مقاله تحقیقی

استفاده از روش امپدانس جهت برآورد سریع شمارش میکروبی مزوفیل‌ها در سس مایونز

سهیلا فرجی [۱،*]، علی فضل آرا [۲] ، مهناز هاشمی روان [۱]، نسرین فرجی [۱]، دلنیا فرجی [۱]

۱. دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین- پیشوا، دانشکده کشاورزی، گروه علوم صنایع غذایی، ورامین، ایران
۲. دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، اهواز، ایران

***مسؤول مکاتبات:** سهیلا فرجی، کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی، شماره تماس، ۰۹۱۶۳۲۲۱۲۶۷، پست الکترونیکی: Faraji_soh@yahoo.com

محل انجام تحقیق: دانشگاه شهید چمران اهواز، دانشکده دامپزشکی، گروه بهداشت مواد غذایی، صنایع غذایی آذین شوشتر

تاریخ تحویل: ۸۹/۱۱/۱۱ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۲/۱۶

چکیده

سس مایونز، نوعی چاشنی است که از امولسیون‌شدن روغن‌های گیاهی خوراکی (حداقل ۶۶ درصد) در یک فاز مایع شامل سرکه به‌دست می‌آید. استفاده از روش‌های جدیدی که بتوانند ضمن داشتن حساسیت کافی در حداقل زمان، نتایج وضعیت بهداشتی مواد غذایی را ارائه نمایند، از جمله نکات مهم در صنایع غذایی به‌شمار آمد. در این تحقیق، تعداد ۵۰ نمونه سس مایونز در فصل زمستان، تهیه شد و با استفاده از روش‌های امپدانس و استاندارد، مورد ارزیابی میکروبی (شمارش کلی میکروبی) قرار گرفت. با استفاده از نتایج، منحنی‌های انطباق روش‌های مرجع با امپدانس و معادله منحنی‌های مذکور با استفاده از نرم‌افزار Excel به‌دست آمد که انطباق دو روش در شمارش کلی میکروبی سس مایونز در فصل زمستان، ۸۸/۴ درصد بود. هدف اصلی اجرای این طرح، بهره‌گیری از روش جدید همچون تکنیک امپدانس و بررسی میزان تطابق آن با روش مرجع در قالب طراحی یک مدل ریاضی پیشگو بود تا با بهره‌گیری از تکنیک امپدانس، به یک روش دقیق‌تر، مطمئن‌تر و سریع‌تر دست یافت که ارزیابی بار میکروبی نمونه-های مورد آزمایش را در مدت زمان کوتاه‌تری امکان‌پذیر سازد.

واژه‌های کلیدی: امپدانس، سس مایونز، شمارش کلی میکروبی

مقدمه

مایونز، فرآورده غذایی آماده‌ای است که به‌صورت امولسیون دائم روغن در آب بوده و دارای بو و مزه ملایم و رنگ آن کرم تا زرد کمرنگ است. pH آن نباید از ۴/۱ تجاوز نماید (۱).

مخمرها، کپک‌ها و باکتری‌ها قادرند سس‌های سالاد و محصولات مشابه را فاسد کنند. باکتری‌هایی‌که نسبت به اسید مقاوم هستند می‌توانند سس‌ها را فاسد کنند. بنابراین انتظار می‌رود باکتری لاکتوباسیلوس، در سس سالاد گاز تولید کند. گونه-های باسیلوس، نسبت به اسید مقاوم نیستند. (۲).

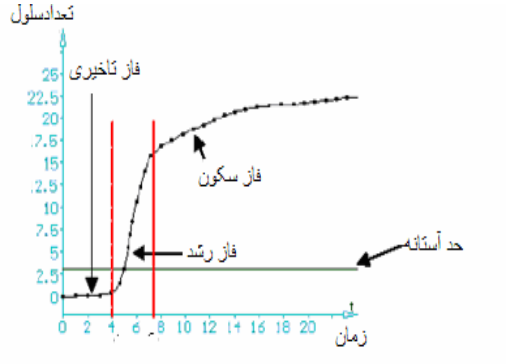
مفهوم اندازه‌گیری امپدانس الکتریکی رشد میکروبی، توسط جی. ان. استوارت در سال ۱۸۹۹ شناخته شده، اما تا سال ۱۹۷۰ از این تئوری برای این هدف استفاده نشده بود (۳).

در این روش، جداسازی سریع میکروب‌ها از طریق نمایش فعالیت‌های متابولیک به‌وسیله ایجاد تغییر در

مقاومت الکتریکی امکان‌پذیر است. سنجش مقاومت الکتریکی اساس ساخت چندین دستگاه از جمله باکتومتر، مالتوسو باک‌ترک است.

اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی، روش نسبتاً سریعی است که جداسازی سریع میکروب‌ها را از طریق نمایش فعالیت‌های متابولیک به‌وسیله ایجاد تغییر در مقاومت الکتریکی، امکان‌پذیر می‌سازد (۴).

طی متابولیسم میکروبی، سوبسترای مغذی که اغلب شامل ترکیبات بزرگ مولکول (پروتئین‌ها، پپتیدها و کربوهیدرات‌ها) است مولکول مصرف شده و منجر به تولید مولکول‌های کوچک‌تر و محصولات فرعی دارای بار الکتریکی می‌شود. این محصولات جدید، حاوی بار الکتریکی هستند و اجزای تشکیل‌دهنده آن‌ها هدایت الکتریکی مواد مغذی مایع را تغییر داده و از میزان مقاومت الکتریکی محیط مغذی می‌کاهند که این کاهش به طریق تکنیکی و با استفاده از دو الکترود در محلول غذایی، قابل اندازه‌گیری است (۵). اگر ولتاژ برق متناوب در الکترودها به‌کار گرفته شود، اختلاف حاصل از کاهش ولتاژ که امپدانس نام‌گذاری شده است، قابل اندازه‌گیری است (۶). طی گذشت زمان، میزان تغییر در ساختار یونی یا بار الکتریکی، در ماده غذایی افزایش یافته یا مثبت می‌گردد و علی‌رغم کاهش سیگنال‌های اندازه‌گیری‌شده که ناشی از کاهش مقاومت الکتریکی است، میزان هدایت الکتریکی که تابع این کاهش است، افزایش می‌یابد که شبیه به منحنی رشد باکتریایی است. این منحنی‌های معمول اندازه‌گیری باک‌ترک را می‌توان به سه بخش اصلی طبقه‌بندی کرد. این بخش‌ها که در نمودار ۱ مشاهده می‌شوند عبارتند از:



نمودار ۱ - منحنی رشد میکروارگانیسم‌ها در دستگاه باک‌ترک.

۱. مرحله مقدماتی یا عادت‌کردن
۲. مرحله رشد لگاریتمی یا صعودی
۳. مرحله ثابت

در طی مرحله مقدماتی، میکروارگانیسم‌ها، خود را با شرایط محیط کشت همسو می‌کنند. در مرحله رشد لگاریتمی یا صعودی، نتایج حاصل از تغییر در وضعیت یون‌ها چندان مشخص نیست. همگام با تکثیر میکروارگانیسم‌ها در مرحله رشد تصاعدی، تعداد میکروارگانیسم‌ها تقریباً به 10^6 تا 10^7 عدد در هر میلی‌لیتر مایع مغذی محیط کشت می‌رسد و کم‌کم منحنی رشد میکروارگانیسم‌ها به انتهای مرحله رشد تصاعدی می‌رسد که خود یک وجه مشخصه است و منحنی به صورت خط مستقیم افقی ادامه می‌یابد. نقطه تغییر جهت منحنی از مرحله آغازی یا فاز تأخیری به مرحله رشد تصاعدی، بهترین بخش جهت اندازه‌گیری در این تکنیک است (۷).

در دو دهۀ اخیر، استفاده از روش امپدانس جهت شناسایی میکروب‌های تاثیرگذار در مواد غذایی و نیز شمارش کلی میکروب در غذاهای مختلف، گسترش فراوانی یافته است. بر این مبنا، استاندارد AFNOR, ISO در اتحادیه اروپا به منظور بهره‌گیری از تکنیک امپدانس به‌عنوان جایگزین مطمئن در آزمون میکروبی مواد غذایی به جای روش‌های قدیمی و مرسوم که وقت‌گیر بودند تدوین شده‌اند. تحقیقات متعددی در زمینه استفاده از روش امپدانس در کنترل کیفیت میکروبی مواد غذایی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

Hardy و همکاران در سال ۱۹۷۷، روش امپدانس را به‌عنوان روش سریع برای تعیین آلودگی میکروبی سبزیجات منجمد بررسی کردند (۸).

Cady در سال ۱۹۷۸، امپدانس را به‌عنوان یک روش متناوب جهت جایگزین روش پلیت کانت برای تسریع بخشیدن به شمارش میکروبی شیر پیشنهاد کرد (۹).

Andrade و همکاران در سال ۱۹۹۸، روش امپدانس را در مقایسه با روش کشت مرجع در پلیت به‌منظور شناسایی انتروکوکوس‌های موجود در سطح

در تماس با مواد غـذایی مـورد اسـتفاده قـرار دادنـد (۱۰).

فضل‌آرا در سال ۱۳۸۳، شمارش کلـی میکروبـی شیر پاستوریزه را بـا اسـتفاده از دو روش امپـدانس و مرجع، مورد بررسی مقایسه‌ای قرار داد (۱۱).

در ارزیابی بار میکروبی، شمارش کلی میکروب‌هـا (مزوفیل‌ها) در سس مایونز، یکی از دستورالعمل‌هـای ضروری و مطابق با استاندارد میکروبـی سـس مـایونز ایران به شماره ۲۹۶۵ است که می بایـست از حـدود اعلام‌شـده در اسـتاندارد مـذکور فراتـر نباشـد و لـذا بررسی محـصولات تولیـدی کارخانجـات در حـداقل زمان و اطمینان از کیفیت محصول قبل از ارسـال آن به بازار مصرف، از جملـه نکـات بـسیار مهـم و حـائز اهمیت است کـه بـا توجـه بـه روش مرسـوم و رایـج مرجع، بسیار وقت‌گیـر بـوده و نیـاز بـه آمـاده‌سـازی وسایل و مواد زیادی دارد. لذا در اجـرای ایـن طـرح، بهره‌گیری از روش‌جدید همچون تکنیک امپـدانس و بررسـی میـزان تطـابق آن بـا روش مرجـع در قالـب طراحی یک مدل ریاضی پیشگو مدنظر واقـع گردیـد تا بدین‌وسیله بتوان با بهره‌گیری از تکنیک امپدانس، به یک روش دقیق‌تر، مطمـئن‌تـر و سـریع‌تـر دسـت یافت که ارزیابی بار میکروبی نمونه‌های مورد آزمایش را در مدت زمان کوتاه‌تری امکان‌پذیر سازد.

مواد و روش‌ها

مواد مصرفی در این پژوهش، سس مایونز، محیط کشت پلیت کانت آگار، پلیت، محیط کـشت 001A ساخت Sylab اتریش (ویژه شمارش کلی)، سـمپلر، دستگاه امپدانس به‌همراه لوازم جانبی مثل انکوباتور و ویال مخصوص امپدانس استفاده شد.

روش‌ها

روش کشت مرجع

ابتدا محیط کشت پلیت کانت آگار استریل آماده گردید و ۱۰ سی‌سی از سس مایونز بـا ۹۰ سـی‌سـی رینگر ترکیب شد. سپس از هر نمونـه سـس مـایونز، رقت ۰/۱ تا ۰/۰۰۰۰۱ تهیه شد و یک سی‌سی از هر رقت، به‌صورت جداگانه به پلیت‌های اسـتریل منتقـل گردید. سپس محیط پلیت کانت آگـار در داخـل هـر پلیت به میزان ۱۵-۱۰ میلی‌لیتر (تا حدودی که کف پلیت از محیط پوشیده شود) ریخته شد. پلیت‌هـا بـه آرامی سفت شد و به حالت جامد درآمد و بعد از چند دقیقه مجدداً حدود ۵ میلی‌لیتر از محیط پلیت کانت آگار به پلیت‌ها افزوده شد، به‌طوری کـه لایـه نـازکی محیط سطح پلیت را پوشاند. پس از سفت‌شدن لایـه دوم، پلیت‌ها به‌صورت واژگون در گرمخانه ۳۷ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ تا ۷۲ سـاعت قـرار داده شـد (۱۲).

پس از ۷۲ ساعت، نمونه‌های کـشت داده‌شـده از انکوباتور خارج گردید و به‌وسیله پرگنه شمار، پرگنه-های تشکیل شده در هر پلیـت بـه‌طـور جداگانـه بـر اساس دستورالعمل شماره ۲۳۲۵ موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، شمارش شد و داده‌های بـه-دست آمده به‌صورت لگاریتم کلنی شمارش شـد، بـه ازای هر گرم ($Log\ cfu.g^{-}$) ارائه گردید. شایان ذکر است تنها پلیت‌هـایی کـه ۳۰۰-۳۰ پرگنـه داشـتند، شمارش شدند و در نهایـت در میـزان عکـس رقـت، ضرب گردید. در این پروژه، از ۵ رقت استفاده شد که هر کدام ۳ بار تکرار شد (۱۳).

روش کشت امپدانس

همزمان با انجام روش مرجع، آزمـایش شـمارش کلی از طریق دستگاه آنالایزر میکروبی سی لب که بر اساس روش امپدانس و اندازه‌گیری مقاومت ظاهری و هدایت الکتریکی بین الکتـرودهـای موجـود در ویـال آزمایشگاهی ویژه دستگاه انجام می‌پذیرد، نیز صورت گرفت. ابتـدا ۹ سـی‌سـی محـیط کـشت 001A در سلول (ویال) ریخته شد و در داخل اتوکلاو در دمـای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد و فشار ۱/۵ اتمـسفر بـه‌مـدت ۱۵ دقیقه استریل گردید. محیط کشت تا دمای ۴۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد. یک سی‌سی از نمونـه سس مایونز در شرایط کاملا استریل، به ویال منتقـل گردید و در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گـراد بـه‌مـدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. آزمایش شـمارش کلـی بـه روش امپدانس به ازای هر نمونه، ۳ بار تکرار شد.

تجهیزات باک‌ترک سری ۴۳۰۰ قابلیـت ثبـت دو نوع امپـدانس خـاص بـا دو انـدازه‌گیـری بـه‌صـورت

جداگانه را دارد. این مقادیر برای امپدانس محیط کشت با علامت M و برای امپدانس الکترود با علامت E نشان داده شده است. اساس اندازه‌گیری امپدانس با بررسی تغییرات نمودار از نقطه شروع تا انتهای مسیر است. یکی از ویژگی‌های روش اندازه‌گیری امپدانس آن است که تمامی نمودارهای حاصل، دارای یک نقطه آغازین مشخص هستند و به‌همین دلیل، متابولیت‌های حاصل، سبب نوسانات مشخص در میزان هدایت الکتریکی اولیه آن‌ها می‌شوند.

تغییر در مقدار M ، بستگی به میزان کاهش امپدانس (مقاومت ظاهری) محیط کشت در مقایسه با نقطه شروع دارد که به صورت درصد بیان می‌شود. مقدار M ، اساس نمایش امپدانس در محیط کشت است و با ساختار یونی محیط رشد و نمونه مورد آزمایش، ارتباط دارد. بنابراین، استفاده از محیط‌های کشت که به خودی خود دارای هدایت الکتریکی بالایی هستند، در این روش میسر نیست، زیرا ثبت تغییر در میزان هدایت الکتریکی آن‌ها به‌سختی امکان‌پذیر است. با بهره‌گیری از یک تکنیک یا روش ویژه در اندازه‌گیری امپدانس به‌صورت متوالی در تجهیزات باک‌ترک، عملا استفاده از محیط‌های کشت که دارای هدایت الکتریکی بالایی هستند، نیز میسر شده است. بنابراین، میزان عملکرد و ویژگی‌های این دستگاه، وسیع‌تر شده است.

در روش جدید، علاوه بر تغییرات امپدانس در محیط کشت (امپدانس M) نوسانات مربوط به تغییرات امپدانس در الکترودها (امپدانس E) نیز ثبت می‌شوند که به‌منظور ثبت امپدانس و تغییرات آن در الکترودها از عملکرد الکتروشیمیایی دو لایه‌ای الکترون‌ها در اطراف الکترودها استفاده می‌شود که بر مبنای میزان این عملکرد الکتروشیمیایی، میزان امپدانس الکترودها معین و ثبت می‌گردد که در واقع در این بخش، تاثیر عملکرد الکتروشیمیایی الکترون‌ها از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است و در واقع، اندازه‌گیری مقدار امپدانس الکترودهای دستگاه، ویژگی منحصر به فرد تکنولوژی باک‌ترک است. در این مطالعه، تغییرات در محیط کشت M-value بررسی گردید.

نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی در کل دوره در روش مرجع و نیز زمان‌های به‌دست آمده توسط دستگاه امپدانس در سیستم نرم‌افزاری ویژه دستگاه که بر اساس Excel طراحی شده است، ثبت گردید. بهترین منحنی ارتباط دو روش با بالاترین (ضریب تعیین) R^2 به‌دست آمد و بر این اساس، فرمول یا معادله منحنی رگرسیون مربوطه که جهت پیشگویی و محاسبه ریاضی تراکم میکروبی بر اساس پارامتر زمان امپدانس است، حاصل شد. نتایج حاصله با استفاده از نرم‌افزار SPSS 16 و بهره‌گیری از آزمون One Sample T Test و نیز آزمون مک-نمار مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت.

نتایج

نتایج آزمایش میکروبی شمارش کلی به روش مرجع

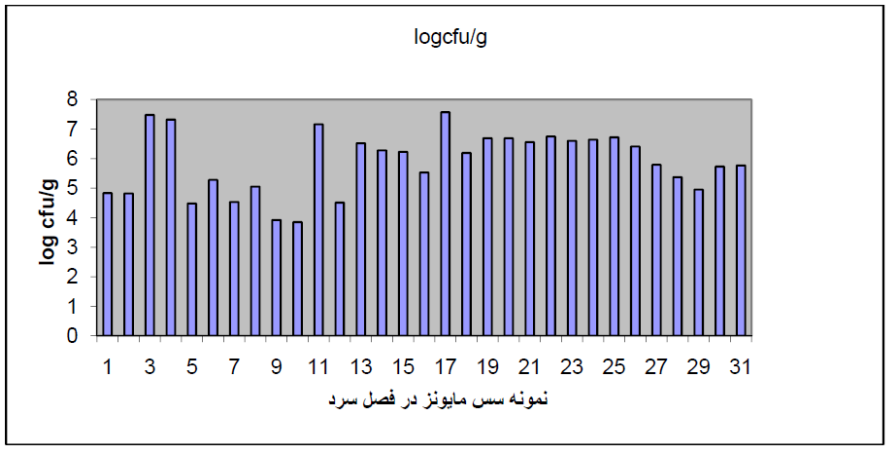
در این تحقیق، بار میکروبی باکتری‌های مزوفیل نمونه‌های سس مایونز در فصل زمستان مورد بررسی قرار گرفت و بر اساس نتایج حاصل از شمارش کلونی‌های رشد کرده در پلیت به تفکیک مقادیر میانگین شمارش کلی باکتری‌ها ناشی از سه تکرار به‌دست آمد و با نتایج حاصل از آزمون به‌روش امپدانس، مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت. حداکثر آلودگی در فصل زمستان به میزان $۳/۷ \times ۱۰^{۷}$ باکتری در هر گرم سس مایونز و حداقل آن $۸/۳ \times ۱۰^{۳}$ باکتری در هر گرم سس مایونز بود به‌ترتیب در نمودار ۲ و جدول ۱ مشاهده می‌گردد.

نتایج آزمایش میکروبی شمارش کلی به‌روش امپدانس

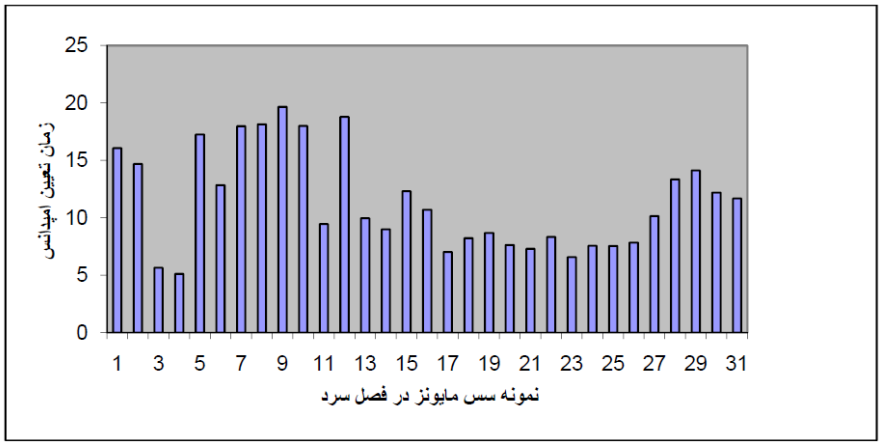
پس از کالیبره‌شدن دستگاه امپدانس و معرفی نمونه‌ها به دستگاه، طی حداکثر مدت زمان ۲۴ ساعت، نتایج حاصل از آزمون میکروبی به‌روش امپدانس برحسب زمان امپدانس (IDT) در سیستم نرم‌افزاری ویژه دستگاه ثبت شد. این نتایج به ترتیب در نمودار ۳ و جدول ۲ مشاهده می‌گردد.

جدول ۱ - میانگین شمارش کلی باکتری نمونه‌های سس مایونز در فصل زمستان.

شماره نمونه سس مایونز	شمارش کلی میکروبی به‌روش مرجع	شماره نمونه سس مایونز	شمارش کلی میکروبی به‌روش مرجع
۱	$۶/۸\times۱۰^{۴}$	۱۷	$۳/۷\times۱۰^{۷}$
۲	$۶/۶\times۱۰^{۴}$	۱۸	$۱/۵۶\times۱۰^{۶}$
۳	۳×۱۰^{۷}	۱۹	$۴/۹\times۱۰^{۶}$
۴	$۲/۱\times۱۰^{۷}$	۲۰	$۴/۹\times۱۰^{۶}$
۵	۳×۱۰^{۴}	۲۱	$۳/۶\times۱۰^{۶}$
۶	$۱/۹\times۱۰^{۵}$	۲۲	$۵/۶\times۱۰^{۶}$
۷	$۳/۴\times۱۰^{۴}$	۲۳	$۳/۹۷\times۱۰^{۶}$
۸	$۱/۱۱\times۱۰^{۵}$	۲۴	$۴/۴\times۱۰^{۶}$
۹	$۸/۳\times۱۰^{۳}$	۲۵	$۵/۲\times۱۰^{۶}$
۱۰	۷×۱۰^{۳}	۲۶	$۲/۶\times۱۰^{۶}$
۱۱	$۱/۴۴\times۱۰^{۷}$	۲۷	$۶/۲\times۱۰^{۵}$
۱۲	$۳/۲\times۱۰^{۴}$	۲۸	$۲/۳۵\times۱۰^{۵}$
۱۳	$۳/۳\times۱۰^{۶}$	۲۹	$۸/۹\times۱۰^{۴}$
۱۴	$۱/۹\times۱۰^{۶}$	۳۰	$۵/۳۵\times۱۰^{۵}$
۱۵	$۱/۷\times۱۰^{۶}$	۳۱	$۵/۹\times۱۰^{۵}$
۱۶	$۳/۴\times۱۰^{۵}$		



نمودار ۲ - نمودار میانگین شمارش میکروبی نمونه سس مایونز در فصل زمستان.



نمودار ۳ - میانگین زمان تعیین امپدانس نمونه سس مایونز در فصل زمستان.

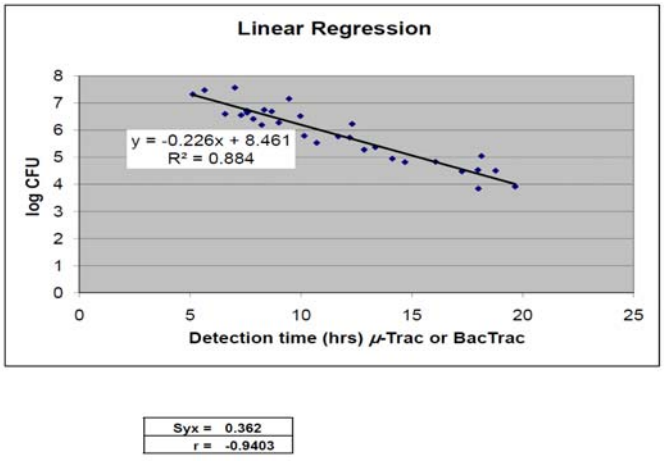
جدول ۲ - میانگین زمان تعیین امپدانس نمونه‌های سس مایونز در فصل زمستان.

شماره نمونه	تعیین زمان امپدانس	شماره نمونه	تعیین زمان امپدانس
۱	۱۶/۰۷	۱۷	۷/۰۲
۲	۱۴/۶۹	۱۸	۸/۲۳
۳	۵/۶۵	۱۹	۸/۶۸
۴	۵/۱۲	۲۰	۷/۶۳
۵	۱۷/۲۶	۲۱	۷/۳
۶	۱۲/۸۵	۲۲	۸/۳۴
۷	۱۷/۹۸	۲۳	۶/۵۸
۸	۱۸/۱۴	۲۴	۷/۵۷
۹	۱۹/۶۶	۲۵	۷/۵۵
۱۰	۱۸	۲۶	۷/۸۵
۱۱	۹/۴۶	۲۷	۱۰/۱۵
۱۲	۱۸/۷۸	۲۸	۱۳/۳۵
۱۳	۹/۹۷	۲۹	۱۴/۱۲
۱۴	۹	۳۰	۱۲/۲
۱۵	۱۲/۳۱	۳۱	۱۱/۶۸
۱۶	۱۰/۷۱		

علاوه بر تعیین معادله خطوط کالیبراسیون یا منحنی کالیبراسیون، پارامترهای مهم ضریب همبستگی (r) و پراکندگی (SYX) برای سنجش کالیبراسیون نشان داده شده است. هر چه تابع r به مقدار ایده‌آل، یعنی یک، نزدیک‌تر باشد (مساوی با بالاترین حد تطابق، یعنی تمام مقادیر روی خطوط) دقت ارتباط بین روش امپدانس و روش مرجع، بیشتر است و همچنین r باید در حیطه ۰/۸۵- تا ۱- باشد. SYX تابع هم باید در نظر گرفته شود. این تابع باید کمتر از ۰/۵ باشد.

میانگین بار میکروبی نمونه‌ها در فصل زمستان ($۱/۶۰۱\times۱۰^{۶}$ cfu. ml^{-1} $\pm$ $۴/۸۱\times۱۰^{۶}$) و میزان انحراف معیار این نمونه‌ها $۸/۹\times۱۰^{۶}$ بود. میانگین بار میکروبی در فصل زمستان، بالاتر از حد مجاز استاندارد برای سس مایونز بود و تجزیه تحلیل آماری، اختلاف معنی‌داری بین بار میکروبی فصل زمستان و مقدار استاندارد ($۱۰^{۳}$ باکتری در هر گرم سس مایونز) حاصل گردید ($P <۰/۰۵$).

منحنی ارتباط زمان‌های به‌دست آمده از دستگاه امپدانس با مقدار بار میکروبی حاصل از روش مرجع با استفاده از آزمون رگرسیون خطی برای فصل زمستان، در نمودار ۴ مشاهده می‌گردد.



نمودار ۴ – منحنی ارتباط زمان‌های به‌دست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار میکروبی مزوفیل‌ها در فصل زمستان.

بدین ترتیب، معادله رگرسیونی باکتری‌ها در فصل زمستان با زمان‌های تعیین‌شده به‌وسیله دستگاه امپدانس باک‌ترک ۴۳۰۰ به شرح ذیل به دست آمد.

$$Y=-O.226x+8.461$$

در مطالعه حاضر، شمارش میکروبی با دو روش امپدانس و مرجع مورد مقایسه قرار گرفت و میزان ارتباط روش امپدانس و مرجع برای فصل سرد، بالا بود. میزان R^2 یا ضریب تعیین معادله فوق مساوی ۰/۸۸۴ بود که بیانگر میزان تطابق دو روش به‌کار برده شده به میزان ۸۸/۴ درصد است. بنابراین، به‌منظور تسریع در حصول نتایج، همواره می‌توان با استفاده از روش امپدانس و به‌دست آوردن زمان لازم جهت شمارش میکروارگانیسم‌ها (x) و قرار دادن مقدار مربوطه در معادله فوق، میزان تراکم میکروبی (y) را در هر گرم از نمونه مورد آزمایش، محاسبه نمود. ضریب همبستگی (r=-۹۴/۰۳) و پراکندگی (SYX=۰/۳۶۲) به دست آمد.

بحث

امروزه از تکنیک اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی یا امپدانس حاصل از انجام متابولیسم میکروبی به‌منظور شمارش، تشخیص و شناسایی میکروب‌های مختلف استفاده می‌شود. از آن‌جایی که در صنایع غذایی به‌لحاظ اقتصادی، تولید سریع و انبوه و برگشت سرمایه از اهمیت زیادی برخوردار است، به موازات آن، کنترل کیفی تولیدات دارای اهمیت بسیاری است. روش امپدانس، حصول نتایج آزمون‌های کنترل کیفی را در مدت زمان کوتاه‌تری مقدور می‌سازد (۱۴).

امپدانس به‌عنوان یک روش سریع و ویژه برای تعیین باکتری‌های بیماری‌زای عامل تعیین میزان مسمومیت‌زایی و عملکرد موثر آن برای تعیین ایمنی و سلامت غذا شناخته شد (۱۵). روش امپدانس اخیرا در فرانسه و آلمان به‌عنوان یک تکنولوژی مناسب برای آزمون میکروبی محصولات غذایی پذیرفته شده و دو استاندارد در این زمینه منتشر گردیده است (۱۶).

در مطالعه انجام‌شده در فصل زمستان روی ۵۰ نمونه سس مایونز، ۳۱ نمونه (۶۲ درصد نمونه‌ها) دارای بار میکروبی بوده که تمامی آن‌ها (۱۰۰ درصد نمونه‌های فصل زمستان) دارای آلودگی بیش از حد مجاز (بیش از 10^3 در هر گرم سس مایونز) تشخیص داده شدند. بر اساس روش امپدانس، حداکثر زمان صرف شده جهت دریافت نتایج، ۱۹/۶۶ و حداقل زمان صرف شده، ۵/۱۲ ساعت بود که در مقایسه با روش استاندارد مرجع (به مدت ۱ تا ۳ روز) از سرعت چشمگیری برخوردار بوده است. حداکثر آلودگی در فصل زمستان، به‌میزان $8/3\times10^7$ باکتری در هر گرم سس مایونز و حداقل آن 7×10^3 باکتری در هر گرم سس مایونز بود. میزان تطابق روش امپدانس با روش استاندارد مرجع در سس مایونز ۸۸/۴ درصد گزارش شده است.

با توجه به این‌که ضریب همبستگی باید بین ۰/۸۵- تا ۱- (به‌عنوان همبستگی قابل قبول بین دو روش) و میزان پراکندگی نقاط syx باید کمتر از ۰/۵ باشد تا فاصله هر نقطه تا خط قابل قبول باشد. در این تحقیق، ضریب همبستگی (r = -۰/۹۴۰۳) و میزان پراکندگی نقاط (syx=۰/۳۶۲)، کمتر از حداقل میزان اعلام‌شده گزارش گردید. پس با توجه به نتایج حاصل از داده‌ها، منحنی حاصله به‌عنوان منحنی استاندارد قابل قبول برای محصول سس مایونز در فصل زمستان در منطقه خوزستان به نظر می‌آید.

تحقیقات مشابهی از نظر مقایسه روش امپدانس با روش مرجع در جستجوی میکروب‌ها در مواد غذایی توسط محققین انجام شده است که از آن جمله می‌توان به تحقیق انجام‌شده توسط فضل‌آرا در سال ۱۳۸۳ روی ۸۵ نمونه شیر پاستوریزه اشاره نمود که در آن، شمارش کلی میکروبی با دو روش امپدانس و مرجع مورد بررسی مقایسه‌ای قرار گرفت و میزان تطابق روش دو روش بر اساس منحنی رگرسیون ۹۵/۰۶ درصد به‌دست آمد. میزان تطابق این دو روش در شیر بالاتر از این دو روش در سس مایونز بوده است. شاید بتوان علت انطباق کمتر دو روش در سس مایونز نسبت به شیر را به استفاده از فرمولاسیون‌های مختلف در تهیه انواع سس مایونز مربوط دانست (۱۷).

همچنین، در بررسی دیگری توسط نوری و همکارانش در سال ۱۳۸۴ که با استفاده از دو روش مرجع و امپدانس نسبت به شمارش انتروکوک‌ها (استرپتوکوک‌های گروه D) در بستنی‌های سنتی غیرپاستوریزه مصرفی شهر اهواز انجام گرفت، در این تحقیق نیز در دو فصل گرم و سرد بین دو روش مرجع و امپدانس از نظر آلودگی به انتروکوک اختلاف معنی‌داری وجود داشت. در بررسی آنان، میزان دو روش بر اساس منحنی رگرسیون ۸۷/۸۵ درصد گزارش گردید که از این نظر، مشابه تحقیق حاضر بود و بیانگر تاثیر شرایط آب و هوایی فصل روی تراکم میکروبی محصول است (۱۸).

Batrinou و همکاران در سال ۲۰۰۵، جمعیت میکروبی مخلوط شکلات تلخ را به‌وسیله روش امپدانس تعیین کردند. میزان تطابق روش امپدانس با روش مرجع بر اساس منحنی رگرسیون ۸۹/۸۹ درصد بود. انطباق دو روش، بسیار شبیه به انطباق دو روش در سس مایونز است. روش آزمون و محیط کشت و شرایط آزمون بسیار شبیه به تحقیق حاضر بوده و در ضمن، شکلات تلخ مانند سس مایونز، از ترکیبات متفاوت تشکیل شده است که این امر در جواب آزمون و مشابه‌بودن نتایج، تاثیرگذار بوده است (۱۹).

ابهری سه گنبد در سال ۱۳۸۵، رشد میکروبی در ماهی حلوای سفید نگهداری‌شده در یخ را با روش مرجع و امپدانس و طراحی مدل ریاضی مربوطه بررسی کرد و میزان دو روش را برای باکتری‌های سایکروفیل بر اساس منحنی رگرسیون ۹۲/۴۳ درصد و برای باکتری‌های مزوفیل ۹۱/۱۵ درصد اعلام نمود. میزان انطباق این دو روش به میزان انطباق دو روش در سس مایونز نسبتا نزدیک بوده و دقت انجام آن در دو محصول نیز تقریبا مشابه است که در واقع تطابق بالای بین دو روش در ماهی حلوای سفید، ترکیب نسبتاً ثابت عضلات ماهی بوده است. به عبارت دیگر، مطالعات انجام‌شده حاکی از آن است که هر چه ترکیب یا فرمولاسیون مواد غذایی، ثابت یا یکنواخت‌تر باشد، منحنی‌های کالیبراسیون حاصله بین دو روش از درصد انطباق بالاتری برخوردار خواهد بود (۸).

در تمامی این مطالعات، نتایج حاصل از دو روش مرجع و امپدانس از نظر آماری، اختلاف معنی‌داری نشان ندادند و علل تفاوت‌های جزیی در نتایج دو روش می‌توان به عواملی چون نوع و ترکیبات تشکیل‌دهنده مواد غذایی مختلف، نوع باکتری مورد مطالعه، محیط‌های کشت مصرفی متفاوت، روش‌های مختلف کشت و جداسازی میکروبی، میزان دقت و خطاهای فردی پرسنل آزمایشگاه نسبت داد. در تحقیق حاضر نیز به‌ترتیب تعداد ۵۰ نمونه سس مایونز به روش‌های مرجع و امپدانس مورد بررسی قرار گرفت. ۱۰۰ درصد کل نمونه سس مایونز، آلودگی بالاتر از محدوده استاندارد داشتند. بر اساس آزمون آماری مک‌نمار، اختلاف معنی‌داری بین دو روش وجود نداشت ($p>0.05$) و لذا با توجه به این موضوع و از آن‌جایی که روش امپدانس در مدت زمان بسیار کوتاه‌تر و سریع‌تر نسبت به شناسایی باکتری اقدام می‌نماید و می‌تواند تعداد نمونه بیشتری را مورد آزمایش قرار دهد و از سوی دیگر به‌دلیل آن‌که به مواد و آماده‌سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع نیاز ندارد، می‌تواند به‌عنوان روشی کاربردی، آسان و سریع در امر نظارت و کنترل کیفی سس مایونز مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طور کلی، مقادیر ضریب همبستگی در حیطه ۰/۸۵- تا ۱- و نیز ضریب تعیین (R^2) بالاتر از ۰/۷۵ بیانگر میزان تطابق بالای روش مرجع و امپدانس است که در اکثر تحقیقات انجام‌شده در داخل و خارج کشور، مبنای تایید منحنی‌های حاصله و کاربردی‌بودن معادله آن‌ها در صنایع غذایی است. بنابراین، با توجه به نتایج حاصل از تحقیق حاضر که انطباق خوبی بین روش امپدانس و مرجع در شناسایی بار میکروبی مزوفیل سس‌های مایونز ملاحظه شد، معادل ۸۸/۴ درصد برای نمونه‌های فصل زمستان، روش امپدانس می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های قدیمی در تعیین تراکم باکتریایی سس مایونز باشد.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از همکاری معاونت پژوهشی دانشگاه چمران اهواز و معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ورامین- پیشوا و همچنین مدیریت صنایع

غـذایی آذیـن شوشـتر در انجـام مطالعـه حاضـر سپاسگزاری می‌گردد. همچنین از سرکار خانم فدایی که در انجام این پژوهش، همکاری صمیمانه‌ای داشته‌اند، قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

۱. مقصودی، ش.۱۳۸۴. تکنولوژی تولید انواع سس، چاپ اول، انتشارات مرز دانش، تهران، ص ۳۵۹.

۲. ترابی‌زاده، ه. ۱۳۸۱. امولسیون‌های غذایی و امولسیفایر، چاپ اول، انتشارات آییژ تهران، ص ۱۲۵.

۳. فضل‌آرا، ع. ۱۳۸۳. ارزیابی شمارش کلی میکروبی در شیرهای پاستوریزه با استفاده از روش امپدانس و مقایسه آن با نتایج حاصله از روش مرسوم و استاندارد پورپلیت. هفتمین کنگره سراسری میکروب شناسی ایران. دانشگاه علوم پزشکی سمنان. ص ۱۶۶.

۴. بی نام .۱۳۷۱. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام-روش شمارش کلی میکروارگانیسم در ۳۰ درجه سیلسیوس. استاندارد ملی ایران شماره ۵۲۷۲.

۵. بی نام .۱۳۸۶. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران.میکروبیولوژی سس مایونز و سس سالاد- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون. استاندارد ملی ایران شماره ۲۹۶۵.

۶. بی نام .۱۳۸۰. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. آئین کاربرد روش‌های عمومی آزمایش‌های میکروبیولوژی. استاندارد ملی ایران شماره ۲۳۲۵.

۷. نوری، الف. ۱۳۸۴. بررسی و شمارش آنتروکوک‌ها در بستنی‌های غیرپاستوریزه مصرفی در شهر اهواز به‌روش مرجع و تطابق آن با تفکیک امپدانس و طراحی الگوی ریاضی مربوطه، پایان‌نامه دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، ص ۵۰.

۸. ابهری سه گنبد، ح. ۱۳۸۵. رشد میکروبی ماهی حلوای سفید (pampus argemteus) نگهداری‌شده دریخ با روش مرجع و روش امپدانس و طراحی مدل ریاضی مربوطه و ارتباط بار میکروبی با تغییرات TVN، پایان-نامه دکتری عمومی دامپزشکی، دانشگاه چمران اهواز، ص ۵۰.

9. Jay, J. M., 1996. Modern Food Microbiology. 4th ed. Chapman and Hall. London. UK, 421-426.
10. Firstenberg-Eden, R., 1984. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. Food Technology 37: 64-70.
11. Silley, P., Forsthe, S., 1996. Impedance microbiology-a rapid change for microbiologists. Journal of Applied Bacteriology 80: 233-243.
12. Ur, A. Brown, D. F. J., 1974. Rapid detection of bacterial activity using impedance measurements. Biomedical Engineering 8: 18-20.
13. Yang, L., Bashir, R., 2008. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. Biotechnology Advances 26: 135 –150.
14. Hardy, D., Kraeger, S. J., Dufour, S. W. Cady, P., 1977. Rapid detection of microbial contamination in frozen vegetables by automated impedance measurements. Applied and Environmental Microbiology 34: 14-17.
15. Cady, P., 1978. Progress in impedance measurements in microbiology in sharpe. (Eds), Mechnizing microbiology. Journal of Food Protection 13: 199-239.
16. Andrade, N. J., Bridgeman, T. A., Zottola, E. A., 1998. Bactericidal activity of sanitizers against Entercocci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance method. Journal of Food Protection 61: 833-838.
17. Fazlara, A., Rasekh, A., Khataminia, A., 2007. Comparative survey on hygienic quality (Coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) of industrial butter with using standard methods and impedance-splitting Method. 1st Irania Congress of Clinical Microbiology Shiraz-Iran, 42.
18. Anon, A., 1989. House of common session 1988-1989. Agricultural committee. First report–salmonella ineggs, vol.2. Inutes of evidence and appendices, londo , Her Majesty s stationary office.
19. Batrinou, A. M., Katsogiannos, E. N., Spiliotis, V. K., 2005. Estimation of microbial population of bitter chocolate mix by impedance measurement. Ernahrung/nutrition 29: 260-263.