

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN BACTERIAL POPULATION AND ASSOCIATED GAS GENERATION IN SOAKING FLOAT OF SHEEP SKIN USING A SENSOR ARRAY SYSTEM

EVALUAREA RELAȚIEI DINTRE POPULAȚIA DE BACTERII ȘI GENERAREA DE GAZE ASOCIATE ÎN FLOTA DE ÎNMUIERE A PIEILOR DE OAI FOLOSIND UN SISTEM DE SENZORI

Ünal KIZIL¹, Ali Nail YAPICI^{2*}, Binnur Meriçli YAPICI³, Sadi Turgut BİLGİ⁴, Melis İNALPULAT¹

¹Agricultural Sensor and Remote Sensing Laboratory, Faculty of Agriculture, Department of Agricultural Structures and Irrigation, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale/Turkey, e-mail: unal@comu.edu.tr, melissacan@comu.edu.tr

²Department of Textile, Clothing, Shoes, and Leather, Çanakkale Vocational School of Technical Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale/Turkey, e-mail: yapicin@comu.edu.tr

³Department of Biology, Faculty of Arts and Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale/Turkey, e-mail: byapici@comu.edu.tr

⁴Department of Midwifery, School of Health, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale/Turkey, e-mail: stbilgi@comu.edu.tr

EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN BACTERIAL POPULATION AND ASSOCIATED GAS GENERATION IN SOAKING FLOAT OF SHEEP SKIN USING A SENSOR ARRAY SYSTEM

ABSTRACT. In this study it was aimed to design a metal oxide gas sensor array to determine the bacterial load in soaking float of wet-salted domestic sheep skin for garment leather production. The results showed that an array of 4 metal oxide gas sensors employed with Artificial Neural Networks (ANNs) can predict the bacterial population in soaking float of leather manufacturing. The relationship between predicted and observed bacterial populations yielded a R^2 value of 0.95 in model testing. Design procedures, gas sensors and other materials and techniques were explained in this paper.

KEY WORDS: leather, bacteria, gas sensors, odor, artificial neural networks

EVALUAREA RELAȚIEI DINTRE POPULAȚIA DE BACTERII ȘI GENERAREA DE GAZE ASOCIATE ÎN FLOTA DE ÎNMUIERE A PIEILOR DE OAI FOLOSIND UN SISTEM DE SENZORI

REZUMAT. Acest studiu a avut ca scop proiectarea unui sistem de senzori de gaz pe bază de oxizi de metal pentru a determina numărul de bacterii în flota de înmuiere a pieilor ovine sărate umede de proveniență domestică pentru producția de piele pentru îmbrăcăminte. Rezultatele au arătat că o serie de 4 senzori de gaz pe bază de oxid de metal utilizați în asociere cu rețele neuronale artificiale (RNA) pot prezice populația bacteriană în flota de înmuiere din procesul de fabricare a pielii. Relația dintre populațiile de bacterii prezise și observate a dat o valoare R^2 de 0,95 la testarea modelului. Procedurile de proiectare, senzorii de gaz și alte materiale și tehnici au fost explicate în această lucrare.

CUVINTE CHEIE: piele, bacterii, senzori de gaz, miros, rețele neuronale artificiale

ÉVALUATION DE LA RELATION ENTRE LA POPULATION BACTÉRIENNE ET LA PRODUCTION DE GAZ ASSOCIÉE DANS LA FLOTTE À TREMPAGE DE LA PEAU DE MOUTON EN UTILISANT UN SYSTÈME DE RÉSEAU DE CAPTEURS

RÉSUMÉ. Cette étude a eu l'objectif de concevoir un système de réseau de capteurs de gaz à base d'oxyde de métal afin de déterminer la charge bactérienne dans la flotte à trempage de la peau de mouton domestique en saumure pour la production de cuir pour vêtements. Les résultats ont montré qu'une suite de 4 capteurs de gaz à base d'oxydes métalliques utilisés avec les réseaux de neurones artificiels (RNA) peut prédire la population bactérienne dans la flotte à trempage du processus de fabrication du cuir. La relation entre les populations bactériennes prédites et observées a donné une valeur R^2 de 0,95 dans le test de modèle. Les procédures de conception, les capteurs de gaz et d'autres matériaux et techniques sont expliquées dans cet article.

MOTS CLÉS: cuir, bactéries, capteurs de gaz, odeur, réseaux de neurones artificiels

INTRODUCTION

Leather industry is one of the agro-based industries which have created new employment

INTRODUCERE

Industria de pielărie este una din industriile bazate pe agricultură care au creat noi locuri de muncă

* Correspondence to: Ali Nail YAPICI, Department of Textile, Clothing, Shoes, and Leather, Çanakkale Vocational School of Technical Sciences, Çanakkale Onsekiz Mart University, 17020, Çanakkale/Turkey, e-mail: yapicin@comu.edu.tr

opportunities in Turkey primarily thanks to about 500 active tanneries [1]. Sheep skin is an organic material mainly used in the production of garment leather products. It is substantially composed of 64% water, 33% protein which is the most abundant resource of collagen protein type I, 2% fat, 0.5% of mineral salts and other substances [2, 3].

It may contain different strains of halophilic cocci and Gram-positive or Gram-negative rods [4]. It was found that most of the bacteria isolated raw hides/skins has proteolytic activity [5, 6]. Pre and main soaking processes provide a chemically and physically suitable environment for bacterial growth. Since the proteolytic microorganisms may damage the skin and cause quality problems [7], microbial activity should be taken under control [8]. In order to prevent damages that may occur during the soaking process, appropriate bactericides are used [9]. If the process cannot be controlled properly it may cause odor problems, hair loss, loose grain [10] or even loss of the collagen which is mainly protein component of the skin.

The by-products of microbial metabolism may be CO_2 , H_2O , acids, aldehydes, alcohols, sulfides, etc. [9]. *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas*, and *Streptomyces* species are isolated and bacteria identified in soaking float of leather manufacturing. They are known as ammonifying bacteria. *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Proteus* species, known as H_2S producing microorganisms, are also available in tannery processing float. Methane (CH_4) can be produced by microorganisms through decomposition of CH_3COOH in anaerobic conditions. It is also composed by methanogenic bacteria existing in CO_2 and H_2 substrates. *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter* species, enteric bacteria, commonly exist on raw skin and in soaking float. These bacteria could be achieved via mixed acid and butanediol fermentation. In the mixed acid fermentation some products such as lactic, acetic and succinic acids as well as ethanol and equal amounts of H_2 and CO_2 are formed [11].

Millions of bacteria can be observed within 4 to 6 hours per each milliliter of the float liquid [12]. It is vitally important to estimate the number of microorganisms using practical and rapid methods.

în Turcia, în primul rând datorită celor aproximativ 500 de tăbăcării active [1]. Pielea de oaie este un material organic utilizat în principal la fabricarea îmbrăcămintei din piele. Aceasta este compusă în esență din 64% apă, 33% proteine, care este cea mai abundentă resursă de proteină de colagen de tip I, 2% grăsime, 0,5% săruri minerale și alte substanțe [2, 3].

Aceasta poate conține diferite tulpini de coci halofili și tije Gram-pozitive sau Gram-negative [4]. S-a constatat că cele mai multe dintre bacteriile izolate de pe pieile brute au activitate proteolitică [5, 6]. Procesele de pre-înmuire și înmuire principală oferă un mediu chimic și fizic adecvat pentru dezvoltarea bacteriilor. Deoarece microorganismele proteolitice pot deteriora pielea și pot prejudicia calitatea [7], activitatea microbiană trebuie să fie controlată [8]. Pentru a preveni deteriorările care pot apărea în timpul procesului de înmuire, se folosesc bactericide adecvate [9]. Dacă procesul nu poate fi controlat în mod corespunzător, poate cauza miros neplăcut, căderea părului, scăderea rezistenței feței [10] sau chiar pierderea colagenului, care este principala componentă proteică a pielii.

Metabolismul microbian poate avea ca produse secundare CO_2 , H_2O , acizi, aldehyde, alcooli, sulfuri etc. [9]. Speciile *Bacillus*, *Clostridium*, *Proteus*, *Pseudomonas* și *Streptomyces* sunt izolate, iar bacteriile sunt identificate în flota de înmuire din procesul de fabricare a pielii. Acestea sunt cunoscute ca bacterii amonificatoare. De asemenea, speciile *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Proteus*, cunoscute ca microorganisme generatoare de H_2S , pot fi găsite în flotele de prelucrare din tăbăcărie. Microorganismele pot produce metan (CH_4) prin descompunerea CH_3COOH în condiții anaerobe. Acesta este, de asemenea, compus din bacterii metanogene existente în substraturile de CO_2 și H_2 . Speciile *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, bacterii enterice, se pot găsi de obicei pe pielea brută și în flota de înmuire. Aceste bacterii pot lua naștere prin fermentarea mixtă a acidului și a butandiolului. În procesul de fermentație mixtă acidă se formează anumite produse, cum ar fi acizii lactic, acetic și succinic, precum și etanolul și cantități egale de H_2 și CO_2 [11].

Se pot observa milioane de bacterii într-o perioadă de 4 până la 6 ore pe fiecare mililitru de lichid din flotă [12]. Este extrem de important să se estimeze numărul de microorganisme folosind metode practice și rapide. Prin urmare, ar trebui să se utilizeze un

Therefore, a control mechanism should be used before such damage occurs.

Some traditional methods that are being used to determine the bacterial loads during the leather production process are time consuming and expensive. Therefore, there is a need to develop practical and cost effective methods. Electronic nose (e-nose) systems have been used in a wide range of applications, including food safety, microbiology, health, and environmental quality [13]. This non-destructive technology provides a fast and reliable tool in the sensing of quality parameters of biological materials [14].

An e-nose employs gas sensors that measure total headspace volatiles and create a smell print specific to biological material that is being evaluated. Its response includes a whole set of volatiles in a unique digital pattern [15]. Therefore, an e-nose system requires a pattern recognition system that is trained with a database of such digitized patterns. Use of Artificial Neural Networks (ANNs) is a common pattern recognition technique in e-nose systems. The ANNs require no mathematical formulations and can be considered as electronic networks of "neurons" similar to neural structure of human brain [16].

In this study it was aimed to evaluate gas sensors to observe whether there is a relationship between bacterial population and associated gas generation in soaking process. Specific objectives of this study are to design a prototype gas sensing system and to evaluate the performance of ANNs that can be used to estimate bacterial loads during the soaking stages of sheep skin.

MATERIALS AND METHODS

Wet-salted domestic sheep skins were used as the material. The experiment was conducted using the liquid sample obtained during soaking, which is the most important process for bacterial growth.

A wide variety of bacteria have been isolated from the soak water, including species of *Bacillus*, *Chromobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Serratia marcescens* [9]. Most of these bacteria population are aerobic having proteolytic

mechanism de control înainte să apară astfel de deteriorări.

Unele metode tradiționale utilizate pentru a determina numărul de bacterii din cadrul procesului de fabricare a pielii sunt consumatoare de timp și costisitoare. Prin urmare, există o nevoie de a dezvolta metode practice și rentabile. Sistemele de tip nas electronic (e-nose) au fost utilizate într-o gamă largă de aplicații, printre care siguranța alimentară, microbiologie, sănătate și calitatea mediului [13]. Această tehnologie nedistructivă oferă un instrument rapid și sigur pentru detectarea parametrilor de calitate ai materialelor biologice [14].

Nasul electronic utilizează senzori de gaz care măsoară substanțele volatile totale din spațiul de deasupra materialului și creează o amprentă de miros specifică materialului biologic analizat. Răspunsul său include un set întreg de substanțe volatile într-un model digital unic [15]. Prin urmare, nasul electronic necesită un sistem de recunoaștere a tiparelor, care cuprinde o bază de date cu astfel de tipare digitale. Utilizarea rețelelor neuronale artificiale (RNA) este o tehnică uzuală de recunoaștere a tiparelor în sistemele de tip e-nose. RNA nu necesită formule matematice și pot fi considerate "neuroni" ai rețelelor electronice, similari cu structura neuronală a creierului uman [16].

În acest studiu s-a urmărit evaluarea senzorilor de gaz pentru a observa dacă există vreo relație între populația bacteriană și generarea de gaze asociate în procesul de înmuiere. Obiectivele specifice ale acestui studiu sunt de a proiecta un prototip de sistem de detectare a gazelor și de a evalua performanța RNA utilizate pentru a estima numărul de bacterii din cadrul etapelor de înmuiere a pielii de oaie.

MATERIALE ȘI METODE

S-a utilizat ca material piei ovine umed sărate de proveniență domestică. Experimentul a fost efectuat folosind proba de lichid obținută în timpul înmuierii, cel mai favorizant proces pentru dezvoltarea bacteriilor.

S-a izolat o mare varietate de bacterii din apa utilizată pentru înmuiere, inclusiv specii de *Bacillus*, *Chromobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Serratia marcescens* [9]. Cele mai multe dintre aceste populații de bacterii sunt aerobe cu

activity. It is noteworthy to mention that bacterial population of above 10^5 cfu/ml could be problematic [17]. In our study, the number of total aerobic mesophilic bacteria and proteolytic bacteria was assessed.

The liquid obtained by means of common methods was sampled and populations of these microorganisms were determined. The samples were diluted serially to obtain different number of microorganisms (populations), and corresponding gas generation patterns. The samples were also assessed using Petri plate technique for microbial counts. Then, the gas generation pattern of each sample was recorded simultaneously. Finally, ANNs model parameters were developed and performance of the model was tested.

Sheep Skin Processing

A paddle was used to soak the skins at the Çanakkale Onsekiz Mart University, Biga Vocational College's Skin Processing Facility. In the pre-soaking process, five wet-salted domestic sheep skins were soaked at 20 °C for four hours in 800% water. Then, this liquid was discharged and same amount of water at the same temperature was added with 0.5% non-ionic surface active agent and 0.4% bactericide for main soaking. After running for 30 minutes, the paddle is rested. Then, running process was repeated every hour for 5 minutes for 24 hours. Following this process, required amount of liquid was sampled and bacterial populations were determined for the sample and its serial dilutions.

Determination of Bacterial Populations

After a 24-hour soaking process, some portion of soaking float sample was taken into a sterile container. Sterilized solutions containing 0.85% NaCl and/or 5% NaCl were used for dilutions of float samples. 10 ml sample was diluted with 90 ml sterilized water including NaCl. Other serial dilutions were prepared by adding 1 ml of this diluted sample into 9 ml sterilized water including NaCl. As a result, the main sample was diluted up to 10^{-6} times.

Numbers of total aerobic mesophilic and proteolytic bacteria were determined using Petri plate technique. Simultaneously, the gas generation patterns of each sample were recorded with the sensor array.

activitate proteolitică. Este de remarcat că o populație bacteriană de peste 10^5 ufc/ml poate fi problematică [17]. În studiul nostru s-a evaluat numărul total de bacterii mezofile aerobe și bacterii proteolitice.

Lichidul obținut prin metode obișnuite a fost prelevat și s-au determinat populațiile acestor microorganisme. Probele au fost diluate în serie pentru a obține un număr diferit de microorganisme (populații) și modelele corespunzătoare de generare a gazului. Probele au fost, de asemenea, evaluate folosind plăci Petri pentru a determina numărul de microbi. S-a înregistrat simultan modelul de generare a gazului din fiecare probă. În cele din urmă, s-au stabilit parametrii modelului RNA și s-a testat performanța modelului.

Prelucrarea pieilor de oaie

S-a utilizat un hașpel pentru a înmuia pieile în unitatea de prelucrare a pielii din cadrul Colegiului Profesional Biga, Universitatea Çanakkale Onsekiz Mart. În procesul de pre-înmuire, cinci piei ovine umed sărate de proveniență domestică au fost înmuiate la 20°C timp de patru ore, în 800% apă. Apoi, acest lichid a fost evacuat și în aceeași cantitate de apă, la aceeași temperatură, s-au adăugat 0,5% agent tensioactiv neionic și 0,4% bactericid pentru înmuirea principală. După funcționare timp de 30 minute, hașpelul este oprit. Apoi se repetă procesul la fiecare oră timp de 5 minute pe o perioadă de 24 ore. În urma acestui proces, se prelevează cantitatea necesară de lichid și se determină populațiile de bacterii pentru eșantionul respectiv și diluțiile sale seriale.

Determinarea populațiilor de bacterii

După un proces de înmuire de 24 de ore, s-a prelevat o probă din flota de înmuire într-un recipient steril. S-au folosit soluții sterile care conțin 0,85% NaCl și/sau 5% NaCl pentru diluții ale probelor de flotă. O probă de 10 ml a fost diluată cu 90 ml de apă sterilizată, cu conținut de NaCl. S-au preparat alte diluții seriale prin adăugarea a 1 ml din această probă diluată în 9 ml de apă sterilizată, cu conținut de NaCl. Ca urmare, proba principală a fost diluată până la 10^{-6} ori.

Numărul total de bacterii aerobe mezofile și proteolitice a fost determinat folosind tehnica plăcilor Petri. În același timp, s-au înregistrat modelele de generare a gazului pentru fiecare probă, utilizând rețeaua de senzori.

In the determination of numbers of total aerobic mesophilic bacteria and proteolytic bacteria, Plate Count Agar (PCA) and Calcium Caseinate Agar (CCA) medium were used, respectively [18, 19]. Five percent of NaCl was added to mediums for the bacterial counts. Then, 0.1 milliliter of each dilution was inoculated on PCA and CCA medium [20]. The Petri dishes were incubated at 37 °C for 48 hours. After incubation, in PCA medium, colonies were counted from all the Petri dishes containing 30-300 colonies. Mean of these counts was considered as number of total aerobic mesophilic bacteria. In CCA medium, only the colonies that form a transparent zone were considered to detect the number of proteolytic bacteria [19]. Bacterial counts were conducted at Basic and Industrial Microbiology Laboratory of the Çanakkale Onsekiz Mart University, Faculty of Arts and Sciences, Department of Biology.

Development of Prototype Sensing System

Metal-oxide Figaro gas sensors were used in this study (Figaro USA, Inc., Glenview, Ill., USA). A metal-oxide sensor is a thick film detector made by coating a film of tin oxide sintered on a small ceramic tube [21, 22]. When the sensor is exposed to an atmosphere containing gases, the tin-dioxide surface adsorbs these gas molecules and cause oxidation allowing a change in conductivity. An electrical circuit was used to convert the change in conductivity to an output signal, voltage.

The sensors, target gases and detection ranges are given in Table 1. These sensors respond in the presence of other gas molecules along with listed target gases. Therefore, it is possible to evaluate the overall bacterial activities within the solution.

La determinarea numărului total de bacterii mezofile aerobe și bacterii proteolitice, s-au utilizat mediile Plate Count Agar (PCA), respectiv agar cazeinat de calciu (CCA) [18, 19]. S-a adăugat 5% NaCl în medii pentru a determina numărul de bacterii. Apoi s-a inoculat 0,1 ml din fiecare diluție în mediile PCA și CCA [20]. Plăcile Petri au fost incubate la 37°C timp de 48 ore. După incubare, s-au numărat coloniile din toate cutiile Petri cu mediu PCA, rezultând 30-300 colonii. Valoarea medie a acestora a fost considerată numărul total de bacterii mezofile aerobe. În mediul CCA, doar coloniile care formează o zonă transparentă au fost luate în considerare pentru a detecta numărul de bacterii proteolitice [19]. Determinarea numărului de bacterii s-a efectuat în Laboratorul de Microbiologie de Bază și Industrială din cadrul Universității Çanakkale Onsekiz Mart, Facultatea de Arte și Științe, Departamentul de Biologie.

Dezvoltarea sistemului prototip de senzori

În acest studiu s-au utilizat senzori de gaz Figaro pe bază de oxid de metal (Figaro USA, Inc, Glenview, Ill., SUA). Un senzor pe bază de oxid de metal este un detector cu peliculă grosă realizat prin acoperirea unui mic tub ceramic cu o peliculă de oxid de staniu sinterizat [21, 22]. Când senzorul este expus la o atmosferă care conține gaze, suprafața staniu-dioxid adsorbă aceste molecule de gaz și determină oxidarea, permițând o modificare a conductivității. S-a utilizat un circuit electric pentru a transforma modificarea conductivității într-un semnal de ieșire, tensiune.

Senzorii, gazele urmărite și domeniile de detecție sunt prezentate în Tabelul 1. Acești senzori reacționează în prezența altor molecule de gaz, împreună cu gazele urmărite menționate. Prin urmare, este posibilă evaluarea activității bacteriene generale în soluție.

Table 1: Sensors and detection ranges
Tabelul 1: Senzori și domenii de detecție

Model <i>Model</i>	Target gas <i>Gaz</i>	Detection range (ppm) <i>Domeniu de detecție (ppm)</i>
TGS-842	Methane <i>Metan</i>	500-10000
TGS-826	Ammonia <i>Amoniac</i>	30-300
TGS-825	Hydrogen sulfide <i>Hidrogen sulfurat</i>	5-100
TGS-822	Organic vapors <i>Vapori organici</i>	50-5000

A 20x12x8.5 cm³ glass container was used as the main body of prototype sensing unit. The circuit was mounted on the lid of the container. Injection and ventilation holes were provided through the lid. A schematic representation of the system is given in Figure 1.

S-a utilizat un recipient de sticlă de 20x12x8.5 cm³ pentru corpul principal al unității prototip de detectare. Circuitul a fost montat pe capacul recipientului. Capacul a fost prevăzut cu orificii de injecție și de ventilație. O reprezentare schematică a sistemului este redată în Figura 1.

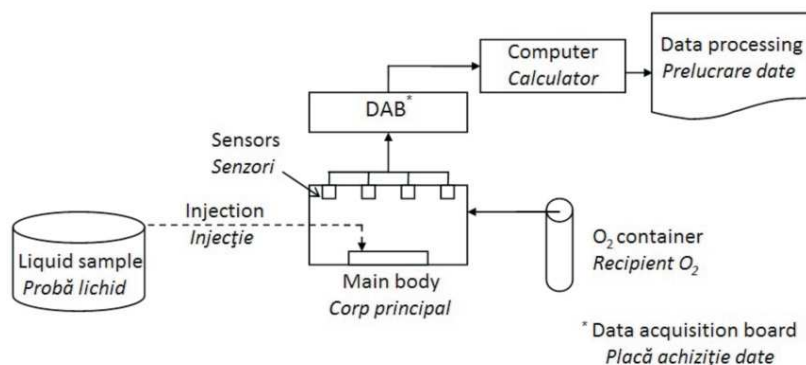


Figure 1. Schematic representation of the system
Figura 1. Reprezentare schematică a sistemului

Interconnections between the sensor array and signal circuits, and circuits and data acquisition board were assembled. A data acquisition board and Windaq software (Dataq Instruments Inc., Akron, Ohio) were used to acquire and transfer signals from circuits to the computer. In order to remove the liquid headspace gas from the container and sensors' surface, an oxygen tube (O₂) was connected to the system through a manometer.

S-au stabilit interconexiuni între rețeaua de senzori și circuitele de semnal și s-au asamblat circuitele și placa pentru achiziția datelor. S-au utilizat o placă pentru achiziția datelor și software-ul Windaq (Dataq Instruments Inc., Akron, Ohio) pentru a achiziționa și transfera semnale de la circuite la calculator. Pentru a îndepărta gazul din spațiul de deasupra recipientului și de pe suprafața senzorilor, s-a conectat un tub de oxigen (O₂) la sistem prin intermediul unui manometru.

Data Acquisition and Processing

Prior to surging the sensor array with headspace gas, the system was flashed with O₂ for two minutes. Ten milliliters of liquid sample was taken from 250 ml sterile container using a syringe. The sample was injected to the sterile Petri dish that was placed underneath the sensors through injection hole on the lid. Gas generation pattern of each sample was recorded for 10 minutes. A sample raw data and base-line corrected data are represented in Figure 2.

Achiziția și prelucrarea datelor

Înainte de a umple rețeaua de senzori cu gaz, s-a trecut un jet de O₂ prin sistem timp de două minute. S-a prelevat zece mililitri de probă de lichid dintr-un recipient steril de 250 ml cu ajutorul unei seringi. Proba a fost injectată prin gaura de injecție de pe capac în cutia sterilă Petri care a fost plasată sub senzori. S-a înregistrat modelul de generare a gazului la fiecare probă timp de 10 minute. Eșantioane de date brute și de date cu corecția liniei de bază sunt reprezentate în Figura 2.

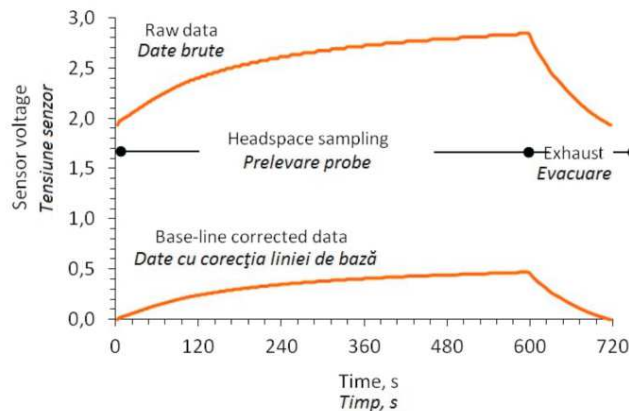


Figure 2. Raw and base-line corrected data samples
Figura 2. Eșantioane de date brute și cu corecția liniei de bază

The signals were base-line corrected using the following equation:

S-a efectuat corecția liniei de bază a semnalelor, utilizând următoarea ecuație:

$$V_b = \frac{V_i - V_{\min}}{V_{\min}} \quad (1)$$

where V_b is base-line corrected sensor voltage at a given second i , V_i is sensor voltage at a given second i , and V_{\min} is the minimum sensor voltage recorded during the operation.

unde V_b este tensiunea senzorului cu corecția liniei de bază la o secundă dată i , V_i este tensiunea senzorului la o secundă dată i , iar V_{\min} este tensiunea minimă a senzorului înregistrată în timpul operațiunii.

For each sample run, four base-line corrected curves were obtained corresponding to each sensor. The area under each curve was calculated to be used as sensor response representing the sample. In the calculation of area under each curve, it was assumed that the curve can be divided into rectangles as shown in Figure 3.

Pentru fiecare probă efectuată, s-au obținut patru curbe cu corecția liniei de bază, corespunzătoare fiecărui senzor. Zona de sub fiecare curbă a fost calculată pentru a fi utilizată ca răspuns al senzorului reprezentativ pentru probă. La calcularea zonei de sub fiecare curbă, s-a presupus că se poate împărți curba în dreptunghiuri, așa cum arată Figura 3.

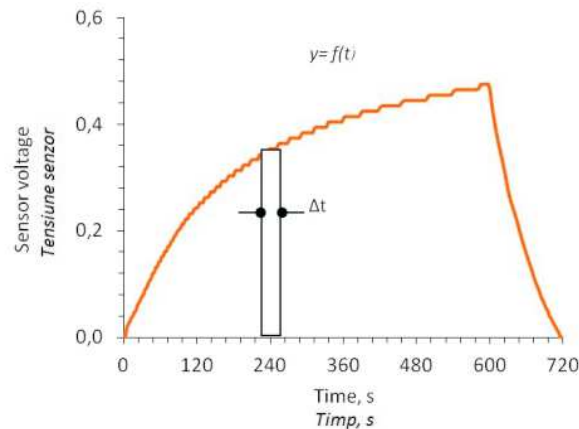


Figure 3. Rectangle representing a unit area under the curve
 Figura 3. Dreptunghi reprezentând o unitate de suprafață sub curbă

The area representing each curve was then calculated using the following equation:

S-a calculat apoi zona reprezentând fiecare curbă folosind următoarea ecuație:

$$A = \sum_{k=1}^{720} f(t_k) \Delta t \tag{2}$$

where A is total area under the curve, t is time in seconds, k is designation number of each rectangle and V is sensor voltage.

unde A este suprafața totală de sub curbă, t este timpul exprimat în secunde, k este numărul de identificare al fiecărui dreptunghi, iar V este tensiunea senzorului.

ANN Architecture and Training Parameters

Arhitectura RNA și parametrii de antrenament

Thirty seven readings each including four sensor responses were used as the dataset. The dataset was randomly partitioned into 3 groups including training (18), validation (11), and testing (8). Data partitioning and other ANN computations were conducted using XLMiner (Cytel Software Corporation, 675 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA, USA) add-in of MS Excel.

Setul de date a cuprins treizeci și șapte indicații, fiecare incluzând patru răspunsuri de la senzori. Setul de date a fost repartizat aleatoriu în 3 grupe, și anume setul de antrenament (18), setul de validare (11) și setul de testare (8). Repartizarea datelor și alte calcule RNA au fost efectuate folosind componenta software XLMiner (Cytel Software Corporation, 675 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA, SUA) pentru MS Excel.

The ANNs can be considered as electronic networks of “neurons” similar to the neural structure of human brain and require no mathematical formulations. They can process records one at a time, and “learn” (training phase of ANN) by comparing their prediction of the record with the known actual record. The errors from the first prediction are fed back into the network, and used to modify the networks algorithm the second time, and so on for many iterations (epochs) [23].

RNA pot fi considerate rețele electronice de “neuroni”, similare cu structura neuronală a creierului uman și nu necesită formule matematice. Acestea pot prelucra înregistrările pe rând și pot “învăța” (faza de antrenament a RNA) comparând predicția lor referitoare la înregistrare cu înregistrarea reală cunoscută. Erorile din prima predicție sunt trimise înapoi în rețea și sunt utilizate pentru a modifica algoritmul rețelelor pentru a doua oară, și așa mai departe pentru mai multe iterații (epoci) [23].

An ANN consists of three layers including input, hidden, and output. The database is introduced to

O RNA constă din trei straturi, și anume cel de intrare, cel ascuns și cel de ieșire. Baza de date este

input layer to train the model. The input layer is followed by hidden layer(s). There may be more than one hidden layers where there is one node for each class. The difference in the connection of nodes, methods of computing weights, number of nodes in hidden layers, and the type of transfer function between the layers cause the difference among the ANNs models. In this study, a standard fully connected, feed-forward, back-propagation neural network (BPNN) model with a standard sigmoid input transfer function was used. This is a typical application of supervised training method.

Determination of number of hidden layers and nodes are critical factors that affect the performance of the ANNs model. Trial and error is the most commonly used method to determine these numbers. The overall data collection and processing techniques in ANN analysis are shown in Figure 4.

introdusă în stratul de intrare pentru a antrena modelul. Stratul de intrare este urmat de stratul(urile) ascuns(e). Pot exista mai multe straturi ascunse în cazul în care există un nod pentru fiecare clasă. Diferențele de conexiune a nodurilor, metodele de calcul al ponderilor, numărul de noduri din straturile ascunse și tipul de funcție de transfer între straturi duc la diferențe între modelele RNA. În acest studiu, s-a folosit un model standard de rețea neuronală cu retro-propagare, conectată complet, cu transmitere înainte, cu o funcție standard de transfer de intrare de tip sigmoid. Aceasta este o aplicație tipică pentru metoda de antrenament supravegheat.

Determinarea numărului de straturi ascunse și de noduri este un factor critic care afectează performanța modelului RNA. Metoda încercare-eroare este cea mai frecvent utilizată pentru a determina aceste numere. Ansamblul de tehnici de colectare și prelucrare a datelor din cadrul analizei RNA este prezentat în Figura 4.

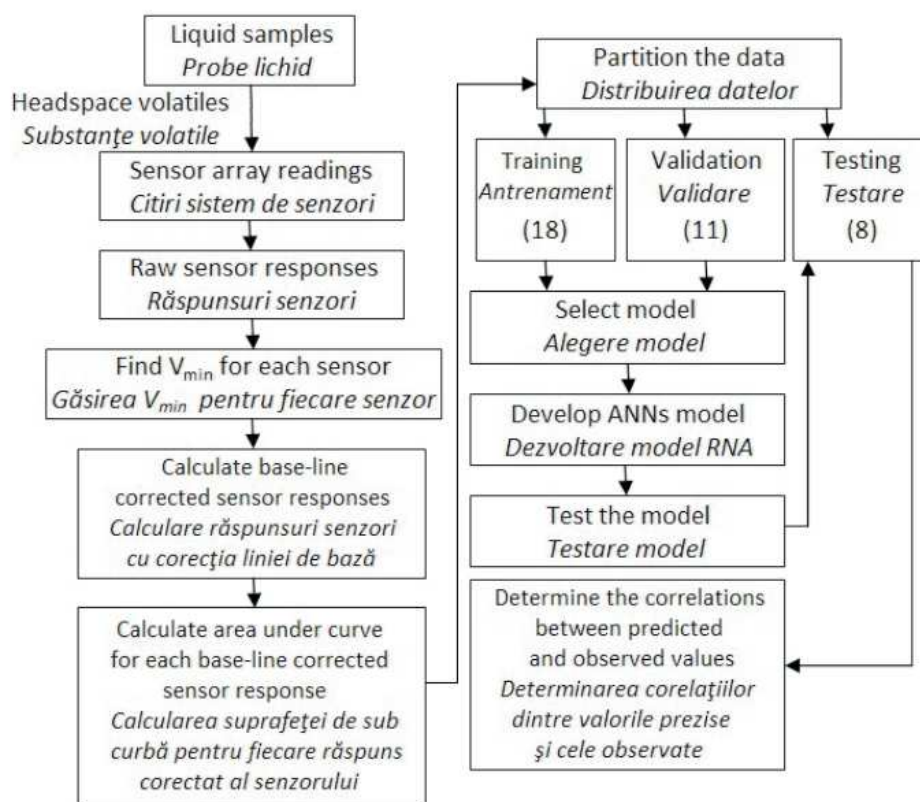


Figure 4. Schematic representation of ANNs analysis
Figura 4. Reprezentare schematică a analizei RNA

RESULTS

The goal of this study was to test the performance of metal oxide gas sensors and ANNs to identify the bacterial loads during the soaking process of domestic sheep skins. Increasing number of bacterial population caused higher concentrations of headspace gases. However, as the liquid diluted up to 99.9%, the bacterial population decreases about 1000 times. Therefore, the gas generation between diluted and concentrated samples changes dramatically.

In Figure 5, the graph was plotted for the first 11 readings where the bacterial population is considerably low compared to the remaining 26 samples. The resultant R^2 values were still promising for diluted samples.

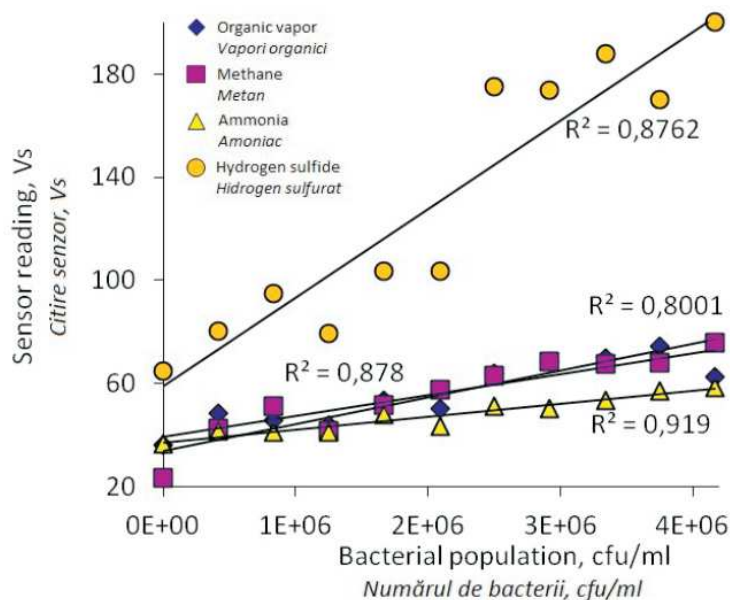


Figure 5. Relationship between bacterial counts and sensor responses for diluted 11 samples
Figura 5. Relația dintre numărul de bacterii și răspunsurile senzorului pentru 11 probe diluate

In the next step, the ANNs model was developed. In the selection of model parameters trial and error method was used. In the training phase where the model developed, randomly selected 18 readings were used as explained above. Once the model developed, 11 readings were used to predict bacterial populations. Predicted and observed populations were plotted to see R^2 values. The model parameters were changed until the highest R^2 values obtained (Table 2).

REZULTATE

Scopul studiului a fost acela de a testa performanța senzorilor de gaz pe bază de oxid de metal și RNA pentru a identifica numărul de bacterii din cadrul procesului de înmuiere a pieilor de oaie. Creșterea numărului populației bacteriene a dus la concentrații mai mari de gaze. Cu toate acestea, pe măsură ce lichidul a fost diluat până la 99,9%, populația bacteriană a scăzut de aproximativ 1000 de ori. Prin urmare, cantitatea de gaz generat de probele diluate și cele concentrate se modifică semnificativ.

În Figura 5 s-a trasat graficul pentru primele 11 citiri în care populația bacteriană este considerabil mai scăzută comparativ cu restul de 26 de probe. Valorile R^2 rezultate au fost promițătoare pentru probele diluate.

În etapa următoare s-a dezvoltat modelul RNA. La selectarea parametrilor modelului, s-a utilizat metoda încercare-eroare. În faza de antrenament în care s-a dezvoltat modelul, s-au utilizat 18 citiri selectate aleatoriu, după cum s-a explicat mai sus. Odată ce s-a dezvoltat modelul, s-au utilizat 11 citiri pentru a prezice populațiile bacteriene. S-au reprezentat grafic populațiile prezise și cele observate pentru a vedea valorile R^2 . Parametrii modelului au fost modificați până ce s-au obținut cele mai mari valori R^2 (Tabelul 2).

Table 2: ANNs model parameters
Tabelul 2: Parametrii modelului RNA

# hidden layers <i># straturi ascunse</i>	1
# nodes in hidden layer <i># noduri în stratul ascuns</i>	5
Hidden layer sigmoid <i>Funcția sigmoid din stratul ascuns</i>	Standard
Output layer sigmoid <i>Funcția sigmoid din stratul de ieșire</i>	Standard
# epochs <i># epoci</i>	1000
Step size for gradient descent <i>Pasul scăderii după gradient</i>	0.1
Weight change momentum <i>Impulsul schimbării ponderii</i>	0.6
Error tolerance <i>Toleranța de eroare</i>	0.01
Weight decay <i>Scăderea ponderii</i>	0

The relationship between number of epochs and total residuals sum of square (TRSS) shows the learning capacity of the model. As explained above, model weights were calculated by comparing the input and output data. Decrease in TRSS should be seen to observe how learning process evolves depending on the number of epochs. Number of epochs and corresponding Total RSS values are shown in Figure 6.

Relația dintre numărul de epoci și suma totală a pătratelor reziduurilor (TRSS) arată capacitatea de învățare a modelului. Așa cum s-a explicat mai sus, ponderile modelului au fost calculate prin compararea datelor de intrare și de ieșire. Scăderea TRSS trebuie observată pentru a vedea modul în care procesul de învățare evoluează în funcție de numărul de epoci. Numărul de epoci și valorile totale RSS corespunzătoare sunt prezentate în Figura 6.

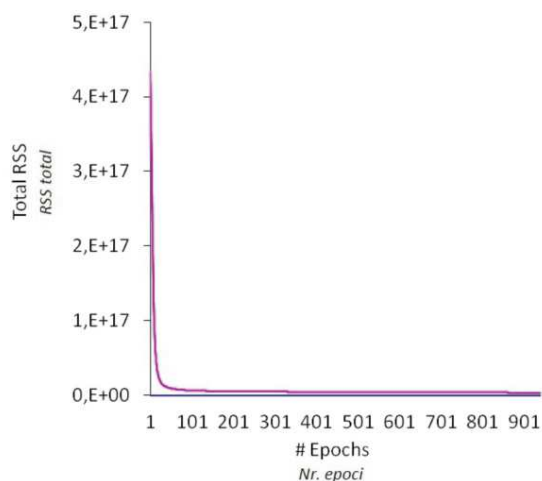


Figure 6. Relationship between TRSS and number of epochs
Figura 6. Relația dintre TRSS și numărul de epoci

In order to evaluate the performance of ANNs model, R^2 values between predicted and observed readings were calculated as shown in Figure 7.

Pentru a evalua performanța modelului RNA, s-au calculat valorile R^2 dintre indicațiile prezise și cele observate, după cum arată Figura 7.

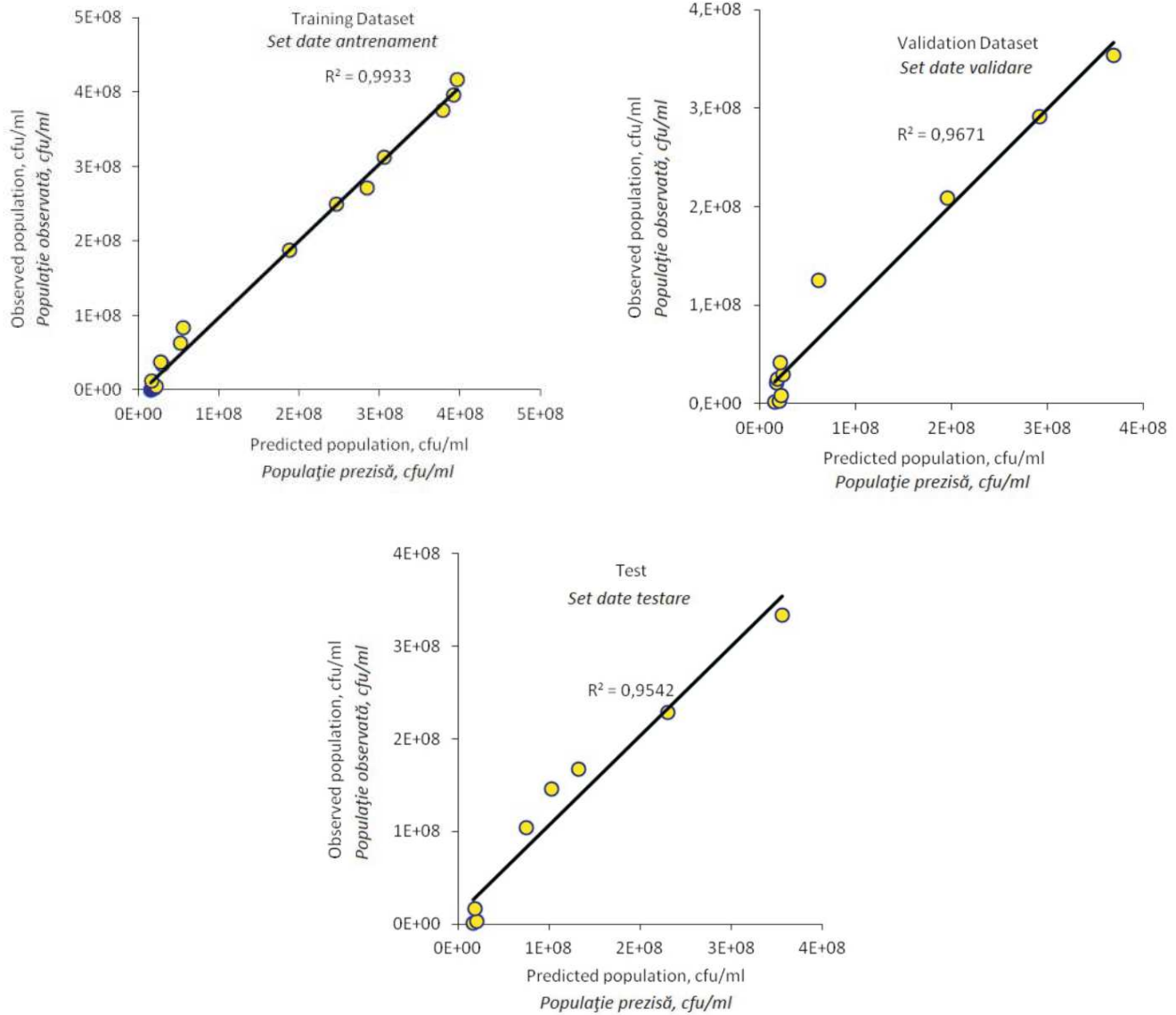


Figure 7. Relationships between the observed and predicted bacterial populations
 Figura 7. Relațiile dintre populațiile de bacterii observate și prezise

Higher R^2 values obtained with training dataset are normal since the model itself is developed using this data. The performance of model can be best explained with validation and test data. These datasets also show a good prediction performance.

Valorile R^2 mai mari obținute în cadrul setului de date de antrenament sunt normale, deoarece modelul în sine a fost dezvoltat folosind aceste date. Performanța modelului poate fi cel mai bine explicată prin datele de validare și de testare. Aceste seturi de date arată, de asemenea, o performanță bună a predicției.

CONCLUSIONS

During the soaking process, quality loss of skin by reason of uncontrolled microbial growth is one of the major risks in leather industry. It is vitally important to know the population of microorganisms to avoid any bacterial damage. Petri plate technique is most commonly used method in the determination of bacterial load. However, this method is time consuming and costly. Therefore, there is a need for a quick and practical method that can be used to estimate bacterial population. Gas sensor arrays used with ANNs have widely been used in quality assessment of agricultural products.

A sensor array developed using 4 metal oxide based gas sensors to estimate the bacterial load in soaking float of sheep skin. The sensor array was used to collect gas sensor responses during a specified time period. In the development of the system, cost effectiveness was the primary goal. Once the sensor responses acquired, the signals were saved as MS Excel format for further data processing and model development. In this study ANNs model was used as the statistical method. The data was partitioned into 3 parts including training, validation, and testing. The model was developed with randomly selected 11 readings. In the selection of best model parameters trial and error method was employed. The set of model parameters that yielded the highest R^2 value between predicted and observed bacterial populations was selected.

The highest R^2 values for training, validation, and test data were found to be 0.99, 0.97, and 0.95, respectively. Our future work involves developing an electronic nose system that does data collection, processing, model development, classification in one unit. We are also planning to apply this technology to various areas related to agricultural production.

Acknowledgement

This work was supported by the Çanakkale Onsekiz Mart University, Commission of Scientific Research Projects with grant number 2010/101. The authors explicitly state that there is no potential conflict among them.

CONCLUZII

În timpul procesului de înmuiere, scăderea calității pielii din cauza creșterii microbiene necontrolate este unul dintre riscurile majore ale industriei de pielărie. Este extrem de important să se cunoască populația de microorganisme, pentru a evita orice deteriorare bacteriană. Tehnica plăcilor Petri este metoda cel mai frecvent utilizată pentru determinarea numărului de bacterii. Această metodă este însă consumatoare de timp și costisitoare. Prin urmare, este nevoie de o metodă rapidă și practică care să poată fi utilizată pentru a estima populația bacteriană. Sistemele de senzori de gaz cuplate cu RNA au fost utilizate pe scară largă în evaluarea calității produselor agricole.

Un sistem de senzori a fost dezvoltat folosind 4 senzori de gaze pe bază de oxid de metal pentru a estima cantitatea de bacterii în flota de înmuiere a pielii de oaie. Sistemul de senzori a fost utilizat pentru a colecta răspunsurile senzorilor de gaz într-o anumită perioadă de timp. La dezvoltarea sistemului, obiectivul principal a fost rentabilitatea. După obținerea răspunsurilor senzorilor, semnalele au fost salvate în format MS Excel pentru prelucrarea datelor și dezvoltarea modelului. În acest studiu modelul RNA a fost folosit ca metodă statistică. Datele au fost împărțite în 3 părți, și anume setul de antrenament, setul de validare și cel de testare. Modelul a fost dezvoltat cu 11 citiri selectate aleatoriu. La selectarea celor mai buni parametri ai modelului s-a utilizat metoda încercare-eroare. S-a selectat setul de parametri ai modelului care a dat cea mai mare valoare R^2 între populațiile bacteriene prezise și cele observate.

Cele mai mari valori R^2 pentru setul de antrenament, setul de validare și cel de testare s-au dovedit a fi 0,99, 0,97, respectiv 0,95. Activitățile viitoare presupun dezvoltarea unui sistem de tip nas electronic format dintr-o singură unitate care să colecteze și să prelucreze date, să dezvolte modele și să efectueze clasificări. Se urmărește aplicarea acestei tehnologii în diverse domenii legate de producția agricolă.

Mulțumiri

Această lucrare a fost realizată cu sprijinul Universității Çanakkale Onsekiz Mart, Comisia de Proiecte de Cercetare Științifică, număr de grant 2010/101. Autorii afirmă în mod explicit că nu există niciun conflict potențial între aceștia.

REFERENCES

1. MARKA, Doğu Marmara Kalkınma Ajansı, Gerede'nin Deri ve Deri Ürünlerinde Kümelenmesi" Raporu (in Turkish), MARKA Yayınları Serisi, **2010**, 11-12.
2. Sharphouse, J.H., *Leather Technicians Handbook*, Vernon Lock Ltd., London, UK, **1989**, 575.
3. Ding, Z., Pang, X., Albu, L., Establishment Of Average Molecular Structure Model For Collagen Extracted From Leather Solid Waste With Chromium, *Revista de Pielarie Incaltaminte*, **2012**, 12, 4, 245-256.
4. Orlita, A., Microbial biodeterioration of leather and its control: a review, *International Biodeterioration and Biodegradation*, **2004**, 53, 157-163.
5. Aslan, E., Birbir, M., Examination of gram positive bacteria on salt-pack cured hides, *J. Am. Leather Chem. As.*, **2011**, 106, 12, 372-380.
6. Aslan, E., Birbir, M., Examination of gram-negative bacteria on salt-pack cured hides, *J. Am. Leather Chem. As.*, **2012**, 107, 4, 106-115.
7. Yapıcı, A.N., Yapıcı, B.M., Karaboz, I., Tozan, M., An in vitro assessment of the effectiveness of some bactericides on bacteria isolated from soaking float, *Asian J. Chem.*, **2009**, 21, 2, 1521-1525.
8. Bienkiewicz, K., *Physical chemistry of leather making*, Robert E. Krieger Publishing Company, Malabar, Florida, **1983**, 541.
9. Didato, D., Bowen, J., Hurlow, E., *Microorganism control during leather manufacture*, Leather Technologists Pocket Book, The Society of Leather Technologists and Chemists, East Yorkshire, UK, **1999**, 339–352.
10. John, G., Possible defects in leather production, Definitions, causes, consequences, remedies and types of leather, Druck Partner Rübemann GmbH, Carl-Benz-Strasse 11, D-69495, Hemsbach, **1997**, 33-35.
11. Madigan, M.T., Martinko, J.M., Brock mikroorganizmaların biyolojisi, Prokaryotik çeşitlilik: Bacteria (in Turkish), Palme Yayıncılık, ed: Çökmüş, C., (11 ed.), Ankara, **2010**.
12. Lindner, W., Neuber, H.U., Preservation in the tannery, *International Biodeterioration*, **1990**, 26, 195-203.
13. Kızıl, U., Lindley, J.A., Potential use of gas sensors in beef manure nutrient content estimations, *Afr. J. Biotechnol.*, **2009**, 8, 12, 2790-2795.
14. Balasubramanian, S., Panigrahi, S., Louge, C.M., Marchello, M., Doetkott, C., Gu, H., Sherwood, J., Nolan, L., Spoilage identification of beef using an electronic nose system, *T. ASAE*, **2005**, 47, 5, 1625-633.
15. Cheng, S., Wang, Y., Wang, J., Wei, Z., Lu, Q., Detection of eggshell crack using electronic nose, *T. ASABE*, **2010**, 53, 3, 789-794.
16. Kızıl, U., Saçan, M., Artificial neural network model as a Statical analysis tool in pipe-framed greenhouse design, *J. Food, Agric. Environ.*, **2010**, 8, 2, 843-846.
17. Rangarajan, R., Didato, D.T., Braynt, S.D., Measurement of Bacterial Population in Typical Tannery Soak Solutions by Traditional and New Approaches, *J. Am. Leather Chem. As.*, **2003**, 98, 477-486.
18. Oppong, D., Bryant, S.D., Rangarajan, R., Steele, S., Radwell, D., Hyllengren, L., Bailey, D.G., Dudley, R., Rabinovich, D., Application of molecular techniques to identify bacteria isolated from the leather industry, *J. Am. Leather Chem. As.*, **2006**, 101, 140-145.
19. Pichhardt, K., *Food microbiology* (in Turkish), Literatür Yayıncılık, (Ed: Sekin, Y. and Karagözü, N.), Istanbul, Turkey, **2004**, 358.
20. Bilgi, S.T., Yapici, B.M., Yapici, A.N., Determination of bacterial and fungal numbers in floats of pre-tanning operations, *Afr. J. Biotechnol.*, **2009**, 8, 8, 1602-1607.
21. Bartlett, P.N., Gardner, J.W., Odor sensor for an electronic nose, In *Sensors and Sensory Systems for an Electronic Nose*, Kluwer Academic Publishers, Netherland, **1992**, 327 p.
22. Ho, C.K., Itamura, M.T., Kelley, M., Hughes, R.C., Review of chemical sensors for in-situ monitoring of volatile contaminants, SAND2001-0643, Sandia National Laboratories, Albuquerque - New Mexico, USA, **2001**, 28.
23. XLMiner, User's manual, Cytel Software Corporation, 675 Massachusetts Avenue, Cambridge, MA, USA, **2009**.

Article received/Data primirii articolului: 19.05.2014

Accepted/Acceptat la data: 05.06.2014