های کنسرو و یا کمپوت دارای هر یک از حالات زیر باشند، مشکوک محسوب می شوند.

➤ قوطی هایی که دارای بادکردگی خفیف هستند:

➤ در این حالت سطح قاعده ی قوطی از حالت طبیعی خارج شده است و به صورت کمی متورم در میاید. در بعضی از موارد فشار انگشت در سطح متورم باعث می شود که در طرف متقابل متورم شود و در پاره ای دیگر از موارد فشار انگشت باعث فرو رفتن سطح باد کرده می شود و با برداشتن انگشت قوطی به حالت اولیه خود برمی گردد.

➤ این قوطی ها باید گرمخانه گذاری شود و روزانه مورد بررسی قرار گیرند. چنانچه در اثر گرمخانه گذاری بادکردگی شدید و احتمال انفجار وجود داشت باید بلافاصله قوطی ها را خارج کرده و مورد آزمایش قرار دهید.

➤ قوطی هایی که دارای بادکردگی شدید هستند :

➤ در این حالت دو سطح قاعده کاملا بر آمدگی می باشد و گاهی اوقات به سبب فشار زیاد گاز داخلی، تغییر شکل در محل درزها و در زبندی بوجود می آید، این نوع بادکردگی ممکن است به یکی از دلایل زیر باشد.

➤ الف- آلودگی های میکروبی، که در این صورت نمونه ها مردود می باشند.

➤ ب- واکنش های شیمیایی، که در این صورت صلاحیت مصرف این نوع کنسرو ها پس از انجام آزمایش های شیمیایی تعیین می گردد.

➤ پ- پر شدن بیش از حد قوطی، تغییر فشار جو و حرارت.

➤ قوطی هایی که دارای زنگ زدگی خفیف هستند :

➤ در این حالت زنگ زدگی بداخل قوطی نفوذ نکرده است.

➤ قوطی هایی که دارای ضرب دیدگی خفیف هستند :

➤ در این حالت ضرب دیدگی به پوشش داخلی قوطی آسیب زیادی نرسانده است. این قوطی ها باید مانند

قوطی ها باید مانند قوطی های سالم گرمخانه گذاری شده، سپس مورد آزمایش قرار گیرند.



Swollening of can

➤ قوطی های معیوب :

➤ چنانچه قوطی های کنسرو و یا کمپوت دارای هر یک از حالات زیر باشند معیوب و مردود شناخته می شوند در این صورت نیازی به انجام آزمایش های میکروبی نمی باشند. مگر در موارد یک منظور از آزمایش شناسایی عامل آلودگی باشد.

➤ قوطی های در باز

➤ قوطی های سوراخ شده و نشت کرده

➤ قوطی های دارای رنگ زدگی شدید

- قوطی های سوراخ شده که مجدداً لحیم شده اند

- قوطی هایی که در اثر ضربه شدید کج یا تا شده و شکل ظاهری آن ها تغییر کرده است که معمولاً در قسمت هایی که ضرب دیدگی شدید دارند ورنی قوطی از بین می رود.

Spoilage by Non-sporeforming Bacteria

- Due to leakage of the can- *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavonabacterium*, *proteus* and other microorganisms can also causes spoi





Black spot on tin and on food

مواد و وسایل مورد نیاز:

1. نمونه ماده غذایی (کنسرو رب گوجه فرنگی ، کنسرو نخود فرنگی)
2. درب بازکن قوطی کنسرو
3. دستگاه pH متر
4. پنبه - الکل
5. پتری دیش استریل
6. محیط کشت کوکدمیت
7. بشر حاوی آب جوش
8. بن ماری (65 c)
9. پارافین
10. لوله حاوی محیط کشت آگار ترمواسیدورانس
11. محلول های رنگ آمیزی گرم

➤ انکوباسیون اولیه نمونه ها :

➤ به جز در مورد کنسرو های متورم، کلیه نمونه ها را باید قبل از این که کشت داده شوند در دمای گرمخانه نگهداری کرد.

➤ ارگانیسیم هایی که بعد از مراحل عمل آوردن زنده می مانند ممکن است از لحاظ تعداد کم باشند و مقصود از انکوباسیون اولیه این است که تکثیر ارگانیسیم های زنده مانده را تشدید کرده و بنابراین شانس باقی مانده آن ها را در محیط، هنگام برداشت، افزایش دهد.


➤ از آنجایی که مجاورت ارگانیسیم ها با حرارت نیمه کشنده ممکن است باعث شود باکتری ها به حالت کمون در آیند، بنابراین زمان انکوباسیون اولیه بسیار مهم می باشد.

روش آزمایش:

➤ جهت انجام آزمایش ابتدا باید انکوباسیون اولیه انجام گیرد و جهت این عمل نمونه ای که به آزمایشگاه می رسد باید برای مدت معینی تحت حرارت مشخص در انکوباتور قرار گیرد که بر حسب هدف جداسازی نوع باکتری مقدار و درجه حرارت انکوباسیون و متفاوت می باشد.

➤ در صورتی که هدف جداسازی باکتری های ترموفیل باشد باید نمونه مورد آزمایش را به مدت ۸ روز در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد قرار داد و در صورتی که هدف جداسازی باکتری های مزوفیل باشد باید نمونه ماده غذایی را به مدت ۱۰ الی ۲۰ روز در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داد.

➤ در حین اتوگذاری باید قوطی کنسرو را بخوابانید تا حرارت به صورت یکسان بر قوطی کنسرو اثر بکند و در صورتی که در حین اتوگذاری قوطی کنسرو و بادکرد باید آن را از اتو خارج کنید.



برای شروع آزمایش باید قوطی را آماده کرده باشید و بر حسب قوطی را برداشته و در صورتی که قوطی کثیف بود با آب و صابون کاملا تمیز کنید. سپس درب کنسرو را با پنبه آغشته به الکل تمیز کنید و آن را روی شعله چراغ گاز بگیرید ولی باید دقت کنید که شعله نباید زیاد باشد.

می توانید آن را با ساولون ضد عفونی کنید و درب بازکن را الکل زده و روی شعله بگیرید و حرارت دهید و بدون این که درب قوطی کنسرو را حرارت دهید در کنار شعله درب کنسرو را باز کنید

قبل از بازکردن درب قوطی کنسرو های باد کرده باید دقت نمود که در صورتی که تورم قوطی بیش از حد باشد ابتدا یک قیف شیشه ای را به صورت معکوس بر روی قوطی کنسرو قرار داد و با عبور دادن یک میخ استریل از طریق لوله قیف به آرامی با زدن چند ضربه قوطی را سوراخ کنید تا گاز تجمع پیدا کرده در قوطی به آرامی خارج شود، و سپس اقدام به باز کردن درب کنسرو کنید.

بعد از بازکردن درب کنسرو به کمک دستگاه pH متر، pH کنسرو را اندازه گیری کنید و در صورتی که pH کنسرو بیش از ۴/۵ بود از محیط کشت کوکدمیت و در صورتی pH کنسرو کمتر از ۴/۵ بود از محیط کشت آگار ترمواسیدوانس استفاده کنید.



سازمان ملی تحقیقات و آموزش در زمینه ایمنی و کیفیت مواد غذایی
وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی

آماده سازی و گرمخانه گذاری مواد غذایی کسرو شده اسیدی و کم اسید (بر اساس استاندارد ملی ۲۳۲۶ جاب اول سال ۱۳۸۶)



➤ جهت نمونه هایی که درای pH بیش از ۴/۵ هستند از ۴ لوله حاوی محیط کشت کوکدمیت استفاده کنید و لوله ها را از شماره ی ۱ الی ۴ شماره گذاری کنید. لوله های شماره ۱ و ۲ را برای کشت هوازی و لوله ها شماره ۳ و ۴ را برای کشت بی هوازی انتخاب کنید.

➤ لوله های شماره ۳ و ۴ (لوله های کشت بی هوازی) را جهت خارج کردن اکسیژن محلول در آن ها به مدت ۱۰ دقیقه در داخل بشر حاوی آب جوش قرار دهید.

➤ سپس به داخل تمام لوله ها به کمک پی پت مقدار ۱ الی ۲ میلی لیتر از کنسرو را اضافه کنید. در هنگام اضافه نمودن نمونه باید دقت کنید که لوله های محیط کشت را نباید تکان دهید و نمونه را آرام ، آرام به لوله ها اضافه کنید و سپس یک لوله از لوله های محیط کشت هوازی (لوله ی شماره ۲) و یک لوله از لوله های محیط کشت بی هوازی (لوله ی شماره ۴) را به مدت ۱۵ دقیقه در داخل بن ماری ۶۵ درجه سانتی گراد شوک حرارتی دهید و با ریختن پارافین بر روی لوله های شماره ی ۳ و ۴ شرایط بی هوازی را برای آن ها ایجاد کنید و سپس تمامی ۴ لوله را به ۷۲ ساعت در داخل گرمخانه (انکوباتور) با حرارت ۳۷ درجه ی سانتی گراد قرار دهید.

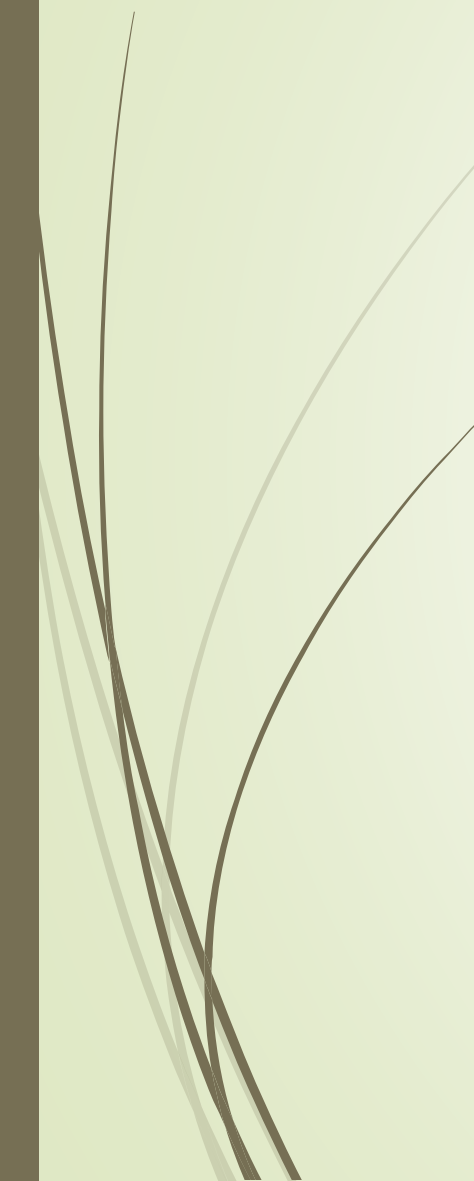
بعد از طی مدت زمان فوق نتیجه را به صورت بوجود آمدن کدورت در سطح مایع و یا متلاشی شدن قطعات گوشت در لوله های بی هوازی و یا ایجاد گاز و بالا آمدن پارافین در این لوله ها بررسی کنید و با خارج کردن پارافین از لوله های بی هوازی و انجام عمل رنگ آمیزی به روش گرم برای تمامی لوله های مرفولوژی و واکنش گرم باکتری های جدا شده را مشخص کنید.



گشت میکروبی مواد غذایی کنسرو شده کم اسید و اسیدی (بر اساس استاندارد ملی ۲۳۲۶ چاپ اول سال ۱۳۸۶)



پودان غذایی کسرو شده اسیدی



➤ در صورتی که نمونه کنسرو شده دارای pH کمتر از ۴/۵ باشد از محیط کشت آگار ترمواسیدورانس باید استفاده کرد.

➤ برای این آزمایش مقدار یک میلی لیتر از ماده مورد آزمایش را در داخل پتری دیش استریل ریخته و سپس لوله محیط کشت آگار ترمواسیدورانس را که قبلا به حالت مذاب در آمده است و اکنون حرارت آن به حدود ۵۰ درجه سانتی گراد رسیده است را در کنار شعله چراغ گاز و با رعایت شرایط آسپتیک به آرامی به پتری دیش اضافه کنید و پتری دیش را به صورت علامت 8 به صورت پورپلیت چند با حرکت داده تا نمونه ماده غذایی با محیط کشت به خوبی مخلوط گردد.

➤ بعد از سفت شدن محیط کشت و نوشتن مشخصات آزمایش بر روی پتری دیش آن را به مدت ۳ الی ۵ روز در حرارت ۵۵ درجه سانتی گراد قرار دهید. با توجه به رشد کلنی باکتری ها بر روی آن اقدام به انجام عمل رنگ آمیزی به روش گرم و مشخص نمودن واکنش گرم و مرفولوژی باکتری جدا شده کنید.



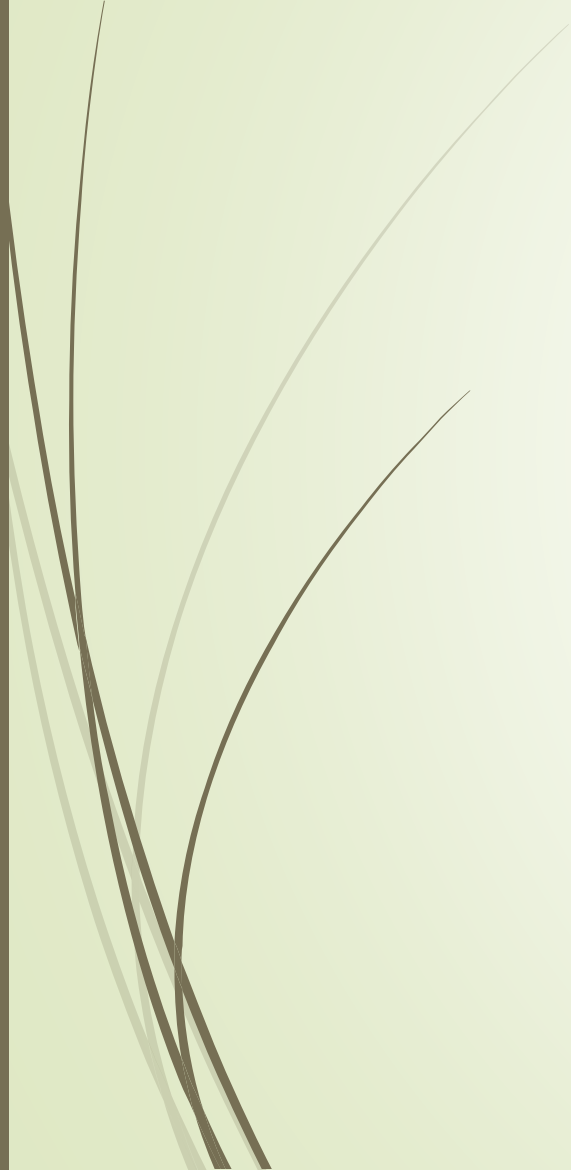
Spoilage by thermophilic spore-forming bacteria

Flat sour causing organism detection by culture methods



Microbial spoilage in canned food

Canned food	Products	Type of spoilage	Organism	Signs of spoilage	
				In the can	In the canned food
Corn, peas, spinach, asparagus	Low and medium acid products; pH above 4.6	Flat sour spoilage	<i>Bacillus steavo-thermophilus</i>	Possible loss of vacuum	Lowered pH; sour, slightly abnormal odour, etc.
		Thermophilic anaerobic	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	Can swells, may burst	Fermented, sour cheesy, or butyric odour
		Sulfide spoilage	<i>Clostridium nigricans</i>	Can flat	Usually blackened, 'rotten egg' odour
		Putrefaction	<i>Clostridium sporogenes</i>	Can swells; may burst	Typical putrid odour; pH slightly above normal; may be toxic
Tomato juice, fruits, fruit juices	Acid products; pH below 4.6	Flat sour	<i>Bacillus thermoacidurans</i>	Little change in vacuum	Slight pH change; off flavour and odour
		Butyric anaerobes	<i>Clostridium butyricum</i>	Can swells; may burst	Fermented, butyric odour
			Mostly lactic acid type of bacteria	Can swells; may burst	Acid odour
			Yeasts	Can swells; may burst	Fermented, yeasty odour
		Molds	Can flat	Surface growth, musty odour	





از حسن و روح شما ساکنان مرام