مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹، صفحات ۶۳-۵۳

بررسی آلودگی به انتروکک دربستنی‌های غیرپاستوریزه عرضه شده در اهواز با استفاده از دو روش مرجع و امپدانس و تعیین میزان تطابق آنها

علی فضل آرا [۱] * ، سیاوش مکتبی[۱]، اشرف السادات نوری[۲]

۱) گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز
۲) دامپزشک عمومی
نویسنده رابط: علی فضل آرا، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، صندوق پستی: ۱۴۵ - ۶۱۳۵۵
همراه : ۰۹۱۲۳۰۹۱۸۱۳ **Fazlara2000@yahoo.com**

تاریخ دریافت مقاله: ۸۹/۶/۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۹/۲۵

چکیده:

زمینه و اهداف: انتروکک‌ها در بسیاری از کشورها به‌عنوان میکروارگانیسم شاخص در موادغذایی مطرح هستند. آلودگی زیاد به آنها بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی حاکم بر مراکز تهیه و توزیع مواد غذایی است. هدف این مطالعه تعیین آلودگی بستنی‌های غیر پاستوریزه عرضه شده در اهواز به انتروکک با دو روش مرجع و امپدانس و تعیین میزان تطابق آنها بود.

روش بررسی: ۱۰۰ نمونه بستنی غیر پاستوریزه به‌صورت تصادفی از ۵ منطقه شهر اهواز در دو دوره ۶ ماهه (فصول سرد و گرم) در سال ۱۳۸۸ جمع‌آوری شد. روش استاندارد مرجع مطابق دستورالعمل مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران انجام شد. روش امپدانس براساس ثبت نتایج حاصل از اندازه‌گیری تغییرات مقاومت الکتریکی (Media or M-Value) در محیط مایع اختصاصی انتروکک‌ها هر ده دقیقه یکبار انجام پذیرفت. میزان انطباق و معادله منحنی مذکور با استفاده از نرم‌افزار Excel بدست آمد. داده‌ها با آزمون‌های T و مجذور کای تجزیه و تحلیل شد.

یافته‌ها: با دو روش استاندارد مرجع و امپدانس، به‌ترتیب ۷۵ (۷۵٪) و ۷۹(۷۹٪) نمونه دارای انتروکک بودند. حداکثر و حداقل مدت‌زمان صرف شده جهت دریافت نتایج به‌روش امپدانس به‌ترتیب ۲۲/۸۱ و ۶/۷۲ ساعت بود که در مقایسه با حداقل زمان لازم به‌روش استاندارد مرجع، که ۵ تا ۶ شبانه روز است، از سرعت چشمگیری برخوردار بود. میزان تطابق (Correlation) روش امپدانس با روش مرجع یا استاندارد در بستنی‌های سنتی ۸۷/۸۵٪ بود.

نتیجه گیری: روش امپدانس در مدت‌زمان کوتاه‌تر، تعداد نمونه بیشتری را می‌تواند ارزیابی کند. در کنترل کیفی مواد غذایی دریافت نتایج در حداقل زمان ممکن و اطمینان از کیفیت محصول تولیدی مد نظر تولید کنندگان و مراکز نظارتی است. این روش می‌تواند جایگزین مناسبی برای روش‌های قدیمی و وقت‌گیر باشد.

کلید واژه‌ها: انتروکک، بستنی غیر پاستوریزه، امپدانس، روش مرجع، اهواز

۵۴/ مجله میکرب شناسی پزشکی ایران(سال ۴ شماره ۳، پاییز۱۳۸۹) علی فضل آراو همکاران

مقدمه:

انتروکک‌ها از جمله میکروارگانیسم‌هایی هستند که عمدتاً در روده‌ها یافت می‌شوند. حضور زیاد آنها در مواد غذایی می‌تواند دلیلی بر آلودگی مدفوعی باشد(۱، ۲). جنبه مفید این باکتری‌ها نقش پروبیوتیکی آنهاست و جنبه مضرشان نقش آنها در مسمومیت غذایی است که مورد بحث است. از بین تولیدات شیری، بستنی و پنیر از جمله محصولاتی هستند که به‌صورت دست‌ساز و سنتی به‌طور گسترده توسط اقشار مختلف مردم استفاده می‌شود. طی مطالعات انجام شده، انتروکک‌ها و کلی‌فرم‌ها به‌عنوان دو شاخص مهم بهداشتی مطرح هستند. انتروکک‌ها نسبت به کلی‌فرم‌ها شاخص بهتری در مورد غذاهای یخ زده و منجمد می‌باشند. تراکم بیش از حد مجاز آنها در مواد غذایی بیانگر وضعیت نامطلوب بهداشتی است(۱).

مطالعات متعددی در زمینه آلودگی شیر و فرآورده‌های لبنی با انتروکک‌ها انجام شده است. در بررسی که توسط آلکسیوا در بلغارستان روی ۸۵ نمونه بستنی انجام گرفت، ۸۱ ٪ دارای انتروکک مدفوعی بودند. این آلودگی پس از پاستوریزاسیون، به‌طور ثانویه به‌علت آلودگی تجهیزات و ظروف ایجاد شده بود(۳). در مطالعه گوجو بر روی ۲۷۰ نمونه شیرخام و پاستوریزه اکثر انتروکک‌ها از شیر پاستوریزه و غیرپاستوریزه جداسازی شد. گونه‌های رایج، *انتروکوکوس فاسیوم* و *انتروکوکوس فکالیس* به‌ترتیب به‌میزان ٤٣/٢ و ٢٤/٦ درصد بوده است(٤). آلکسیوا در طی مطالعه‌ای گزارش نمود که ۹۳٪ از نمونه‌های کره مورد بررسی به *انتروکوکوس فکالیس* آلودگی داشتند(۵). همچنین هاگاراس و همکاران (۱۹۹۱) در مصر یازده سویه *انتروکوکوس فکالیس* را از شیر تخمیر شده جدا کردند(٦). در مطالعه دیگر، از ۹۸ نمونه پنیر سفید ٢٢/٤ ٪ حاوی انتروکک نبودند و در ۱۵/۳ ٪ تعداد انتروکک‌ها فراتر از 10^4 cfu درهر گرم پنیر بود(۷). در مطالعه ماسود، از ۵۰ نمونه بستنی ۱۲ درصد حاوی انتروکک بود که نشان داد بستنی‌های عرضه شده شرایط رضایت بخش ندارند (۲).

بررسی و جداسازی انتروکک‌ها به‌عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در سایر مواد غذایی غیر از لبنیات نیز گزارش شده است (۱۲–۸). از آن جمله در طی تحقیقی توسط کلومن و همکاران (۲۰۰۹) در ترکیه با بررسی ۲۰۰ نمونه مختلف غذایی شامل انواع گوشت گاو، ماهی و طیور، همبرگر، پیتزا، ناگت مرغ، استیک گاوی، سالاد و انواع ادویه‌ها در طی یک سال، آلودگی ۵۰ درصدی به انتروکک‌ها گزارش گردید (۱۳). به‌همین ترتیب باربوسا و همکاران (۲۰۱۰) در شمال پرتقال نیز جداسازی ۱۸۲ ایزوله انتروکک از فرآورده‌های گوشتی تخمیری سنتی را گزارش نمودند که بیشترین ایزوله‌ها به‌ترتیب مربوط به *انتروکوکوس فکالیس* و *انتروکوکوس فاسیوم* بودند(١٤). در این مقالات، به‌عدم رعایت صحیح اصول بهداشتی در مراحل مختلف تولید تا عرضه از جمله آلودگی تجهیزات، ظروف و پایین بودن بهداشت فردی پرسنل مرتبط اشاره شده است. محققین دیگر نیز جداسازی انواعی از انتروکک‌ها را از مواد غذایی همچون فرآورده‌های تخمیری سویا (۱۵)، انواعی از فرآورده‌های تخمیری گیاهی (١٦)، محصولات آبزیان و فرآورده‌های دریایی(۱۷) گزارش نموده‌اند.

از نظر اقتصادی در صنایع مختلف، تولید انبوه و برگشت سریع سرمایه از اهمیت زیاد برخوردار است، به موازات آن در صنایع غذایی، کنترل کیفی تولیدات دارای اهمیت بسیاری است. امروزه ابداع روش‌های سریع، حساس و دارای ویژگی (اختصاصیت) زیاد برای شناسایی باکتری‌های بیماریزای مواد غذایی در صدر تحقیقات کنترل کیفیت و سلامتی مواد غذایی می‌باشد. با توجه به این موضوع، بر اساس مبانی انتقال الکترون، از فن امپدانس در زمینه میکرب‌شناسی به‌منظور شناخت و تعیین میزان باکتری‌های بیماریزای مواد غذایی استفاده شده است (۱۸). از آن‌جا که روش امپدانس، در مدت‌زمان بسیار کمتر و سریع‌تر میکروارگانیسم‌ها را شناسایی می‌نماید و همچنین علاوه بر

صرفه جویی در مواد مصرفی و کاهش زمان مورد نیاز شناسایی میکروارگانیسم، می‌تواند تعداد نمونه‌های بیشتری را آزمایش کند، لذا بهره‌گیری از این فن در کنترل کیفیت مواد غذایی مد نظر قرار گرفت. لازم به‌ذکر است که در این روش برخلاف روش مرجع خطاهای فنی در انجام کشت وجود ندارد، نیازی به‌مواد و آماده سازی‌های مرسوم در روش‌های کشت مرجع از جمله تهیه سریال رقت از نمونه‌های غذایی نمی‌باشد. این امر در سرعت عمل انجام آزمایش‌های مربوطه بر روی تعداد زیادی از نمونه‌ها نیز موثر واقع می‌گردد.

در واقع تلفیق اندازه‌گیری امپدانس یا مقاومت ظاهری با عوامل بیولوژی در جهت شناسایی باکتری‌های مختلف، زمینه گسترده تحقیقاتی را در چند ساله اخیر مطرح نموده است (۱۹).

در شهر اهواز به‌دلیل طولانی بودن دوره گرما تقریباً در تمام طول سال بستنی مصرف می‌شود. بنابراین، به‌منظور ارزیابی وضعیت بهداشتی بستنی‌های سنتی شهر اهواز انجام این مطالعه مدنظر قرار گرفت. از آنجایی که علائم استفراغ و اسهال در مسمومیت غذایی با انتروکک‌ها نیز مشاهده می‌شود، اهمیت این مطالعه دو چندان می‌گردد. چون این علائم از جمله علائم ثابت در مسمومیت استافیلوکوکی هستند، لذا ممکن است به‌دلیل شباهت علائم بالینی، مسمومیت ناشی از انتروکک‌ها هم به‌اشتباه مسمومیت استافیلوکوکی قلمداد گردد (۲۰). از سوی دیگر با توجه به‌خطاهای احتمالی در روش دستی و جهت دست‌یابی به‌روشی دقیق‌تر و سریع‌تر، در این مطالعه روش امپدانس (Impedance-splitting method) استفاده شد. بنابراین، **هدف** این مطالعه تعیین آلودگی بستنی‌های غیر پاستوریزه عرضه شده در اهواز به انتروکک با دو روش مرجع و امپدانس و تعیین میزان انطباق آنها بود.

مواد و روش‌ها:

نمونه‌گیری به‌صورت تصادفی ازپنج منطقه (شمال، غرب، شرق، مرکز و جنوب) شهر اهواز در دو دوره ٦ ماهه (فصول سرد و گرم) در سال ۱۳۸۸ انجام شد. تعداد نمونه اخذ شده از هر منطقه ۲۰ عدد بود که در هر فصل ۱۰ نمونه از هر منطقه و در مجموع از پنج منطقه، ۵۰ نمونه در فصل سرد و ۵۰ نمونه در فصل گرم جمع‌آوری شد. پس از انتقال نمونه‌ها در کنار یخ به آزمایشگاه، آزمایش‌ها سریعاً انجام می‌شد.

در روش مرجع پس از تهیه رقت از نمونه بستنی‌ها تا رقت 10^{-6}، برای انجام روش پورپلیت از محیط KF استرپتوکوکوس آگار استفاده شد. گرمخانه‌گذاری در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۷۲ ساعت انجام شد. ظروف پتری طی این مدت هر ٢٤ ساعت بررسی گردید. پرگنه‌های قرمز یا صورتی تیره مشکوک به انتروکک شمارش شدند. جهت اطمینان، به‌صورت تصادفی از پرگنه‌های موجود نمونه‌برداری شده، آزمایش‌های تائیدی انجام گرفت. برای این منظور، حداکثر ۱۰ عدد از پرگنه‌ها در محیط صفرا- اسکولین آزید آگار کشت داده می‌شد. رشد پرگنه‌هایی به‌رنگ خرمایی تا سیاه در دمای ٤٤ درجه سانتی‌گراد و کاتالاز منفی که در رنگ‌آمیزی گرم، به‌شکل کوکسی زنجیره‌ای و گرم مثبت مشاهده می‌شدند، مورد تایید قرار می‌گرفتند. تعداد پرگنه‌های شمارش شده در مرحله قبل با توجه به‌تعداد و درصد پرگنه‌های تائیدی در این مرحله، مورد محاسبه قرار می‌گرفتند(۲۰ و۲۱).

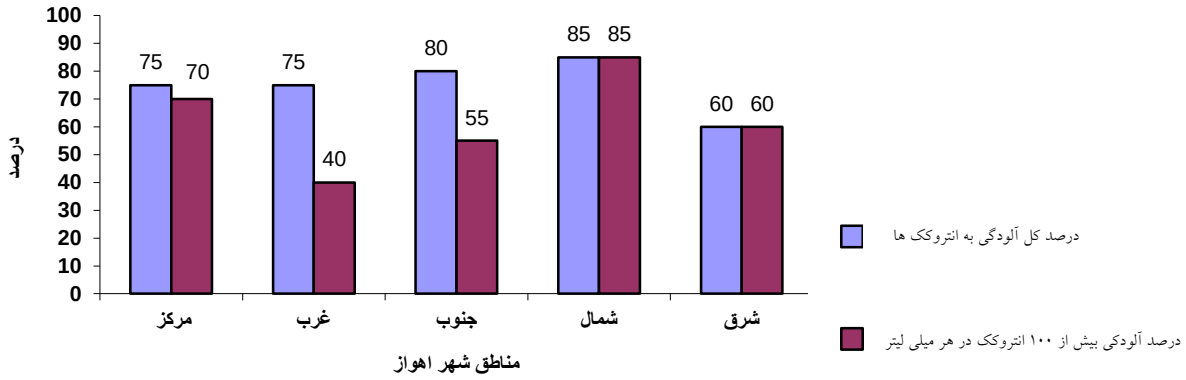
در روش امپدانس به‌تعداد نمونه‌ها، محیط اختصاصی آبگوشت کانامایسین اسکولین آزید استریل شده (SY-Lab) به‌میزان ۹ میلی لیتر به لوله‌های استریل الکترودار مخصوص روش امپدانس اضافه شد. از هر نمونه ذوب شده بستنی، یک میلی لیتر به هر لوله افزوده شد. پس از یکبار تنظیم (کالیبراسیون) گرمخانه‌های دستگاه امپدانس آنالایزر میکربی (Bactrac 4300)، دما بر روی ۳۷ درجه سانتی‌گراد تنظیم می‌شد و لوله‌ها در گرمخانه دستگاه قرار می‌گرفتند. دستگاه با فواصل زمانی ده دقیقه یکبار، به‌کمک الکترودهای موجود در هر لوله، از طریق اندازه‌گیری میزان امپدانس نتایج را ثبت می‌نماید (٢٤-٢٢). قرائت نتایج بر اساس ثبت نتایج اندازه گیری میزان امپدانس محیط کشت (M-Value) در داخل لوله‌های مخصوص روش امپدانس صورت می‌پذیرفت (۲۳، ۲۵). چنانچه نمونه مورد آزمایش حاوی مقادیر زیادی انتروکک باشد، به لحاظ مصرف سریع‌تر ماکرومولکول‌های موجود در محیط کشت و تبدیل آنها به میکرومولکول، سبب کاهش میزان امپدانس یا مقاومت ظاهری و برعکس آن افزایش میزان هدایت الکتریکی درمحیط کشت

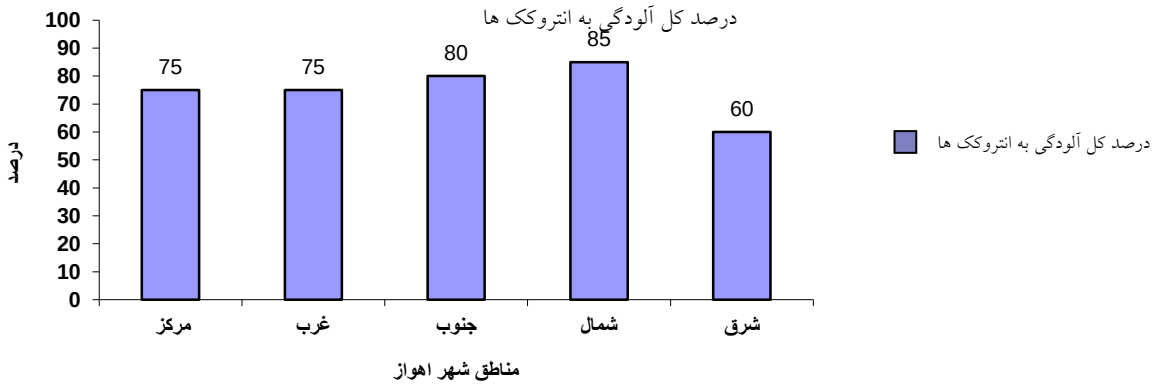
می‌شود. این نوسانات و تغییرات امپدانس به‌صورت یک منحنی ثبت می‌شوند. بنابراین، هرچه میزان آلودگی بیشتر باشد، وقوع تغییر یا نوسان در میزان امپدانس و متعاقب آن هدایت الکتریکی در محیط کشت سریع‌تر یا زودتر صورت می‌گیرد. دستگاه با پایش(مونیتورکردن) لوله‌های حاوی الکترود در طی مدت حداکثر ۲٤ ساعت، با توجه به‌تراکم آلودگی، نسبت به‌اعلام نتیجه مثبت و یا منفی در پایان ۲٤ ساعت اقدام می‌کند. به این نحو که هرچه نمونه آلوده‌تر باشد نتیجه در مدت زمان کوتاهتری مشخص و ثبت می‌شود و هر چه آلودگی کمتر باشد، نتیجه دیرتر حاصل می‌شود. چون دستگاه هر ده دقیقه یک بار نسبت به اندازه‌گیری امپدانس اقدام می‌کند، منحنی رشد و رفتار باکتری در محیط کشت نیز از طریق نرم‌افزار دستگاه درخصوص تک تک نمونه‌ها رسم و ثبت می‌شود. نتایج هر دو روش با استفاده از نرم افزار Excel 2003/PC مقایسه شد و با کمک نرم‌افزار دستگاه امپدانس، که برپایه اکسل است، میزان همبستگی این دو روش بررسی شد. منحنی انطباق و معادله خط منحنی مذکور به‌دست آمد. نهایتاً، نتایج حاصله به‌تفکیک فصل سرد و گرم و مناطق پنجگانه اهواز با بهره‌گیری از نرم‌افزار SPSS 16 پردازش شدند. داده‌ها با آزمون‌های آماری کا- اسکوئر، حداقل اختلافات معنی‌دار، مقایسه بین نسبت‌ها و آزمون T تجزیه وتحلیل شدند.

یافته‌ها:

الف: وضعیت بهداشتی بستنی‌ها

از ۵۰ نمونه در فصل سرد به‌روش مرجع، ۳۹ نمونه (۷۸٪) آلوده به انتروکک بود و آلودگی ۳۰ نمونه (٦۰ ٪) بیش از 10^2 انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی بود. در روش امپدانس ٤۲ نمونه (۸٤ ٪) از نظر انتروکک مثبت بود. از ۵۰ نمونه در فصل گرم به‌روش مرجع ۳٦ نمونه (۷۲ ٪) آلوده بود که آلودگی ۳۲ نمونه (٦٤ ٪) بیش از10^2 انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی بود. در روش امپدانس ۳۷ نمونه (۷٤ ٪) از نظر آلودگی به انتروکک مثبت بود. در مجموع از۱۰۰ نمونه بستنی سنتی در دو فصل سرد و گرم در پنج منطقه اهواز، در روش مرجع ۷۵ نمونه (۷۵ ٪) آلوده بود (نمودار۱). آلودگی ٦۲ نمونه (٦۲٪) بیش از10^2 انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی بود (جدول۱). در روش امپدانس، ۷۹ نمونه (۷۹ ٪) از نظر آلودگی به انتروکوک‌ها مثبت بودند.





نمودار ۱: درصد آلودگی بستنی سنتی به انتروکک در مناطق مختلف شهراهواز به‌روش مرجع

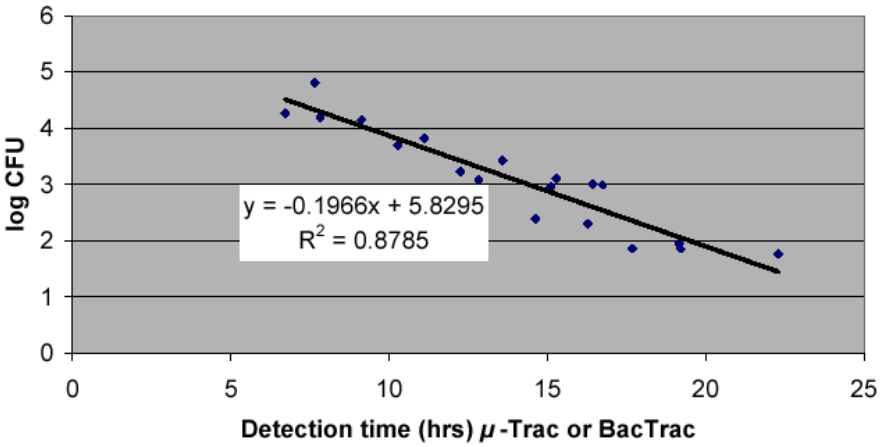
جدول ۱ : توزیع فراوانی آلودگی بستنی سنتی به انتروکک درمناطق مختلف شهر اهواز بهروش مرجع

منطقه	تعداد نمونه‌ها در دو فصل سرد وگرم	تعداد و درصد نمونه‌های آلوده	تعداد و درصد نمونه‌های آلوده با کمتراز 10^2 CFU/ml	تعداد و درصد نمونه‌های آلوده با بیش از 10^2 CFU/ml
مرکز	۲۰	۱۵ (٪۷۵)	۱ (٪۵)	۱٤ (٪۷۰)
غرب	۲۰	۱۵ (٪۷۵)	۷ (٪۳۵)	۸ (٪٤۰)
جنوب	۲۰	۱٦ (٪۸۰)	۵ (٪۲۵)	۱۱ (٪۵۵)
شمال	۲۰	۱۷ (٪۸۵)	۰	۱۷ (٪۸۵)
شرق	۲۰	۱۲ (٪٦۰)	۰	۱۲ (٪٦۰)
جمع	۱۰۰	۷۵ (٪۷۵)	۱۳ (٪۱۷/۳۳)	٦۲ (٪۸۲/٦۷)

در آلودگی نمونه‌های مناطق مختلف شهر اهواز فقط در فصل سرد اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p <$ ۰/۰۵). همچنین با حد مجاز آلودگی (10^2 انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی)، بین مناطق مرکز با غرب و نیز شمال با غرب، جنوب و شرق اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p <$ ۰/۰۵). بین نمونه‌های آلوده با بیش از حد مجاز آلودگی در دو فصل سرد و گرم نیز اختلاف معنی‌داری دیده نشد ($p >$ ۰/۰۵). در مقایسه میانگین تعداد انتروکک در فصل سرد و گرم در کل مناطق، اختلاف معنی‌دار بین مناطق مختلف در دو فصل وجود نداشت ($p >$ ۰/۰۵). مقایسه میانگین تعداد انتروکک بین مناطق مختلف در کل دوره و در فصول سرد و گرم نشان داد که بین مناطق شمال با غرب، مرکز با جنوب، شرق و غرب اختلاف معنی‌دار وجود دارد ($p <$ ۰/۰۵). همچنین در منطقه شمال اختلاف معنی‌داری در میانگین انتروکک بین فصل سرد وگرم دیده شد ($p <$ ۰/۰۵). در مناطق جنوب، غرب، شرق و مرکز اختلاف معنی‌داری بین میانگین تعداد انتروکک در دو فصل دیده نشد ($p >$ ۰/۰۵).

ب: انطباق دو روش مرجع و امپدانس

با روش امپدانس، حداکثر زمان صرف شده جهت دریافت نتایج ۲۲/٦۱ ساعت و حداقل زمان ۷/۲٦ ساعت بود. حداقل زمان لازم به‌روش استاندارد مرجع ٦-۵ شبانه روز بود. آزمون‌های آماری، همبستگی (Correlation coefficient) بالایی را بین دو روش (r=۰/۹۳۷) نشان داد. لذا، بر اساس منحنی رگرسیونی حاصل، میزان R^2 یا ضریب تعیین (Coefficient of determination) روش امپدانس با روش استاندارد مرجع در بستنی‌های سنتی معادل ۰/۸۷۸۵ بود. منحنی انطباق دو روش مرجع و امپدانس در این مطالعه با بهره‌گیری از نرم‌افزار Excel ترسیم و معادله منحنی مربوط حاصل شد (شکل۱).



شکل ۱ : منحنی انطباق دو روش امپدانس و مرجع در بستنی‌های سنتی

$Y = ۰/۱۹۶۶ X + ۵/۸۲۹۵$

Y= تراکم انتروکک (Log cfu/ml)

X= زمان شناسایی در روش امپدانس (Hour)

میزان R^2 یا ضریب تعیین معادله حاصله در مطالعه حاضر، مساوی ۰/۸۷۸۵ بیانگر میزان تطابق دو روش به‌کار برده شده است. به‌عبارت دیگر بر اساس مدت‌زمان صرف شده جهت شناسایی انتروکک در روش امپدانس، می‌توان تراکم انتروکک‌ها را با استفاده از معادله مذکور به‌میزان ۸۷/۸۵ درصد تعیین نمود، که درصد نسبتاً بالایی است. بنا براین، به‌منظور تسریع در حصول نتایج، همواره می‌توان با استفاده از روش امپدانس و به‌دست آوردن زمان لازم جهت شناسایی انتروکک در نمونه‌های بستنی سنتی (X) و قراردادن مقدار مربوطه در معادله فوق الذکر، میزان تراکم انتروکک (Y) را در هرمیلی لیتر از نمونه بستنی مورد آزمایش محاسبه نمود.

بحث:

آلودگی زیاد مواد غذایی به انتروکک می‌تواند بیانگر آلودگی مدفوعی باشد و به‌همین دلیل شمارش انتروکک‌ها در غذا می‌تواند راهنمای خوبی جهت بررسی کیفیت بهداشتی محصولات و شرایط بهداشتی کارخانجات مواد غذایی باشد (۱). با توجه به‌مقاومت برخی گونه‌های انتروکک به‌انجماد و برخی به‌گرما به‌عنوان شاخص بهداشتی در مواد غذایی منجمد، همچنین مواد غذایی فرآوری شده وکنسروی انتروکک‌ها مورد توجه می‌باشند(۲۰). بررسی‌های متعددی در رابطه با آلودگی بستنی به میکروارگانیسم‌های بیماریزای مواد غذایی ازجمله *اشریشیا کلی*، *استافیلو کوکوس*، *سالمونلا* و... انجام شده است (۲ ، ۲۹-۲۶). تورانتاس در سال ۲۰۰۲ نسبت به‌ارزیابی مقایسه‌ای آلودگی به کلیفرم‌های مدفوعی و نیز انتروکک‌ها در بستنی و سبزیجات منجمد اقدام نمود. بر اساس نتایج حاصل، به‌ترتیب ۸۱ و ۷۵ درصد بستنی‌ها و سبزیجات منجمد، آلوده به انتروکک بودند. این در حالی بود که میزان آلودگی محصولات مورد اشاره به کلیفرم مدفوعی به‌ترتیب

٤ و ٢٤ درصد بود. نتایج حاکی از آن بود که هیچگونه ارتباط مستقیمی بین میزان آلودگی به کلیفرم مدفوعی و انتروکک‌ها وجود ندارد. بنابراین، با توجه به‌مقاومت انتروکک در برابر سرما، به‌نظر می‌رسد در محصولات غذایی منجمد، انتروکک به‌عنوان شاخص بهداشتی بهتر مطرح باشد(۳۰).

در مطالعه حاضر، در روش مرجع ۷۵ درصد نمونه‌ها آلوده بودند. این آلودگی در فصول سرد و گرم به‌ترتیب ۳۹ درصد و ۳٦ درصد بود. همچنین به‌ترتیب ٦۰ و ٦٤ درصد نمونه‌های فصول سرد و گرم دارای آلودگی بیش از^{2}۱۰ انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی بود. اگرچه درصد نمونه‌های آلوده در فصل سرد بیشتر از نمونه‌های آلوده در فصل گرم است، اما اختلاف معنی‌دار بین دو فصل دیده نشد($p > ۰/۰۵$). علت آن شرایط تقریباً یکسان نگهداری بستنی در هر دو فصل سرد و گرم در فریزرهای زیر صفر درجه است. یا من و همکاران در سال ۲۰۰٦ در ترکیه، میزان آلودگی بیش از حد مجاز به انتروکک در بستنی‌های سنتی را ٤۷ درصد گزارش کردند. اختلاف معنی‌داری بین دو فصل گرم و سرد اعلام نشد که از این نظر مطابق با نتایج بررسی حاضر می‌باشد. بر این اساس این نوع بستنی را به‌عنوان خطر بالقوه برای بهداشت و سلامت عمومی جامعه به‌خصوص کودکان عنوان نمودند. لذا، بر ضرورت انجام اقدامات کنترلی و نظارت دقیق بر تولید و عرضه سنتی این محصول تاکید کردند(۲٦). در بررسی مشابه، میفرنی و همکاران در سال ۱۹۹۳ وضعیت بهداشتی بستنی‌های مصرفی در شهر یودین ایتالیا را از نظر آلودگی میکربی از جمله به انتروکک بررسی کردند. ٤٦ درصد بستنی‌های مورد مطالعه از نظر بهداشتی قابل مصرف نبودند. در این بررسی بین فصول و ماه‌های مختلف بر خلاف مطالعه حاضر، اختلاف معنی‌دار ملاحظه شد هر چند که تفاوت معنی‌داری بین مناطق مختلف و طعم‌های مختلف بستنی مشاهده نشد(۲۷). در مطالعه مشابه آنورانجینی و همکاران (۲۰۰۸) در منگلور هندوستان نیز هیچ یک از ۹۰ نمونه بستنی سنتی مورد آزمایش‌های میکربی، از جمله *انتروکوکوس فکالیس*، از نظر بهداشتی قابل مصرف نبودند. ضمن آنکه اختلاف معنی‌داری بین مناطق مختلف شهر ملاحظه نشد ولی طعم‌های مختلف بستنی حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار از نظر آلودگی به انتروکک بود ($p <۰/۰۵$). بیشترین آلودگی در بستنی‌ها با طعم توت‌فرنگی گزارش شد(۲۹). حال آن که در مطالعه حاضر، در مقایسه حد مجاز آلودگی به انتروکک در هر میلی‌لیتر بستنی، بین مناطق مختلف اختلاف معنی‌داری ملاحظه شد ($p <۰/۰۵$). شاید بتوان علت این موضوع را تفاوت در رعایت نکات بهداشتی در مناطق مختلف نسبت به‌یکدیگر دانست. زیرا آلودگی انتروککی ناشی از عدم رعایت بهداشت وآلودگی مدفوعی است، که مناطق مختلف شهری نیز با توجه به‌وضعیت اجتماعی، فرهنگی و اقتصادی مختلف از این نظر با یکدیگر تفاوت دارند.

آلکسیوا (۱۹۷۷)، دوبرتین و سی یمز (۱۹۷۵)، آنورانجینی و همکاران(۲۰۰۸) همچون یا من و همکاران (۲۰۰٦)، علت آلودگی به انتروکک در بستنی را عدم رعایت بهداشت در مراحل مختلف تولید و به‌خصوص آلوده شدن مخلوط بستنی پس از پاستوریزه شدن از طریق هوا، حشرات و یا تماس با سطوح و ظروف مورد استفاده در مراکز تهیه بستنی دست‌ساز اعلام می‌کنند. به‌همین دلیل آلودگی به انتروکک را به‌عنوان شاخص یا معیاری در ارزیابی کیفیت بهداشتی بستنی مطرح نمودند(۳ ، ۲٦ ، ۲۸ و۲۹).

با وجود اختلاف در تعداد موارد تشخیص آلودگی به انتروکک با دو روش مرجع و امپدانس، بررسی دو روش در فصول سرد و گرم، اختلاف معنی‌داری بین دو روش ملاحظه نگردید. تطابق دو روش امپدانس و استاندارد مرجع ۸۷/۸۵٪ بود (R^2=۰/۸۷۸۵). در مطالعه آندرد و همکاران در سال ۱۹۹۸، روش امپدانس در مقایسه با روش کشت مرجع در ظرف پتری به‌منظور شناسایی انتروکک‌های موجود در سطوح در تماس با مواد غذایی استفاده شد. اعلام شد با توجه به انطباق بالای روش مرجع با روش امپدانس (R^2=۰/۹۲)، روش امپدانس به‌عنوان روش انتخابی و جایگزین روش مرجع برای شناسایی انتروکک توصیه می گردد(۲۳). اسپیلر و همکاران در سال ۲۰۰٦ در آلمان از روش امپدانس و اندازه‌گیری مقاومت الکتریکی برای ارزیابی تراکم انتروکک 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* به‌محیط کشت مذکور نسبت به‌ردیابی و یا پایش تغییرات هدایت الکتریکی از طریق الکترودهای تعبیه شده در محیط کشت اقدام نمودند. میزان تغییرات مقاومت یا هدایت الکتریکی را به‌صورت معادله ریاضی و تابعی از تراکم باکتریایی انتروکک‌ها گزارش کردند(۳۱). گوروسی و همکاران در ایتالیا نیز در سال ۲۰۰۸ تراکم کلی میکربی در انواع بستنی‌های عرضه شده در شهر بلونا را با استفاده از روش استاندارد مرجع و نیز روش امپدانس ارزیابی نمودند. میزان انطباق دو روش خوب و معادل R^2 =۰/۷۷۹٤ گزارش شد. اظهار داشتند که روش امپدانس به‌عنوان یک روش مطمئن، کاربردی، سریع و آسان در ارزیابی کیفیت بستنی‌های تولیدی کارخانجات مواد غذایی و نیز مراکز نظارتی و کنترلی قابل استفاده است(۲٤). لک و همکاران در سال ۱۳۸٤، شمارش کلی میکربی در۱۵۰ نمونه بستنی سنتی را با دو روش استاندارد پورپلیت و امپدانس بررسی کردند. میزان انطباق دو روش R^2 =۰/۸۰ به‌دست آمد(۳۲). بررسی مشابه در سال ۱۳۸۳ بر روی شیرهای پاستوریزه، میزان تطابق را R^2 =۰/۹۵۰٦ نشان داد (۳۳). در مطالعه خاتمی‌نیا و همکاران (۲۰۰۸) دو روش استانـــدارد مرجـع و امپدانـس را در شناسایی *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* در کره‌های پاستوریزه مقایســه کردند. میزان انطباق دو روش به‌ترتیب R^2 =۰/۸٦٦ و R^2 =۰/۷۹۰۳ گزارش شد(۳٤). 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 میکربی، میزان دقت و خطاهای فردی است (۲٤ و ۳۵).

از روش امپدانس در شناسایی سایر میکروارگانیسم‌های بیماریزای غذایی نیز استفاده شده است. به‌عنوان نمونه، برای ردیابی *استافیلوکوکوس اورئوس* ظرف حداکثر ۱٦/٤ ساعت در فرآورده‌های طیور(۳٦)، تعیین تراکم *باسیلوس استئاروترموفیلوس* به‌کار رفته است(۳۷). از این روش امپدانس در تحقیقات میکرب‌شناسی هم استفاده شده است. از آن جمله ارزیابی اثرات ضدمیکربی عصاره روغنی برخی از گیاهان بر روی باکتری‌های گرم مثبت و منفی را می‌توان نام برد(۳۸). امروزه از روش امپدانس در بسیاری از کشورهای اتحادیه اروپا از جمله آلمان، اتریش، فرانسه، ایتالیا، لهستان و... به منظور انجام سریع‌تر و راحت‌تر کنترل کیفی میکربی مواد غذایی مختلف به‌خصوص در جهت شناسایی پاتوزن‌های غذایی استفاده می‌شود. در این زمینه استانداردهای مربوطه به‌صورت دستورالعمل‌های ISO نیز تدوین شده است. از روش امپدانس به‌ویژه در کنترل کیفی حجم انبوه محصولات و فرآورده‌های تولیدی در کارخانه‌های صنایع غذایی و حتی تصفیه فاضلاب آنها استفاده می‌شود (۳۹-۱۸، ٤۱). در ایران نیز استانداردهای مربوط به‌استفاده از روش امپدانس در میکرب‌شناسی مواد غذایی به‌شماره‌های ۷۷۲٦ و ۷۷۲۷ به‌ترتیب مربوط به‌شمارش میکربی در مواد غذایی و نیز جستجوی سالمونلا مصوب شده است (۲۲و٤۲). هم‌اینک در تعدادی از کارخانجات صنایع غذایی و به‌خصوص شیر و فرآورده‌های لبنی استفاده می‌شود.

نتیجه‌گیری :

استانداردهای ملی موجود در هر جامعه، شاخص‌های بهداشتی آن جامعه هستند. با توجه به‌نتایج حاصل از مطالعه حاضر مبنی برآلودگی زیاد بستنی‌های سنتی شهر اهواز به انتروکک‌ها، سالم بودن بستنی‌های سنتی مورد تردید است. از طرفی در بررسی حاضر میزان آلودگی در بستنی‌های جمع‌آوری شده از نظر کیفیت بهداشتی منطبق بر استانداردهای بهداشتی نمی‌باشد. لذا، جهت ارتقاء سطح کیفی و بهداشتی این ماده غذایی باید نظارت بهداشتی بیشتر و دقیق‌تری بر مراکز تولید و عرضه بستنی سنتی از سوی مراکز و سازمان‌های مسئول صورت پذیرد.

بر اساس نتایج مطالعه حاضر، روش امپدانس از انطباق بالایی با روش مرجع در شناسایی انتروکک‌ها در بستنی سنتی برخوردار است. لذا، به‌عنوان روشی کاربردی، آسان و سریع در امر نظارت و کنترل کیفی بستنی‌های تولیدی و عرضه شده قابل استفاده می‌باشد. در همین راستا انجام مطالعات مشابه بیشتر در داخل کشور در مورد به‌کارگیری روش امپدانس در شناسایی سایر میکروارگانیسم‌های بیماریزای مواد غذایی و نیز تدوین استانداردهای ملی مربوطه (علاوه بر استاندارد های ملی فوق الذکر) پیشنهاد می‌گردد.

تقدیر و تشکر

مطالعه حاضر با اعتبارات پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز انجام گرفته است. بدین‌وسیله ازحوزه معاونت پژوهشی دانشگاه صمیمانه سپاسگزاری می‌نماید.

فهرست مراجع:

1. Hurlbert RE. *Microbiology Laboratory Manual*. 2nd ed. USA; Washington State University. 1998; PP:11-15.
2. Masud T. Microbiological quality and public health significance of ice-cream. *J Med Assoc* 1989; 39(4):102-104.
3. Aleksieva V. Isolation and cold resistance of enterococci in ice cream. *Vet Med Nauki* 1977; 14(6):37-42.
4. Gogov I. Study of enterococci in milk. *Vet Med Nauki* 1975; 12 (8):73-74.
5. Aleksieva V. Find of entrococci in sour cream and butter. *Vet Med Nauki* 1976; 13(2):49-59.
6. Hagaras AE, Fayed EO, Aly AA, El-Samragy YA. Growth characteristics of enterococci isolated from *Laban Rayeb*. *Nahrung* 1991; 35(2):209-213.
7. Aleksieva V. Enterococci and coliform content in white brine cheese. *Vet Med Nauki* 1980; 17(2):85-91.
8. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, DeVuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int J Food Microbiol* 2006; 106(1):1-24.
9. Sabia C, Usern SDN, E. Messi GP, Anacarso I, Manicardi G, Bondi M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *J Appl Microbiol* 2008; 104:970-979.
10. Gogov I. Enterococci studies of uncut raw dried meat products. *Vet Med Nauki* 1981; 18(3):72-76.
11. Gomes BC, Esteves CT, Palazzo ICV, Darini ALC, Felis GE, Sechi LA, *et al*. Prevalence and characterization of Enterococcus spp. isolated from Brazilian foods. *Food Microbiol* 2008; 25(5):668-675.
12. López M, Sáenz Y, Rojo-Bezares B, Martínez S, DelCampo R, Ruiz-Larrea F, *et al*. Detection of vanA and vanB2-containing enterococci from food samples in Spain, including Enterococcus faecium strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int J Food Microbiol* 2009; 133(1-2):172-178.
13. Koluman A, Akan LS, Çakiroğlu FP. Occurrence and antimicrobial resistance of enterococci in retail foods. *Food Control* 2009; 20(3):281-283.
14. Barbosa J, Gibbs PA, Teixeira P. Virulence factors among enterococci isolated from traditional fermented meat products produced in the North of Portugal. *Food Control* 2010; 21(5):651-656.
15. Yoon MY, Kim YJ, Hwang HJ. Properties and safety aspects of Enterococcus faecium strains isolated from Chungkukjang, a fermented soy product. *LWT – Food Sci Technol* 2008; 41(5):925-933.
16. Pérez-Pulido R, Abriouel H, Omar NB, Lucas R, Martínez-Cañamero M, Gálvez A. Safety and potential risks of enterococci isolated from traditional fermented capers. *Food Chem Toxicol* 2006; 44(12):2070-2077.
17. Valenzuela AS, Benomar N, Abriouel H, Cañamero MM, Gálvez A. Isolation and identification of Enterococcus faecium from seafoods: Antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. *Food Microbiol* 2010; 27(7):955-961.

18. Yang L, Bashir R. Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnol Adv* 2008; 26(2): 135–150.
19. Gómez-Sjöberg R, Morisette DT, Bashir R. Impedance microbiology-on-a-chip: microfluidic bioprocessor for rapid detection of bacterial metabolism. *J Microelectromech Syst* 2005; 14(4):829-838.
20. Vanderzant C, Splittstoesser DF. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* 4th ed. USA; American Public Health Association. 2008; PP:613-621, 778-784.
۲۱- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، جستجو، شناسایی و شمارش انتروکک‌های روده‌ای در مواد غذایی ، استاندارد شماره ۲۱۹۸، ۱۳۸۷.
۲۲- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، اصول شناسایی و شمارش میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی با استفاده از روش امپدانس، استاندارد شماره ۷۷۲۶، ۱۳۸۳.
23. Andrade NJ, Bridgeman TA, Zottola EA. Bacteriocidal activity of sanitizers against Enterococci attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. *J Food Prot* 1998; 61(7):833-838.
24. Grossi M, Lanzoni M, Pompei A, Lazzarini R, Matteuzzi D, Ricco B. Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. *Biosens Bioelectron* 2008; 23(11)1616-1623.
25. Wawerla M, Stolle A, Schalch B. Eisgruber H. Impedance microbiology: application in food hygiene. *J Food Prot* 1999; 62(12):1488-1496.
26. Yaman H, Elmali M, Ulukanli Z, Tuzcu M, Genctav K. Microbial quality of ice cream sold openly by retail outlets in Turkey. *Rev Med Vet* 2006; 157(10): 457-462.
27. Maifreni M, Civilini M, Domenis C, Manzano M, DiPrima R, Comi G. Microbiological quality of artisanal ice cream. *Int J Hyg Environ Med* 1993; 194(5-6): 553-570.
28. Dobbertin S, Siems H. Bacteriological quality of commercial ice cream. *Arch Lebensmittelhyg* 1975; 26(3):110-115.
29. Anuranjini C, Geethu S, Dhanashree B. Bacteriological analysis of ice creams from Mangalore, south India. *Indian J Med Res* 2008; 127(1):91-92.
30. Turantas F. Incidence of faecal streptococci as an indicator of sanitation in ice-cream and frozen vegetables. *Int J Food Sci Technol* 2002; 37(3):239-243.
31. Spiller E, Scholl A, Alexy R, Kummerer K, Urban GA. A microsystem for growth inhibition test of *Enterococcus faecalis* based on impedance measurement. *Sens Actuators B Chem* 2006; 118(1-2):182-191.
۳۲- لک، ا. ارزیابی شمارش کلی میکروبی در بستنی‌های سنتی با استفاده از روش امپدانس، *ششمین کنگره دامپزشکی ایران*، دانشگاه فردوسی مشهد ، ۱۳۸٤، ص ۲٦۹.
۳۳- فضل آرا ، ع. ارزیابی شمارش کلی میکروبی در شیرهای پاستوریزه با استفاده از روش امپدانس و مقایسه آن با نتایج حاصله از روش مرسوم واستاندارد پور پلیت، *هفتمین کنگره سراسری میکروب شناسی ایران*، دانشگاه علوم پزشکی سمنان، ۱۳۸۳، ص۱٦٦.
34. Khataminia A, Fazlara A. 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. 2008; PP:272-273.
35. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus spp.* 1. Media for isolation and enumeration. Review Article. *Int J Food Microbiol* 2003; 88(2-3):147-164.
36. Glassmoyer KE, Russell SM. Evaluation of a selective broth for detection of *Staphyiococcus aureus* using impedance microbiology. *J Food Prot* 2001; 64(1):44-50.
37. Flint SH, Brooks JD. Rapid detection of *Bacillus stearothermophilus* using

impedance-splitting. *J Microbiol Methods* 2001; 44(3):205-208.
38. Marino M, Bersani CC, Comi G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. *Int J Food Microbiol* 2001; 67(3):187–195.
39. Ribeiro T, Romestant G, Depoortere J, Pauss A. Development, validation, and applications of a new laboratory-scale indirect impedancemeter for rapid microbial control. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; 63(1):35-41.
40. Lasik M, Nowak J. Electrical impedance for bacterial metabolic activity screening-evaluation of single and mixed bacterial consortia for wastewater biodegradation. *Int Food Res J* 2010; 17:591-599.
41. Obacz A, Kowalik J, Ziajka S. Application of the impedance phenomenon in the microbiology and hygiene of food. *Med Weter* 2008; 64(8):966-968.
۴۲- موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، جستجو و *شناسایی سالمونلا* با استفاده از روش امپدانس، استاندارد شماره ۷۷۲۷، ۱۳۸۳.