JVM Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره دوازدهم، شماره اول، ۱۳۹۵، پیاپی ۳۲: ۸۰-۶۹

بررسی مقایسه‌ای مدل‌های پیشگوی بار میکروبی بر پایه امپدانس در بستنی-های وانیلی و کاکائویی تولیدی به روش‌های سنتی و صنعتی

علی فضل‌آرا[1،*]، سیاوش مکتبی[2]، فاطمه نوروزی[3]

۱- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۲- دانشیار گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

۳- دانش‌آموخته دکترای دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۵ اردیبهشت ۱۳۹۳ تاریخ پذیرش: ۱۹ اردیبهشت ۱۳۹۴

چکیده: *شمارش کلی بار میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی به روش پورپلیت و مطابقت نتایج حاصله با استانداردهای موجود، از جمله کارهای آزمایشگاهی معمول در تمامی کارخانجات تولیدکننده بستنی و نیز ادارات نظارت بر بهداشت مواد غذایی است. از سوی دیگر سرعت دستیابی به نتایج بار میکروبی در اسرع وقت و در حداقل زمان ممکن، از جمله نکات ویژه و مدنظر کارخانجات به منظور اطمینان از کیفیت محصولات تولیدی و در حال توزیع می‌باشد. لذا با تکیه بر این موضوع، بهره‌گیری از تکنیک امپدانس در ارزیابی بار میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی (وانیلی و کاکائویی) مدنظر واقع شد که با صرف وقت کمتر، دستیابی سریع‌تر به نتایج را میسر می‌سازد. همچنین در این مطالعه، مطابقت نتایج حاصله از روش امپدانس با نتایج به دست آمده از روش پورپلیت به منظور طراحی مدل‌های پیشگوی بار میکروبی بر پایه امپدانس در بستنی‌های مذکور مورد بررسی واقع گردید. بدین منظور در طی ۶ ماه، ۱۲۰ نمونه (بستنی‌های سنتی و صنعتی هر کدام ۶۰ عدد) از مناطق مختلف اهواز تهیه شدند. نیمی از نمونه بستنی‌های سنتی و صنعتی از نوع وانیلی و نیم دیگر کاکائویی بودند. نمونه‌ها در شرایط استریل مورد آزمایش و کشت قرار گرفتند. اندازه‌گیری بار میکروبی به روش پورپلیت و نیز امپدانس بر اساس دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران به انجام رسید. سپس منحنی انطباق بین دو روش و معادلات آن‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل به دست آمد. بر اساس نتایج حاصل، میزان انطباق روش امپدانس با روش پورپلیت در بستنی‌های ساده و کاکائویی تولیدی به روش صنعتی به ترتیب معادل ۹۶/۵۵٪ و ۹۵/۳۱٪ بود. همچنین میزان انطباق روش امپدانس با روش شمارش بار میکروبی به روش مرجع در بستنی‌های ساده و کاکائویی تولیدی به روش سنتی به ترتیب معادل ۸۹/۰۷٪ و ۸۷/۳۷٪ بود. به طور کلی در مطالعه حاضر میزان انطباق روش امپدانس با روش شمارش بار میکروبی به روش مرجع در بستنی‌های صنعتی و سنتی به ترتیب معادل ۹۴/۶۱٪ و ۸۷/۹۲٪ بود. بنابر نتایج، به لحاظ اهمیت حصول هر چه سریع-تر نتایج در آزمون‌های کنترل کیفیت غذایی، بهره‌گیری از تکنیک‌های جدیدی همچون روش امپدانس در صنایع غذایی به عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم قدیمی می‌تواند مورد استفاده باشد که در چند سال اخیر نیز در برخی کشورهای توسعه یافته به منظور کنترل کیفیت مواد غذایی مختلف مورد استفاده قرار گرفته است.*

کلمات کلیدی: *روش پورپلیت، روش امپدانس، بستنی صنعتی، بستنی سنتی، بستنی ساده، بستنی کاکائویی*

**نویسنده مسئول: علی فضل‌آرا*

آدرس: گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران. تلفن ۰۹۱۲۳۰۹۱۸۱۳، فکس ۳۳۶۰۸۰۷-۰۶۱۱

پست الکترونیک: Fazlara2000@yahoo.com و a.fazlara@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

مفهوم اندازه‌گیری امپدانس الکتریکی رشد میکروبی اولین بار توسط جی. ان. استوارت در سال ۱۸۹۹ شناخته شد اما تا سال ۱۹۷۰ از این تئوری برای ارزیابی و شناسایی میکروب‌ها استفاده نشده بود (۱۵). در این روش، تشخیص سریع میکروب‌ها از طریق نمایش فعالیت‌های متابولیک به وسیله ایجاد تغییر در مقاومت الکتریکی در محیط کشت امکان‌پذیر می‌باشد (۱). اگرچه تکنیک آنالیزی امپدانس بر پایه فرآیند کشت می‌باشد، اما این روش اساسا با شناسایی میکروارگانیسم‌ها با استفاده از روش‌های استاندارد در پلیت (پور پلیت، اسپیرال پلیت، دراپ پلیت و اسپاتولاپلیت) متفاوت است. امروزه از روش‌های نوین سریع و دقیق در تشخیص میکروب‌های مواد غذایی نظیر امپدانس به عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم قدیمی در امر کنترل کیفیت فرآورده‌های غذایی استفاده می‌گردد (۶). با استفاده از روش امپدانس، جداسازی شماری از میکروب‌های بیماری زایی غذایی مانند *سالمونلا*، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس ارئوس* و *لیستریا مونوسایتوژنز* به طور موفق انجام می‌گیرد.

بار میکروبی یکی از فاکتورهای بسیار مهم در ارزیابی کیفیت انواع بستنی می‌باشد. شمارش کلی میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی و مطابقت نتایج حاصله با مقادیر استانداردهای موجود، از جمله کارهای آزمایشگاهی معمول در تمامی کارخانجات تولیدکننده بستنی و نیز ادارات نظارت بر بهداشت مواد غذایی است. از سوی دیگر سرعت دستیابی به نتایج بار میکروبی در اسرع وقت و در حداقل زمان ممکن، از جمله نکات ویژه و مد نظر کارخانجات و نیز ادارات نظارت بر بهداشت مواد غذایی به منظور اطمینان از کیفیت بستنی‌های تولیدی می‌باشد. لذا در مطالعه حاضر استفاده از تکنیک امپدانس به منظور ارزیابی بار میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی وانیلی و کاکائویی مورد مصرف در ایران و مطابقت نتایج حاصله با نتایج حاصل از روش مرجع پورپلیت و نهایتاً طراحی مدل‌های پیشگوی بار میکروبی بستنی‌های مذکور بر پایه امپدانس مدنظر واقع گردید.

مواد و روش‌ها

دراین مطالعه، تعداد ۱۲۰ نمونه بستنی (بستنی سنتی و صنعتی هر کدام ۶۰ عدد) به صورت تصادفی از مناطق مختلف اهواز تهیه شد. به این نحو که از ۶۰ نمونه بستنی سنتی و نیز ۶۰ نمونه بستنی صنعتی، تعداد ۳۰ نمونه بستنی وانیلی یا ساده و ۳۰ نمونه بستنی کاکائویی بود. نمونه‌ها از محصولات تولیدی صنعتی عرضه شده با تاریخ‌های تولید مختلف و به شکل‌های مختلف چوبی، قیفی، حصیری و لیوانی و نیز بستنی‌های تولیدی سنتی در سطح شهر اهواز خریداری شدند. سپس نمونه‌ها در شرایط سرما و در کنار یخ به آزمایشگاه مواد غذایی منتقل و آزمایش‌های مورد نظر بر روی نمونه‌ها انجام شد.

الف- کشت به روش سنتی

ابتدا از نمونه‌های بستنی، سریال رقت تهیه گشته بر طبق دستورالعمل شماره ۵۴۸۴ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران نسبت به انجام کشت پورپلیت دو لایه درمحیط کشت آگار استاندارد شمارش میکروبی در پلیت وگرمخانه گذاری در ۳۰ درجه سانتی گراد اقدام گردید (۴). پس از گذشت زمان لازم برای نگهداری در گرم خانه (۴۸ ساعت)، پلیت‌ها ازگرمخانه خارج شده و پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشتند،

Archive of SID

www.SID.ir

انتخاب و کلنی‌های آنها شمارش شده، تراکم میکروبی نمونه شیرهای مورد آزمایش محاسبه و ثبت شد (۴).

ب-کشت به روش امپدانس

به منظور جلوگیری از شوک سرمایی، ۳۰ دقیقه قبل از انجام کشت، لوله‌های امپدانس حاوی محیط براث ویژه روش امپدانس (Bimedia 001A) را که از قبل آماده و استریل شده بودند از یخچال بیرون آورده شد تا با محیط هم دما شوند. سپس با یک گرم از نمونه بستنی که به طور همزمان کشت در پلیت آن نیز انجام داده شد، تلقیح گشته و درون انکوباتور دستگاه آنالایز میکروبی Bactrac 4300 (ساخت شرکت Sy-lab اتریش) قرار داده و مشخصات لوله شامل نوع و شماره نمونه وارد نرم افزار دستگاه شد. پروتکل مربوط به ارزیابی شمارش کلی میکروبی در ۳۰ درجه سانتی گراد با استفاده از تغییرات امپدانس یا مقاومت الکتریکی در محیط کشت (Media Value or M-Value) با مدت زمان گرم شدن اولیه (Warm Up)، زمان یک ساعت و حد آستانه (Threshold) معادل ۵ درصد و فواصل زمانی اندازه‌گیری امپدانس معادل ۱۰ دقیقه برای طول مدت زمان ۲۴ ساعت کارکرد دستگاه تنظیم گردید و به طور اتوماتیک و براساس پروتوکل تنظیمی در طی مدت حداکثر ۲۴ ساعت، مقادیر امپدانس ناشی از تغییرات هدایت الکتریکی در محیط کشت در فواصل زمانی هر ۱۰ دقیقه مورد پایش و ثبت قرار گرفت. زمانی که میزان هدایت الکتریکی از حد آستانه تنظیمی فراتر رفت، به عنوان زمان تشخیص (Detection Time) توسط دستگاه ثبت گردید. نهایتا نمونه‌ها پس از ۲۴ ساعت از انکوباتور دستگاه خارج شده و نتایج آنها در نرم افزار دستگاه ثبت شد (۵). نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی در نمونه بستنی‌های سنتی و صنعتی وانیلی و کاکائویی در روش مرجع و نیز زمان‌های به دست آمده برحسب ساعت توسط دستگاه امپدانس در سیستم نرم افزاری ویژه دستگاه آنالیزر میکروبی باک تراک ۴۳۰۰ که بر اساس Excel طراحی شده است، ثبت گردید و به منظور نمایش میزان ارتباط، منحنی‌های پراکنش زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با لگاریتم مقادیر بار میکروبی در هر دو نوع بستنی سنتی و صنعتی با بالاترین ضریب تعیین (R^2) ترسیم شد و براین اساس فرمول یا معادله منحنی رگرسیون مربوطه که جهت پیشگویی و محاسبه ریاضی تراکم میکروبی بر اساس پارامتر زمان امپدانس می‌باشد، حاصل گردید.

در پایان نتایج حاصل از فاکتورهای مورد مطالعه (بار میکروبی به روش مرجع، مدت زمان ثبت شده جهت ارزیابی بار میکروبی با روش امپدانس، بار میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی وانیلی و کاکائویی) با استفاده از نرم افزارSPSS مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند. تحلیل داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از روش‌های رگرسیون خطی، تحلیل همبستگی و محاسبه ضریب همبستگی پیرسن و آزمون t برای دو نمونه مستقل انجام گرفت.

نتایج

نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی بستنی‌های ساده و کاکائویی (صنعتی و سنتی) در کل تحقیق در روش مرجع و نیز زمان‌های به‌دست آمده توسط دستگاه امپدانس در سیستم نرم‌افزاری ویژه دستگاه باک تراک ۴۳۰۰ که بر اساس Excel طراحی شده است، درج شد و منحنی ارتباط زمان‌های به‌دست آمده از دستگاه امپدانس با مقدار بار باکتریایی بستنی‌های ساده و کاکائویی (صنعتی و سنتی) حاصل از روش مرجع با

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده از آزمون رگرسیون خطی بدست آمد. منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با بار باکتریایی بستنی‌های صنعتی وانیلی و کاکائویی به تر تیب در شکل‌های ۱ و ۲ آمده است.

بدینوسیله معادله رگرسیونی شمارش کلی بار میکروبی بستنی‌های صنعتی وانیلی یا ساده و کاکائویی با زمان-های تعیین شده به وسیله دستگاه امپدانس باک تراک ۴۳۰۰ به شرح ذیل بدست آمد:

بستنی صنعتی ساده: Y= - ۰/۴۱۲ X+۱۰/۵۱

بستنی صنعتی کاکائویی: Y=- ۰/۳۲۶ X+۸/۸۶۰

مقادیر R^2 یا ضریب تعیین بدست آمده در شکل‌های ۱ و ۲ که به ترتیب معادل ۰/۹۶۵ و ۰/۹۵۳ هستند، بیانگر میزان بالای قدرت پیشگویی مقادیر بار باکتریایی بستنی صنعتی وانیلی و کاکائویی با بهره‌گیری از تکنیک امپدانس و معادلات رگرسیونی حاصل می‌باشد که به ترتیب معادل ۹۶/۵٪ و ۹۵/۳٪ خواهد بود.

معادله رگرسیونی شمارش کلی بار میکروبی بستنی‌های سنتی ساده و کاکائویی با زمان‌های تعیین شده به وسیله دستگاه امپدانس باک تراک ۴۳۰۰ به شرح ذیل بدست آمد (شکل‌های ۳و ۴):

بستنی سنتی ساده: Y= - ۰/۴۱۶X +۱۰/۲۷

بستنی سنتی کاکائویی: Y= -0/352X+9/580

میزان ضریب تعیین معادلات در شکل‌های ۳ و ۴ که به ترتیب معادل ۰/۸۹و ۰/۸۷۳ هستند، بیانگر ارتباط خوب بین مقدار بار باکتریایی و زمان‌های تعیین شده به‌وسیله دستگاه باک‌تراک ۴۳۰۰ می‌باشد که به ترتیب معادل ۸۹٪ و ۸۷/۳٪ می‌باشد.

معادله رگرسیونی شمارش کلی بار میکروبی بستنی-های صنعتی و سنتی با زمان‌های تعیین شده به وسیله دستگاه امپدانس باک تراک ۴۳۰۰ به شرح ذیل بدست آمد (شکل‌های ۵ و ۶):

بستنی صنعتی: Y=- ۰/۳۶۹ X+ ۹/۶۸۶

بستنی سنتی: Y= -۰/۳۸۵ X+۹/۹۲۶

میزان ضریب تعیین معادلات در شکل‌های ۵ و ۶ که به ترتیب معادل ۰/۹۴۶ و ۰/۸۷۹هستند، بیانگر ارتباط خوب بین مقدار بار باکتریایی و زمان‌های تعیین شده به‌وسیله دستگاه باک‌تراک ۴۳۰۰ می‌باشد که به ترتیب معادل ۹۴/۶٪و ۸۷/۹٪ می‌باشد.

می‌توان اظهار داشت که مقادیر ضریب تعیین به دست آمده در تمامی شکل‌های فوق بیانگر میزان بالای قدرت پیشگویی فاکتور مورد مطالعه (بار میکروبی) در بستنی‌های سنتی و صنعتی ساده و کاکائویی با بهره-گیری از تکنیک امپدانس، با استفاده از معادلات رگرسیونی حاصل می‌باشد.

بحث

امروزه بهره‌گیری از روش امپدانس با توجه به امکان حصول سریع نتایج، بسیار توسعه یافته است و در موارد مختلفی از این روش استفاده می‌شود. مزیت روش امپدانس، سرعت انجام آن است که بسیار سریع-تر از روش‌های مرجع میکروبی است. از سوی دیگر روش مرجع بر اساس شمارش کلی میکروبی در پلیت می‌باشد که در واقع تعداد ارگانیسم‌های زنده را به صورت کلنی‌های قابل رویت در سطح محیط کشت آشکار می‌نماید. با طراحی منحنی‌های کالیبراسیون دو روش که بر اساس معادلات رگرسیونی می‌باشد و برای هر ماده غذایی به طور مجزا طراحی می‌گردد، می‌توان تراکم بار میکروبی را با استفاده از روش امپدانس و معادله رگرسیونی مربوطه به طور محاسباتی پیشگویی نمود (۱۹).

در این مطالعه شمارش کلی باکتری‌ها با دو روش مرجع و امپدانس بر روی ۱۲۰ نمونه بستنی صنعتی و

Archive of SID

www.SID.ir

سنتی (هر کدام ۶۰ عدد) مورد بررسی قرار گرفت. به این نحو که از ۶۰ نمونه بستنی سنتی و نیز ۶۰ نمونه بستنی صنعتی، تعداد ۳۰ نمونه بستنی ساده و ۳۰ نمونه بستنی کاکائویی بود. بر اساس نتایج حاصل، میزان انطباق روش امپدانس با روش شمارش بار میکروبی به روش مرجع در بستنی‌های وانیلی یا ساده و کاکائویی تولیدی به روش صنعتی به ترتیب معادل ۹۶/۵ درصد و ۹۵/۳ درصد بود. همچنین میزان انطباق روش امپدانس با روش شمارش بار میکروبی به روش مرجع در بستنی-های ساده و کاکائویی تولیدی به روش سنتی به ترتیب معادل ۸۹ درصد و ۸۷/۳ درصد بود. به طور کلی در مطالعه حاضر میزان انطباق روش امپدانس با روش شمارش بار میکروبی به روش مرجع در بستنی‌های صنعتی و سنتی به ترتیب معادل ۹۴/۶ درصد و ۸۷/۹ درصد بود.

در بررسی‌های آماری که از نظر تحلیل همبستگی با استفاده از نرم‌افزار SPSSانجام گرفت میزان همبستگی بالایی بین بار میکروبی و زمان امپدانس ملاحظه شد. همچنین در مطالعه حاضر بار میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی وانیلی و کاکائویی به روش مرجع با زمان امپدانس رابطه مستقیم نشان داد. بر اساس نتایج حاصل، اختلاف معنی‌داری بین بستنی‌های صنعتی کاکائویی با وانیلی از نظر مقادیر لگاریتم بار باکتریایی و زمان‌های امپدانس برای شناسایی توسط دستگاه آنالایزر میکروبی ملاحظه نگردید. بنابراین به لحاظ کاربردی می توان از یک منحنی و معادله به عنوان مدل پیشگو ثابت برای ارزیابی بستنی‌های وانیلی و کاکائویی صنعتی استفاده نمود و نیازی به استفاده از منحنی و معادلات جداگانه به تفکیک برای بستنی‌های وانیلی و کاکائویی نیست. همچنین اختلاف معنی‌داری بین بستنی‌های سنتی کاکائویی با وانیلی از نظر مقادیر لگاریتم بار باکتریایی و زمان‌های امپدانس مشاهده نگردید. پس می‌توان از یک منحنی و معادله به عنوان مدل پیشگو ثابت در جهت بررسی بستنی‌های وانیلی و کاکائویی سنتی استفاده نمود. بر اساس مقایسه آماری بین بستنی‌های وانیلی صنعتی با سنتی و همچنین بستنی‌های کاکائویی صنعتی با سنتی از نظر لگاریتم بار باکتریایی و زمان‌های امپدانس اختلاف معنی‌داری وجود داشت. بنابراین، نمی‌توان از یک منحنی و معادله برای ارزیابی بستنی-های وانیلی (سنتی و صنعتی) استفاده نمود. همچنین به منظور بررسی بستنی‌های کاکائویی (سنتی و صنعتی) نیز نمی‌توان از یک منحنی و معادله رگرسیونی استفاده کرد و باید از منحنی و معادلات جداگانه به تفکیک برای بستنی‌های صنعتی و سنتی استفاده شود.

Deak و همکارانش در سال ۱۹۹۳، برای تعیین و تخمیر مخمرها در آب میوه‌جات، از روش امپدانس غیر مستقیم و شمارش پلیت استفاده کردند. در این تحقیق تعدادی از نمونه‌ها قبل از آزمایش، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. نتایج حاصل، میزان انطباق این دو روش را ۷۸ درصد نشان داد. همچنین شمارش میکروبی در نمونه‌هایی که قبل از آزمایش در انکوباتور قرار گرفته بودند در مدت زمان ۹/۴۸ ساعت شناسایی شد در حالی که این مدت زمان برای نمونه‌های انکوبه نشده ۱۴/۱ ساعت بود. به این دلیل که جمعیت اولیه میکروبی در طول انکوباسیون افزایش یافته بود(۱۰). Madden و Gilmor در سال ۱۹۹۵ در ایرلند به منظور شمارش کلی‌فرم‌های موجود در ۹۰۰ نمونه شیر پاستوریزه از تکنیک امپدانس و روش MPN نه لوله‌ای استفاده کردند. تجزیه و تحلیل رگرسیونی ۹۸ نمونه مثبت نشان داد که دقت دو روش یکسان ولی نتایج در روش امپدانس سریع‌تر حاصل گردید. همچنین روش امپدانس به عنوان یک روش

Archive of SID

www.SID.ir

جایگزین روش‌های سنتی گزارش گردید (۱۷). Carvalho و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان کاهش فعالیت *لاکتوباسیلوس دلبروسی بولگاریکوس* در محصولات لبنی یخزده را بررسی کردند. در این مطالعه از روش‌های ایمپدیمتریک (زمان تعیین امپدانس، هدایت و ظرفیت الکتریکی) و pH استفاده شد. مقدار زمان‌های ثبت شده امپدانس نشان داد که زمان تعیین امپدانس برای ارزیابی فعالیت تخمیری مناسب نیست. دراین مطالعه گزارش شد ظرفیت الکتریکی نسبت به هدایت الکتریکی انطباق بهتری با pH دارد و هیچ‌گونه اختلاف معنی‌داری بین ظرفیت الکتریکی و pH وجود ندارد (۹).

Batrinou و همکاران در سال ۲۰۰۵، تراکم میکروبی در مخلوط شکلات تلخ را با استفاده از تکنیک امپدانس مورد بررسی قرار دادند. بر اساس نتایج حاصل از ارزیابی منحنی کالیبراسیون در شمارش کلی میکروب‌های هوازی و زمان‌های امپدانس ثبت شده، میزان انطباق بالایی بین دو روش وجود داشت (۸۹/۸۹ درصد). همچنین گزارش کردند که روش امپدانس یک روش اتوماتیک، سریع و راحت‌تر در مقایسه با روش مرجع شمارش پلیت می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک روش جایگزین مورد استفاده قرار گیرد (۸). Spiller و همکاران در سال ۲۰۰۶ در آلمان از روش امپدانس و اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی برای ارزیابی تراکم *انتروکوک* و پایش بقاء آنها در محیط کشت استفاده نمودند. بدین نحو که از یک محیط کشت مغذی متشکل از ماکرومولکول‌ها و دارای مقاومت یا هدایت الکتریکی ثابت و پایدار استفاده کردند. با تلقیح مقادیر مشخصی از سوسپانسیون *انتروکوکوس فکالیس* به محیط کشت مذکور نسبت به ردیابی و یا پایش تغییرات هدایت الکتریکی از طریق الکترودهای تعبیه شده در محیط کشت اقدام نمودند. میزان تغییرات مقاومت یا هدایت الکتریکی را به صورت معادله ریاضی و تابعی از تراکم باکتریایی *انتروکوک*‌ها گزارش کردند (۱۸).

در مطالعه‌ای که Glassmoyer و Russell در سال ۲۰۰۱ انجام دادند یک محیط مایع انتخابی حاوی آکریفلاوین و نالیدیکسیک اسید برای ردیابی *استافیلوکوکوس اورئوس* با روش امپدانس طراحی گردید (:) (SIB = *S. aureus* Impedance Broth). در این محیط، *استافیلوکوکوس اورئوس* ظرف حداکثر ۱۶/۴ ساعت در دستگاه امپدانس تشخیص داده می‌شود. این باکتری در گوشت ماکیان تازه و پخته شده که با *استافیلوکوکوس اورئوس* تلقیح شده بودند، در کمتر از ۱۱/۵ ساعت قابل ردیابی بود (۱۳). در تحقیق دیگری که توسط فضل آرا و همکاران در سال ۱۳۹۱ صورت گرفت تعداد ۱۰۰ نمونه شیر (شیر خام و پاستوریزه) از نظر شمارش کلی میکروبی با استفاده از روش امپدانس و روش مرجع مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین مقدار اسیدیته شیر بر اساس درجه دورنیک اندازه‌گیری شد. بنابر نتایج حاصل، میزان همبستگی بالایی بین بار میکروبی به روش مرجع و اسیدیته و همچنین هر دو فاکتور مذکور با زمان امپدانس ملاحظه شد (۳). در تحقیقی دیگر با به کارگیری ترکیبی از سنسورهای ایمپدیمتریک همراه با کاهش غلظت متیلن بلو در خصوص شناسایی کلی‌فرم-های شیر استفاده شد. بر اساس نتایج حاصل از Lee و همکاران، منحنی کالیبراسیون، ارتباط خطی بین زمان امپدانس و غلظت کلی‌فرم‌ها را با ضریب تعیین ۰/۹۱۹۲ نشان داد (۱۶). Fontana و همکاران در سال ۲۰۰۲، در ایتالیا در مطالعه‌ای نتایج حاصل از شمارش اسپورهای *کلستریدیایی* را در ۱۲۵ نمونه شیر خام که خامه آنها

Archive of SID

www.SID.ir

گرفته شده بود، با دو روش مرجع و امپدانس با هم مقایسه کردند که نتایج حاصل از این دو روش، تطابق ۹۷/۹۶٪ را نشان دادند (۱۲). Grossi و همکاران در سال ۲۰۰۸، در ایتالیا نیز تراکم کلی میکروبی در انواع بستنی‌های عرضه شده در شهر بلونا را با استفاده از روش استاندارد مرجع و نیز تکنیک امپدانس مورد ارزیابی قرار دادند و میزان انطباق دو روش را خوب و معادل ۷۸ درصد گزارش نمودند و اظهار داشتند که روش امپدانس به عنوان یک روش مطمئن، کاربردی، سریع و آسان در ارزیابی کیفیت بستنی‌های تولیدی کارخانجات مواد غذایی و نیز مراکز نظارتی و کنترلی قابل استفاده است (۱۴). فضل‌آرا و همکاران (۱۳۸۸) به منظور تشخیص *لیستریا* در شیر و محصولات لبنی روش استاندارد مرجع و تکنیک امپدانس را بررسی کردند و در مجموع ۲۵۰ نمونه مورد بررسی، اعم از شیرهای خام و موارد شاهد مثبت و منفی، صرفا ۴ مورد اختلاف در نتایج دو روش ملاحظه شد که بر اساس آزمون آماری اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود نداشت (۲). در مطالعه Andrade و همکاران در سال ۱۹۹۸ روش امپدانس در مقایسه با روش کشت مرجع در پلیت به منظور شناسایی *انتروکوک*‌های موجود در سطوح در تماس با مواد غذایی استفاده شد و اعلام گردید که با توجه به انطباق بالای روش مرجع با روش امپدانس (۹۲٪)، روش امپدانس به عنوان روش انتخابی و جایگزین روش مرجع برای شناسایی انتروکوک توصیه می‌گردد (۷).

نتایج مطالعات فوق همگی حاکی از میزان انطباق خوب روش‌های مرجع با روش امپدانس است که با نتایج مطالعه حاضر قرابت دارد. علت تفاوت در مقادیر ذکر شده انطباق روش‌های مرجع و امپدانس، نوع و ترکیبات تشکیل دهنده مواد غذایی مختلف، نوع باکتری مورد مطالعه، محیط‌های کشت مصرفی متفاوت، روش‌های مختلف کشت و جداسازی میکروبی، میزان دقت و خطاهای فردی است (۱۱). لذا با توجه به این موضوع که روش امپدانس در مدت زمان بسیار کمتر و سریع‌تر نسبت به شناسایی باکتری اقدام می‌نماید و می‌تواند تعداد نمونه بیشتری را مورد آزمایش قرار دهد و از سوی دیگر به دلیل آن که به مواد و آماده‌سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع نیاز ندارد، می‌تواند به عنوان روشی کاربردی، آسان و سریع در امر نظارت و کنترل کیفی شیر و فرآورده‌های لبنی مورد استفاده واقع گردد. به طور کلی مقادیر ضریب تعیین بالاتر از ۰/۷۵، بیانگر تطابق بالای روش مرجع و امپدانس می‌باشد که در اکثر تحقیقات انجام شده در داخل و خارج کشور مبنای تایید منحنی‌های حاصله و کاربردی بودن معادله آنها در صنایع غذایی می‌باشد. بنابراین با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر که انطباق خوبی بین روش امپدانس و مرجع در شناسایی بار میکروبی بستنی‌های ساده و کاکائویی (سنتی و صنعتی) ملاحظه شد، روش امپدانس می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های قدیمی در تعیین بار میکروبی بستنی باشد.

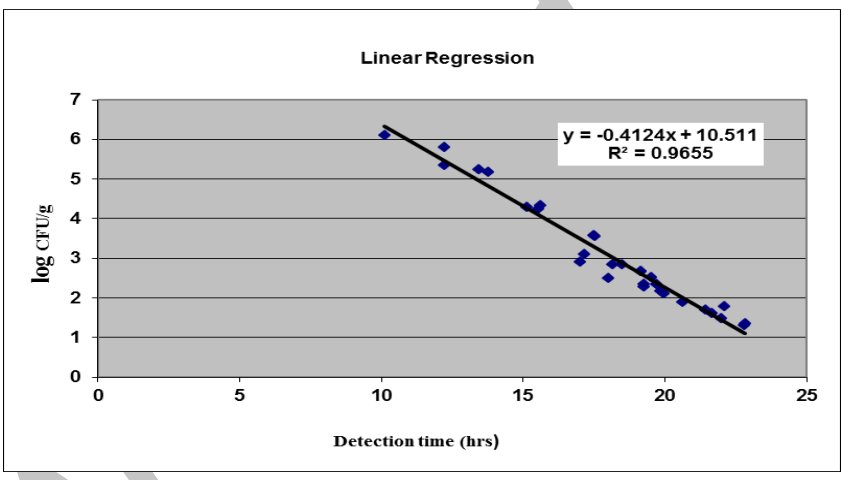
در مطالعه حاضر همچون مطالعات سایر محققین ذکر شده در فوق با استفاده از معادلات منحنی‌های به دست آمده در قسمت نتایج که همگی حاکی از میزان همبستگی بالای فاکتورهای مورد مطالعه بودند، می توان با به دست آوردن یا اندازه‌گیری هریک از فاکتورهای مورد مطالعه، سایر فاکتورها را نیز به صورت محاسباتی به دست آورده و یا پیشگویی نمود. اما با توجه به آن که مدل‌های پیشگوی میکروبی در مواد غذایی همواره تابع فاکتورهای درون اثر و برون اثر مؤثر در رشد میکروبی از جمله سطح بهداشت در

Archive of SID

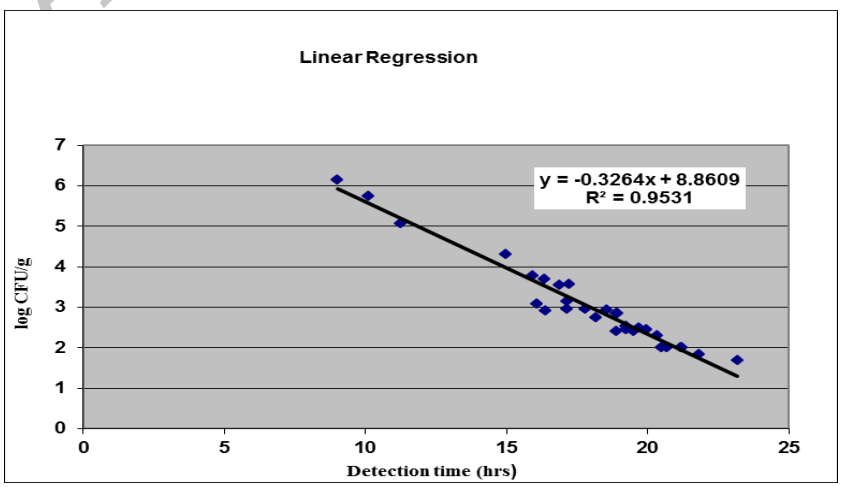
www.SID.ir

مراحل مختلف تولید و نیز شرایط اقلیمی منطقه ای و ... هستند، لذا یک مدل در تمام شرایط کاربرد ندارد. بر این اساس مدل‌های پیشگوی طراحی شده در مطالعه حاضر که در منطقه اهواز و شرایط گرمسیری خوزستان انجام شده است، مختص استفاده در همین منطقه اقلیمی و با ویژگی‌های میکروبی بستنی‌های سنتی و صنعتی توزیعی در استان خوزستان می‌باشد. بدیهی است که در صورت نیاز به استفاده از چنین معادلات پیشگویی در سایر مناطق و با ویژگی‌های مختلف از نظر فاکتورهای درون اثر و برون اثر متفاوت نیاز به تهیه و طراحی مدل‌های مناسب مربوطه خواهد بود.

نتیجه کلی آن که با توجه به اهمیت حصول سریع نتایج در آزمون‌های کنترل کیفی شیر و فراورده‌های لبنی، استفاده از تکنیک‌های سریع‌تر همچون روش امپدانس می تواند رهگشا بوده و انجام آزمون‌های وقت‌گیر مرسوم به خصوص انجام کشت و شمارش بار میکروبی به روش مرجع را تا حد بسیاری کاهش دهد. اما انجام این امر مستلزم بررسی دقیق نمونه‌های هر منطقه یا کارخانه و طراحی و تدوین کالیبراسیون‌های دقیق با میزان انطباق بالا می‌باشد تا بدینوسیله با اطمینان به معادلات پیشگوی حاصل بتوان فاکتورهای مورد نظر در امر کنترل کیفیت را پاسخ داده، از طریق محاسباتی به دست آورد.

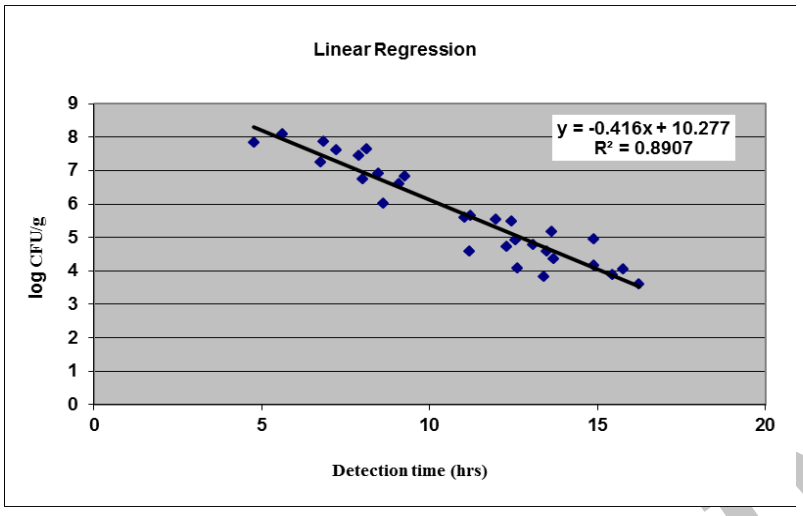


شکل ۱- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار باکتریایی بستنی صنعتی وانیلی

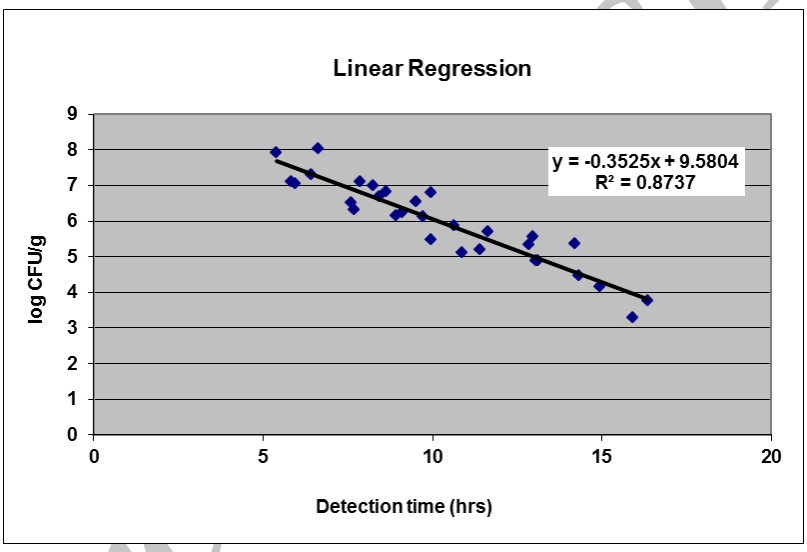


شکل ۲- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با بار میکروبی بستنی‌صنعتی کاکائویی

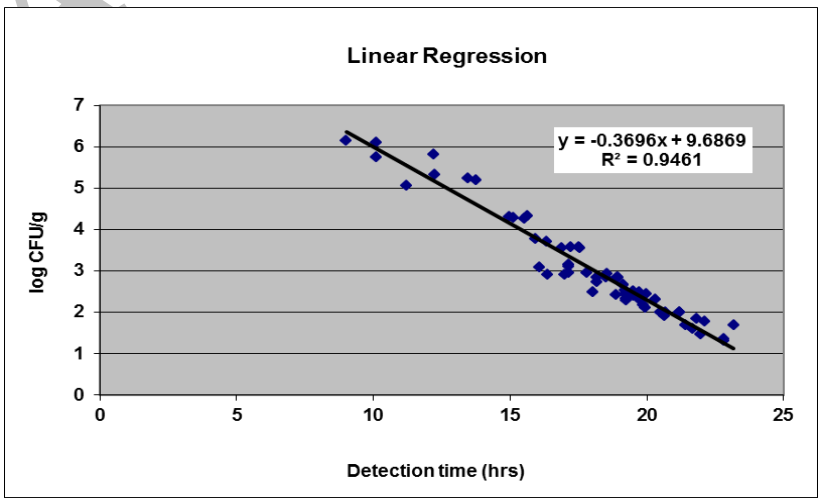
www.SID.ir



شکل ۳- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با بار باکتریایی بستنی سنتی وانیلی

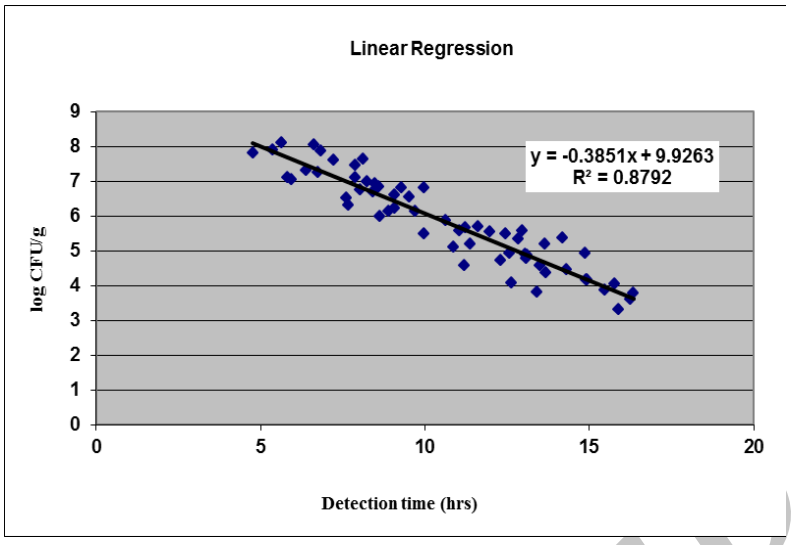


شکل ۴- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار باکتریایی بستنی سنتی کاکائویی



شکل ۵- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار باکتریایی بستنی‌صنعتی(ساده و کاکائویی)

www.SID.ir



شکل ۶- منحنی ارتباط زمان‌های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار باکتریایی بستنی‌سنتی (ساده و کاکائویی)

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان نامه از محل اعتبار پژوهانه سال ۹۲ دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است که بدین وسیله ازحوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

منابع

۱. رضویلر، و. (۱۳۸۷). *میکروب‌های بیماریزا در مواد غذایی و اپیدمیولوژی مسمومیت‌های غذایی*. چاپ اول، انتشارات دانشگاه تهران، صفحات: ۴۷-۴۶.

۲. فضل‌آرا، ع. (۱۳۸۸). بررسی شیرهای خام از نظر آلودگی به *لیستریا مونوسیتوژنز* با استفاده از روش امپدانس، *اولین سمینار کشوری سلامت شیر از تولید تا مصرف*، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، صفحه ۴۱.

۳. فضل‌آرا، ع.، زارعی، م.، متقیان، ن. (۱۳۹۰). بررسی روش اندازه‌گیری بار میکروبی شیر خام و پاستوریزه با استفاده از اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی (امپدانس) و تطابق آن با اسیدیته قابل تیتر شیر، *مجله دامپزشکی ایران*.جلد ۹ شماره۲، صفحات: ۱۰۳-۹۷.

۴. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۱). استاندارد ملی شماره ۵۴۸۴، شیر و فرآورده‌های آن- روش شمارش کلی پرگنه‌های میکروارگانیسم‌ها در ۳۰ درجه سلسیوس.

۵. مج=وسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران (۱۳۸۳). استاندارد ملی شماره ۷۷۲۶، میکروبیولوژی مواد غذایی- اصول شناسایی و شمارش میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی با استفاده از روش امپدانس.

۶. نوری، ا.، فضل آرا، ع.، مکتبی، س. (۱۳۸۶). بررسی و شمارش *انتروکوک‌ها* در بستنی‌های غیرپاستوریزه مصرفی در شهر اهواز به روش مرجع و تطابق آن با تکنیک امپدانس و طراحی الگوی ریاضی مربوطه، *نهمین کنگره سراسری میکروب شناسی ایران*، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، صفحه ۲۳۱.

7. Andrade, N.J., Bridgeman, T.A., Zottola, E.A. (1998). activity of sanitizers against Entercocci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance method. *Journal of Food Protection* **61**: 833-8.
8. Batrinou, A.M., Katsogiannos, E.D., Koustoumpardis, E.N., Spiliotis V.K. (2005). Estimation of microbial population of bitter chocolate mix by impedance measurement. *Ernahrung/Nutrition* **29**: 260-3.

Archive of SID
www.SID.ir

9. Carvalho, S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P. (2003). Impedimetric method for estimating the residual activity of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii ssp. Bulgaricus*. *International Dairy Journal* **13**: 463.
10. Deak, T., Beuchat, L.R. (1993). Comparison of conductimetric and traditional plating techniques for detecting yeast in fruit juices. *Journal Applied Bacteriology* **75**: 546-50.
11. Domig, K.J., Mayer, H.K., Kneifel, W. (2003). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 1. Media for isolation and enumeration, Review article. *International Journal of Food Microbiology* **88**: 147-64.
12. Fontana, M.A., Busiello, S.T., Biosotti, S.T., Dallorto, G.I., Unger, B.R., Masaniger, H.E. Schinkinger, M.A. (2002). Rapid enumeration of clostridial spores in raw milk samples using an impedimetric method. *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* **10**: 107-16.
13. Glassmoyer, K.E., Russell, S.M. (2001). Selective broth for detection of *Staphyiococcus aureus* using impedance. *Journal of Food Protection* **64**: 44-50.
14. Grossi, M., Lanzoni, M., Pompei, A., Lazzarini, R., Matteuzzi, D., Ricc, B. (2008). Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. *Biosensors and Bioelectronics* **23**: 1616-23.
15. Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005). *Modern Food Microbiology*, 7 th Edition, Springer Science Inc. USA. pp: 272-3.
16. Lee, Y., Wu, I.Y., Hus, C.L., Liang, H.J., Yang, C.J., Jang, H.D. (2009). A rapid and selective method for monitoring the growth of coliforms in milk, using the combination of amperometric sensor and reducing of methylene blue. *Sensors and Actuators B Chemical* **14**: 575-80.
17. Madden, R.H., Gilmour, A. (1995). Impedance as an alternative to MPN enumeration of coliforms in pasteurized milks. *Food Microbiology* **21**: 387-8.
18. Spiller, E., Scholl, A., Alexy, R., Kummerer, K., Urban, G.A. (2006). A microsystem for growth inhibition test of *Enterococcus faecalis* based on impedance measurement. *Sensors and Actuators B Chemical* **118**: 182-91.
19. Yang, L., Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborn pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances* **26**: 135-50.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 12, Issue 1, 2016

Comparative Survey on Predictive Impediometric Models for Microbial Load in Vanilla and Cocoa Ice-Creams Produced with Traditional and Industrial Methods

***Fazlara, A.*[*1], *Maktabi, S.*[2], *Norouzi, F.*[3]**

1. Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
2. Associate Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran
3. Graduated from Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

Received Date: 5 May 2014 *Accepted Date: 9 May 2015*

Abstract: *Measuring total microbial count of ice-cream with conventional pour plate count method and comparing the results with standard limits is one of the routine tests in ice-cream manufacturer factories. Achieving the results of total microbial count in minimum time is really important for confidence from the hygienic quality of products. So impedance-splitting method as a new technique for this purpose was considered in order to receiving the results in less time and as soon as possible. The main purpose of this study was to evaluate the correlation between impedance detection time (IDT in hrs.) and total microbial population ($\log_{10}$ N) of industrial and traditional ice-cream in order to design the predictive microbial model according to impedance technique. During 6 months, 120 samples (60 samples for industrial and 60 samples for traditional ice-cream) were collected from different areas of Ahvaz. Half of samples in both industrial and traditional ice-creams were Vanilla and the other half were cocoa. Samples examined under sterile conditions. The total microbial count by pour plate technique and impedance-splitting method were carried out based on the recommendations of Iran's Standard Institute and Industrial Investigation. Then the calibration curves of 2 methods and their equations were obtained by using Excel software. The calibration curves of methods were elaborated for total microbial count and impedance detection time, demonstrating a good correlation between the two methods in industrial ice-cream (96.55% and 95.31% for Vanilla or plain and cocoa ice-creams respectively). According to the calibration curves, the correlation between two methods was 89.07% and 87.37% for plain and cocoa traditional ice-creams respectively. In general the correlation between two methods was 94.61% for industrial and 87.92% for traditional ice-cream. Therefore, impedance measurement which is a more rapid, automated and less laborious method than conventional total microbial count technique could be used like some developed countries as an alternative method for the rapid measuring the total microbial loads in foods instead of conventional methods.*

Keywords: *Pour plate count; Impedance-splitting method; Industrial ice-cream; Traditional ice-cream; Plain ice-cream; Cocoa ice-cream*

**Corresponding author: Fazlara, A.*
Address: Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran. Tel: +98 9123091812
Email: a.fazlara@scu.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir