

مدل سازی ریاضی تراکم میکروبی بر اساس روش امیدانس در فیله گوشت ماکیان و بررسی تطابق آن با مقدار ازت فرار تام (TVN)

علی فضل آرا^{۱*}، مهدی پورمهدی بروجنی^۲، فروغ جافری^۳

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

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

۳- دانش آموخته دکترای دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز

(تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۷ تاریخ پذیرش: ۹۱/۱۰/۲۸)

چکیده

شمارش کلی بار میکروبی نمونه فیله‌های گوشت ماکیان به روش مرسوم پورپلیت و مطابقت نتایج حاصله با استانداردهای موجود از جمله کارهای آزمایشگاهی معمول است. از سوی دیگر سرعت دستیابی به نتایج در اسرع وقت از جمله نکات ویژه و مد نظر به منظور اطمینان از کیفیت محصول می باشد. لذا با تکیه بر این موضوع، بهره گیری از تکنیک امیدانس به عنوان روشی جدید در ارزیابی بار میکروبی فیله‌های گوشت ماکیان مد نظر واقع شد که با صرف وقت کمتر، دستیابی سریع تر به نتایج را میسر می سازد. همچنین در این مطالعه مطابقت نتایج حاصله از روش امیدانس با نتایج بدست آمده از روش مرجع کشت پورپلیت و نیز میزان ازت فرارکل مورد بررسی واقع گردید. در طی این بررسی تعداد ۸۰ نمونه فیله گوشت ماکیان (۴۰ نمونه فصل سرد و ۴۰ نمونه فصل گرم) تهیه شد و با استفاده از روش امیدانس و نیز روش مرجع پورپلیت مورد ارزیابی از نظر شمارش کلی بار میکروبی قرار گرفتند. همچنین مقدار ازت فرار تام اندازه گیری شد. روش پورپلیت، اندازه گیری مقدار ازت فرار تام و روش امیدانس، بر اساس دستورالعمل‌های موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام پذیرفت و سپس با استفاده از نتایج، منحنی‌های مربوط به انطباق سه روش با یکدیگر و معادله منحنی‌های مذکور با استفاده از روش‌های آماری و نرم افزار Excel بدست آمد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، میزان تطابق روش امیدانس با روش مرجع پورپلیت در فصول سرد و گرم و نیز کل داده ها به ترتیب 98.1% ، 97.3% و 97.4% بود. میزان تطابق روش امیدانس با مقدار ازت فرار تام در فصول سرد و گرم و نیز کل داده ها به ترتیب 81.5% ، 85.4% و 82.5% و همچنین میزان تطابق مقدار بار باکتریایی با مقدار ازت فرار تام به همان ترتیب معادل 83.2% ، 86.8% و 84.4% حاصل گردید. بنابر نتایج موجود، به لحاظ اهمیت حصول هر چه سریع تر نتایج در آزمون‌های کنترل کیفیت غذایی، بهره‌گیری از تکنیک های جدیدی همچون روش امیدانس در صنایع غذایی به عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم قدیمی می تواند مورد استفاده باشد.

کلید واژگان: گوشت ماکیان، روش امیدانس، روش پورپلیت، شمارش کلی بار میکروبی، مقدار ازت فرار تام

* مسئول مکاتبات: a.fazlara@scu.ac.ir

۱- مقدمه

گوشت طیور به علت بالا بودن درصد پروتئین نسبت به سایر گوشت ها، کم بودن افت پس از کشتار، قابلیت هضم بالا، سرعت رشد طیور و پایین بودن قیمت گوشت مرغ نسبت به سایر گوشت ها از اهمیت ویژه ای برخوردار است، از طرفی تولید پروتئین با پرورش طیور ساده تر، آسان تر و امکان پذیرتر از سایر دام هاست. به همین دلایل گوشت طیور، به عنوان یک منبع غذایی حاوی پروتئین به طور وسیعی در تغذیه انسان در تمامی دنیا مورد استفاده قرار گرفته است. [۱]

پس از کشتار طیور مجموعه تغییرات شیمیایی، فیزیکی و میکروبی در لاشه و گوشت آغاز می شود که در اثر این تغییرات، کاهش قابل توجهی در اختصاصات کیفی محصول ایجاد می گردد. روش های ارزیابی کیفیت محصول نیز عمدتاً بر پایه تعیین میزان پیشرفت همین تغییرات طراحی شده اند. از جمله این تغییرات به فاکتورهای تراکم میکروبی و نیز مقدار ازت فرار تام^۱ (TVN) به عنوان فاکتور شیمیایی می توان اشاره نمود.

در دو دهه اخیر استفاده از روش میزان مقاومت الکتریکی یا امپدانس جهت شناسایی میکروب های حائز اهمیت در مواد غذایی و نیز شمارش کلی میکروب ها در غذاهای مختلف گسترش فراوانی یافته است. در این روش، تشخیص سریع وجود باکتری ها از طریق نمایش فعالیت های متابولیک به وسیله ایجاد تغییر در مقاومت الکتریکی در محیط کشت امکان پذیر می باشد [۲]. در ایران نیز برای اولین بار در سال ۱۳۸۲ این تکنولوژی به کار گرفته شد و پس از آن استانداردهای مربوط به آیین کار شمارش کلی میکروبی با روش امپدانس و نیز جستجوی سالمونلا در مواد غذایی با روش امپدانس به شماره های ۷۷۲۶ و ۷۷۲۷ در سال ۱۳۸۴ در مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی به تصویب رسید [۳ و ۴].

بنابراین با توجه به آن که شیوه رایج و متداول ارزیابی کیفیت گوشت ها از جمله فیله گوشت ماکیان، سنجش تراکم میکروبی با استفاده از روش مرسوم یا مرجع شمارش کلی میکروبی در گوشت می باشد که کاری وقت گیر و نیازمند آماده سازی های مقدماتی زیادی است، در این مطالعه سعی بر طراحی مدل ریاضی تراکم میکروبی مذکور براساس میزان

مقاومت الکتریکی یا امپدانس می باشد تا بدینوسیله بتوان به سهولت و در حداقل زمان، تعداد بیشتری از نمونه ها را از نظر کیفیت میکروبی مورد ارزیابی قرار داد. همچنین در این مطالعه ارزیابی میزان تطابق روش امپدانس با تغییرات ازت فرار تام که از جمله فاکتورهای تعیین کننده در کنترل کیفیت شیمیایی گوشت می باشد، نیز مدنظر واقع گردیده است.

۲- مواد و روش کار

با توجه به شرایط خاص اقلیمی جنوب ایران و بخصوص منطقه خوزستان که عمده شرایط آب و هوایی در طول سال به دو فاز زمانی شامل فصل گرم (اول اردیبهشت ماه تا آخر مهرماه) و فصل سرد (اول آبان ماه تا آخر فروردین ماه) تقسیم بندی می گردد، به منظور اجرای این تحقیق در طی دو فصل مذکور، تعداد ۸۰ نمونه فیله گوشت ماکیان از سطح شهر اهواز تهیه گردید. به این نحو که در هر فصل تعداد ۴۰ نمونه اخذ شد. سپس نمونه ها در شرایط سرما و در کنار یخ سریعاً به آزمایشگاه مواد غذایی منتقل شد و اولین سری آزمایش ها (شامل شمارش کلی میکروبی، اندازه گیری ازت فرار تام و نیز تغییرات امپدانس) حداکثر در طی مدت ۲۴ ساعت انجام گرفت. همانطور که بیان شد، هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی میزان تطابق روش مرجع شمارش کلی میکروبی و مقدار ازت فرار تام با میزان مقاومت الکتریکی یا امپدانس و نهایتاً ترسیم منحنی ها و به دست آوردن معادلات رگرسیونی مربوطه بود. به نحوی که معادلات حاصل برای ارزیابی کیفیت فیله های تازه گوشت ماکیان تا مرحله فساد قابل استفاده و کاربرد باشند. لذا در مطالعه حاضر علاوه بر فیله گوشت های تازه ماکیان، نیاز به استفاده از فیله های مانده و دارای بار میکروبی بالا نیز بود. بنابراین همچون روش مرسوم نگهداری گوشت های تازه، نسبت به نگهداری نمونه ها در دمای یخچالی اقدام گردید تا بدینوسیله با گذشت زمان به تدریج تراکم میکروبی در نمونه ها افزایش یافت و سپس مجدداً نسبت به انجام آزمایش های فوق الذکر به صورت تاخیری بر روی نمونه ها تا مرحله بروز علائم ظاهری و ارگانولپتیک فساد اقدام و نتایج حاصله ثبت گردید.

1. Total volatile nitrogen

۲-۱- کشت به روش مرجع

پس از تهیه سریال رقت‌های ده‌تایی از نمونه‌ها، کشت به روش پورپلیت با استفاده از محیط کشت آگار میکروبی در پلیت^۱ انجام شد. پس از گذشت زمان لازم برای نگهداری پلیت‌ها در انکوباتور (۴۸ ساعت)، پلیت‌ها از انکوباتور خارج شده و پلیت‌هایی که بین ۳۰ تا ۳۰۰ کلنی داشتند انتخاب و تعداد کلنی‌های آنها شمارش می‌شد. سپس برای هر نمونه، به منظور گزارش تراکم میکروبی، تعداد کلنی‌های شمارش شده در پلیت، در ضریب و نسبت معکوس رقت مربوطه ضرب شده و نتیجه نهایی که بار میکروبی موجود در یک گرم (cfu/gr) نمونه گوشت ماکیان بود، حاصل می‌گردد [۵، ۶ و ۷].

۲-۲- کشت به روش امیدانس

به منظور جلوگیری از شوک سرمایی، ۱۵ دقیقه قبل از انجام کشت، لوله‌های حاوی محیط براث مخصوص روش امیدانس^۲ را که قبلاً آماده و استریل شده بودند از یخچال بیرون آورده می‌شد تا با محیط هم دما شوند. سپس با یک میلی لیتر یا ۱۰۰۰ میکرولیتر از رقت^۱ ۱۰- نمونه که به طور همزمان کشت در پلیت آن نیز انجام داده می‌شد، تلقیح گشته و درون انکوباتور دستگاه آنالایزر میکروبی باک تراک^۳ ۴۳۰۰ قرار داده می‌شد و مشخصات لوله شامل نوع و شماره نمونه وارد نرم افزار دستگاه می‌شد و پروتوکل مربوط به ارزیابی شمارش کلی میکروبی در ۳۰ درجه سانتی گراد با استفاده از تغییرات امیدانس یا مقاومت الکتریکی در محیط کشت (Media Value or M-Value) با مدت زمان گرم شدن اولیه یک ساعت^۴ و حد آستانه^۵ معادل ۵ درصد و فواصل زمانی اندازه گیری امیدانس معادل هر ۱۰ دقیقه برای طول مدت زمان حداکثر ۲۴ ساعت کارکرد دستگاه تنظیم می‌گردد و نتایج حاصله از اندازه گیری میزان تغییرات امیدانس و به تبع آن

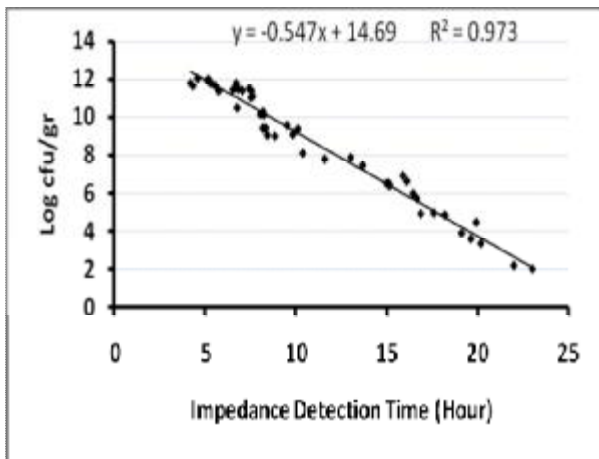
1. Plate Count Agar
2. Bimedia 001A
3. Bactrac 4300
4. Warm Up Time
5. Threshold

هدایت الکتریکی در نرم افزار دستگاه آنالایزر میکروبی باک تراک ۴۳۰۰ ثبت می‌گردد [۳].
نتایج حاصل از شمارش کلی میکروبی به روش مرجع و نیز مدت زمان به دست آمده جهت ارزیابی بار میکروبی برحسب ساعت توسط دستگاه امیدانس در سیستم نرم افزاری ویژه دستگاه آنالایزر میکروبی باک تراک ۴۳۰۰ که بر اساس Excel طراحی شده است، ثبت می‌گردد و منحنی ارتباط دو روش با بالاترین ضریب تعیین (R^2) به دست آمده و بر این اساس فرمول یا معادله منحنی رگرسیون مربوطه که جهت پیشگویی و محاسبه ریاضی تراکم میکروبی بر اساس پارامتر زمان امیدانس می‌باشد، حاصل می‌شد.

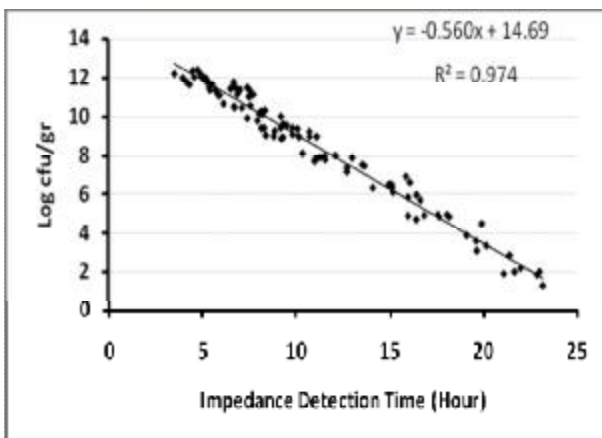
۲-۳- اندازه گیری ازت فرار تام

برای اندازه گیری ازت فرار تام از دستگاه کلدال اتوماتیک استفاده می‌شد. در ابتدا ۱۰۰ گرم از فیله گوشت ماکیان برداشته و در داخل هاون چینی کاملاً هموژن و یکنواخت می‌گردید. سپس ۱۰ گرم از فیله گوشت ماکیان هموژن شده توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۱، وزن می‌گردد و همراه با مقدار ۱/۵ گرم اکسید منیزیم به بالن هضم کلدال وارد و بعد از آن ۶۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه می‌گردد. یک ارلن که با آب مقطر شسته شده بود، به عنوان ظرف گیرنده در زیر قسمت مبرد یا سرد کننده دستگاه تقطیر قرار می‌گرفت و به آن ۱۰ قطره معرف متیل‌رد ۰/۱ درصد اضافه می‌شد. پس از آن دستگاه روشن گشته، محلول اسید بوریک ۲ درصد به طور اتوماتیک به میزان ۴۰ میلی لیتر توسط دستگاه به ارلن گیرنده اضافه می‌شد. پس از روشن شدن دستگاه، عمل جوش و تقطیر با توان گرمایی p:500 وات حداکثر در مدت زمان ۲۵ دقیقه انجام می‌گرفت و سپس دستگاه خاموش می‌شد. در نهایت محلول تقطیر شده توسط محلول تیترازول اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیترو می‌گردد و بر اساس مقدار اسید مصرفی، مقدار ازت فرار تام بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ گرم فیله گوشت ماکیان محاسبه می‌شد [۸].

نهایتاً نتایج حاصل از فاکتورهای مورد مطالعه (بار میکروبی به روش مرجع، TVN) و نیز مدت زمان ثبت شده جهت ارزیابی



شکل ۲ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (فصل گرم)



شکل ۳ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (کل داده ها)

تحلیل همبستگی با نرم افزار آماری SPSS نشان داد که همبستگی بسیار قوی و معکوسی بین لگاریتم بار میکروبی و میزان امپدانس وجود دارد. و بدینوسیله معادلات رگرسیونی شمارش کلی بار میکروبی فیله های گوشت ماکیان با زمان های تعیین شده به وسیله دستگاه امپدانس باک تراک ۴۳۰۰ به ترتیب در فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها به شرح ذیل بدست آمد:

فصل سرد	$Y = -0.572x + 14.68$
فصل گرم	$Y = -0.547x + 14.69$
کل داده ها	$Y = -0.560X + 14.69$

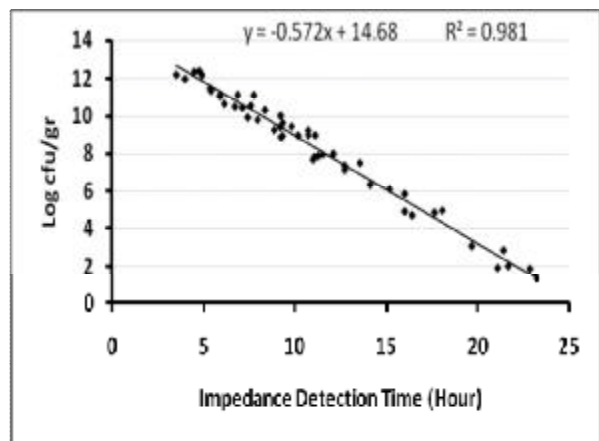
بار میکروبی با روش امپدانس) با استفاده از نرم افزار SPSS مورد بررسی و تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفتند و تحلیل داده های جمع آوری شده با استفاده از رگرسیون خطی، تحلیل همبستگی و محاسبه ضریب همبستگی پیرسن و آزمون t برای دو نمونه مستقل^۱ انجام گرفت. همچنین منحنی های مربوط به رگرسیون یا پراکنش زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با لگاریتم مقادیر بار میکروبی، زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با TVN و نیز لگاریتم بار میکروبی با TVN با استفاده از نرم افزار Excel رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- منحنی های مربوط به ارتباط امپدانس و

شمارش کلی میکروبی به روش مرجع

منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار میکروبی فیله های گوشت ماکیان حاصل از روش مرجع به صورت مجزا در سه منحنی که شامل منحنی های فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها می باشد و با استفاده از آزمون رگرسیون خطی بدست آمده به ترتیب در شکل های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است.



شکل ۱ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (فصل سرد)

1. Independent samples t test

می‌گردد [۱۰]. اسپیلر و همکاران در سال ۲۰۰۶ در آلمان از روش امیدانس و اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی برای ارزیابی تراکم اتروکوک 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 اتروکوکوس 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 اتروکوک‌ها گزارش کردند [۱۱]. گوروسی و همکاران در ایتالیا نیز در سال ۲۰۰۸ تراکم کلی میکروبی در انواع بستنی‌های عرضه شده در شهر بلونا را با استفاده از روش استاندارد مرجع و نیز روش امیدانس ارزیابی نمودند. میزان انطباق دو روش خوب و معادل $R^2 = 0.7794$ گزارش شد. آنان اظهار داشتند که روش امیدانس 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 [۱۲]. لک و همکاران در سال ۱۳۸۴، شمارش کلی میکروبی در ۱۵۰ نمونه بستنی سستی را با دو روش استاندارد پورپلیت و امیدانس بررسی کردند. میزان انطباق دو روش $R^2 = 0.78$ به دست آمد [۱۳]. بررسی مشابه در سال ۱۳۸۳ بر روی شیرهای پاستوریزه، میزان تطابق را $R^2 = 0.9506$ نشان داد [۱۴]. در مطالعه خاتمی‌نیا و همکاران در سال ۲۰۰۸ دو روش استاندارد مرجع و امیدانس را در شناسایی اشریشیا کلی و استافیلوکوکوس اورئوس در کره‌های پاستوریزه مقایسه کردند. میزان انطباق دو روش به ترتیب $R^2 = 0.7966$ و $R^2 = 0.7903$ گزارش شد [۱۵].

والکر و همکاران نیز در سال ۲۰۰۵، با استفاده از تکنیک امیدانس شمارش سریع بیفیدوباکتریوم لاکتیس^۲ (پروبیوتیک) افزوده شده به شیر را بررسی کردند و تغییرات امیدانس محیط کشت یا M-Value در ۴۰ درجه سانتی‌گراد را توسط دستگاه آنالیزر رشد میکروبی باک ترک ۴۱۰۰ ثبت نمودند. در این بررسی میزان انطباق دو روش ۹۸/۷۴ درصد گزارش شده است. و نتایج حاصل از دو روش مرجع و امیدانس از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان ندادند [۱۶]. به همین ترتیب در مطالعه‌ای که گلسمویر و راسل در سال ۲۰۰۱ انجام دادند

مقادیر R^2 یا ضریب تعیین^۱ بدست آمده در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ که به ترتیب معادل ۰/۹۷۳، ۰/۹۷۴ و ۰/۹۷۴ هستند، بیانگر میزان بالای قدرت پیشگویی مقادیر بار میکروبی فیله‌های گوشت ماکیان با بهره‌گیری از تکنیک امیدانس و معادلات رگرسیونی حاصل می‌باشد که به ترتیب معادل ۰/۹۸/۱، ۰/۹۷/۳ و ۰/۹۷/۴ خواهد بود.

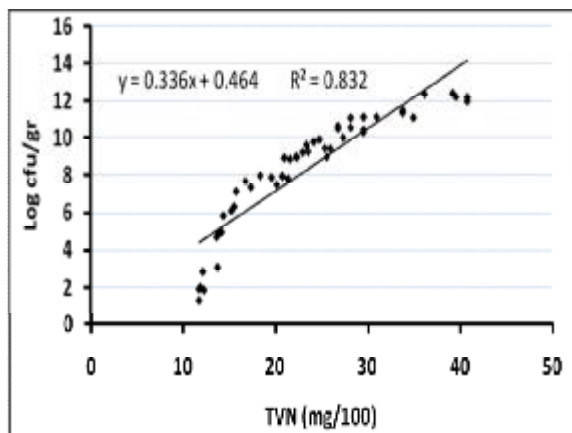
امروزه بهره‌گیری از روش امیدانس با توجه به امکان حصول سریع نتایج، بسیار توسعه یافته است و در موارد مختلفی از این روش استفاده می‌شود. مزیت روش امیدانس، سرعت انجام آن است که بسیار سریع‌تر از روش‌های مرجع میکروبی است. اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی (امیدانس) روش نسبتاً سریعی است که در آن شناسایی سریع میکروب‌ها از طریق نمایش فعالیت‌های متابولیک به وسیله ایجاد تغییر در مقاومت الکتریکی امکان پذیر می‌شود. از سوی دیگر روش مرجع بر اساس شمارش کلی میکروبی می‌باشد که در واقع تعداد ارگانیزم‌های 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 امیدانس و معادله رگرسیونی مربوطه به طور محاسباتی پیشگویی نمود [۹].

در مطالعه حاضر میزان پیشگویی مقادیر بار میکروبی فیله‌های گوشت ماکیان با استفاده از معادلات رگرسیونی حاصل به ترتیب معادل ۰/۹۸/۱، ۰/۹۷/۳ و ۰/۹۷/۴ برای فصل سرد، فصل گرم و کل داده‌ها بود که این موضوع بیانگر کاربردی بودن مناسب روش امیدانس در تعیین بار میکروبی فیله‌های گوشت ماکیان می‌باشد. تحقیقات مشابه دیگر در زمینه استفاده از روش امیدانس در کنترل کیفیت میکروبی مواد غذایی مختلف به انجام رسیده است. در مطالعه آندرد و همکاران در سال ۱۹۹۸، روش امیدانس در مقایسه با روش کشت مرجع در پلیت به منظور شناسایی اتروکوک‌های موجود در سطوح در تماس با مواد غذایی استفاده شد و اعلام گردید که با توجه به انطباق بالای روش مرجع با روش امیدانس ($R^2 = 0.92$)، روش امیدانس به عنوان روش انتخابی و جایگزین روش مرجع برای شناسایی اتروکوک توصیه

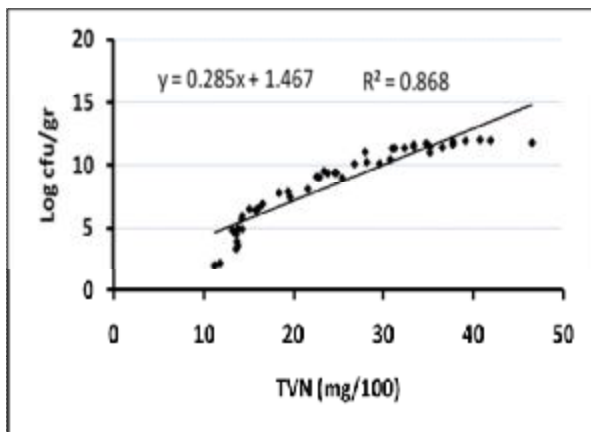
2. *Bifidobacterium lactis*

1. Determination of coefficient

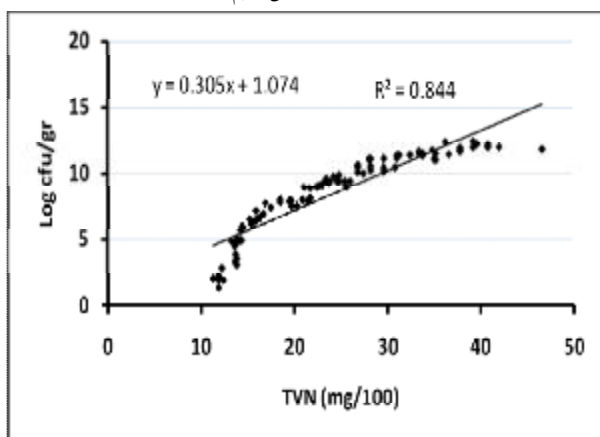
منحنی که شامل منحنی فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها می باشد و با استفاده از آزمون رگرسیون خطی بدست آمده در شکل های ۴ و ۵ و ۶ نشان داده شده است.



شکل ۴ منحنی ارتباط ازت فرار تام با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (فصل سرد)



شکل ۵ منحنی ارتباط ازت فرار تام با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (فصل گرم)



شکل ۶ منحنی ارتباط ازت فرار تام با مقادیر بار میکروبی فیله گوشت ماکیان (کل داده ها)

معادلات رگرسیونی شمارش کلی بار میکروبی فیله های گوشت ماکیان با مقادیر ازت فرار تام به ترتیب در فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها به شرح ذیل بدست آمد:

یک محیط مایع انتخابی حاوی آکریفلاوین و نالیدیکسیک اسید برای ردیابی استافیلوکوکوس اورئوس با روش امیدانس طراحی گردید (SIB)^۱. در این محیط، استافیلوکوکوس اورئوس ظرف حداکثر ۱۶/۴ ساعت در دستگاه امیدانس تشخیص داده می شود. 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 [۱۷]. در تحقیقی دیگر امیدانس به عنوان روشی در تعیین میزان باسیلوس استئاروترموفیلوس^۲ به کار رفته است. بر اساس نتایج حاصله از فلینت و بروکس در سال ۲۰۰۱ با استفاده از باک ترک ۴۰۰۰ ارتباط قابل قبولی بین تعداد باکتری مورد مطالعه و تغییرات امیدانس اندازه گیری شده به دست آمد [۱۸]. گاروو و همکاران در سال ۲۰۰۱ نیز کاربرد امیدانس را برای ارزیابی استارتر کالچر لبنی در شیر سویا بررسی کردند و ارتباط خطی بین شمارش باکتری های استارتر کالچر و زمان تعیین امیدانس با ضریب همبستگی بالا ($r = -0.95$) به دست آمد [۱۹].

نتایج مطالعات فوق همگی حاکی از میزان انطباق خوب روش های مرجع با روش امیدانس است که با نتایج مطالعه حاضر قرابت دارد. علت تفاوت در مقادیر ذکر شده انطباق روش های مرجع و امیدانس، نوع و ترکیبات تشکیل دهنده مواد غذایی مختلف، نوع باکتری مورد مطالعه، محیط های کشت مصرفی متفاوت، روش های مختلف کشت و جداسازی میکروبی، میزان دقت و خطاهای فردی است [۱۲ و ۲۰].

با توجه به این که روش امیدانس در مدت زمان کوتاه تر، تعداد نمونه های بیشتری را می تواند مورد ارزیابی قرار دهد، این تکنیک می تواند جایگزین مناسبی برای روش های قدیمی و وقت گیر باشد و در کنترل کیفیت مواد غذایی در شرایط کنونی که دریافت نتایج در حداقل زمان ممکن و اطمینان از کیفیت محصول تولیدی مد نظر تولیدکنندگان و مراکز نظارتی می باشد، حائز اهمیت است.

۳-۲- منحنی های مربوط به ارتباط ازت فرار

تام و شمارش کلی میکروبی به روش مرجع

همچنین منحنی های مربوط به ارتباط ازت فرار تام با مقادیر بار میکروبی فیله های گوشت ماکیان به صورت مجزا در سه

1. *S. aureus* Impedance Broth
2. *Bacillus stearothermophilus*

می‌تواند به عنوان شاخصی در ارزیابی فساد میکروبی گوشت بوقلمون مطرح باشد [۲۲]. امانی و همکاران در سال ۲۰۱۰ با بررسی اثرات ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های روغنی سیر، آویشن و سبزیجات معطر در گوشت چرخ کرده، گزارش نمودند که این روغن‌ها اثر قابل توجهی در کاهش بار میکروبی و شاخص‌های شیمیایی مانند ازت فرار تام، pH و TBA دارند و فاکتورهای مذکور دارای همبستگی خوبی با هم بوده و تمامی آن‌ها تحت اثر اسانس‌های مورد مطالعه کاهش نشان دادند [۲۳]. سایکورسکی و همکاران در سال ۱۹۹۰ گزارش کردند که معمولاً میزان ازت فرار تام حداکثر معادل ۳۰ میلی گرم درصد به عنوان حد قابل قبول برای ماهی در نظر گرفته می‌شود. آنان اعلام داشتند که میزان ازت فرار تام در طول دوره نگهداری افزایش می‌یابد و با میزان بار میکروبی ارتباط مستقیم دارند [۲۴]. تجادا و هیدوبرو نیز در سال ۲۰۰۲ افزایش میزان ازت فرار تام را به عنوان فاکتور شیمیایی کیفیت ماهی توربوت پرورشی تا روز ۱۴ نگهداری در یخ گزارش نموده، بیان داشتند که ازت فرار تام با زمان نگهداری و نیز آزمایش‌های بار میکروبی مطابقت و ارتباط خوبی دارند [۲۵]. به همین ترتیب ارتباط خوبی بین بار باکتری‌های مولد فساد و ازت فرار تام در ماهی آزاد دریایی^۵ نگهداری شده در یخ توسط هازبر و همکاران در سال ۲۰۰۶ گزارش شده است [۲۶]. همچنین مطالعه انجام شده توسط جوزف و آدنس در سال ۲۰۰۴ بر روی ماهی شبه شوریده، ارتباط قوی بین شمارش بار باکتریایی کل و میزان ازت فرار تام را نشان داد. ($r=0/98$) [۲۷]. مطالعه دیسارافونگ و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی اثر شرایط نگهداری احشاء بر تغییرات شیمیایی و میکروبیولوژیکی در سس ماهی در طول تخمیر، نشان داد که میزان شمارش کلی میکروبی احشاء نگهداری شده در دمای اتاق، معمولاً نسبت به نمونه‌های نگهداری شده در یخ در تمام دوره نگهداری، بیشتر بود و بعد از ۸ ساعت از میزان اولیه $2/9 \log \text{cfu/g}$ به $5/46 \log \text{cfu/g}$ برای نمونه‌های نگهداری شده در یخ و به $5/93 \log \text{cfu/g}$

$$Y=0.336 x+0.464$$

فصل سرد

$$Y=0.285 x+1.467$$

فصل گرم

$$Y=0.305 x+1.074$$

کل داده‌ها

در بررسی‌های آماری با نرم‌افزار SPSS میزان همبستگی بالایی بین بار میکروبی و ازت فرار تام ملاحظه شد. مقادیر ضرایب تعیین به دست آمده در شکل‌های ۴، ۵ و ۶ که به ترتیب معادل ۰/۸۳۲، ۰/۸۶۸ و ۰/۸۴۴ هستند، بیانگر میزان بالای قدرت پیشگویی مقادیر بار میکروبی فیله‌های گوشت ماکیان با استفاده از مقادیر ازت فرار تام و معادلات رگرسیونی حاصل می‌باشد که به ترتیب معادل ۰/۸۳۲، ۰/۸۶۸ و ۰/۸۴۴ خواهد بود.

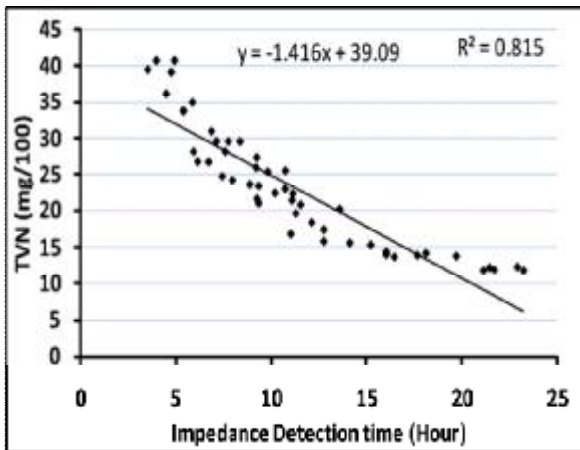
اندازه‌گیری ازت فرار تام یکی از روش‌هایی است که به طور گسترده برای تعیین کیفیت مواد غذایی با منشاء دامی استفاده می‌شود این روش شامل اندازه‌گیری فاکتورهای مثل تری متیل آمین (TMA) که توسط باکتری‌های عامل فساد تولید می‌شوند، دی متیل آمین (DMA) که توسط آنزیم‌های اتولیز کننده در طی دوره نگهداری تولید می‌شوند، آمونیاک (که توسط آمین زدایی اسیدهای آمینه و کاتابولیسیم نوکلئوتیدها ساخته می‌شوند) و سایر ترکیبات نیتروژنی فرار است [۲۱].

مطالعات مختلفی در مورد ارتباط بین ازت فرار تام با مقادیر بار میکروبی انجام شده است و اگرچه این مطالعات عمدتاً در مورد آبزیان مختلف به انجام رسیده است، نتایج آنها حاکی از آن است که در بسیاری موارد این دو فاکتور دارای ارتباط و همبستگی نسبتاً خوبی بوده‌اند که از جمله گزارشاتی که این همبستگی را تصدیق می‌کنند می‌توان به موارد زیر اشاره نمود:

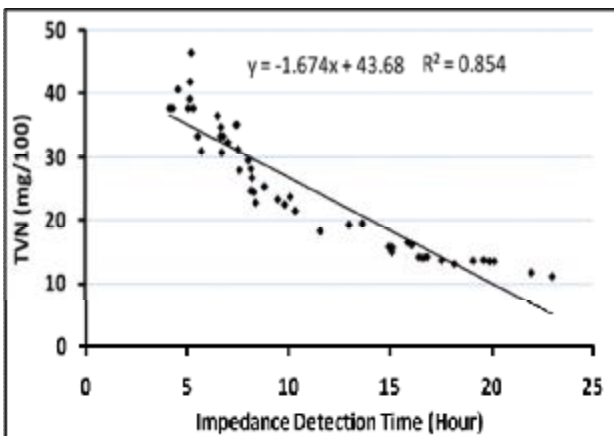
فراکوئزا و همکاران در سال ۲۰۰۷ فساد گوشت بوقلمون بسته‌بندی شده در اتمسفر اصلاح شده (MAP) را از نظر شاخص‌های میکروبی و ارتباط آنها با ازت فرار تام مورد بررسی قرار دادند که بعد از ۱۲ روز، افزایش قابل توجهی در تعداد مزوفیل‌ها، سرمادوست‌های هوازی و همچنین افزایش ازت فرار تام ملاحظه شد. بر اساس نتایج آنان ارتباط معنی داری بین فاکتورهای مورد مطالعه وجود داشت و ازت فرار تام

4. Thiobarbituric acid
5. *Pseudoperca semifaciata*

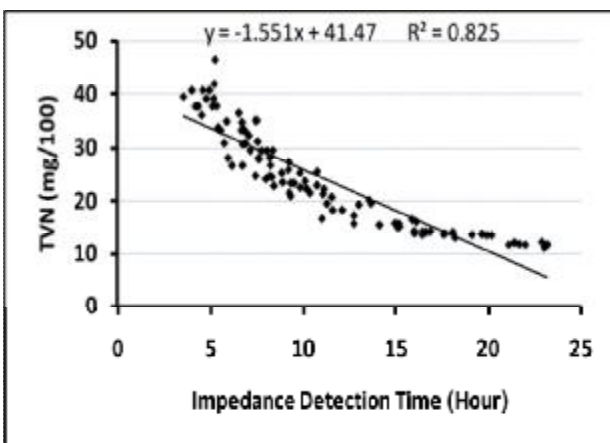
1. Trimethylamine
2. Dimethylamin
3. Modified atmosphere package



شکل ۷ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر ازت فرار تام فیله گوشت ماکیان (فصل سرد)



شکل ۸ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر ازت فرار تام فیله گوشت ماکیان (فصل گرم)



شکل ۹ منحنی ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقادیر ازت فرار تام فیله گوشت ماکیان (کل داده ها)

برای نمونه های نگهداری شده در دمای اتاق رسید. در این مطالعه افزایش در مقادیر ازت فرار کل و تری متیل آمین را همچون گزارش گرم و هاس در سال ۱۹۹۷، به دلیل رشد باکتری های مولد فساد نظیر فتوباکتریوم و باکتری های خانواده ویبریو دانسته و ارتباط معنی داری را بین بار میکروبی و فاکتورهای شیمیایی مورد مطالعه اعلام داشتند [۲۸ و ۲۹]. تمامی این گزارش ها با نتایج حاصله از تحقیق حاضر که حاکی از میزان همبستگی بالای بین بار میکروبی و ازت فرار تام می- باشد، مطابقت دارند.

از سوی دیگر برخی از مطالعات انجام یافته حاکی از آن است که ارتباط معنی داری بین مقادیر ازت فرار تام با بار میکروبی وجود ندارد. در مطالعاتی که توسط حیدری و همکاران در سال ۱۳۸۲ در ماهی سارم و هوور مسقطی [۳۰] و نیز بایکساز نوگوئراس و همکاران در سال ۲۰۰۳ در ماهی ماکرل نگهداری شده در یخ [۳۱] انجام شده است، هیچ گونه ارتباط معنی داری بین مقدار ازت فرار تام با زمان نگهداری و نیز بار باکتریایی کل وجود نداشت که کاملاً برخلاف نتایج گزارش شده توسط سایر محققین ذکر شده در فوق و نیز نتایج حاصله از مطالعه حاضر می باشد. شاید بتوان علت تفاوت در این گزارشات را به فاکتورهایی مانند گونه ماهی، تفاوت در نوع و درصد ترکیبات متشکله گوشت و عضلات نظیر میزان چربی، اندازه ماهی، فصل و منطقه صید، روش نگهداری و نیز نرمال فلور میکروبی آنان مرتبط دانست.

۳-۳-۳ منحنی های مربوط به ارتباط امپدانس و ازت فرار تام

منحنی های مربوط به ارتباط زمان های بدست آمده از دستگاه امپدانس با مقدار ازت فرار تام فیله های گوشت ماکیان به صورت مجزا در سه منحنی که شامل منحنی فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها می باشد و با استفاده از آزمون رگرسیون خطی بدست آمده در شکل های ۷، ۸ و ۹ نشان داده شده است.

۴- نتیجه گیری

بر اساس تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصله با نرم افزار SPSS، اختلاف معنی داری بین فصول سرد و گرم از نظر مقادیر ازت فرار تام، زمان های امپدانس برای شناسایی میکروب ها توسط دستگاه آنالایزر میکروبی و نیز لگاریتم تعداد باکتری در هر گرم از فیله گوشت ماکیان ملاحظه نگردید. شاید بتوان علت این موضوع را رعایت زنجیره سرما و شرایط یکسان و ثابت نگهداری فیله های گوشت ماکیان در فصول سرد و گرم سال دانست. از این رو در مطالعه حاضر با توجه به عدم وجود اختلاف معنی دار فاکتورهای مورد مطالعه بین فصول سرد و گرم سال، به لحاظ کاربردی می توان از منحنی و معادلات بدست آمده در مورد کل داده ها به عنوان مدل های پیشگو ثابت برای ارزیابی نمونه های مورد بررسی در کل سال استفاده نمود و نیازی به استفاده از منحنی و معادلات جداگانه به تفکیک برای فصول سرد و گرم سال نمی باشد و بدینوسیله می توان با اندازه گیری امپدانس و بهره گیری از معادلات رگرسیونی به دست آمده در مطالعه حاضر، نسبت به محاسبه و پیشگویی ریاضی مقادیر بار میکروبی و نیز ازت فرار تام در فیله های گوشت ماکیان در حداقل زمان ممکن اقدام نمود.

۵- سپاسگزاری

این پژوهش در قالب پایان نامه از محل اعتبار پژوهانه سال ۹۰ دانشگاه شهید چمران اهواز انجام شده است که بدین وسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صمیمانه سپاسگزاری می گردد.

۶- منابع

- [1] Ghaemmaghani, S. (2011). Meat Hygiene and Inspection in Slaughter-House, 2nd Edition. Institute of Scientific-Applied Higher Education of Jihad-e-Agriculture Publications, Tehran. pp:2-4, 143-145.
- [2] Razavilar, V. (2008). Pathogenic Microorganisms in Foods and Epidemiology of Food Borne Intoxications. 3rd Edition. Tehran University Publications. pp:46-47.
- [3] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2004). Microbiology of

معادلات رگرسیونی مقادیر ازت فرار تام فیله های گوشت ماکیان با زمان های تعیین شده به وسیله دستگاه امپدانس باک تراک ۴۳۰۰ به ترتیب در فصل سرد، فصل گرم و کل داده ها به شرح ذیل بدست آمد:

$$Y = -1.416x + 39.09 \quad \text{فصل سرد}$$

$$Y = -1.674x + 43.68 \quad \text{فصل گرم}$$

$$Y = -1.551x + 41.47 \quad \text{کل داده ها}$$

در بررسی های آماری میزان همبستگی بالایی بین مقادیر ازت فرار تام و زمان های تعیین شده به روش امپدانس ملاحظه شد. مقادیر ضرایب تعیین به دست آمده در شکل های ۷، ۸ و ۹ که به ترتیب معادل ۰/۸۱۵، ۰/۸۵۴ و ۰/۸۲۵ هستند، بیانگر میزان بالای قدرت پیشگویی مقادیر ازت فرار تام فیله های گوشت ماکیان با بهره گیری از تکنیک امپدانس و معادلات رگرسیونی حاصل می باشد که به ترتیب معادل ۸۱/۵٪، ۸۵/۴٪ و ۸۲/۵٪ خواهد بود.

همان طور که در فوق بیان گردید، تاکنون مطالعات زیادی از نظر بررسی کیفیت مواد غذایی مختلف بوسیله اندازه گیری امپدانس و ازت فرار تام به صورت مجزا از یکدیگر صورت پذیرفته است. در حالی که طی بررسی و جستجوهای انجام شده که ضمن اجرای مطالعه حاضر در منابع موجود و پایگاه های اطلاعات علمی صورت گرفت، هیچ مطالعه ای مبنی بر بررسی این دو فاکتور (اندازه گیری امپدانس و ازت فرار تام) به طور همزمان و ارزیابی میزان همبستگی و مقایسه آنها با هم یافت نگردید. حال آن که در بررسی های آماری که در مطالعه حاضر از نظر تحلیل همبستگی با استفاده از نرم افزار SPSS انجام گرفت، میزان همبستگی بالایی بین امپدانس و ازت فرار تام ملاحظه شد و میزان انطباق مقادیر ازت فرار تام با روش امپدانس به تفکیک در فصول سرد و گرم و نیز کل داده ها به ترتیب معادل ۸۱/۵٪، ۸۵/۴٪ و ۸۲/۵٪ درصد بود. لذا بر اساس نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر می توان اظهار داشت امپدانس به عنوان یک روش جدید و نسبتاً سریع و قابل استناد می تواند با استفاده از مدل های ریاضی طراحی شده مربوطه به طور همزمان علاوه بر ارزیابی و تخمین بار میکروبی، در تعیین میزان ازت فرار تام نیز کاربرد داشته باشد. هر چند که کاربردی شدن این موضوع نیازمند انجام تحقیقات و مطالعات بیشتر می باشد.

- Veterinary Students Congress, Ferdowsi University of Mashhad. p: 269.
- [14] Fazlara, A. (2004). Evaluation of total microbial count in pasteurized milks with using impedance-splitting method and it's comparing with the results of conventional standard pour plate technique. 7th Iranian Microbiology Congress, Semnan University of Medical Sciences. p:166
- [15] Khataminia, A. and Fazlara, A. (2008). Comparative survey on hygienic quality (*Coliforms*, *Esherichia coli* and *Staphylococcus aureus*) of industrial butters with using standard methods and impedance-splitting method. Proceeding of Jubilee World Buiatrics Congress, Budapest. Hungary. pp:272-273.
- [16] Walker, K., Ripandelli, N. and Flint, S. (2005). Rapid enumeration of *Bifidobacterium lactis* in milk Powders using impedance. International Dairy Journal. 15(2): 183-188 .
- [17] Glassmoyer, K.E. and Russell, S.M. (2001). Evaluation of a selective broth for detection of *Staphylococcus aureus* using impedance microbiology, Journal of Food Protection. 64(1): 44-50.
- [18] Flint, S.H. and Brooks, J.D. (2001). Rapid detection of *Bacillus Stearothermophilus* using impedance – splitting method, Journal of Microbiological Methods. 13(1): 205 – 220.
- [19] Garro, M.S., Devaldez, G.F. and Degiori, G.S. (2001). Application of conductimetry for evaluation of lactic starter cultures in soy milk. Journal of Food Science. 67: 1175-1178.
- [20] Domig, K.J., Mayer, H.K. and 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(2-3):147-164.
- [21] Malle, P. and Poumeyrol, M. (1989). A new chemical criterion for the quality of fish: trimethylamine/total volatile basic nitrogen. Journal of Food Protection. 50: 419-423.
- [22] Amany, M. S., Reham, A. and Gehan, S. A. (2010). Studies on antimicrobial and antioxidant efficiency of some essential oil on minced beef. Journal of American Science. 6(12): 691-700.
- [23] Fraqueza, M. and Barreto, A. (2007). Spoilage of light (PSE-like) and dark turkey meat under aerobic or modified atmosphere foodstuffs –Fundamentals for detection and determination of microorganisms in foodstuffs with impedance method, National Standard No: 7726.
- [4] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2004). Microbiology of foodstuffs –Determination of salmonella with impedance method, National Standard No: 7727.
- [5] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 °C, National Standard No: 5272.
- [6] Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guideline of general requirements for examination, National Standard No: 9899.
- [7] Vanderzant, C. and Splittstoesser, D.T. (1992). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd Edition, American Public Health Association. pp:75-95.
- [8] Parvaneh, V. (2007). Quality Control and Chemical Examinations of Foods. 4th Edition. Tehran University Publications. pp:249-251.
- [9] Yang, L. and Bashir, R. (2008). Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of food borne pathogenic bacteria, Biotechnology Advances. 26: 135-150.
- [10] Andrade, N. J., Bridgeman, T. A. and Zottola, E. A. (1998). Bactericidal activity of sanitizers against Enterococci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance method. Journal of Food Protection. 61(7): 833-838.
- [11] Spiller, E., Scholl, A., Alexy, R., Kummerer, K. and Urban GA. (2006). A microsystem for growth inhibition test of *Enterococcus faecalis* based on impedance measurement. Sensors and Actuators B: Chemical. 118(1-2):182-191.
- [12] Grossi, M., Lanzoni, M., Pompei, A., Lazzarini, R., Matteuzzi, D. and Ricco, B. (2008). Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. Biosensors and bioelectronics. 23(11):1616-1623.
- [13] Lak, E. (2005). Evaluation of total microbial count in traditional ice-creams with using impedance technique. 6th Iranian

- [28] Dissaraphong, S., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Kishimura, H. (2006). The influence of storage condition of tuna viscera before fermentation on the changes in fish sauce during fermentation. *Bioresource Technology*. 97: 2032-2040.
- [29] Gram, L. and Huss, H. H. (1997). Microbiological spoilage of fish and fish products, *International Journal of Food Microbiology*. 33: 121-137.
- [30] Heydari, M., Akhondzadeh, A., Rezaie, M. Hoseini, H. and Saffarian, A. R. (2004). Study on capability of some quality control chemical methods in comparison with total psychrotrophic bacterial count in some species of frozen bony fish. *Journal of Veterinary Research*. 59(4): 385-390.
- [31] Baixas-Nogueras, S., Bover-Cid, S., Veciana-Nogues, M.T. and Vidal-Carou, M.C. (2003). Suitability of volatile amines as freshness index for iced mediterranean hake. *Journal of Food Science*. 68(5): 1607-1610.
- package: microbial indicators and their relationship with total volatile basic nitrogen. *British Poultry Science*. 49(1):12-20.
- [24] Sikorski, E., Kolakwska, A. and Burt, J. R. (1990). Post-harvest biochemical and microbial changes. In Z. E. Sidorski (Ed.), *Seafood: Resources, Nutritional Composition and Preservation*. Boca Raton Fla: CRC Press. pp: 53-75.
- [25] Tejada M. and Huidobro A. (2002). Quality of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*) during ice storage related to the slaughter method and gutting. *European Food Research and Technology*. 215: 1-7.
- [26] Hozbor, M.C., Saiz, A.I., Yeannes, M.I. and Fritz, R. (2006). Microbiological change and its correlation with quality indices during aerobic iced storage of sea salmon (*Pseudoperca semifasciata*). *LWT*. 39: 99-104.
- [27] Joseph, O. and Adnes, O. (2004). Storage life of croaker (*Pseudolithus senegalensis*) in ice and ambient temperature. *African Journal of Biomedical Research*. 7: 13-17.

Mathematical modeling of microbial load in poultry meat fillets according to Impedance-Splitting method and evaluation it's correlation with total volatile nitrogen (TVN)

Fazlara, A.^{1*}, Pourmahdi Brojeni, M.², Jaferi, F.³

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

(Received: 90/9/7 Accepted: 91/10/28)

Measuring total microbial count of poultry meat with conventional pour plate method and comparing the results with standard limits is one of the routine tests. 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 a shorter time and as soon as possible. The main purpose of this study, was to evaluate the correlation between impedance detection time (IDT in hrs), total microbial population ($\log_{10} N$) and total volatile nitrogen (TVN) of poultry meat fillets. Totally 80 samples (40 samples in warm season and 40 samples in cold season) were collected and examined under sterile conditions. The total microbial count by pour plate technique and impedance – splitting method, also measuring total volatile nitrogen were carried out based on the recommendations of Iran's Standard Institute and Industrial Investigation. Then the calibration curves of 3 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 cold and warm season and also all of samples equal to 98.1%, 97.3% and 97.4%, respectively. Also according to the calibration curves, the correlation between impedance detection time and total volatile nitrogen in cold and warm season and also all of samples were equal to 81.5%, 85.4% and 82.5% respectively. Also the correlation between total microbial count and total volatile nitrogen in cold and warm season and also all of samples were equal to 83.2%, 86.8% and 84.4%, respectively for poultry meat samples. Therefore, impedance measurement which is a more rapid, automated and less laborious method than conventional technique could be used as an alternative method for the rapid quality evaluation in foods instead of conventional methods.

Keywords: Total microbial count, Impedance – splitting method, Pour plate method, Total volatile nitrogen, Poultry meat.

* Corresponding Author E-Mail Address: a.fazlara@scu.ac.ir