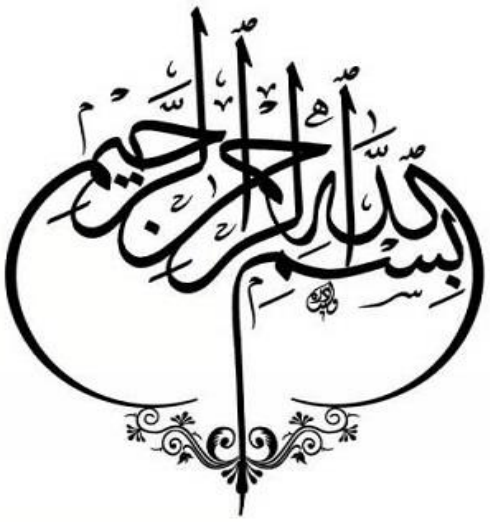


جزوه کنترل کیفیت مواد اولیه

(بخش دوم جزوه)

Shamim Khandan Alamdari

شمیم خندان علمداری

دانشگاه فنی و حرفه ای دختران ولی عصر (عج)

ضنایع غذایی – کنترل کیفیت

۱۳۹۸

به نام خدا

با سلام خدمت دانشجویان عزیز؛

باتوجه به وضعیت پیش آمده (بیماری کرونا وایرس) ، جزوه درس کنترل کیفیت مواد اولیه به صورت PDF خدمت شده ارائه شده است . سعی شده است که به صورت روان و شیوا برای شما تهیه شود. درصورتکه پس از مطالعه سوال یا ابهامی برای شما ایجاد گردید می توانید از طریق ایمیل در تماس باشید.

برای همه ی شما عزیزان آرزوی موفقیت و سلامتی دارم

Shamim Khandan Alamdari

شمیم خندان علمداری

Email: sshamimkh@yahoo.com

گندم

گندم ، مهمترین گیاه زراعی روی زمین است. سابقه کشت گندم به ۱۰ تا ۱۵ هزار سال پیش از میلاد می رسد و اجداد وحشی گندم در منطقه خاور میانه، غرب ایران، شرق ترکیه و شمال عراق پیدا شده و هم اکنون هم در این مناطق وجود دارد. معروف است که هر روز در نقطه ای از کره زمین کاشت و در همان روز در نقطه ای دیگر برداشت می شود. این امر حاکی از توانایی سازش بسیار زیاد این گیاه با اقلیم های گوناگون است. گندم در محدوده وسیعی از شرایط آب و هوایی جهان رشد می کند، این گیاه یکی از سازگارترین گونه های غلات است. از آنجاییکه گندم غذای اصلی انسان بوده و بطور مستقیم مورد مصرف قرار می گیرد، سطوح وسیعی از زمین های قابل کشت جهان به کشت گندم اختصاص دارد. گندم منبع اصلی کربوهیدرات غذای انسان را تشکیل داده و از لحاظ تهیه و ارزش نان کیفیت بالایی دارد و دلیل آن وجود گلوتن در دانه گندم می باشد.

هرگاه ساختمان دانه ی گندم را در نظر بگیرید شامل یک پوسته ی خارجی یا سبوس ، قسمت نشاسته ای یا اندوسپرم و جوانه است. نسبت این قسمت ها در گندم عبارت است از : قسمت نشاسته ای (۸ %) ، سبوس (۱۲/۵ %) ، و جوانه (۲/۵ %)

- ترکیبات آرد گندم مختلف است و بستگی به نوع گندم و نسبت سبوس گسری و نسبت سبوس گیری در مرحله ی آسیاب کردن دارد.

- جوانه دانه گندم شامل مقدار قابل توجهی پروتئین و چربی بوده و سبوس حاوی مقدار زیادی سلولز و خاکستر است و ترکیب عمده ی اندوسپرم را نشاسته تشکیل می دهد آرد کامل که از دانه کامل بدست می آید دارای رنگ تیره می باشد ، و نسبت پروتئین و چربی و خاکستر در آن بیشتر بوده و در نتیجه دارای ارزش غذایی بیشتری است.

- هرچه درجه سبوس گیری بیشتر باشد ← رنگ آرد روشن تر می باشد ← و نسبت مواد پروتئینی و چربی نیز در آن کاهش می یابد.

- با تکنیک های جدید آسیاب کردن چند نوع مختلف آرد تولید می شود ←

آرد کامل ← درجه استخراج آن بین ۹۰ تا ۱۰۰ درصد است ← و در درجات دیگر آرد با ۸۰ % و ۷۲% استخراج تولید می گردد.

● آردی که درجه استخراج آن کمتر است ← رنگ آن سفیدتر ← و برای مصارف شیرینی پزی و نانوایی بسیار مرغوب است ، اما ارزش غذایی کمتری دارد و در اکثر کشورها این نوع آرد را با افزایش برخی از مواد افزودنی (ریبوفلاوین، اسید نیکوتونیک ، آهن کلسیم تیامین و ....) غنی می کنند .

● آرد گندم مقدار قابل توجهی گلوتن دارد.

● گلوتن : دارای خاصیت الاستیسیته و نیز جذب آب قابل توجهی است ← به همین دلیل آرد گندم نسبت به سایر آردها برای نانوایی مرغوب تر و مناسب تر است.

مهم ترین ویژگی هاي آرد که می تواند بر روي عمل آوري خمیر و پخت نان و کیفیت نان تولیدي اثرگذار با شد عبارتست از:

- **رنگ آرد**

عوامل مؤثر در رنگ آرد : نوع گندم، میزان سبوس در آرد و اندازه آن، وجود ناخالصی مثل شن و ماسه، رطوبت و کهنگی آرد . سفید بودن آرد همواره به معناي کیفیت بهتر آرد نیست، بلکه بسته به نوع نان و با توجه به میزان سبوس در آرد، در برخی موارد آرد هاي تیره براي بعضی از نان ها مثل نان سنگک مناسب تر هستند

- **میزان سبوس در آرد**

سبوس یک جزء باارزش و داراي مواد غذایی فراوان می باشد . سبوس آرد بر روي رنگ آرد تأثیرگذار بوده، همچنین میزان آب جذب شده توسط آرد در هنگام تهیه خمیر به میزان سبوس در آرد بستگی دارد . به عبارت دیگر آردهاي داراي سبوس بیشتر، در هنگام خمیرگیري آب بیشتري جذب می نمایند

- **اندازه سبوس**

اندازه سبوس در رنگ آرد و بر عمل آوري خمیر و کیفیت پخت نان اثرگذار می باشد . تجربه نشان داده چنانچه اندازه سبوس درشت تر از حد معمول با شد علاوه بر تیرگی رنگ آرد موجب پایین آمدن کیفیت نان خواهد گردید

- **اندازه ذرات (دانه بندي آرد)**

علاوه بر تأثير سبوس بر نرمی و زبري آرد، اندازه ذرات (دانه بندي) آرد نيز با تأثير بر نرمی يا زبري آرد و ميزان جذب آب، روي كيفيت خمير حاصل و در نهايت چگونگی بافت نان اثرگذار می باشد

- **نكته**

آردهاي زبر، تيره تر از آردهاي نرم ديده می شوند. زيرا آنها سايه به وجود آورده و نور را می شكنند، به عنوان مثال رنگ سمولينايی كه ذرات و ابعاد آن درشت است زرد ديده می شود در حالی كه اگر آن را نرم نماييم رنگ آن سفيد و روشن تر به نظر می رسد .

قدرت آرد به لحاظ قوام و كشش خمير حاصل در برخی موارد مشاهده می شود كه خمير حاصل قوام و كيفيت خوبی به لحاظ قدرت و كشش و خاصيت ورآ مدن ندارد . اين امر به دلا يل مختلف از جمله : كيفيت گندم و شرايط توليد آرد مربوط می گردد . در چنين مواردي شناخت راهكارهاي منا سب و به كارگيري صحيح اين راه ها براي بهبود كيفيت خمير از جمله مهارت هاي مهم براي نانوا محسوب می شود . استفاده درست و به جا از مواد افزودنی مانند بهبوددهنده ها می تواند تا حدود زيادي علاوه بر اصلاح ضعف آرد حتی موجب كيفيت مطلوب نان گردد.

رطوبت

Shamim K.

۱)روش انتخابی

دستگاه های مورد نیاز شامل ←

- ترازوی آزمایشگاهی (با دقت ۰/۱ میلی گرم)
- اتوو که حرارت آن در ۱۰۰ درجه سانتیگراد میزان شده باشد.
- دیسکاتور که حاوی یک جسم رطوبت گیر مناسب باشد.
- ظروف فلزی در دار مخصوص اندازه گیری رطوبت که دارای قطر ٤ تا ٦ سانتیمتر بوده و ارتفاع آن از ٥ سانتی متر متجاوز نباشد.

روش آزمون ، ظرف مخصوص ظرف مخصوص اندازه گیری رطوبت را که قبلا بمدت یک ساعت در اتو و خشک شده است در دیسکاتور تا حرارت ازمایشگاه سرد کرده و آن را دقیقا توزین کنید ← سپس ۵ گرم از نمونه را در آن به دقت ۰/۱ میلی گرم توزین کرده و آن را به اتوو منتقل نمایید ← پس از ۵ ساعت ظرف را از اتوو خارج کنید و آن را در دسیکاتور تا حرارت ازمایشگاه سرد کنید ← این عمل را تا حصول وزن ثابت ادامه دهید ← سپس مقدار درصد رطوبت را از رابطه زیر محاسبه کنید:

$$\frac{(m1 - m2) \times 100}{m0}$$

m1 = وزن ظرف + آرد قبل از خشک کردن

m2 = وزن ظرف + آرد پس از خشک کردن

m0 = وزن نمونه مورد آزمایش

۲) در کارخانجات معمولا روش های سریع بیشتر مورد نظر است و از این رو روش کارترسیمون (به صفحه ۷ مراجعه کنید) که نمونه مدت ۱۵ دقیقه تحت حرارت ۱۵۰ درجه سانتی گراد قرار می گیرد.

استفاده از کوره مادون قرمز (به صفحه ۸ مراجعه کنید) و نیز اتوومجهز به خلاء (به صفحه ۵ مراجعه کنید) روش هایی است که غالبا در کارخانجات بکار می رود ← اما نتیجه این روش ها همیشه در حدود ۱% بیشتر از روش انتخابی است که قبلا ذکر شد و بدین جهت در گزارش نتیجه عملیات ازمایشگاهی باید روشی که برای تعیین رطوبت بکار رفته است قید شود.

● نتیجه ای که از روش های حرارتی فوق حاصل می شود رطوبت آزاد در نمونه را بیان می کند و آب پیوسته اندازه گیری نمی شود ← در حالی که با روش تقطیر و بکار بردن ۲۰ گرم از نمونه و استفاده از جلال های تولوئن و یا گزیلین (به صفحه ۶ مراجعه کنید) می توان رطوبت تام را در نمونه اندازه گیری کرد.

● توجه کنید که هرگاه رطوبت آرد از ۱۳% بر طبق روش انتخابی متجاوز باشد محیط مساعدی برای رشد میکروارگانیسم و حشرات نیز قارچ و کپک و ... خواهد بود.

Shahrim Khanlan Alamdari

خاکستر :

● مقدار خاکستر در قسمت سبوس دانه بیشتر از قسمت اندوسپرم یا قسمت نشاسته ای دانه است و میزان خاکستر در آردهایی که املاح خارجی به ان اضافه نشده باشد درجه سبوس گیری یا سفید کردن آرد را بیان می کند.

● مقدار خاکستر در آرد کامل گندم ۱/۲ تا ۱/۸ درصد و هرگاه بازده آرد ۷۲% باشد این مقدار به ۰/۲ تا ۰/۵ درصد کاهش می یابد.

● در آردهایی که کربنات کلسیم به ان اضافه می شود مقدار خاکستر تعیین کننده درجه آرد نمی باشد.

● روش عمل ← ۳ – ۵ گرم از نمونه را مانند روش کلی (به صفحه ۱۰ مراجعه کنید) عمل کنید.

خاکستر غیر محلول در اسید :

به خاکستر حاصل از ۳ – ۴ سانتی متر مکعب اسید کلریدریک در حدود ده نرمال اضافه کرده ← سپس آن را روی حمام بخار تبخیر کنید ← سپس ان را به مدت ۱ ساعت دیگر نیز حرارت دهید ← ۲۵ سانتی متر مکعب اسید کلریدریک دو نرمال به آن اضافه کنید ← ۵ دقیقه آن را روی حمام بخار حرارت داده ← سپس روی یک کاغذ صافی بدون خاکستر عبور دهید ← باقی مانده مواد در بوته خاکستر را با مقداری اسید کلریدریک رقیق شسته و به کاغذ صافی اضافه کنید ← کاغذ صافی را به وسیله آب داغ بشویید و آن را به بوته اولیه منتقل کرده و در حرارت ۵۵۰ – ۶۰۰ درجه سانتی گراد بسوزانید و بعد از سرد کردن در دسیکاتور آن را توزین کنید .

• وزن مواد باقی مانده در بوته مقدار خاکستر غیر محلول در اسید را نشان می دهد.

پروتئین :

• به دلیل اینکه جوانه دانه غلات شامل مقدار قابل توجهی پروتئین است ، که در زمان سفید کردن آرد گرفته می شود ← پروتئین آرد کامل بیشتر از آرد سفید است .

Shamim Khandan Alamdari

• روشی که برای تعیین پروتئین در آرد به کار می رود ← **روش کدال**

• در روش ماکروکدال ← معمولا مقدار ۱/۴ گرم نمونه مورد آزمایش قرار می گیرد

• در روش میکروکدال ← مقدار نمونه ۰/۲ – ۰/۵ گرم در نظر گرفته می شود

• ضریب تبدیل ازت به پروتئین ← ۵/۷

• همچنین از روش جذب رنگ برای اندازه گیری پروتئین در انواع آردها استفاده می شود.

گلوتن :

• روشی که برای اندازه گیری مقدار گلوتن به کار می رود زیاد دقیق نیست اما از ننظر کنترل کارخانه ای روی نمونه آرد تحویل شده کافی به نظر می رسد.

• روش کار ← ۲۰ گرم آرد را با ۱۵ سانتی متر مکعب آب محلوط کرده ← با دست و یا کاردک به خوبی مخلوط کنید به طوری که خمیر سفتی تولید شود ← سپس آن را در یک بشر محتوی آب انداخته و با کمک انگشت آن را در اب فشار دهید تا مواد نشاسته ای آن خارج شود ← سپس این عمل زیر شیر اب انجام دهید ← آنقدر ادامه دهید تا آب خارج شده از خمیر بی رنگ باشد سپس آن را به قطعات ریز تقسیم کرده و در یک شیشه ساعت قرار داده و در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد در اتوو تا حصول وزن ثابت خشک کنید ← باقی مانده ان را توزین کنید ← این مقدار میزان گلوتن خشک را در نمونه برداشت شده را نشان می دهد.

• عمل شستشوی گلوتن را می توان به وسیله دستگاه سیمون انجام داد و نتیجه بهتری از این کار عاید خواهد شد.

• مرغوبیت جنس آرد برای نانوایی بستگی به مقدار و نوع گلوتن دارد.

اسیدیته :

برای اندازه گیری اسیدیته در آرد سه روش مختلف به کار می رود.

الف) اندازه گیری اسیدیته در استخراج آبکی :

Shahnim Khandan Alamdari

۱۸ گرم آرد را با ۲۰۰ سانتی متر مکعب آب فاقد Co_2 (قبلا آن را مدتی جوشانیده و بگذارید سرد شود) در یک ارلن مایر ریخته (درب ارلن را مسدود کنید) و ان را در حمام اب ۴۰ درجه به مدت ۱ ساعت قرار دهید ← سپس آن را صاف کنید و ۱۰۰ سانتی متر مکعب از صاف شده را با محلول سود ۰/۰۵ نرمال در برابر فنل فتالیین تیره کنید و اسیدیته آن را بر حسب اسید لاکتیک محاسبه کنید.

• اسیدیته ← در استخراج آبکی آرد، در اثر ماندن و نگه داری آرد افزایش می یابد.

ب) اندازه گیری اسیدیته در استخراج الکلی :

۱۰ گرم آرد را به ۱۰۰ سانتی متر مکعب الکل ۹۰% خنثی اضافه کرده و به مدت ۲۴ ساعت بگذارید بمانید و گاهگاهی آن را بهم بزنید ← سپس ۵۰ سانتی متر مکعب از مایع فوقانی را با محلول الکلی سود ۰/۰۵ نرمال در برابر معرف فنل فتالیین تیره کنید.

• اسیدیته استخراج الکلی غالبا بر حسب اسید سولفوریک گزارش داده می شود.

ج) اسیدهای چرب آزاد یا عدد اسیدی :

• بالا رفتن اسیدهای چرب آزاد در آرد در طول مدنت نگه داری خیلی بیشتر از افزایش اسیدیته در استخراج آبکی و با استخراج الکلی است.

• عدد اسیدی ، مقدار میلی گرم پتاسی که برای خنثی کردن اسیدهای چرب ۱۰۰ گرم آرد مصرف می شود ، ۰/۰۱ $\pm$ ۱۰ گرم از نمونه را در کارتوش مخصوص سوکسله توزین کرده و به وسیله اتر دوپتریل سبک (۴۰ – ۶۰) چربی آن را به وسیله دستگاه سوکسله به مدت ۱۶ ساعت استخراج کنید ← پس از تبخیر کامل حلال به چربی استخراج شده ۱۰ سانتی متر مکعب الکل و ۱۰ سانتی متر مکعب کلروفرم خنثی افزوده و چند قطره ممحلول فنل فتالیین نیز اضافه کنید و آن را تا حصول رنگ صورتی روشن که چند لحظه ثابت بماند با محلول پتاس ۰/۱ نرمال خنثی کنید و از رابطه زیر عدد اسیدی را محاسبه کنید.

$$\text{درصد اسیدیته} = \frac{\text{نرمال مصرف شده } 0.1 \times \text{مقدارپتاس} \times 5/61 \times ۱۰۰}{\text{مقدار نمونه}}$$

• هرگاه ۱۰ گرم از نمونه مصرف شده باشد با ضرب کردن مقدار پتاس مصرف شده در عدد ۵۶/۱ عدد اسیدی محاسبه می شود.

Shahram Khandan Alamdari

pH

۱۰ – ۱۲ گرم آرد را با ۱۰۰ سانتی متر مکعب آب مخلوط کرده و بهم بزنید ← اجازه دهید ۲۰ دقیقه بماند ← سپس آن را صاف کرده ← با استفاده از pH متر ←pH آن را اندازه گیری کنید .

• pH آرد ← معمولا در حدود ۶/۰ – ۶/۸ است.

• هرگاه از گاز کلر برای سفید کردن آرد استفاده شده باشد pH کم می شود.

مواد بیرنگ و اصلاح کننده

• **اصلاح کننده ها** ← موادی هستند که سبب بهبود آرد از نظر خاصیت خمیری و تهیه نان می شوند.

• با اضافه کردن این مواد خاصیت جذب آب در آرد افزایش یافته و در مدت چند ساعت تغییرات مطلوبی در گلوتن آرد به وجود می آید.

• مواد متعددی دارای این خاصیت و کیفیت هستند اما گروه که در کشورهای مختلف مجاز تشخیص داده شده اند محدود می باشند.

● قوانین مربوط به کشور انگلستان در مورد مواد اصلاح کننده و بی رنگ کننده ذکر می شود :

الف) آردهایی که (به جز آرد کامل) برای استفاده در تهیه کیک و شیرینی مصرف می شوند ممکن است حاوی کلر باشند.

ب) به آردهای مختلف به جز آرد کامل ممکن است مواد زیر را اضافه کرد:

پرسولفات پتاسیم ، سولفات منوکلسیم، پرسولفات آمونیوم ، اسید اسکوربیک

ج) آردهای مختلف به جز آرد کامل ممکن است حاوی پراکسید بنزوئیل باشند به شرط آنکه مقدار آن از ۵۰ قسمت در ملیون تجاوز نکند.

Shahram Khandani Alamdari

د) آردی که برای تهیه بیسکویت مصرف می شود ممکن اسست حاوی انیدرید سولفورو باشد به شرطی که مقدار آن از ۲۰۰ قسمت در ملیون تجاوز نکند.

• برمات ها نیز در آرد به عنوان سفید کننده و اصلاح کننده ندرتا مصرف می شوند اما مقدار آن نباید از یک در پنج هزار تجاوز کند.

مواد سفید کننده

برای سفید کردن آرد از بعضی مواد سفید کننده استفاده می شود ← این مواد قسمت رنگین آرد ، گزانتوفیل را به ترکیبات بی رنگ تبدیل می کند ← با این عمل در حقیقت می توان ارد نوع پایین را به آرد نوع مرغوب تر تبدیل کرد اما باید توجه داشت که مواد سفید کننده اثری بر روی سبوس ندارند.

• مواد بی رنگ کننده ای که به آرد افزوده می شوند شامل ← کلر ، تری کلرور ازت ، اکسیدهای ازت ، پراکسید بنزوئیل

• به طور کلی مواد بی رنگ کننده و اصلاح کننده ای که جهت مصرف مجاز تشخیص داده شده است تحت بررسی و مطالعه طولانی از نظر ایجاد مسمومیت و عوارض مختلف واقع شده و پس از آن صلاحیت مصرف آن ها اعلام شده است.

Shamim Khandan Alamdari

ویتامین C

آسکوربیک اسید نیز مانند برمات به عنوان ماده اصلاح کنندهبه نسبت ۲۰ – ۲۸ PPm (آرد با هشتاد درصد استخراج) به کار می رود. برای تعیین این جسم محلول ۰/۱ % ، ۲ – ۶ دی کلروفنل را به آرد مرطوب اضافه کنید. در برابر ویتامین C لکه های سفید رنگی به وجود خواهد آمد.

پرسولفات آمونیوم و یا پتاسیم

این مواد به عنوان اجسام اصلاح کننده با آرد مخلوط می شوند و غالبا به نسبت ۱۱۰ قسمت در میلیون مصرف می شوند.

برای جستجوی پرسولفات ها ۲۰ گرم ارد را با ۲۰ سانتیمتر مکعب اب مخلوط کرده و آن را به صورت خمیر درآورید ، روی آن را محلول الکلی بنزیدین یک درصد بریزید ، ذرات پرسولفات در تماس با بنزیدین ایجاد رنگ آبی می نمایند.

برمات پتاسیم

• برمات پتاسیم را به نسبت ۱۰ -۱۵ PPm با آرد مخلوط می شود. برای شناسایی این جسم آرد را با محلول ۰/۵ % یدور پتاسیم در اسید کلریدریک دو نرمال کاملا مرطوب کنید.

• ظهور لکه های سیاه وجود برمات را ثابت می کند.

مواد بی رنگ کننده

• گاز کلر ، به عنوان سفید کننده و اصلاح کننده به کار می رود مصرف آن امروزه کمتر متدوال بوده اما با وجود این در آردی که برای تهیه برخی از انواع کیک های سفید مصرف می شود تا حد ۹۰۰ PPm مصرف می شود.

• کلر روی مواد رنگین آرد اثر کرده سبب کاهش رنگ آن می شود.

• افزایش کلر به آرد سبب کاهش ارزش غذایی پروتئین آرد شده و نیز pH آن را تنزل می دهد.

دی اکسید کلر

• آردها به جز آرد کامل ممکن است حاوی دی اکسید کلر باشد.

• این ماده به عنوان بی رنگ کننده و اصلاح کننده عمل کرده و به نسبت ۱۵ - ۳۰ PPm به آرد مخلوط می شود.

Shahram Khandani Alamdari

• اختلاط این جسم با آرد سبب کاهش مقداری از ویتامین E موجود در آرد می گردد ولی اثر سوء دیگری هنوز گزارش نشده است.

جستجو و اندازه گیری مواد بی رنگ کننده در آرد

آزمایشاتی که برای اندازه گیری و تشخیص کلر در آرد عمل می شود بر این پایه است که کلر توسط چربی آرد جذب می شود و برای جستجوی کلر باقی مانده ازمایشات روی چربی استخراج شده انجام می گیرد اما دقت آزمایشات به نحوی نیست که بتوان مقادیر کم کلر را در آرد تشخیص داد.

آزمایشات کیفی

چربی ۳۰ گرم ارد را به وسیله ۵۰ سانتی متر مکعب اتر دوپترول استخراج کنید ← سپس با صاف کردن و یا سانتریفوژ کردن حلال حاوی چربی را جدا کرده و نهایتا حلال را تبخیر کنید تا چربی ازاد شود ← یک قطعه سیم مسی را روی شعله حرارت دهید تا سیاه شود ← سپس آن را در چربی استخراج شده فرو برید و مجددا آنرا روی شعله حرارت دهید. هرگاه چربی استخراج شده حاوی کلر باشد رنگ ییزی در اطراف سعله به وجود می آورد.

آزمایش کمی

برای تشخیص کمی کلر ← چربی ۴۰۰ گرم آرد را توسط ۷۰۰ سانتی متر مکعب اتر دوپترول سبک استخراج کرده ← سپس آن را به وسیله قیف بوکنر صاف کنید تا حلال جاوی چربی جدا شود ← حلال را تبخیر کنید تا به حجم کمی برسد و آن را به یک کپسول و یا کروزه ی پلاتینی منتقل کنید ← و به آن ۲۰ سانتی متر مکعب پتاس الکلی ۴% اضافه کنید ← آن را تبخیر کنید و به آرامی بسوزانید تا خاکستر شود ← خاکستر بدست آمده را دو مرتبه و هر دفعه با ۲۰ سانتی متر مکغب اسید نیتریک رقیق استخراج کنید و آن را از روی کاغذ صافی فاقد کلر صاف کنید← کاغذ صافی را با اب (که از قبل آن را جوشانده و سرد کنید) کاملا شسته و کاغذ را در ظرف پلاتینی بسوزانید و سپس مجددا آن را به وسیله اسید رقیق استخراج کنید ← نتیجه دو بار استخراج را با هم مخلوط کرده و آن را روی حمام بخار تبخیر کنید تا حجم آن به ۵۰ سانتی متر مکعب برسد ← سپس ۵ سانتی متر مکعب کلرور سدیم ۰/۰۲ نرمال و ۱۰ سانتی متر مکعب نیترات نقره ۰/۰۲ نرمال به آن اضافه کنید ← آن را سرد کرده و در داخل یک ارلن مایر صاف کنید ← صافی را با آب بشویید و آن را به وسیله محلول ۰/۰۲ نرمال تیوسیانات در

Shamim Khandan Alamdari

برابر معرف آلوم فریک تیتره کنید ← مقدار کلرور سدیم سدیم را از مقدار مصرف تیوسیانات کم کنید ← باقی مانده را به عنوان مقدار کلر بر حسب PPm گزارش کنید ← ارد معمولی که فاقد مواد بی رنگ کننده باشد نتیجه در حدود ۱ PPm خواهد بود.

نان

• از آرد گندم در درجه اول به منظور تهیه نان استفاده می شود و در پاره ای نقاط از آرد ذرت و نیز آرد های دیگر به این منظور استفاده می شود.

• هر چقدر درجه استخراج اردی که در تهیه نان مصرف شده است بیشتر باشد ارزش غذایی آن بیشتر است ارزش غذایی آن بیشتر است و آردهای سفید شده با درجه استخراج کمتر دارای ارزش غذایی کمتری هستند.

• در تهیه نان ها در برخی از موارد فقط از خمیرر آرد استفاده می شود. گاهی از روغن شیر، شکر و سایر مواد نیز در تهیه نان استفاده می شود.

• در کشورهایی که افزودن برخی از مواد اصلاح کننده و بی رنگ کننده در آرد مجاز شناخته شده به طور قطع این قوانین عینا در مورد نان نیز قابل قبول است.

• از برخی از مواد نگه دارنده نیز در تهیه نان ها استفاده می شود که عمده ترین آن ها اسید پروپیونیک و املاح آن هستند.

Shamim Khandan Ahmdari

برخی از آزمایشات نان

در ابتدا از نمونه موجود برای اندازه گیری رطوبت استفاده شده و بقیه نمونه موجود را به قطعات کوچک تقسیم کرده و در هوای گرم خشک کنید و بعد از اینکه نمونه با اندازه کافی خشک شد، آن را در یک آسیاب آزمایشگاهی خرد و یکنواخت کنید و در شیشه در دار نگه داری کنید. نسبت کاهش وزن را در نمونه خشک شده در معرض هوا تعیین کنید و در محاسبات بعدی جهت آزمایش های مختلف در نظر بگیرید.

ماده خشک

ابتدا وزن نمونه دریافتی را تعیین کنید (د حدود ۲۰۰ گرم نان، نصف نان سنگک و یا نصف نان ماشینی و یا نزن مناسبی که در نظر می گیرید) سپس آن را به قطعات کوچک تقسیم کرده و روی یک کاغذ صافی در معرض هوای گرم قرار دهید تا ظاهرا خشک شده و هیچگونه تبادل رطوبت در محیط انجام نشود، آن را مجددا توزین کنید.

نمونه خشک شده را در آسیاب آزمایشگاهی کاملا خرد و یکنواخت کنید و روی ۵ گرم از نمونه یکنواخت شده تعیین رطوبت کنید (به طریق کلی آن را در حرارت ۱۰۰ درجه سانتی گراد خشک کنید) درصد ماده خشک را از رابطه زیر محاسبه کنید.

$$\text{درصد ماده خشک} = \frac{\frac{100\ B \times C}{100}}{A} = \frac{B \times C}{A}$$

A = وزن اولیه نان

B = وزن نانخشک شده در معرض هوا

C = درصد ماده خشک در نمونه خرد شده

Shamim Khandan Alamdari

پروتئین

۲ گرم از نمونه خشک آماده شده را با روش ماکروکلدال عمل کنید و ضریب پروتئین ۵/۷ را به کار برید.

خاکستر

۳ – ۵ گرم از نمونه را طبق روش کلی (صفحه ۱۰) خاکستر کنید.

بیسکویت ، کیک و شیرنیجات

بیسکویت :

محصولی است که از مخلوط آرد ، چربی ، شکر ، گلوکز مایع ، شیر و برخی کواد دیگر تهیه می شود.

از نظر کنترل این محصول استاندارد های ثابت و یکنواختی موجود نبوده اما برای بررسی ترکیبات و کیفیت آن ، تعیین رطوبت ، چربی ف پروتئین ، قند ، نشاسته ، خاکستر و نمک بر طبق روش های ارائه شده و در قسمت ارد قابل اجرا خواهد بود. عامل رطوبت در نگهداری بیسکویت بسیار مهم است و بالا بودن مقدار آن سبب تسریع در فساد محصول می شود.

کیک و شیرینیجات

از نظر کنترل این محصولات تعیین مقادیر رطوبت، چربی ، خاکستر ،قند پروتئین و نمک لازم است. روش های مربوطه که در مورد آرد بیان شد در این موارد نیز قابل اجرا خواهد بود. هرگاه محصول از چربی کره تهیه شده باشد برای کنترل آن باید چربی مقدار کافی از آن را استخراج نموده و بر روی چربی استخراج شده آزمایشات رایشه – میسل وپولنسک را به روش نیمه کوچک انجام داد. همچنین برای کنترل تندی و فساد چربی مصرف شده در محصول بر روی چربی استخراج شده آرمایشات تعیین پراکسید ، کرایس و تعیین اسیدهای چرب آزاد را بایستی انجام داد.

Shamim Khandan Alamdari

آزمون های میکروبی

برای به حداقل رساندن تغییرات غذایی که موجب فساد و از کنترل خارج شدن مواد غذایی می شود ، باید از روش های مناسب نگهداری استفاده شود. عوامل مختلف میکروبی هر کدام با گذشت زمان و به نحوی باعث فساد در مواد غذایی می شوند. در نگهداری مواد غذایی از روش های مختلفی استفاده می شود و هنگام مصرف مواد غذایی چه به صورت تازه یا منجمد ، باید شرایط و ضوابط استاندارد بهداشتی تا در چرخه مصرف مشکلی ایجاد نشود و مصرف آن در جامعه بلامانع باشد، بنابراین باید حتما برای این منظور ازمایش های بهداشتی و کنترل کیفی انجام شود.

طریقه انجام آزمون های میکروبی به شرح زیر است:

برای کشت میکروارگانیسم ها می توان از محیط های کشت جامد ، مایع و ظروف مختلف استفاده کرد . از محیط های کشت عمومی و یا اختصاصی ، برای شناسایی عوامل مختلف میکروبی استفاده می شود.

محیط های کشت به واسطه ترکیبشان از نظر داشتن مواد مغذی و اختصاصی و یا بازدارنده ، به چند دسته تقسیم می شوند :

الف) محیط های کشت عمومی ←

محیط های کشت عمومی دارای مواد مغذی ، پایه ای اصلی مورد نیاز برای رشد و تکثیر اکثر میکروارگانیسم ها ، مانند محیط جامد آگار مغذی هستند.

ب) محیط های کشت انتخابی ←

محیط های کشت انتخابی به دلیل داشتن بعضی از مواد بازدارنده از رشد بعضی از میکروارگانیسم ها جلوگیری می کنند و باعث رشد یک یا تعدادی از میکروارگانیسم ها می شوند. مانند ، محیط های دارای صفرا برای کلی فرم ها و یا محیط سالمونلا شیگلا

ج) محیط های کشت غنی سازی ←

محیط های کشت غنی سازی شده به لحاظ داشتن پروتئین و pH مشخص و ترکیبات خاص ، برای رشد دسته ای از میکروارگانیسم ها که در مواد غذایی به تعداد کمی وجود دارند و جستجوی آن ها لازم است به کار می روند . این محیط ها معمولا برای ازدیاد میکروارگانیسم مورد نظر و رشد آن ها مناسب هستند.

د) محیط های کشت افتراقی ←

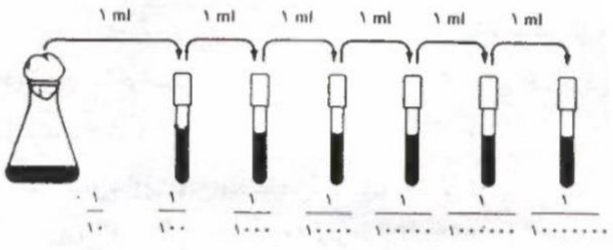
Shamim Khandan Alamdari

محیط های کشت افتراقی برای دسته ای از میکروارگانیسم ها به کار می روند که بعد از رشد، باعث افتراق آن ها از سایر میکروارگانیسم ها می شوند؛ به عنوان مثال کلی فرم ها در اثر تخمیر لاکتوز محیط از هم جدا می شوند .

- محیط های کشت های افتراقی دسته ای از باکتری های را که قادر به تخمیر قند نیستند ، در این محیط بی رنگ باقی می مانند.

• با وسایل موجود و استریل ، ماده غذایی را نرم و یکنواخت کنید تا بتوانید به مقادیر مورد نیاز برای انجام آزمایش ها استفاده کرد. نمونه ممکن است مایع ، جامد و یا نیمه جامد باشد. با توجه به نوع باکتری مورد نظر ، مقادیر ثابتی از نمونه را توزین کنید. به عنوان مثال اگر نیاز باشد از رقت های $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{100}$ کشت داده شود، ۲۵ گرم از نمونه را توزین کنید و از رقیق کننده های استریل همچون سرم فیزیولوژی یا آب پپتونه به میزان ۲۲۵ میلی لیتر به آن اضافه کرده و تا رقت $\frac{1}{10}$ به دست بیاورید. در صورتیکه نمونه غذایی جامد و یا نیمه جامد باشد ، باید مجموع نمونه و رقیق کننده را در مخلوط کن به مدت ۲ – ۳ دقیقه مخلوط کرده تا شیرابه یکنواختی حاصل شود. سپس رقت های $\frac{1}{100}$ و $\frac{1}{1000}$ را به ترتیب با اضافه کردن 1cc از رقت های حاصل به لوله هایی که حاوی ۹ میلی لیتر از رقیق کننده است، تهیه کرده و تا هر میزان که لازم است، می توان نسبت به رقیق کردن آن ادامه داد و رقت های $\frac{1}{10000}$ و $\frac{1}{100000}$ را نیز بدست آورد.

Shahram Nabavian Ahmadi



مراحل تهیهٔ رقت‌ها از نمونهٔ غذایی (Serial Ten Fold Dilution)

روش کشت و شمارش کلی باکتری ها در مواد غذایی

برای شمارش کلی باکتری ها در نمونه های غذایی ، از میحیط های کشت جامد و یا مایع می توان استفاده نمود.

استفاده از محیط های کشت جامد به دو روش انجام می شود:

الف) مخلوط کردن نمونه با محسط کشت در پلیت

بعد از تهیه رقت های مورد نیاز مطابق روش گفته شده، حداقل ۲ – ۳ پلیت برای رقت ها به کار برده می شود. محیط های لازم برای کشت شامل Nutrient Agar و یا Plate Count Agar است. برای انجام کشت به وسیله یک پیپت از رقیق ترین رقت تهیه شده ماده غذایی ، در دو پلیت استریل، هر کدام به میزان یک میلی لیتر ریخته می شود. پس از آن رقت های دیگر نیزهمانند حالت اخیر در پلیت های دیگر وارد می گردد. سپس به میزان ۱۰ – ۱۵ میلی لیتراز محیط کشت که قبلا تهیه کرده و پس از اینکه اتوکلاو شدن در دمای ۴۵ – ۵۰ درجه سانتی گراد نگهداری شده است، به تمام پلیت های مذکور اضافه کرده و حداقل ۱۵ – ۲۰ بار به شکل "8" پلیت ها را بر سطح میز آزمایشگاه تکان داده تا یک میلی لیتر محلول رقیق شده مذکور در تمام محیط کشت

Shamim Khanlan Alamdari

پخش گردد. پلیت ها را باقی بگذارید تا ببندد و روی هر پلیت ، از محیط کشت مربوط ، مجددا حدود ۳ – ۵ میلی لیتر ریخته تا قشر نازکی تشکیل گردد و در واقع محیط کشت به شکل دو لایه خواهد شد.

بعد از اینکه محیط های کشت پلیت ها منعقد شدند آن ها را به شکل واژگون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد (به مدت ۴۸ ساعت) می گذاریم . پس از این مدت ، پرگنه ها را شمارش می کنیم. همیشه بهتر است که یک پلیت را به عنوان شاهد به کار ببریم. در هنگام شمارش پرگنه ها بهتر است که پلیت هایی که بین ۳۰ – ۳۰۰ پرگنه دارند ، برای شمارش انتخاب شوند. پس از انتخاب پلیت ها ، پرگنه ها را شمارش کرده و میانگین حداقل ۲ پلیت هم رقت به دست می آید و در عکس رقت مربوز ضرب می شود و تعداد باکتری در هر گرم از نمونه غذایی گزارش می شود.

۲) روش کشت و شمارش سطحی :

تهیه رقت ها مانند دستورالعمل پیشین است و می توان برای شمارش بسیاری از باکتری ها ، این روش را به کار برد و بسته به نوع باکتری یا قارچ از محیط اختصاصی آن استفاده کرد. به عنوان مثال برای شمارش استافیلوکوک ارئوس از محیط برد پارکر و برای قارچ از محیط پوتیتو دکستروز آگار که طبق دستور کارخانه سازنده تهیه می شوند، استفاده می گردد. در تمام مراحل و کشت های مختلف ، باید شماره نمونه و میزان رقت آن روی پلیت ها نوشته شود و درصورتیکه از درجه حرارت های مختلف انکوباتور نیز استفاده شود، باید بر روی پلیت ها درج شود.

Shamim Khandan Alamdari

در این روش، پس از تهیهٔ محیط کشت که برای شمارش کلی باکتری‌ها همان محیط‌های پلیت کانت آگار و نوترینت آگار هستند، پس از تهیهٔ آنها براساس دستورالعمل کارخانه و اتوکلاو نمودن، محیط کشت را در داخل پلیت‌های استریل، هرکدام به میزان ۱۵ میلی‌لیتر، تقسیم کرده و باقی گذاشته تا منعقد شود و پلیت‌های مذکور را در حالی که درب آنها بسته است در یخچال نگهداری می‌نمایند. به هنگام انجام آزمایش و پس از تهیهٔ رقت‌های مختلف مواد غذایی، از رقیق‌ترین رقت به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر توسط پیپت به پلیتی که به روش فوق تهیه شده است، وارد و با کمک میله‌های شیشه‌ای L شکل به طور کامل در سطح محیط پخش می‌گردد. پلیت‌ها پس از ۱۰ دقیقه به طور واژگون در انکوباتور، همانند روش قبل قرار می‌گیرند و همانند روش قبلی شمارش می شوند، ولی تعداد پرگنه‌های شمارش شده را ابتدا در عکس رقت ضرب و نتیجهٔ حاصل را مجدداً در عدد ۱۰ ضرب کرده تا تعداد باکتری در هرگرم از نمونهٔ غذایی به‌دست آید. علت ضرب کردن آن در عدد ۱۰ این است که به هنگام انجام کشت، صرفاً ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت‌های تهیه شده به داخل پلیت منتقل شده است که این نسبت باید در محاسبه لحاظ شود.

۲-۶-۳.شمارش و بررسی وجود کلی فرم‌ها در مواد غذایی

جستجو و شمارش این باکتری‌ها در مواد غذایی به دو صورت زیر انجام می‌پذیرد و گاهی برای بعضی از مواد غذایی، این جستجو و شمارش با تغییرات جزیی انجام می‌گیرد.

۱ـ شمارش احتمالی کلی فرم‌ها در محیط‌های مایع (MPN)[1]

۲ـ شمارش احتمالی کلی فرم‌ها در محیط‌های جامد

بسیاری از مایعات نظیر آب، نوشابه و شیر را مستقیماً روی محیط‌های کشت اختصاصی منتقل و سپس نسبت به شمارش کلی فرم‌های احتمالی و نهایتاً تأیید آنها اقدام می‌کنند. در مورد مواد جامد نیز همین آزمایش‌ها عملی است، بدین صورت که مادهٔ جامد را پس از یکنواخت کردن (کوبیدن یا ساییدن) با کمک مواد رقیق‌کننده به شکل رقت $\frac{1}{10}$ و $\frac{1}{100}$ و ... درمی‌آورند و به همان طریق شمارش احتمالی نمونه‌های مایع که در فوق بیان شد، عملیات را ادامه می‌دهیم.

استفاده از محیط‌های کشت مایع یا جامد برای هر دو نوع نمونهٔ غذایی جامد یا مایع امکان‌پذیر

است، اما به منظور سهولت کار برای نمونهٔ غذایی مایع می‌توان از محیط کشت مایع و روش MPN و برای نمونهٔ غذایی جامد یا نیمه‌جامد، می‌توان از محیط‌های کشت جامد بهره جست.

الف ـ روش کشت ۳ لولهٔ موازی یا MPN

برای انجام این روش کشت، به سه عدد لولهٔ آزمایش بزرگ به اندازهٔ $۲۰۰^{mm} \times ۲۵^{mm}$ و شش عدد لولهٔ آزمایش معمولی به اندازهٔ $۱۶۰^{mm} \times ۱۶^{mm}$ نیاز است که جمعاً نه لوله می‌شود که در هر لولهٔ آزمایش باید یک لولهٔ درهام نیز قرار گیرد. برای انجام این آزمایش از محیط کشت مایع به نام آب‌گوشت لاکتوز (Lactose Broth) استفاده می‌شود. در هریک از لوله‌های بزرگ ۲۰ میلی‌لیتر از محیط آب‌گوشت لاکتوز با غلظت دوبل (دو برابر) و در هریک از لوله‌های معمولی نیز ۱۰ میلی‌لیتر از محیط آب‌گوشت لاکتوز معمولی می‌ریزند. سپس به هر یک از سه لولهٔ بزرگ ، ۱۰ میلی‌لیتر و در سه لولهٔ معمولی اول، هر کدام یک میلی‌لیتر و به هر یک از سه لولهٔ معمولی دوّم، نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از مایع مورد آزمایش اضافه می‌کنند و پس از تکان دادن، لوله‌ها را در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار می‌دهند و آنها را از نظر تولید گاز و تجمع آن در لوله‌های درهام بررسی می‌کنند.

اگر در لوله‌های درهام گاز موجود باشد، در اثر تلنگر زدن به لوله، حباب گاز متصاعد می‌شود که نشانگر مثبت بودن تخمیر قند لاکتوز است و باید تعداد لوله‌های مثبت را یادداشت کرد. برای مثال، اگر از سه لولهٔ بزرگ ، هر سه لوله مثبت و از سه لولهٔ معمولی اول یک لوله و از سه لولهٔ معمولی دوم دو لوله مثبت باشد، مطابق شکل ۳ـ۱ـ۲ یادداشت می‌شود و با مراجعه به جداول MPN، تعداد احتمالی کلی‌فرم‌ها در ۱۰۰ میلی‌لیتر از مایع به‌دست می‌آید. حال چنانچه نمونهٔ اصلی رقیق شده باشد، تعداد باکتری کلی فرم احتمالی قرائت شده از جدول MPN در عکس رقت ضرب می‌شود.

ضریب تعداد حداکثر احتمالی با حدود ۹۵ درصد اطمینان برای ترکیب‌های مختلف نتایج مثبت و منفی، هنگامی که ۳ قسمت ۱۰ میلی‌لیتری، ۳ قسمت ۱ میلی‌لیتری و ۳ قسمت ۰/۱ میلی‌لیتری به‌کار رفته است.

تعداد لوله‌های واکنش مثبت			MPN	حدود اطمینان ۹۵ درصد	
۳لوله،هریک ۰ امیلی‌لیتر	۳ لوله،هریک ۱میلی‌لیتر	۳لوله،هریک ۰/۱میلی‌لیتر	در ۱۰۰ میلی‌لیتر	پایین‌تر	بالاتر
۰	۰	۱	۳	۰/۵	۹
۰	۱	۰	۳	۰/۵	۱۳
۱	۰	۰	۴	۰/۵	۲۰
۱	۰	۱	۷	۱	۲۱
۱	۱	۰	۷	۱	۲۳
۱	۱	۱	۱۱	۳	۳۶
۱	۲	۰	۱۱	۳	۳۶
۲	۰	۰	۹	۱	۳۶
۲	۰	۱	۱۴	۳	۳۷
۲	۱	۰	۱۵	۳	۴۴
۲	۱	۱	۲۰	۷	۸۹
۲	۲	۰	۲۱	۴	۴۷
۲	۲	۱	۲۸	۱۰	۱۵۰
۳	۰	۰	۲۳	۴	۱۲۰
۳	۰	۱	۳۹	۷	۱۳۰
۳	۰	۲	۶۴	۱۵	۳۸۰
۳	۱	۰	۴۳	۷	۲۱۰
۳	۱	۱	۷۵	۱۴	۲۳۰
۳	۱	۲	۱۲۰	۳۰	۳۸۰
۳	۲	۰	۹۳	۱۵	۳۸۰
۳	۲	۱	۱۵۰	۳۰	۴۴۰
۳	۲	۲	۲۱۰	۳۵	۴۷۰
۳	۳	۰	۲۴۰	۳۶	۱۳۰۰
۳	۳	۱	۴۶۰	۷۱	۲۴۰۰
۳	۳	۲	۱۱۰۰	۱۰۵	۴۸۰۰

ب ـ روش کشت با استفاده از محیط‌های جامد

نمونه‌های جامد و نیمه جامد را ابتدا باید به وسیلهٔ هاون چینی، آسیاب استریل، به‌هم‌زن برقی یا استوماکر یکنواخت کرد و سپس همانند روش بیان شدهٔ قبلی، نسبت به تهیهٔ رقت از نمونهٔ غذایی یکنواخت شده اقدام می‌شود تا رقت‌های $\frac{1}{10}$، $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{1000}$ و ... را به‌دست آید. بعد بر روی ظروف پلیت استریل که رقت مورد استفاده روی آنها نوشته شده است، به اندازهٔ یک میلی‌لیتر از رقت‌های مربوطه انتخابی به کمک پیپت در پلیت‌ها ریخته می‌شود و سپس محیط کشت وایولت ردبایل آگار (VRBA)[1] مذاب با دمای حدود ۴۵ تا ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد که قبلاً نسبت به تهیه و استریل کردن آن اقدام شده است، به میزان ۱۰ الی ۱۵ میلی‌لیتر در پلیت‌های مذکور اضافه می‌گردد. پلیت‌ها را با حرکات دوار به شکل "8" خوب مخلوط و سپس بر روی میز آزمایشگاه رها می‌گردد تا منعقد شود. پس از منعقد شدن محیط کشت در داخل پلیت‌ها مقدار ۵ میلی‌لیتر دیگر از محیط کشت مذاب ، روی آنها ریخته می‌شود تا کاملاً سطح را بپوشاند و در واقع کشت در دو لایه انجام شده است. آنگاه درب ظروف پلیت را بسته، به طور واژگون به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌دهند. سپس پرگنه‌های قرمز رنگ مایل به بنفش را شمارش کرده، میانگین چند ظرف پلیت را به‌دست آورده، در عکس رقت به کار رفته ضرب می‌نمایند. به این ترتیب، تعداد کلی فرم احتمالی در یک گرم از نمونهٔ غذایی به‌دست می‌آید.

پس از مشخص نمودن تعداد کلی فرم احتمالی به وسیلهٔ یکی از روش‌های مذکور (الف یا ب) باید نسبت به تأیید وجود کلی فرم اقدام شود که بدین منظور از پرگنه‌های رشد کرده بر روی محیط کشت ویولت ردبایل آگار و یا از محتویات لوله‌های آزمایش حاوی آب‌گوشت لاکتوز که گازدار است به محیط کشت آب‌گوشت سبز درخشان دارای لاکتوز و ۲ درصد صفرا[2] وارد می‌گردد (این محیط به صورت آماده وجود دارد که بر طبق دستور کارخانهٔ سازندهٔ محیط، آن را تهیه می‌کنند و در لوله‌های آزمایش بزرگ حاوی لولهٔ درهام می‌ریزند و پس از بستن درب لوله‌ها در اتوکلاواستریل و تا هنگام مصرف در یخچال ذخیره و نگهداری می‌کنند)سپس آنها را در انکوباتور ۳۷ درجهٔسانتی گراد، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار داده و پس از آن لوله‌ها را بررسی می‌نمایند. چنانچه در لوله‌های درهام گاز جمع شده

باشد، وجود کلی فرم تأیید می‌شود.

به طور کلی، در مواد غذایی، شمارش کلی فرم‌ها یکی از شاخص‌های بهداشتی برای قضاوت است و مواد غذایی بسیار زیادی طبق استانداردهای مربوط به حد مجاز میکروبی می‌توانند تعدادی کلی‌فرم داشته باشند، مشروط برآن‌که اشریشیاکلی نباشد.

۳-۶-۳.بررسی وجود اشریشیاکلی در مواد غذایی

به منظور بررسی و شناسایی وجود اشریشیاکلی در مواد غذایی در راستای بررسی و شناسایی کلی‌فرم‌های احتمالی و سپس انجام آزمایش مربوط به تأیید وجود کلی فرم‌ها که در این‌جا ذکر شد، مجدداً کشت دیگری از لوله‌های حاوی گاز محیط کشت آب‌گوشت سبز درخشان به عمل می‌آید، بدین معنا که حدود چند قطره از آب‌گوشت سبز درخشان گازدار را با کمک پیپت برداشته و به لوله‌های آزمایش حاوی آب پپتونه[1] (برای انجام آزمایش اندول) و نیز لوله‌های محتوی آب‌گوشت سبز درخشان دیگر می‌افزایند و به مدت ۴۸ ساعت در حرارت گرمخانه‌ای ۴۴ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌دهند. بعد از این مدت، با افزودن معرف کواکس به لوله‌های آزمایش حاوی آب پپتونه ، آزمایش اندول انجام می‌پذیرد که چنانچه با افزودن معرف کواکس حلقهٔ ارغوانی در سطح محیط ظاهر شود، اندول مثبت خواهد بود.

مبنای انجام آزمایش اندول این است که باکتری‌های دارای آنزیم تریپتوفاناز می‌توانند از اسید آمینه تریپتوفان موجود در پپتن محیط کشت، اندول تولید کنند. برای تشخیص وجود اندول از معرف کواکس استفاده می‌شود، که به منظور تهیهٔ معرف کواکس ابتدا مقدار ۱۰ گرم پارا دی متیل آمینو بنزآلدئید را در ۱۵۰ میلی‌لیتر الکل آمیلیک حل کرده، سپس به آهستگی مقدار ۵۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک به آن اضافه می‌کنند و آن را در شیشه‌ای تیره ریخته، در یخچال نگهداری می‌نمایند و به هنگام مصرف، چند قطره از آن را با پیپت در لوله‌های آزمایش حاوی آب پپتونه کشت شده با نمونهٔ مورد آزمایش، می‌افزایند.

چنانچه در انجام آزمایش‌های فوق، نمونه از نظر اندول مثبت باشد و همچنین در محیط آب‌گوشت سبز درخشان نیز تولید گاز صورت گیرد، نشان‌دهندهٔ تأیید کلی‌فرم احشایی یا مدفوعی و به احتمال

۹۰ درصد اشریشیاکلی خواهد بود.

بسیاری از رفرانس‌ها بررسی وجود اشریشیاکلی را تا این مرحله در مواد غذایی کافی می‌دانند، ولی در صورت نیاز به قطعیت بیشتر آزمایش، باید نسبت به انجام آزمایش‌های IMViC (اندول، متیل رد، وژپروسکوئر و سیترات) نیز اقدام شود تا بدین‌وسیله به طور قطعی، اشریشیاکلی از سایر باکتری‌های خانوادهٔ کلی‌فرم و به خصوص انتروباکترو کلبسیلا تفکیک شود. در خصوص اشریشیاکلی، نتیجهٔ آزمایش متیل رد مثبت، وژپروسکوئر و نیز سیترات منفی است.

۴-۶-۳. کشت مواد غذایی از نظر جستجو و شمارش استافیلوکوکوس آرئوس

الف ـ جستجو

در بسیاری از مواد غذایی حساس نظیر شیر خشک اطفال، وجود حتی یک باکتری استافیکوکولوس آرئوس در یک گرم مادهٔ غذایی ممنوع است. بنابراین، جستجوی استافیلوکوک در چنین مواردی ضروری است. برای این کار، مقدار یک گرم از مادهٔ غذایی آماده (خرد، نرم و یکنواخت شده) را به وسیلهٔ قاشق چای‌خوری استریل در داخل لوله‌های حاوی محیط کشت گوشت پخته[1] حاوی ۱۰ درصد نمک ریخته ، لوله را خوب بسته ، کاملاً به هم می‌زنند و در گرمخانهٔ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار می‌دهند. پس از این مدت با آنس نوک حلقوی یک لوپ از کشت فوق را برداشته و در سطح محیط کشت برد پارکر[2] آمادهٔ پخش می‌کنند. سپس این کشت را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در گرمخانهٔ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده . پس از این مدت از پرگنه‌های سیاهِ دارای هاله روشن، آزمایش کوآگولاز انجام می‌گیرد. چنانچه آزمایش کوآگولاز مثبت باشد، در مادهٔ غذایی مورد آزمایش استافیلوکوکوس آرئوس کوآگولاز مثبت وجود دارد. بنابراین، ماده غذایی مذکور خارج از استاندارد و غیرقابل مصرف است.

ب ـ شمارش

نمونه غذایی یکنواخت گشته ، ۲۵ گرم از آن انتخاب و به ظرفی حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر رقیق‌کننده اضافه می‌گردد و به این ترتیب رقت $\frac{۱}{۱۰}$ اولیه به‌دست می‌آید که می‌توان از آن رقت‌های $\frac{۱}{۱۰۰}$ $\frac{۱}{۱۰۰۰}$ و... را نیز تهیه کرد. سپس از رقت موردنظر به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر بر روی پلیت‌های حاوی محیط برد

پارکر منتقل ساخته و با میله‌های شیشه‌ای L شکل در سطح محیط پخش می‌گردد و در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت قرار می‌گیرد. سپس وضع پلیت‌ها بررسی می‌شود. کلیهٔ پرگنه‌های سیاه رنگ با هالهٔ روشن را شمارش کرده در عکس رقت ضرب می‌گردد تا تعداد استافیلوکوک آرئوس در یک گرم از مادهٔ غذایی مربوسه به دست آید.

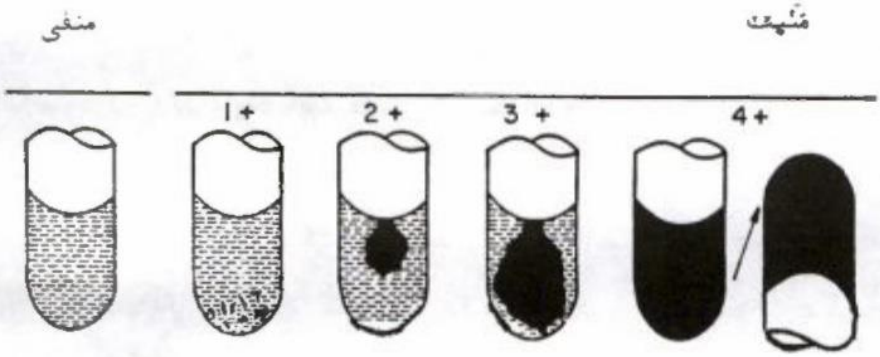
برای تهیهٔ محیط برد پارکر مصرفی در جستجو و یا شمارش استافیلوکوک‌ها، ابتدا محیط برد پارکر را در یک لیتر آب مقطر حل کرده، اتوکلاو می‌کنند، سپس پس از سرد شدن آن تا ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد به آن ۱۰ میلی‌لیتر تلوریت پتاسیم یک درصد و ۵۰ میلی‌لیتر امولسیون زردهٔ تخم‌مرغ اضافه کرده، خوب مخلوط می‌کنند. سپس در پلیت‌های استریل تقسیم می‌نمایند چنانچه این محیط در یخچال نگهداری شود تا ۱۵ روز قابل مصرف خواهد بود. تلوریت پتاسیم یک درصد مصرفی را نیز با حل کردن یک گرم تلوریت پتاسیم در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر استریل و سپس عبور دادن آن از صافی باکتریولوژیک تهیه و در یخچال نگهداری می‌کنند. در واقع، این ماده به دلیل حساسیتش به حرارت با استفاده از اتوکلاو سترون نمی‌شود. جهت تهیهٔ امولسیون زردهٔ تخم‌مرغ نیز، یک تا دو عدد تخم‌مرغ را در ظرف حاوی الکل سفید به مدت یک تا دو ساعت به حالت غوطه‌ور قرار داده، سپس با کمک وسایل سترون نظیر پنس و ... پوسته را شکافته و سفیده را از زرده کاملاً جدا و زرده به استوانهٔ مدرج استریل منتقل می‌شود و با کمک هم‌زن شیشه‌ای مخلوط می‌گردد. هم حجم آن سرم فیزیولوژی اضافه گشته و هم زده می شود. سپس همان‌طور که در بالا قید شد، به محیط پایه برد پارکر اضافه می‌گردد.

در هر دو روش جستجو و یا شمارش استافیلوکوک‌ها، نظر به آن‌که استافیلوکوک‌های کوآگولاز مثبت از نظر بهداشت مواد غذایی حائز اهمیت می‌باشند، باید نسبت به انجام آزمایش کوآگولاز اقدام کرد که به دو صورت زیر انجام می‌پذیرد:

۱- روش سریع: در این روش یک لام را برداشته یک قطره سرم فیزیولوژی یا محلول رینگر $\frac{1}{4}$ روی آن گذاشته، سپس با نوک آنس مقداری از پرگنه باکتری را که بر روی محیط کشت در فوق رشد کرده، به آن افزوده ، مخلوط می‌گردد. سپس مقدار یک قطره پلاسمای خرگوش یا انسان به آن اضافه کرده، با آنس خوب مخلوط می‌شود. بعد به مدت ۱۵ الی ۳۰ ثانیه عمل اختلاط را با حرکات دوار لام ادامه داده، در این فاصله، اگر پلاسما به شکل کوآگوله درآید، نشانهٔ مثبت بودن آزمایش از نظر کوآگولاز است.

۲- روش آهسته: برای انجام این روش در ابتدا یک یا چند پرگنه از پرگنه‌های رشد کرده بر روی

محیط برد پارکر به لوله‌های آزمایش حاوی آب‌گوشت مغذّی یا آب‌گوشت عصارهٔ مغز و قلب منتقل و پس از قرار دادن در انکوباتور ۳۷ درجه به مدت ۲۴ ساعت، جهت انجام آزمایش کوآگولاز مصرف می‌گردد، بدین نحو که در یک لولهٔ باریک مخصوص سرولوژی مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از پلاسمای خرگوش یا انسان ریخته . سپس مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت آب‌گوشت فوق به آن اضافه می‌شود. بهتر است برای نتیجه‌گیری مناسب، شاهد منفی (شامل ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسمای خرگوش به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر از آب‌گوشت استریل فوق) و شاهد مثبت (شامل ۰/۵ میلی‌لیتر پلاسمای خرگوش به همراه ۰/۵ میلی‌لیتر از کشت استافیلوکوک کوآگولاز مثبت تأیید شده) نیز درنظر گرفته شود. سپس لوله‌های آزمایش در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده می شود و تا مدت ۶ ساعت، هر ۰/۵ تا یک ساعت، مورد بررسی قرار داده می شود. لوله شاهد مثبت منعقد می‌شود، در صورتی که در لولهٔ شاهد منفی هیچ‌گونه انعقادی نباید صورت گیرد. چنانچه هر سه لوله منعقد شده باشد، آزمایش غلط و پلاسما خراب است. و لخته‌ها را در لوله‌ها با ۱+، ۲+، ۳+ و ۴+ نشان می‌دهند که نشان دهندهٔ شدت کوآگولاز و مثبت بودن استافیلوکوکوس آرئوس است. (شکل ۲ـ۳)



منفی = هیچ لخته‌ای به وجود نیامده است.
۱+= لخته‌های کوچک جدا از هم
۲+= لختهٔ کوچک به‌هم پیوسته
۳+= لختهٔ بزرگ به‌هم پیوسته
۴+= تمام محتویات لوله منعقد شده و در اثر واژگون شدن نمی‌ریزد. در این آزمایش، می‌توان از یک استافیلوکوک کوآگولاز مثبت و یک سویه کوآگولاز منفی، به عنوان شاهدهای مثبت و منفی برای هر سری آزمایش استفاده کرد.

شکل ۲ـ۳) حالت‌های مختلف آزمایش کوآگولاز

۵-۶-۳. جستجو و شناسایی سالمونلا در مواد غذایی

در کنترل مواد غذایی اصولاً نباید در ۲۵ گرم نمونه هیچ نوع سالمونلایی وجود داشته باشد، ولی در بعضی از مواد غذایی این امر غیرممکن است؛ که در این صورت، باید با نظر کارشناس و رعایت برخی از اصول تا حدی، به ناچار بپذیریم. مثال بارز این موضوع لاشهٔ طیور است.

برای بررسی، ابتدا نمونهٔ غذایی اگر نرم و یکنواخت نباشد، باید با وسیله‌ای استریل و متناسب با نوع نمونه یکنواخت گردد. سپس ۲۵ گرم از مادهٔ غذایی توزین شده در ۲۲۵ میلی‌لیتر آب‌گوشت حاوی لاکتوز[۱] ریخته، خوب به هم زده می شود. آن‌گاه در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفته ؛ که به این مرحله «غنی‌سازی غیرانتخابی» گفته می‌شود در روز دوم باید توسط پیپت استریل مقدار یک میلی‌لیتر از کشت روز اول برداشته و به لولهٔ حاوی محیط آبگوشت سلینت سیستین[۲] منتقل گشته و یک میلی‌لیتر نیز به لولهٔ حاوی محیط آبگوشت تتراتیونات[۳] وارد می‌شود و در گرمخانهٔ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار می‌گیرد؛ که به این مرحله «غنی‌سازی انتخابی» گفته می‌شود. در روز سوم لوله‌ها را از گرمخانه خارج کرده و به وسیلهٔ آنس حلقوی از هریک از لوله‌های مذکور به طور جداگانه در سطح دو ظرف پلیت حاوی محیط آگار سالمونلا شیگلا[۴] و همچنین محیط آگار سبز درخشان[۵] به طور خطی، طوری کشت داده می‌شود که بتوان نسبت به تهیهٔ پرگنهٔ تک اقدام نمود؛ که به این مرحله «استفاده از محیط‌های جامد انتخابی» گفته می‌شود. پلیت‌های مذکور را در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار داده ، روز چهارم پلیت‌های کشت شدهٔ روز قبل از انکوباتور خارج گشته و مورد بررسی قرار می گیرد. پرگنه‌های مشکوک به سالمونلا در روی محیط آگار سالمونلا، شیگلا بی‌رنگ و در محیط آگار سبز درخشان صورتی رنگ می‌شوند. بعضی از سویه‌های سالمونلا پرگنه‌هایی با مرکز سیاه در روی محیط آگار سالمونلا شیگلا ایجاد می‌کنند. برای هریک از پرگنه‌ها یک لولهٔ حاوی محیط سه‌قندی آهن‌دار[۶]، یک لولهٔ حاوی محیط آگار لیزین آهن‌دار[۷] و یک لولهٔ حاوی محیط اوره قرار داده، با کمک آنس سوزنی قسمت سطحی

و بخش عمقی آنها که شیب‌دار هستند، کشت داده می‌شود و سپس لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌گیرند. به این مرحله «استفاده از آزمایش‌های بیوشیمیایی جهت شناسایی پرگنه‌های انتخاب شده گفته می‌شود، که مرحلهٔ چهارم بررسی سالمونلااست روز پنجم لوله‌ها از گرمخانه خارج و بررسی می‌شوند. اکثر سالمونلاها در محیط آگارسه قندی آهن‌دار در قسمت فوقانی رنگ صورتی مایل به قرمز (نشانهٔ قلیایی شدن محیط) و در قسمت عمقی لولهٔ رنگ زرد (نشانهٔ اسیدی بودن محیط) ایجاد می‌کنند که می‌تواند همراه یا بدون تولید گاز H_2S باشد. در صورت وجود گاز H_2S، قسمتی از محیط سیاه‌رنگ خواهد بود. همچنین ممکن است به دلیل تولید گاز حباب‌هایی در داخل محیط کشت ایجاد شود. در محیط آگار لیزین آهن‌دار نیز سالمونلاها سبب ایجاد رنگ ارغوانی در تمام محیط کشت می‌شوند (نشانهٔ قلیایی شدن محیط) و در مواردی نیز ممکن است همراه تولید گاز H_2S باشد که در این‌صورت بخشی از محیط کشت سیاه‌رنگ خواهد شد. همچنین سالمونلاها از نظر آزمایش اوره‌آز منفی هستند و لذا از لوله‌هایی که واکنش آنها با سالمونلا مطابقت داشته باشد، برای انجام آزمایش‌های سرولوژیکی استفاده می‌شود تا گروه و سپس نوع سالمونلا مشخص شود؛ که به این مرحله «تشخیص سرولوژیکی» اطلاق می‌شود که آخرین مرحلهٔ شناسایی و بررسی سالمونلاهااست.

کلیهٔ محیط‌های مصرفی جهت بررسی و جداسازی سالمونلا به شکل آماده وجود دارند که برمبنای دستورالعمل طرز تهیهٔ آنها که از طرف کارخانه بر روی آنها درج شده است، نسبت به تهیهٔ آنها اقدام می‌شود و صرفاً محیط غنی‌سازی انتخابی سلنیت سیستین‌دار پس از تهیه، برخلاف سایر محیط‌های کشت مصرفی، نیاز به انجام اتوکلاو ندارد.

۶-۶-۳. شمارش وشناسایی باسیلوس سرئوس در مواد غذایی

به منظور انجام آزمایش، ابتدا نمونهٔ ارجاعی را یکنواخت کرده، از آن ، رقت $\frac{۱}{۱۰}$ تهیه می‌شود.سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از رقت تهیه شده با پیپت استریل بر روی محیط کشت فنل رد با زردهٔ تخم‌مرغ و پلی‌میکسین [۱] منتقل و با میله‌های شیشه‌ای L شکل کاملاً در سطح محیط کشت ، پخش می‌گردد. سپس پلیت‌ها به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در درجه حرارت ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده می شوند. پس

از این مدت، پرگنه‌های مدور با هاله‌ای رسوب‌دار با کدورت مشخص را در زمینهٔ بنفش شمارش کرده، احتمالاً باسیلوس سرئوس هستند که برای اطمینان باید مورد تأیید واقع شوند و به هرحال، با شمارش این پرگنه‌ها و ضرب کردن آنها در عکس رقت، تعداد باکتری در یک گرم نمونهٔ غذایی مشخص می‌شود.
محیط کشت فنل رد با زردهٔ تخم‌مرغ و پلی‌میکسین به صورت زیر تهیه می‌شود:

معمولاً محیط پایهٔ مذکور به شکل تجارتی وجود دارد که پس از حل کردن آن در آب مقطر و جوشانیدن و تنظیم pH ، آن را در حجم‌های ۹۰ میلی‌لیتری تقسیم و در اتوکلاو استریل می‌کنند و پس از آن‌که تا دمای ۴۵ درجهٔ سانتی‌گراد سرد شد به هر ۹۰ میلی‌لیتر آن ۱۰ میلی‌لیتر امولسیون زرده (طرز تهیهٔ آن قبلاً بیان شده است) و یک میلی‌لیتر محلول یک درصد سولفات پلی‌میکسین که با صافی استریل شده است، می‌افزایند و در ظروف پلیت تقسیم می‌کنند و تا هنگام مصرف در یخچال نگهداری می‌شود.

به منظور تأیید پرگنه‌های مشکوک به باسیلوس سرئوس، تعدادی از آنها را انتخاب کرده، روی محیط آگار مغذی[1] به شکل مورب کشت می‌دهند و به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد قرار می‌دهند. پس از این مدت، از کشت حاصل ، لام تهیه کرده نسبت به رنگ‌آمیزی گرم اقدام می‌شود و در زیر میکروسکوپ ، باسیلوس سرئوس به شکل باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل و هاگ‌دار مشاهده می‌شوند. اسپور این باکتری بیضی شکل است که در مرکز یا نزدیک به انتهای باکتری قرار گرفته، دارای دیوارهٔ نازکی است. در بخشی که اسپور وجود دارد، باسیل متورم نمی‌شود. ولی به هرحال، اگر شناسایی و تأیید قطعی‌تر لازم باشد، باید آزمایش‌های تأییدی زیرین نیز انجام پذیرد.

۱ـ آزمایش قندها: از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری مورد آزمایش روی محیط آگار مغذی، توسط آنس سوزنی برداشت کرده، به لوله‌های محتوی یک درصد قندهای گلوکز، سوکروز، گلیسرول، سالیسین منتقل می‌شود. سپس لوله‌ها را به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده، پس از این مدت، نتیجهٔ تخمیر در لوله‌های مذکور بررسی می‌شود که در صورت وجود باسیلوس سرئوس، تمامی قندهای فوق تخمیر می‌شود و محیط به رنگ زرد درمی‌آید.

۲ـ آزمایش انعقاد شیر لیتموس[1]: از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری در محیط آگار مغذی در محیط شیر لیتموس کشت داده و مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده می شود. چنانچه شیر به شکل کامل یا ناقص منعقد شود، نشان دهندهٔ وجود باسیلوس سرئوس خواهد بود که شیر را تخمیر کرده است.

۳ـ آزمایش ذوب ژلاتین: از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری در محیط آگار مغذی با آنس برداشت کرده، به طور عمقی در محیط ژلاتین[2] کشت داده می‌شود و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار گرفته که چنانچه باسیلوس سرئوس وجود داشته باشد، ژلاتین را ذوب می‌کند.

۴ـ آزمایش نشاسته: از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری در محیط آگار مغذی با آنس حلقوی برداشت کرده، در سطح محیط نشاسته[3] در ظرف پلیت کشت داده، به مدت ۲۴ تا ۴۸ ساعت در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده می‌شود. بعد از این مدت، محلول رقیق لوگل را به نحوی به پلیت می‌افزایند که سطح پلیت را فراگیرد و نظر به آن‌که باسیلوس سرئوس نشاسته را هیدرولیز می‌کند، اطراف پرگنه‌های این باکتری هاله‌ای بی‌رنگ ایجاد می‌شود، در حالی که زمینهٔ محیط قهوه‌ای مایل به بنفش است.

۵ـ آزمایش تبدیل نیترات به نیتریت: از کشت ۲۴ ساعتهٔ باکتری در محیط آگار مغذی به محیط آبگوشت نیترات[4] منتقل کرده، به مدت ۲ تا ۵ روز در دمای ۳۰ درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده می شود. سپس یک میلی‌لیتر معرف (محلول اسید سولفانیلیک و محلول آلفانفتیل آمین) به لولهٔ محیط کشت افزوده، تکان داده می شود . پیدایش رنگ صورتی قرمز در محیط، در مدت چند دقیقه نشانهٔ وجود نیتریت در محیط است. در صورت منفی بودن آزمایش، مقداری پودر روی به لولهٔ آزمایش می‌افزایند که پیدایش رنگ قرمز پس از چند دقیقه نشانهٔ وجود نیترات احیا نشده خواهد بود و چنانچه باکتری مورد آزمایش باسیلوس سرئوس باشد، با احیای نیترات، آن را به نیتریت تبدیل می‌کند.

۷-۶-۳. شمارش کلستریدیوم‌های احیاکنندهٔ سولفیت در مواد غذایی

کلستریدیوم پرفرنژنس یکی از کلستریدیوم‌های مهم احیاکنندهٔ سولفیت است و معمولاً بیش از

۷۰ درصد پرگنه‌های رشد کرده در سطح محیط کشت اختصاصی سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین آگار[1] را تشکیل می‌دهد. بنابراین، در مواد غذایی، اگر شمارش این کلستریدیوم مدنظر باشد، می‌توان از محیط فوق استفاده کرد. برای شناسایی قطعی این باکتری، باید آزمایش‌های تأییدی نیز انجام شود. برای انجام آزمایش ابتدا ۲۵ گرم از نمونهٔ غذایی مشکوک را آماده کرده، در ظروفی که حاوی ۲۲۵ میلی‌لیتر رقیق‌کننده است، ریخته می‌شود و رقت‌های $\frac{1}{10}$ و سپس $\frac{1}{100}$، $\frac{1}{1000}$ و ... تهیه می‌گردد. لوله‌ها را به مدت ۱۰ دقیقه در بن‌ماری ۶۵ درجه شوک حرارتی داده سپس لوله‌ها خارج و سرد می‌شوند. از هرلوله به میزان ۳ میلی‌لیتر برداشت کرده و در ۳ ظرف پلیت، به هرکدام یک میلی‌لیتر از رقت فوق افزوده می شود و به هر ظرف پلیت به میزان ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط سولفیت پلی‌میکسین سولفادیازین که قبلاً برمبنای دستورالعمل کارخانهٔ سازنده تهیه و اتوکلاو شده و حرارتش به ۴۵ تا ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد کاهش یافته است، افزوده می شود. پس از مخلوط کردن و منعقد شدن محیط، ۲ عدد از پلیت‌ها در جار بی‌هوازی و انکوباتور ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار داده می‌شوند. یکی از ۳ ظرف پلیت را نیز در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار می‌گیرد. پس از این مدت ۲ پلیت موجود در جار را بیرون آورده و میانگین پرگنه‌های سیاه‌رنگ به‌دست می‌آید. سپس ظرف پلیت هوازی را بررسی کرده، چنانچه هیچ‌گونه پرگنهٔ سیاهی در پلیت هوازی وجود نداشته باشد، همان عدد میانگین در ظرف پلیت بی‌هوازی گزارش می‌گردد؛ ولی اگر در پلیت هوازی پرگنهٔ سیاه وجود داشته باشد، تعداد آن از عدد میانگین ۲ پلیت بی‌هوازی کسر می شود، عدد باقی‌مانده در عکس رقت مورد مصرف ضرب و گزارش می‌شود. بدین ترتیب میزان کلستریدیوم‌های احیاکنندهٔ سولفیت در یک گرم مادهٔ غذایی، معلوم می‌شود.

به طور کلی، در انجام آزمایش فوق بهتر است برای هریک از رقت‌ها حالت فوق اجرا شود و سپس نتایج پلیت‌هایی که حاوی ۳۰ تا ۳۰۰ پرگنه هستند، مورد قرائت قرار گیرد. باید دانست غذاهایی که حاوی مقادیر بیش از 10^5 عدد کلستریدیوم پرفرنژنس درهر گرم از مادهٔ غذایی هستند، می‌توانند سبب مسمومیت شوند؛ ولی در مواردی دز باقی‌ماندهٔ غذایی که ایجاد مسمومیت کرده، به دلیل تغییراتی که ممکن است در آن رخ داده باشد، از تعداد میکروارگانیسم‌هایش کاسته می‌شود. از جملهٔ

این عوامل می‌توان به تغییر pH اشاره کرد که این باکتری نسبت به اسیدها حساس است از جملهٔ دیگر عوامل مؤثر، منجمد کردن است که سبب کاهش تراکم میکروبی این باکتری در غذا می‌شود. بنابراین، قضاوت نهایی در خصوص یک مادهٔ غذایی با توجه به نوع غذا و شرایط نگهداری آن و نیز استانداردهای مجاز صورت می‌پذیرد.

۸-۶-۳. شمارش قارچ‌ها (کپک‌ها و مخمرها) در مواد غذایی

ابتدا از نمونهٔ غذایی همانند روش‌های گذشته رقت $\frac{1}{10}$ و سپس از آن رقت‌های $\frac{1}{100}$ $\frac{1}{100}$ $\frac{1}{1000}$ و ... نیز تهیه می‌شود. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از هر رقت برداشته ،به پلیت‌هایی که قبلاً در آنها محیط کشت پوتیتو دکستروز آگار [1] یا سایر محیط‌های کشت قارچ ریخته شده ، در یخچال ذخیره شده‌اند، افزوده می‌گردد و با کمک میلهٔ L شکل، به طور کامل، در سطح محیط کشت پخش می‌شود و رقت مربوطه نیز بر روی پلیت‌ها درج می‌گردد. سپس پلیت‌ها در گرمخانهٔ ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۳ تا ۵ روز قرار داده می‌شود. اگر نمونهٔ مربوطه آلوده به اسپور قارچ‌ها باشد، بر روی محیط رشد می‌کند. در این زمان، باید تعداد کلنی‌ها را شمارش و در عکس ضریب رقت ضرب کرد تا تعداد قارچ‌ها (شامل کپک و مخمر) در یک گرم از نمونهٔ غذایی به‌دست آید. گاهی نیز چند نوع مخمر یا کپک رشد می‌کنند که می‌توان نسبت به خالص کردن و جدانمودن آنها و بررسی از نظر جنس و گونه اقدام به‌عمل آورد.

معمولاً در این روش پلیت‌های حاوی ۱۵ تا ۱۵۰ پرگنه مورد شمارش قرار می‌گیرند. همچنین، محیط کشت قارچ‌ها باید به نحوی باشد که از رشد باکتری‌ها ممانعت نماید و به این دلیل، معمولاً به آن آنتی‌بیوتیک نظیر کلرامفنیکل و یا تتراسایکلین ها اضافه می‌شود، یا pH محیط را با به‌کار بردن اسید نظیر اسید تارتریک ۱۰ درصد به حدود ۳ تا ۳/۵ پایین می‌آورند تا رشد باکتری‌ها امکان‌پذیر نباشد. نکتهٔ مهم استریل نمودن اسید با فیلتر است که باید اسید را پس از اتوکلاوکردن محیط کشت قارچ و سرد شدن آن تا دمای ۴۵ الی ۵۰ درجه سانتی‌گراد، افزود تا از هیدرولیز آگار و ممانعت از انعقاد آن جلوگیری شود. به همین ترتیب، چنانچه آنتی‌بیوتیک نیز اضافه شود، باید پس از سرد شدن محیط کشت اتوکلاو شده، صورت پذیرد، زیرا که حرارت اتوکلاو سبب نابودی آنتی‌بیوتیک خواهد شد.