

آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان

محمد حسین مرحمتی زاده^{۱*}، کیمیا کاظم زاده شیرازی نژاد^۲، ماندانا حسن زاده^۳، زهرا جمالی^۳، سید امیرحسین نفیسی^۳، سید مصطفی فاموری^۳

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۲. دانش آموخته دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

۳. دانشجوی دکترای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد کازرون، دانشگاه آزاد اسلامی، کازرون، ایران.

*نویسنده مسئول: Drmarhamati@gmail.com

چکیده:

باتوجه به اینکه راه اصلی ورود قارچ‌ها و باکتری‌ها به مراکز پرورش دام و طیور و در نهایت به زنجیره غذایی انسان خوراک می‌باشد؛ لذا اطلاع دقیق از مقادیر قارچ و باکتری اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های پودر گوشت و خوراک دام، طیور و آبزیان جهت کنترل آن‌ها ضروری می‌باشد. در این پژوهش آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش باکتری اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس انجام شد. در مجموع ۴۰ نمونه (۲۰ نمونه پودر گوشت، ۲۰ نمونه خوراک آماده) با وزن تقریبی ۱۵۰۰ گرم اخذ گردید. ابتدا مشخصات هر یک از نمونه‌ها ثبت و طبق دستورالعمل‌های استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. به منظور بررسی آلودگی نمونه‌ها به قارچ‌های مختلف از روش شمارش قارچ مطابق استاندارد ملی ایران، برای شمارش باکتری اشریشیاکلی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۳۴۵۶ و برای شناسایی سالمونلا، از روش جستجو سالمونلا در مواد غذایی مطابق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۸۱۰ استفاده شد. نتایج این مطالعه نشان داد که از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲,۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشریشیاکلی (۲,۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷,۵ درصد) مثبت مشاهده شد. این نشان می‌دهد که در کارخانجات تولید خوراک دام و طیور و کشتارگاه‌های استان فارس پروتکل‌های بهداشتی جهت پیشگیری از ابتلا خوراک و پودر گوشت به قارچ، سالمونلا و اشریشیاکلی انجام می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پودر گوشت، خوراک، قارچ، سالمونلا، اشریشیاکلی

مقدمه

خوراک هزینه عمده پرورش دام و طیور را به خود اختصاص می‌دهد، بنابراین ارزیابی مداوم منابع جدید و گوناگون مواد خوراکی ضروری باشد (گلیان و معینی، ۱۳۸۲). متخصصین همواره سعی می‌کنند با استفاده از روش‌های مختلف هزینه‌های مربوط به خوراک را در پرورش طیور کاهش دهند. از جمله این روش‌ها استفاده پودر ضایعات کشتارگاهی، که برای انسان قابل استفاده نیست، می‌باشد. اهمیت تغذیه مناسب ایجاب می‌کند که ارزش غذایی این ضایعات به طور صحیح و استاندارد تعیین گردد (روغنی و معینی زاده، ۱۳۸۵). لیکن حجم قابل توجه مصرف پودر ضایعات کشتارگاهی در سال‌های اخیر و وجود برخی از بیماری‌های نوپدید سبب گردیده تا با اطمینان از بی‌خطر بودن مصرف پودر گوشت، احتمال انتشار و انتقال بیماری از این طریق نیز افزون شده در نتیجه نظارت‌های مستمر و بهداشتی در همه جوامع از جمله ایران نیز ضروری‌تر گردد. شواهدی وجود دارد که کنترل آلودگی میکروبی در خوراک دام دارای مزایای بهداشتی قابل توجهی در جمعیت‌های انسانی و حیوانی است. انسان می‌تواند با مصرف تخم‌مرغ، گوشت یا شیر حیوانات مصرف کننده خوراک آلوده، در معرض آلودگی قرار گیرد (Anonymous, ۲۰۰۹).

در خصوص آلودگی مواد خوراکی با قارچ‌ها و سموم آن‌ها گزارش‌های مختلف نشان می‌دهد که آلودگی ناشی از گونه‌های آسپرژیلوس، فوزاریوم، آلترناریا و پنی‌سیلیوم در بسیاری از مواد خوراکی به وفور یافت می‌شود. آسپرژیلوس گونه غالب در خوراک گاوهای شیری و دیگر خوراک‌ها در مناطق گرمسیری و حاره می‌باشد (Kumar et al, ۲۰۱۷). آسپرژیلوس، گونه-ای از قارچ هاست که برخی از آن‌ها انگل داخلی و یا پاتوژن‌های فرصت‌طلب انسانی هستند. گونه‌های دیگر

آن شامل پنی‌سیلیوم، فوزاریوم، آلترناریا از آلودگی-های مهم دانه‌های غلات به شمار می‌روند (Atherstone et al, ۲۰۱۶). آلودگی‌های قارچی منشا تولید مایکوتوکسین‌ها هستند. دانه‌های تخمیری غلات و تفاله چغندر قند ممکن است توسط حیوانات استنشاق یا خورده شوند و باعث ایجاد آثار زیان‌آور و بیماری موسوم به مایکوزیس گردند (Sala, ۲۰۰۵). معمولا کلیه مواد خوراکی بطور بالقوه حاوی مقادیر کمی کپک و قارچ می‌باشند که در شرایط خاصی می‌توانند به سرعت رشد و افزایش پیدا کنند. رشد قارچ‌ها موجب می‌شود که مواد خوراکی به صورت کلوخه و کیک درآمده، در نتیجه حمل و نقل آن‌ها مشکل می‌گردد و همچنین باعث تغییر رنگ، تغییر پایداری و بو و طعم مواد خوراکی شده و در نتیجه دام‌ها از مصرف آن‌ها امتناع می‌کنند. علاوه بر این، قارچ‌ها ترکیبات سمی به نام مایکوتوکسین‌ها را تولید می‌کنند که باعث کاهش تولید و ایجاد بیماری و در شرایط حاد، مرگ دام‌ها شده و از این طریق از نظر اقتصادی، موجب ضرر و زیان قابل توجه دامداران می‌گردد (Cardoso ۲۰۱۶ et al,).

سالمونلا یکی از مهم‌ترین عوامل آلودگی در خوراک دام و پودر گوشت است که به دلیل نقش بسیار مهم آن به عنوان یک بیماری مشترک جدی در بهداشت مواد غذایی، سلامت عمومی را به مخاطره می‌اندازد. (Soltandallal et al, ۲۰۱۰). اشیریشیاکلی نیز از باکتری‌های روده‌ای است که آلودگی‌های ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است. یکی از شایع‌ترین سروتیپ‌های این باکتری‌ها *E.coli* *O157:H7* می‌باشد که بیشتر از گوشت گاوی که حرارت کافی ندیده‌است جدا و گزارش شد (Shekarforoush et al, ۲۰۰۸).

باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه همراه با مواد اولیه مورد استفاده در تولید خوراک دام وارد زنجیره خوراک دام می‌شوند. خانواده انتروباکتریاسه شامل ۳۰ جنس ثابت از جمله سالمونلا و اشریشیاکلی است. بسیاری از جنس‌ها نسبت به انسان، حیوانات، حشرات و گیاهان بیماری‌زا هستند (Maciorowski et al, 2004). تعدادی از جنس‌های این خانواده به طور منظم در ارتباط با حیوانات وجود دارند. آن‌ها به عنوان اعضای بومی میکروفلور روده یافت می‌شوند که ممکن است هیچ گونه اثرات مضر ایجاد نکنند. ممکن است پس از پخت، در حین نگهداری و حمل و نقل محصولات را دوباره آلوده کنند (Hamilton, ۲۰۰۲). بین خطر جداسازی سالمونلا و درجه آلودگی انتروباکتریاسه ارتباط شناخته شده‌ای وجود دارد (Veldman ۱۹۹۵ et al,).

بعد از حرارت، آلودگی پودر گوشت به حداقل می‌رسد ولی با توجه به اینکه شرایط رشد باکتری و قارچ در پودر گوشت فراهم است بعد از حرارت دوباره رشد باکتری شروع می‌شود. در این پژوهش آزمون‌های شمارش قارچ، شمارش باکتری اشریشیاکلی و جستجوی سالمونلا از مراکز ضایعات (پودر گوشت) و کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس انجام می‌شود. با توجه به این که راه اصلی ورود قارچ‌ها و باکتری‌ها به مراکز پرورش دام و طیور و در نهایت به زنجیره غذایی انسان خوراک می‌باشد؛ لذا اطلاع دقیق از مقادیر قارچ و باکتری اشریشیاکلی و سالمونلا در نمونه‌های پودر گوشت و خوراک دام، طیور و آبزیان جهت کنترل آنها ضروری می‌باشد.

مواد و روش کار:

مطالعه حاضر از نوع توصیفی-مقطعی است که جامعه آماری آن، پودر گوشت از مراکز ضایعات و نمونه‌های

پودر شده خوراک کارخانجات دام، طیور و آبزیان مناطق مختلف شهرستان فارس می‌باشد. پس از اخذ مجوز و هماهنگی‌های لازم، نمونه‌گیری به صورت تصادفی انجام گرفت. در مجموع ۴۰ نمونه (۲۰ نمونه پودر گوشت، ۲۰ نمونه خوراک آماده) با وزن تقریبی ۱۵۰۰ گرم اخذ گردید. ابتدا مشخصات هر یک از نمونه‌ها ثبت و طبق دستورالعمل‌های استاندارد به آزمایشگاه منتقل شدند. نمونه‌هایی که به آزمایشگاه تحویل داده شد در طی حمل، جابجایی و نگهداری صدمه ندید و یا تغییری در آن ایجاد نشد. همچنین نمونه‌ها در ظروف تمیز، خشک، سترون و در شرایط اسپتیک جمع‌آوری شده و در شرایطی نگهداری شدند که امکان رشد میکروارگانیسم‌ها وجود نداشته باشد. نمونه‌های جمع‌آوری شده حتی‌الامکان در همان روز نمونه‌برداری، مورد آزمون قرار گرفتند (استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹). نمونه‌های اخذ شده به مدت یک دقیقه به خوبی مخلوط شده و نمونه حاصل بصورت مسقیم جهت آزمون‌های میکروبی و قارچی مورد استفاده قرار گرفتند.

روش شمارش قارچ‌ها

۱- روش کشت: برای شمارش قارچ‌ها، کشت مقادیر مشخصی از آزمایش (فرآورده‌های مایع (و یا سوسپانسیون اولیه (سایر فرآورده‌ها) با استفاده از محیط کشت معین به روش کشت آمیخته و کشت رقت‌های تهیه شده از آزمایش فرآورده‌های مایع و یا رقت اولیه سایر فرآورده‌ها انجام شد.

۲- شرایط گرم خانه گذاری: گرم‌خانه‌گذاری پلیت‌ها در شرایط هوایی در دمای ۲۵ درجه به مدت زمان ۵ روز و در آخر محاسبه تعداد کلنی‌های قابل شمارش در هر گرم از نمونه صورت گرفت.

۳- تهیه محیط کشت: محیط کشت عصاره مخمر- دکستروز-کلرامفنیکل بود. محیط پایه شامل عصاره مخمر به مقدار ۵ گرم، دکستروز به مقدار ۲۰ گرم،

$$N = \frac{\sum c}{v(n1 + 0.1n2)d}$$

روش شمارش اشیریشیاکلی:

۱- مرحله غنی سازی: برای شمارش اشیریشیاکلی، غنی سازی در محیط کشت غیرانتخابی صورت گرفت. آزمون به آب پپتونه بافری (BPW) تلقیح شد و در دمای ۳۷ °C به مدت زمان ۱۸ ساعت گرم خانه گذاری شد.

۲- کشت انتخابی: از کشت به دست آمده در مرحله غنی سازی در محیط BPW، به محیط کشت ویولت رد بایل گلوکز (VRBG) آگار تلقیح شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرم خانه گذاری شد. سپس کلنی های شاخص اشیریشیاکلی پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. کلنی های شاخص اشیریشیاکلی احتمالی، روی یک محیط غیرانتخابی، کشت داده شد و سپس با آزمون های تخمیر گلوکز و واکنش اکسیداز تأیید شد. نمونه برداری جزئی از روش تعیین شده در این استاندارد نیست. برای هر فرآورده به استاندارد مربوط به آن فرآورده مراجعه شد. اگر استاندارد ملی مربوط به آن فرآورده وجود نداشت، با توافق بخش های مرتبط با آن فرآورده، نمونه برداری انجام گردید. روش های نمونه برداری طبق -استاندارد ۱۷۷۲۸ ISO/TS برای مواد غذایی و خوراک دام -استاندارد 13307 ISO برای مرحله تولید اولیه؛ -استاندارد ISO 17604 برای لاشه ها -استاندارد ISO 18593 برای نمونه های محیطی توصیه شده است.

به طور کلی مقداری از آزمون (جرم یا حجم) به مقداری از BPW (جرم یا حجم) اضافه شد تا یک رقت ده تایی به دست آید. برای مثال یک آزمون ۱۰ گرم با ۹۰ میلی گرم از BPW مخلوط شد. این استاندارد برای آزمون های ۱۰ گرم با ۱۰ میلی گرم تأیید شده است. یک آزمون کوچکتر، ممکن است بدون نیاز به

آگار به میزان ۱۵ گرم و آب مقطر به میزان ۱۰۰۰ میلی لیتر است.

از تجهیزات معمول در آزمایشگاه میکروبیولوژی (طبق استاندارد ملی ایران شماره ۹۸۹۹) استفاده شد. برای آماده سازی آزمایش به استانداردهای ملی ایران شماره ۸۹۲۳-۱، ۸۹۲۳-۴ و ۸۹۲۳-۵ و یا استانداردهای ملی اختصاصی مربوط به هر فرآورده مطابق استانداردها انجام گرفت.

شمارش کلنی ها: آزمون های به مقدار X گرم را به 9X میلی لیتر محلول رقیق کننده افزوده شد و خوب مخلوط (۱۰ سوسپانسیون اولیه) شد تا به رقت ۱۰⁻ رسید. در صورت نیاز به رقت های بعدی ۱ میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به ۹ میلی لیتر از محلول رقیق کننده اضافه شد.

با استفاده از یک پی پت سترون، یک میلی لیتر از سوسپانسیون اولیه به هر یک از دو پلیت سترون افزوده شد. در صورت نیاز برای سایر رقت های اعشاری نیز با استفاده از یک پی پت سترون این کار تکرار گردید. به هر یک از پلیت ها حدود ۱۵ تا ۲۰ میلی لیتر از محیط کشت (محیط کامل) با دمای ۴۴ تا ۴۷ درجه سلسیوس افزوده و کاملاً مخلوط شد. زمان لازم بین تلقیح و افزودن محیط کشت بیشتر از ۱۵ دقیقه نشد. پلیت های آماده شده پس از بستن محیط کشت به صورت وارونه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و به مدت زمان ۵ روز گرمخانه گذاری شد.

پرگنه ها بعد از ۳، ۴ و ۵ روز بعد از گرمخانه گذاری بررسی و بعد از پنج روز پلیت های حاوی کلنی شمارش شد. پلیت هایی را که دارای حداقل ۱۰ و حداکثر ۱۵۰ کلنی می باشند برای شمارش انتخاب شد. با استفاده از رابطه زیر تعداد کپک ها و مخمرهای موجود در آزمایش بر حسب میانگین تعداد شمارش شده از دو رقت متوالی محاسبه شد:

کلنی کاملاً مجزا از هر پلیت گرم خانه‌گذاری شده برای آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی انتخاب شد. برای آزمون تأییدی بیوشیمیایی از آزمون اکسیداز و آزمون تخمیر استفاده گردید.

۴- تفسیر نتایج: هر یک از کلنی‌های مشخص انتخاب شده از یک کشت مجدد دارای واکنش اکسیداز منفی و گلوکز مثبت، نمونه‌ای که از آن کشت مجدد تهیه شده‌است، از نظر اشرشیاکلی مثبت در نظر گرفته‌شد. براساس تفسیر نتایج، وجود یا عدم وجود اشرشیاکلی در $x \text{ g}$ با $x \text{ ml}$ از یک آزمون از فرآورده، یا بر روی مساحت سطح سواب شده یا در کل کالاهای (مانند پای پوش پارچه ای) نشان داده‌شد.

روش شمارش سالمونلا:

جستجو و شناسایی سالمونلا چهار مرحله دارد که در استاندارد ملی ایران ۱-۱۸۱۰ بیان شده‌است.

۱- مرحله پیش غنی سازی: سالمونلا ممکن است به تعداد کم و اغلب همراه با تعداد قابل توجهی از سایر باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه یا خانواده‌های دیگر همراه باشد. به منظور فراهم کردن امکان جستجو و شناسایی تعداد کم سالمونلا یا سالمونلاهای آسیب‌دیده پیش‌غنی‌سازی انجام شد.

نمونه موردآزمون در آب پپتونه بافری که به دمای محیط آزمایشگاه رسیده‌است، تلقیح می‌شود و به مدت زمان ۱۸ ساعت در دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شد. برای مقادیر بالا (برای مثال: یک لیتر یا بیشتر) آب پپتونه بافری به دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس رسانده شد و سپس با نمونه موردآزمون مخلوط شد.

۲- کشت انتخابی: از کشت به دست آمده به محیط کشت راپاپورت واسیلیادیس همراه با سویا (RVS) براث) یا راپاپورت واسیلیادیس نیمه جامد اصلاح شده (MSRV) آگار و مولر کافمن تتراتیونات نووبیوسین براث (MKTTn) براث) تلقیح شد. RVS براث یا

اثبات اضافی استفاده شود، مشروط بر این که نسبت مشابه بین آب گوشت غنی کننده و آزمون حفظ شود. اگر در بررسی صحنه گذاری تصدیق نشان داده شود که آزمون بزرگتر از آنچه که در ابتدا تأیید شده، اثرات نامطلوب روی جستجو و شناسایی انتروباکتریاسه ندارد، یک آزمون بزرگتر نیز می‌تواند مورد استفاده قرار گیرد.

سوسپانسیون اولیه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. روش آزمون با جداسازی و انتخاب کلنی‌ها برای تأیید ادامه دادیم.

با استفاده از حلقه کشت از محیط غنی سازی شده برداشته‌شد و به صورت خطی روی سطح پلیت حاوی محیط کشت انتخابی کشت شد، سپس پلیت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرم خانه‌گذاری شد.

۳- تأیید کلنی‌های مشکوک: کلنی‌های مشخص، به رنگ صورتی تا قرمز یا ارغوانی هستند (با یا بدون هاله رسوبی)، کلنی‌های مشکوک از پلیت‌های گرم‌خانه‌گذاری شده علامت‌گذاری شد. حداقل یک کلنی مشکوک برای کشت مجدد و انجام آزمون‌های تأییدی بیوشیمیایی انتخاب شد. اگر نتیجه منفی بود، حداکثر تا چهار کلنی مشکوک انتخاب شد.

اگر بیشتر از یک کلنی مشخص از نظر ظاهری وجود داشت، یک کلنی از هر مورفولوژی برای کشت مجدد انتخاب شد. بعضی از اشرشیاکلی‌ها ممکن است روی محیط کشت کلنی‌های بی‌رنگ ایجاد کنند، بنابراین وقتی هیچ کلنی مشخصی وجود نداشته‌باشد، کلنی‌های متمایل به سفید برای تأیید انتخاب شد. کلنی‌های انتخاب شده برای تأیید را روی محیط کشت غیرانتخابی (مانند پلیت‌های آگار مغذی) کشت خطی دادیم. سپس پلیت‌ها را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرم‌خانه‌گذاری کردیم. یک

پیش از استفاده، محیط کشت آب پپتونه بافری به دمای اتاق رسانده شد.

از آزمون (وزنی یا حجمی) به محیط کشت آب پپتونه بافری (وزنی یا حجمی) افزوده تا رقت یک دهم حاصل شد. برای این منظور، ۲۵ گرم آزمون با ۲۲۵ میلی لیتر از محیط کشت آب پپتونه بافری مخلوط شد. برای مقادیر بیشتر (برای مثال: یک لیتر یا بیشتر) توصیه می شود قبل از مخلوط کردن آزمون، محیط کشت در دمای بین ۳۴ تا ۳۸ درجه سلسیوس گرم شود.

نتایج

۲۰ نمونه پودر گوشت و ۲۰ نمونه خوراک آماده در شهرهای شیراز، اوز، لامرد، کوه چنار و مرودشت از نظر وجود سالمونلا، اشرشیاکلی و قارچ مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج ارائه شده در جدول و نمودار (۱) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه پودر گوشت ۱ نمونه و از ۱۰ نمونه خوراک ۲ نمونه و در کوه چنار ۱ نمونه از ۲ نمونه پودر گوشت از نظر آلودگی به سالمونلا مثبت اعلام گردید. در ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودر گوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودر گوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه ای از آلودگی به سالمونلا مشاهده نگردید.

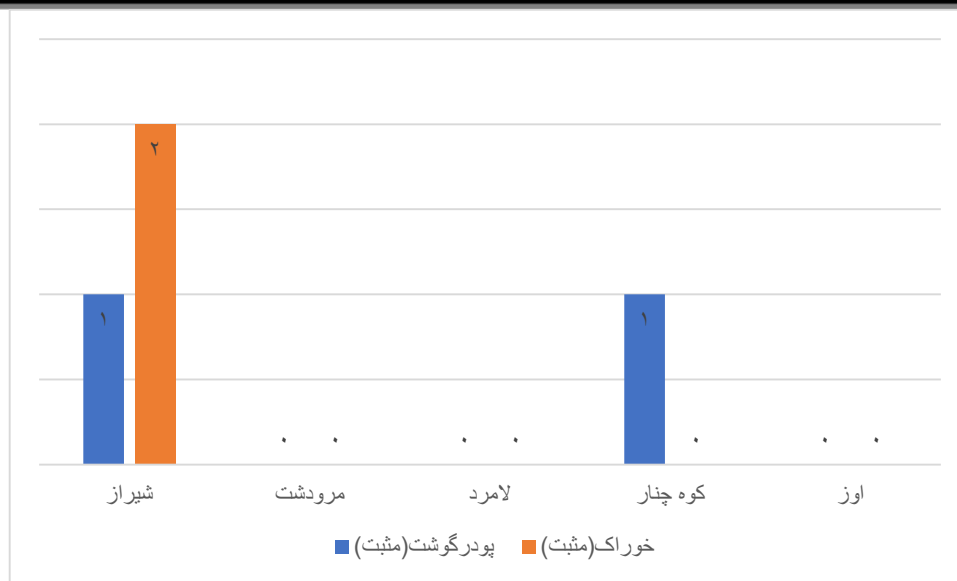
جدول (۱) توزیع فراوانی جدایه های سالمونلا در نمونه های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه ها	تعداد نمونه های مثبت
شیراز	پودر گوشت	۱۰	۱
شیراز	خوراک	۱۰	۲
مرودشت	پودر گوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودر گوشت	۲	۱
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودر گوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودر گوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰

MSRV آگار در دمای ۴۱۵ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت و MKTTn براث در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شد. برای برخی محصولات، ممکن است محیط کشت (های) ۳-کشت روی محیط های جامد انتخابی: غنی کننده انتخابی، به مدت زمان ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری بیشتر نیاز داشته باشند. از کشت های به دست آمده روی دو محیط کشت جامد انتخابی زیر کشت داده شد:

گزیلوز الیزین دئوکسی کوال آگار (XLD آگار)، هر محیط کشت انتخابی جامد دیگر برای تکمیل XLD آگار، XLD آگار در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شد و پس از ۲۴ ساعت بررسی شد. آگار انتخابی دوم مطابق با دستورالعمل سازنده گرمخانه گذاری شد.

۴-تایید کلنی های سالمونلا: کلنی های سالمونلای فرضی مجدداً کشت داده شد و با استفاده از آزمون های بیوشیمیایی و سرولوژیکی مناسب تأیید شد. آزمون و سوسپانسیون اولیه در موارد معمول، برای تهیه سوسپانسیون اولیه از محیط کشت پیش غنی کننده (آب پپتونه بافری) به عنوان رقیق کننده استفاده شد.

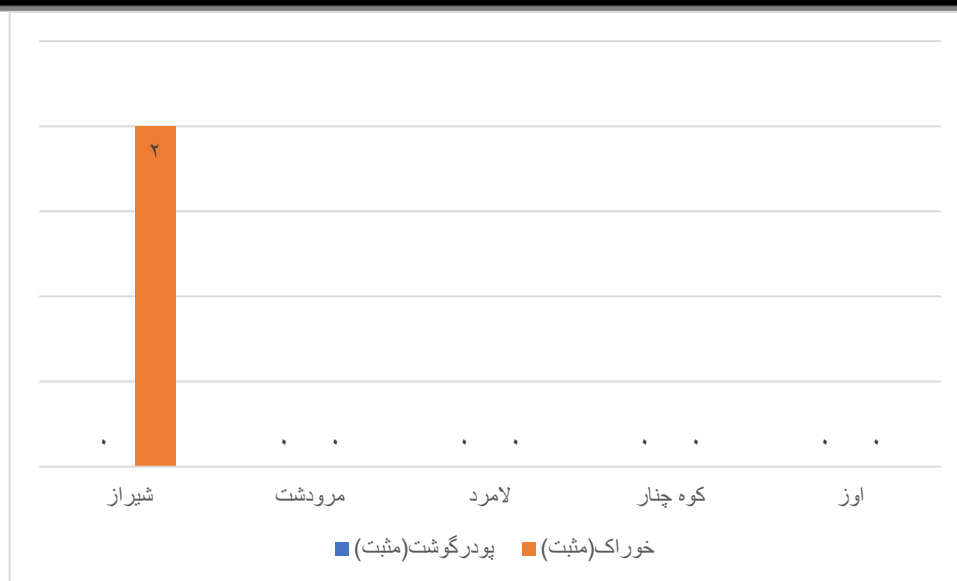


نمودار (۱) توزیع فراوانی جدایه‌های سالمونلا در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول و نمودار (۲) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه خوراک ۲ نمونه از نظر آلودگی به قارچ مثبت اعلام گردید. در ۱۰ نمونه پودر گوشت شیراز، ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودر گوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه پودر گوشت کوه چنار، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودر گوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه ای از آلودگی به قارچ مشاهده نگردید.

جدول (۲) توزیع فراوانی جدایه‌های قارچ در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت
شیراز	پودر گوشت	۱۰	۰
شیراز	خوراک	۱۰	۲
مرودشت	پودر گوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودر گوشت	۲	۰
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودر گوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودر گوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰

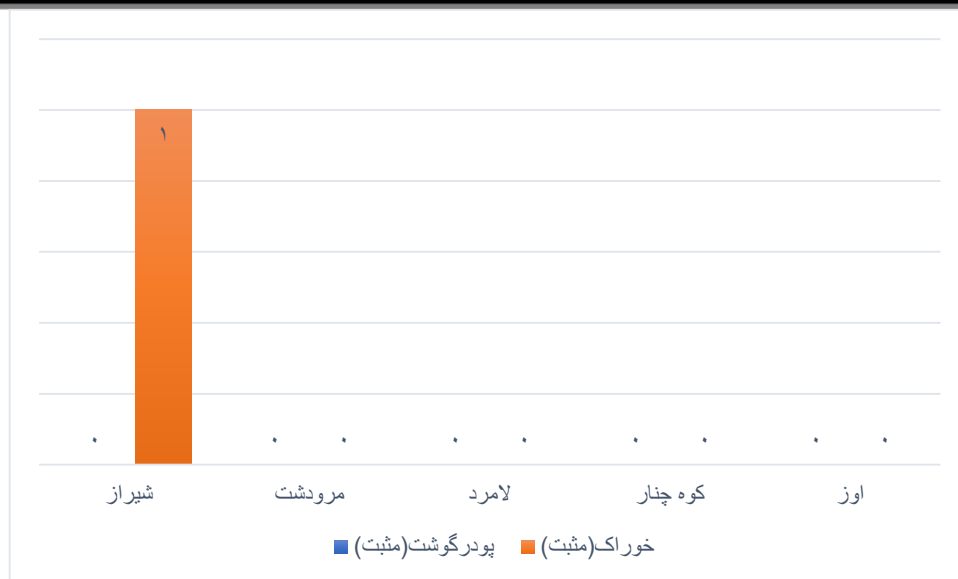


نمودار (۲) توزیع فراوانی جدایه‌های قارچ در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

بر اساس نتایج ارائه شده در نمودار (۳) در شهر شیراز از ۱۰ نمونه خوراک ۱ نمونه از نظر آلودگی به اشریشیاکلی مثبت اعلام گردید. در ۱۰ نمونه پودر گوشت شیراز، ۴ نمونه پودر گوشت مرودشت، ۴ نمونه خوراک مرودشت، ۲ نمونه پودر گوشت لامرد، ۲ نمونه خوراک لامرد، ۲ نمونه پودر گوشت کوه چنار، ۲ نمونه خوراک کوه چنار، ۲ نمونه پودر گوشت اوز و ۲ نمونه خوراک اوز نشانه‌ای از آلودگی به اشریشیاکلی مشاهده نگردید.

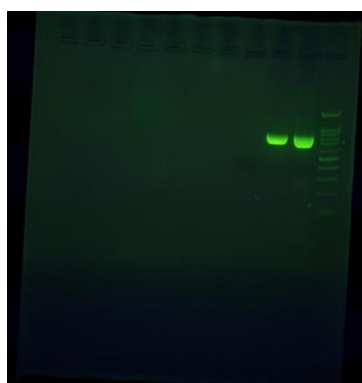
جدول (۳) توزیع فراوانی اشریشیاکلی در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

شهر	نمونه	تعداد کل نمونه‌ها	تعداد نمونه‌های مثبت
شیراز	پودر گوشت	۱۰	۰
شیراز	خوراک	۱۰	۱
مرودشت	پودر گوشت	۴	۰
مرودشت	خوراک	۴	۰
کوه چنار	پودر گوشت	۲	۰
کوه چنار	خوراک	۲	۰
لامرد	پودر گوشت	۲	۰
لامرد	خوراک	۲	۰
اوز	پودر گوشت	۲	۰
اوز	خوراک	۲	۰



نمودار (۳) توزیع فراوانی جدایه‌های اشریشیاکلی در نمونه‌های خوراک و پودر گوشت در شهرهای شیراز، مرودشت، لامرد، کوه چنار، اوز

از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲,۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشریشیاکلی (۲,۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷,۵ درصد) مثبت گزارش شد.



تصویر (۱) PCR نمونه آلوده به سالمونلا

بحث

آلودگی قارچی و به ویژه میکوتوکسین‌ها یک مشکل جهانی محسوب می‌شود و مطابق با آمار سازمان کشاورزی و غذای سازمان ملل متحد تقریباً ۲۵ درصد دانه‌های زراعی جهان دارای آلودگی قارچی هستند و طبق گزارش WHO میکوتوکسین‌ها به ویژه آفلاتوکسین یکی از عوامل موثر در بروز بیماری‌های ناشی از غذا گزارش شده‌اند.

خوراک دام بیش از ۸۰ درصد هزینه‌های واحد پرورش را شامل می‌شود. مواد اولیه ای که جهت تامین جیره غذایی دام از مکان‌های مختلف تهیه می‌گردد امکان انتقال آلودگی و مشکلات مختلف را برای دامداری به همراه خود دارد. یکی از این مشکلات، قارچ‌ها و سموم تولیدی آن‌ها یعنی میکوتوکسین‌ها می‌باشد.

- آسپرژیلوس پارازیتیکوس گزارش کردند. (sala et al., 2005)
- مطالعه دونهام و همکارانش در سال ۲۰۱۳ در تگزاس نشان داد تقریباً ۳۳ درصد جیره‌های خوراک حیوانات که عمدتاً از نوع ذرت است آلوده به آفلاتوکسین هستند (Dunham et al., ۲۰۱۷).
- باتیالنی و همکاران در مطالعه خود نشان دادند تغییرات آب و هوایی مهم‌ترین علت افزایش آلودگی ذرت‌ها به آفلاتوکسین است. آن‌ها بیان کردند آلودگی به آفلاتوکسین در ۱۰۰ سال آینده به عنوان عامل مهمی در آلودگی محصولات غذایی مطرح خواهد بود (Battilani et al., ۲۰۱۶).
- هاجنال و همکارانش نیز در سال ۲۰۱۵ در صربستان نشان دادند که ۲۱ درصد ذرت‌های کشت شده در این کشور برای مصرف انسانی مناسب نیستند و این موضوع در فصول گرم سال بیشتر خودنمایی می‌کند (Hajnal et al., ۲۰۱۷).
- پژوهش میاحی و همکاران نیز بر روی مرغ‌های کشتار شده در اهواز نشان داد ۳۷/۵ درصد از جگرها، ۲۲/۵ درصد از عضلات سینه و ران مرغ‌های کشتار شده آلوده به سم آفلاتوکسین است (Mayahi et al., ۲۰۰۸).
- سالمونلوز یکی از شایع‌ترین عوامل عفونت غذایی به شمار می‌رود که ریشه‌کنی آن در هیچ یک از کشورهای جهان تاکنون امکان پذیر نبوده است. مهم‌ترین مواد غذایی آلاینده عبارتند از گوشت طیور، تخم‌مرغ، گوشت قرمز و شیر.
- مشابه مطالعه فعلی، کاکس و همکاران (۱۹۸۳) سالمونلا را در ۹۲ درصد از نمونه‌های پودر گوشت و استخوان جمع‌آوری شده از کارخانه‌های تجاری شناسایی کردند. بنسینک (۱۹۷۹) همچنین گزارش داد که ۱۱۴ نمونه از ۱۶۴ نمونه پودر گوشت و
- در مطالعه‌ای که رضایی و همکاران (۲۰۱۴) به منظور تعیین میزان آلودگی قارچی خوراک طیور انجام دادند، ۱۶ نمونه خوراک را از استان مرکزی جمع‌آوری کردند که ۳۱/۳ درصد نمونه‌ها آلوده بودند. این محققین متوسط سطح آلودگی به قارچ‌ها را $6/4 \times 10^4$ واحد تشکیل دهنده کلونی/گرم گزارش کردند (Rezaei et al., 2014).
- در مطالعه‌ای که دیوید و اگونالد (۲۰۱۳) در نیجریه بر روی میزان آلودگی قارچی در ۱۰ نوع خوراک انجام دادند نشان دادند که در مجموع ۵ جنس قارچی آسپرژیلوس، فوزاریوم، پنی‌سیلیوم، رایزوپوس و آبسیدیا جداسازی گردید. ترتیب فراوانی جدایه‌های گزارش شده توسط این محققین به صورت آسپرژیلوس فالووس (۲۰/۵۹ درصد)، آسپرژیلوس نیجر (۱۷/۶۵ درصد)، فوزاریوم مونیلی فورم (۱۴/۷۱ درصد)، آبسیدیا (۱۱/۷۶ درصد)، رایزوپوس (۸/۸۲)، پنی‌سیلیوم اکسپانسونوم (۸/۸۲ درصد) پنی‌سیلیوم ایتالیکولوم و پنی‌سیلیوم کالیثوم و آسپرژیلوس گالکوس هر کدام (۵/۸۸ درصد) بود. (David and Egonald et al., 2013)
- مرو و همکاران (۱۳۹۷) به بررسی آلودگی خوراک دام و طیور به گونه‌های قارچی آسپرژیلوس پرداختند و گزارش کردند که به طور متوسط، ۲۵/۲۷ درصد خوراک دام و ۷۰/۳۱ درصد خوراک طیور آلوده به قارچ آسپرژیلوس بودند. از بین آسپرژیلوس‌های جدا شده، تعداد ۴ گونه فالووس، ۲ گونه ورسیکالر، ۲ گونه فومیگاتوس، ۲ گونه نایجر، ۱ گونه پارازیتیکوس، ۱ گونه اوخراستوس و ۱ گونه ترئوس شناسایی شد. (Marvi et al., 1397)
- سالا و همکاران در سال ۲۰۰۵ با مطالعه ۷۸ نمونه خوراک دام در کشورهای تایلند و ویتنام آلودگی ۹۴ درصد نمونه را به گونه آسپرژیلوس فالووس و

باکتری‌های مقاوم منجر به خطرات بعدی برای مصرف‌کننده می‌شوند و اثر بخشی ضد میکروب‌های درمانی برای درمان بیماری هنوز مورد بحث است (Turnidge et al, 2004). نتایج ما نشان می‌دهد که فعل و انفعالات بین دما، زمان و رطوبت در پلت سازی خوراک قادر به القای مرگ حرارتی E.coli بودند (mamber and katz, et al, 1985). در تحقیقی لاشه گاوهای کشتار شده در کشتارگاه شیراز از نظر آلودگی به E.coli بررسی شدند و ۱/۹٪ آن‌ها آلوده بودند (Tahamtan et al., 2007). همچنین لاشه گوسفندان همان کشتارگاه ۹/۳٪ آلودگی داشتند (Shekarforoush et al., 2008). در سال ۱۳۹۰ در یک دوره نمونه برداری در ارومیه، تعداد ۱۳۴ نمونه گوشت طیور که از نقاط مختلف بدن ماکیان تهیه شده بود و از ۳۷ درصد نمونه‌ها اشریشیاکلی جدا گردید (Sadeghi zali et al, 2011).

نتیجه گیری

مطالعات به طور کلی نشان داد، درصد بالایی از نمونه های پودر گوشت و خوراک آماده به قارچ، سالمونلا و اشریشیاکلی آلوده نبودند. بطوری که از تعداد ۴۰ نمونه مورد بررسی، یک نمونه خوراک آلوده به قارچ (۲/۵ درصد)، یک نمونه خوراک آلوده به اشریشیاکلی (۲/۵ درصد) و سه نمونه (یک نمونه خوراک و دو نمونه پودر گوشت) آلوده به سالمونلا (۷/۵ درصد) مثبت مشاهده شد. این ارقام نشان می دهد که در کارخانجات تولید خوراک دام و طیور و کشتارگاه‌های استان فارس پروتکل‌های بهداشتی جهت پیشگیری از ابتلا خوراک و پودر گوشت به قارچ، سالمونلا و اشریشیاکلی انجام می‌شود. با این حال برای ارتقاء سلامت خوراک و پودر گوشت بایستی پروتکل‌های بهداشتی با دقت بیشتری رعایت گردد.

استخوان (۶۹/۵ درصد) به سالمونلا آلوده بودند. (Cox et al, 1983)

در تحقیقی دیگر اصغری (۱۹۹۶) تعداد ۶۵۰ مورد گوشت قرمز (۳۵۰ نمونه گوشت گوسفند و ۳۰۰ نمونه گوشت گوساله) از شهر تهران جمع آوری و مورد مطالعه قرار داد. جمعاً ۲ مورد سالمونلا انتریتیدیس و ۵ مورد سالمونلا تیفی موریوم جدا و شناسایی گردید.

(asghari et al, 1996)

در مطالعه حکیمی و همکاران (۲۰۰۴) تقریباً مشخص شده است که وسایل موجود در مراکز فروش گوشت به ویژه دستگاه های فرآوری گوشت، و حتی کارگران میتوانند از عوامل عمده آلودگی سالمونلایی به صورت ثانویه باشند. (Hakimi et al, 2004)

مطالعه‌ای دیگر در ترکیه در سال ۲۰۱۶ شیوع انتروباکتریاسه و سالمونلا در ۹۰ نمونه پودر ضایعات کشتارگاهی طیور را مورد بررسی قرار داد و آلودگی به سالمونلا را ۲۶/۵ درصد گزارش کردند (Yalçın and Dalkılıç, et al, 2016).

اشریشیاکلی نیز از باکتری‌های روده‌ای است که آلودگی های ناشی از آن در بین انسان و حیوانات در همه جا پراکنده است. یکی از شایع ترین سروتیپ های این باکتری ها E.coli H7:O157 می‌باشد که بیشتر از گوشت گاوی که حرارت کافی ندیده است جدا و گزارش شده است.

در مطالعه کاستا و همکاران (۲۰۰۷) E.coli از ۶۵/۹ درصد از مواد تشکیل دهنده خوراک و خوراک طیور شناسایی شد تا مشخصات مقاومت آن‌ها به داروهای ضد میکروبی تعیین شود. (Costa et al, 2007)

همانطور که مامبر و کاتز (۱۹۸۵) نشان دادند، کلونیزاسیون از خوراک می‌تواند از نظر اپیدمیولوژیک مهم‌تر از فشار انتخابی اعمال شده توسط استفاده از داروهای ضد میکروبی باشد. اینکه تا چه حد این

- 1-Anonymous. (2009). Regulation (EC) No 1774/2002 of the European Parliament and of the Council of 3 October 2002 laying down health rules concerning animal by-products not intended for human consumption.
- 2-Atherstone, C., Grace, D., Lindahl, J. F., Kang'ethe, E. K., & Nelson, F. (2016). Assessing the impact of aflatoxin consumption on animal health and productivity. *African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development*, 16(3), 10949-10966.
- 3-Costa, P. M., Oliveira, M., Bica, A., Vaz-Pires, P., & Bernardo, F. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from poultry feed and feed ingredients. *Veterinary Microbiology*, 120(1-2), 122-131.
- 4-Cox, N. A., and J. E. Bailey. 1991. Present strategies to intervene in *Salmonellae* colonization of poultry. Pages 1–3 in *Proc. 38th Maryland Nutr. Conf.* Univ. Maryland, College Park.
- 5-da Silva Cardoso, V., Vermelho, A. B., Ribeiro de Lima, C. A., Mendes de Oliveira, J., Freire de Lima, M. E., Pinto da Silva, L. H., ... & Miranda Danelli, M. D. G. (2016). Antigenotoxic effect of piperine in broiler chickens intoxicated with Aflatoxin B1. *Toxins*, 8(11), 316.
- 6-David O.M. and Ogunlade J.T. Qualities of poultry feeds produced by local small-scale feed mills in Ekiti State, Nigeria. A public health and feed safety study. 2013; 3(9): 297-302.
- 7-Davies, R. H., and A. D. Wales. 2010. Investigations into *Salmonella* contamination in poultry feedmills in the United Kingdom. *J. Appl. Microbiol.* 109:1430–1440.
- 8-Hakimi Najafabadi, S. (2004). Isolation of *Salmonella* from Tehran butcheries and their utensils and equipments. 7th Iran Congress of Microbiology, Semnan, Iran.
- 9-Hamilton CR, 2002. Real and perceived issues involving animal proteins. In *Protein Sources for the Animal Feed Industry*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Expert Consultation and Workshop, Bangkok, 29 April, 255–276.
- 10-Kumar, P., Mahato, D. K., Kamle, M., Mohanta, T. K., & Kang, S. G. (2017). Aflatoxins: A global concern for food safety, human health and their management. *Frontiers in microbiology*, 7, 2170.
- 11-Maciorowski KG, Jones FT, Pillai SD, Ricke SC, 2004. Incidence, sources, and control of foodborne *Salmonella* spp. in poultry feeds. *World Poultry Sci J.* 60, 446-457.
- 12-Rezaei M. Parviz M., Vakili Saatloo N., Rezapour I. and Assadi A. Fungal Contamination of Feed Material Manufactured in Iran with Emphasis on Its Importance in Safety of Animal Origin Foods. *Journal of Food Quality and Hazards Control*. 2014; 81-84.
- 13-Sadeghi Zali, M.H., Hashempour, A., Delshad, R., Kalbkhani, M., Khodayi, H. and Asadi, S. (2011). Evaluation of salmonella infection in poultry carcasses marketed in Urmia. 2nd International Congress of Food Hygiene, Tehran, Iran.
- 14-Shekarforoush S, Tahamtan Y, Pourbakhsh A. (2008). Detection and frequency of *Stx2* gene in *Escherichia coli* O157 and O157:H7 strains isolated from sheep carcasses in Shiraz-Iran. *Pak J Biol Sci.* 2008 Apr 15; 11(8):1085-92.

-
- 15-Soltandallal, M.M., Doyle, M.P., Rezadehbashi, M., Dabiri, H., Sanaei, M., Modarresi, SH., Bakhtiari, R., Sharifiy, K., Taremi, M., Zali, M.R. and Sharifi-Yazdi, M.K. (2010). Prevalence and antimicrobial resistance profiles of salmonella serotypes, campylobacter and Yersinia spp. isolated from retail chicken and beef, Tehran, Iran. Food Control, 21: 388–392.
- 16-Tahamtan, Y., Pourbakhsh, S.A. and Shekarforoush S.S. (2007). PCR detection of Escherichia coli O157:H7 directed from slaughtered cattle in Shiraz, Iran, Archives of Razi Institute, 61: 1-6.
- 17-Yalçın, H., & Dalkılıç, B. (2019). Incidence of Enterobacteriaceae and Salmonella spp. in Poultry By-Product Meal for Sale on Retail Market in Adana and Mersin. Mehmet Akif Ersoy University Journal of Health Sciences Institute, 4(1).
- 18-Zhang, Y.J., Wu, H.C., Yazici, H., Yu, M.W., Lee, P.H., and Santella, R.M. (2012). Global hypomethylation in hepatocellular carcinoma and its relationship to aflatoxin B1 exposure. World Journal of Hepatology 4: 169-175.

Fungi counting, Escherichia coli counting and Salmonella detection from waste centers (meat meal) and livestock, poultry and aquaculture factories

Marhamatizadeh M H^{1*}, Kazemzadeh Shirazi K², Hasanzadeh M³, Jamali Z³, Nafisi S A H³, Famouri S M³

- 1- Department of Food Safety and Quality Control, Kazerun Branch, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
- 2- Graduate of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun, Iran
- 3- Student of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Islamic Azad University, Kazerun, Iran

*Corresponding author: Drmarhamati@gmail.com

Abstract:

Considering that the main way for fungi and bacteria to enter livestock and poultry breeding centers and finally to the human food chain is food, so accurate information about the amounts of *Escherichia coli*, *Salmonella* and fungi in meat meal samples and animal, poultry and aquatic feed is essential to control them. In this study, fungal counting tests, *Escherichia coli* bacterial counts and *Salmonella* detection were performed from waste centers (meat meal) and livestock, poultry and aquaculture factories in different parts of Fars province. A total of 40 samples (20 samples of meat meal, 20 samples of prepared feed) weighing approximately 1500 grams were taken in order to investigate the contamination of samples with different fungi by the method of counting fungi according to the national standard of Iran, to count the bacterium *Escherichia coli* according to the national standard of Iran No. 3456 and to detect *Salmonella* by the method of searching *Salmonella* in food according to the national standard of Iran NO. 1810. The results of this study showed that out of 40 samples, Fungi detected in one of feed samples (2.5%), *Escherichia coli* detected in one of feed samples (2.5%) and the test results for *Salmonella* in three samples (one feed sample and two meat meal samples) were positive (7.5%). This indicates that hygienic protocols are performed in livestock and poultry feed factories and slaughterhouses in Fars province to prevent the infection of feed and meat meal with fungi, *Salmonella* and *Escherichia coli*.

Keywords: Meat meal, Feed, Fungi, *Salmonella*, *Escherichia coli*