# مطالعه وضعیت میکروبی خط کشتار گاو و تعیین نقاط کنترل بحرانی به منظور پیاده سازی سیستم HACCP

تیوا کفیلی[1]، زهرا امام جمعه[2*]، منوچهر کازرونی تیمسار[3]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پردیس کشاورزی، دانشکده مهندسی بیوسیستم، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران
۲- استادیار، پردیس کشاورزی، دانشکده مهندسی بیوسیستم، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران
۳- دانشیار، پردیس کشاورزی، دانشکده مهندسی بیوسیستم، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران

## چکیده

در این تحقیق، میزان کلی باکتریهای مزوفیل هوازی با انجام نمونه برداری با تکنیک سو آب از $25\ cm^2$ از سطوح لاشه (گردن، سینه، ران، ماهیچه پا، قلوه گاه، سر دست و دنده‌ها)، پس از پایان هر مرحله کشتار (پوست کنی، تخلیه امعاء و احشاء، شقه کردن، چربی‌گیری و شستشوی مقدماتی و شستشوی نهایی) تعیین شد. مشاهدات کاهش میزان بار میکروبی پس از انجام شستشوی مقدماتی $0/2\ \log cfu.cm^{-2}$ و نهایی دراکثر نقاط را نشان داد. بیشترین میزان افزایش تغییرات بار میکروبی نیز پس از پایان پوست کنی، در تمام مناطق خارجی سطح لاشه ($3/5-2/5\ \log cfu.cm^{-2}$) و پس از پایان تخلیه امعاء و احشاء در نواحی سر دست حدود ($0/5\ \log cfu.cm^{-2}$) و سینه حدود ($1\ \log cfu.cm^{-2}$) دیده شد؛ همچنین، بر روی نمونه های گرفته شده آزمونهای تشخیصی پاتوژنهای *سالمونلا* و *اشرشیا کلی*، انجام شد که ملاحظه گردید مرحله پوست کنی، بیشترین افزایش را در میزان آلودگی اشرشیا کلی (۱۶/۶٪) و مرحله تخلیه امعاء و احشاء بیشترین افزایش در میزان آلودگی به سالمونلا (۹/۲٪)، را در لاشه پدید می آورد. پس از پایان شستشوی نهایی نیز، سالمونلا در ۷/۱٪ و اشرشیا کلی در ۱۱/۹٪ از نمونه‌های سوآب شناسایی شد. نهایتا" با توجه به اثرات میکروبیولوژیکی هر یک از مراحل کشتار بر روی لاشه و خط کشتار، نقاطی از فرایند کشتار که می‌توانند به‌عنوان CCP در طرح HACCP مطرح شوند، مورد بررسی قرار گرفتند.

**کلید واژگان:** کشتارگاه گاو، HACCP ، سالمونلا، اشرشیا کلی، نقاط کنترل بحرانی

### ۱-مقدمه

گوشت[1] قرمز یکی از مهمترین اجزای رژیم غذایی انسان، در کلیه جوامع به‌شمار می‌رود؛ به‌طور کلی، می‌توان گفت که گوشت در صورت فراوری صحیح قبل از مصرف یک فراورده سالم است اما هنگامی که عملیات بهداشتی در تهیه آن به درستی مورد توجه قرار نگیرد، میکروارگانیسمهای عامل فساد مواد غذایی می‌توانند زنده مانده و تکثیر یابند. بدلیل ماهیت خود گوشت و تهیه آن از منابع حیوانی، عدم وجود فر ایند حرارتی در حین کشتار و تاثیر اندک انجماد در کاهش بار میکروبی، گوشت خام در گروه غذاهای با ریسک بالای میکروبی قرار دارد؛ بنابراین، نیاز به روشهای کنترلی و پیشگیرانه در تولید آن احساس می‌گردد [۲،۱].این اساس، امروزه ادارات دارویی و غذایی کشورهای

*مسوول مکاتبات: emamj@ut.ac.ir

پیشرفته کلیه کشتارگاه‌ها و واحدهای تولیدی گوشت (گاو، گوسفند، طیور، خوک)، را ملزم به پذیرش و اعمال سیستم کنترلی HACCP نموده اند که مبتنی بر روشهایی است که به‌طور اصولی و علمی و با هدف جلوگیری، حذف یا کاهش خطرات در مواد غذایی عمل می کند [۳].

این سیستم در سال ۱۹۵۹ به‌وسیله شرکت پیلسبری[1] ابداع شد و در خلال سالهای ۱۹۷۵-۱۹۸۵ به‌طور جدی وارد صنایع غذایی گردید. کدکس[2] نیز در طی سالهای ۱۹۹۱- ۱۹۹٤ آنرا پذیرفت و ضوابط آن را منتشر ساخت. این سیستم دارای مفاهیمی با تعاریف زیر است:

**۱- نقطه کنترل[3] (CP):** نقطه‌ای در سیستم فرایند غذایی که عدم کنترل آن خطرات جدی در سلامت محصول ایجاد کند.

**۲- نقطه‌کنترل بحرانی[4] (CCP):** مرحله‌ای که در آن نظارت برای جلوگیری یا حذف آلودگی تا رسیدن به سطح قابل قبول ضروری است.

**۳- محدوده بحرانی[5]:** برای CCP، یک یا چند محدوده مشخص تعیین می شود تا از کنترل کردن خطر به طور مؤثر در CCP اطمینان یابیم.

**٤- انحراف[6]:** عدم دستیابی به حد بحرانی برای یک CCP.

**۵- خطر[7]:** هر عامل فیزیکی، شیمیایی یا بیولوژیکی که اگر از حد مجازی تجاوز کند بر سلامت محصول اثر معکوس داشته باشد.

**٦- مشاهده و مراقبت[8]:** به عملیات مشاهده یا معیارهای نظارتی برای ارزیابی اینکه آیا یک CCP تحت کنترل است یا خیر، اطلاق می شود.

**۷- رسیدگی و تایید[9]:** روشها و آزمایشهاتی که هماهنگی و توافق بین سیستم HACCP و طرح HACCP واحد مربوط را تعیین می کند [٤].

امروزه این سیستم بصورت گسترده در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است، چرا که در صورت اجرای صحیح، می تواند هر منطقه یا نقطه ای را که ایجاد خطر (که می تواند شامل آلودگی میکروبی، فیزیکی و شیمیایی باشد) یا بحران می کند، کنترل کند.

سیستم HACCP کارامد، باید برمبنای داده‌های پایه‌ای صحیح در مورد نوع و میزان آلودگیهای ایجاد شده در هر مرحله تولید بنیان نهاده شود و همچنین بایستی ارزیابی کافی از نقش احتمالی هر عنصر فرایند تولید در بوجود آوردن خطرات تهدید کننده سلامتی یا کیفیتی بعمل آید [۵]. از آنجا که میزان و نوع میکروارگانیسمها برای هر کشتارگاه متغیر است؛ بنابراین، تعیین داده های مرجع مربوط به هر واحد و استقرار سیستم اختصاصی HACCP برای آن، می تواند مفید باشد [٦]. این داده‌ها شامل تعیین میزان فعلی بار میکروبی لاشه‌ها (به‌عنوان معیار مستقیم آلودگی) و شناسایی میکروارگانیسمهای بیماریزایی چون اشرشیا کلی (بعنوان معیار غیر مستقیم آلودگی مدفوعی) و سالمونلا (عامل بیماری سالمونلوزیس) در هر مرحله از کشتار است [۷].

با استناد به این داده‌ها شناسایی نقاط کنترل (CPs) و نقاط کنترل بحرانی (CCPs) که از اولین مراحل اجرای سیستم HACCP است، صورت می‌گیرد. چنین مطالعاتی دراکثر کشتارگاه‌های دنیا انجام شده و مقالات متعددی نیز منتشر گردیده است [۸ ، ۹، ۱۰، ۱۱]. اما تاکنون در هیچ یک از واحدهای کشتاری دام ایران تحقیقی برای اجرای این سیستم به عمل نیامده بود. تنها پیمان روحی در سال ۱۳۷۹، بر اساس الگوی HACCP مطالعه‌ای در خط کشتار طیور انجام داده بود که نتایج آن بصورت پایان‌نامه کارشناسی ارشد ارائه شد [۱۲].

در این تحقیق با تعیین بار میکروبی و شناسایی میکروارگانیسمهای اشرشیا کلی و سالمونلا و تجزیه و تحلیل

1. Pillsbury
2.Codex
3.Control point
4.Critical control point
5.Critical limit
6.Deviation
7.Hazard
8.Monitoring
9.Verification

خطرات احتمالی در هر مرحله کشتار، علاوه بر فراهم آوردن داده‌های اختصاصی مربوط به کشتارگاه، نقاط CPs و CCPs خط کشتار تعیین شد.

## ۲- مواد و روشها

### ۲-۱- مراحل کشتاری

در این کشتارگاه روزانه حدود۳۰- ۲۵ لاشه مورد استحصال قرار می‌گرفت که در این تحقیق هر روز، یک لاشه(جمعا ۱۲ لاشه) به‌طور تصادفی انتخاب گردید و پس از اتمام هر مرحله کشتار بر روی مناطقی از لاشه (جدول ۲)، به روش سوآب نمونه برداری انجام شد.

با همین روش از سطوح ابزار و آلات کشتار نیز برای تحقیق کارامدی روش شستشو نمونه برداری شد. لازم به ذکر است در این کشتارگاه پوست کنی دام به صورت مکانیکی (سیستم مکشی) و سایر مراحل بصورت دستی و با ابزار چاقو به اجرا درمی‌آمد که تمامی ابزار قبل از استفاده با آب داغ ٦٠ الی ۷۰°C آبکشی می شدند. برای انجام مرحله شستشوی نهایی نیز، لاشه در معرض دوش عمودی آب سرد (۲۵°C-۲۰) به مدت ۳۰ ثانیه قرار داده می‌شد.

نمونه‌های تهیه شده (٤٥٠ نمونه) به طور جداگانه در وضعیت سترون به آزمایشگاه منتقل شد و سپس آزمونهای تشخیصی اشرشیا کلی و سالمونلا و شمارش کلی میکروبهای هوازی برای هر کدام بعمل آمد.

### ۲-۲- روش نمونه برداری

در این روش از سوآبهای پنبه ای استریل که در محلول آب پپتون بافری[1] قرار گرفته بودند، استفاده شد به این صورت که سوآب بر روی مساحت ۵×۵ سانتیمتر مربع از نقاط(گردن، سردست، سینه، ران، ماهیچه پا، قلوه گاه، دنده‌ها) ده بار به‌طور افقی و ده بار به‌طور عمودی کشیده شد [۱۰، ۱۱].

**جدول ۱** مراحل کشتار و نمونه برداری

| مراحل کشتار | مناطق نمونه برداری | آزمایشات انجام شده |
|---|---|---|
| ۱- بی حس کردن | - | - |
| ۲- ذبح دام | - | - |
| ۳- پوست کنی | گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا | شمارش کلی- شناسایی و شمارش اشرشیا کلی و سالمونلا |
| ٤- تخلیه امعاء و احشاء | گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا، قلوه گاه و دنده ها | شمارش کلی- شناسایی و شمارش اشرشیا کلی و سالمونلا |
| ٥- شقه کردن | گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا، قلوه گاه و دنده ها | شمارش کلی- شناسایی و شمارش اشرشیا کلی و سالمونلا |
| ٦- چربی زدایی سطحی | گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا، قلوه گاه و دنده ها | شمارش کلی- شناسایی و شمارش اشرشیا کلی و سالمونلا |
| ۷- شستشوی نهایی | گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا، قلوه گاه و دنده ها | شمارش کلی- شناسایی و شمارش اشرشیا کلی و سالمونلا |
| ۸- سرد کردن | - | - |

### ۲-۳- نحوه انتقال به آزمایشگاه

نمونه‌های تهیه شده (٤٥٠ نمونه) در ظروف شیشه‌ای دردار و در کنار یخ ۰°C درجه سانتیگراد سریعاً به آزمایشگاه انتقال یافت. آزمایشهای لازم در همان روز انجام شد.

### ۲-٤- آزمونهای میکروبی انجام شده بر روی نمونه های سوآب سطح لاشه

#### ۲-٤-۱- شمارش کلی میکروبی

این آزمون با استفاده از محیط نوترینت آگار[2]، و با روش کشت پور پلیت[3] انجام شد. نمونه‌های ارسالی ابتدا در داخل شیکر[4] (مدل BA 6024 Steward Co.,UK) به مدت یک دقیقه قرار داده شدند. سپس چند بار با حرکتهای عمودی و افقی به صورت سوسپانسیون در آمدند. به‌وسیله پی پتهای یک میلی لیتر، رقتهای (۰/۱، ۰/۰۱، ۰/۰۰۱) تهیه گردید و

1. Baffered Peptone Water

2. Nutrient Agar (Merck Co., Germany)
3. Pour Plate
4. Shaker

سپس با پی پت جداگانه یک میلی لیتر از هر رقت بر روی پلیت سترون ریخته شده و روی آن محیط کشت استریل ذوب شده که تا دمای ۴۵ ±۰/۵°C خنک شده بود به میزان ۲۰- ۱۵ میلی لیتر ریخته شد و سپس با حرکات دایره‌ای و 8 مانند پلیتها به آرامی حرکت داده شدند و پس از جامد شدن محیط، پلیتها به صورت وارونه بمدت ۷۲- ۴۸ ساعت در گرمخانه ۳۷±۰/۵°C قرار داده شدند [۱۳]. سپس کلنیهای رشد کرده شمارش شده و با توجه به رابطه زیر نتایج گزارش شد [۱۴].

که در رابطه فوق:

$$Cs = \frac{N}{V_1 f_1 + V_2 f_2 + \ldots.} \times Vs$$

Cs : تعداد واحدهای پرگنه ساز در حجم مرجع

V1,V2 : حجم نمونه آزمایشی استفاده شده برای رقتهای $f_1$ و $f_2$

$f_2 , f_1$ : رقت مورد استفاده برای حجمهای V1,V2

Vs : حجم مرجع برای بیان تعداد میکرو ارگانیسمها در نمونه

N : کلیه پرگنه های شمارش شده پلیتها در رقتهای مختلف

**۲-۴-۲- آزمون شناسایی اشرشیاکلی**

پس از تهیه محیط کشت بریلیانت گرین مضاعف[1] در لوله‌های آزمایش دورهام وارونه، به مدت ۱۵ دقیقه در اتوکلاو سترون شد. سپس یک میلی لیتر از رقت ۰/۱ حاوی نمونه سوآب را به لوله محتوی محیط کشت در وضعیت سترون منتقل کرده و در دمای ۳۷ ±۰/۵°C به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری شد. بعد از گذشت این مدت، در صورت مشاهده گاز و کدورت چند قطره از آن را به محیط کشت بریلیانت گرین ساده و آب پپتونه استریل اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری در حمام آب ۴۵ ±۰/۵°C احتمال وجود *اشرشیاکلی* در محیط بریلیانت گرین، با مشاهده گاز به صورت حباب زیر لوله دورهام[2] و یا مشاهده حلقه قرمز در اثر افزودن معرف اندول[3] به محیط آب پپتونه، بررسی گردید [۱۵].

**۲-۴-۳- آزمون شناسایی سالمونلا**

۱۵ cc از سوسپانسیون سوآب لاشه به ۲۲۵ cc محیط غنی کننده لاکتوز براث[4] سترون اضافه و بمدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ ±۰/۵°C گرمخانه گذاری شد. سپس به‌وسیله پی پت استریل، ۱ cc به محیط کشتهای سلنیت[5] F و ۱ cc نیز به محیط کشت تتراتیونات[6] حاوی ید که قبلا در لوله‌های آزمایش توزیع ودر اتوکلاو بمدت ۱۵ دقیقه استریل شده بودند، اضافه شده و بترتیب در دماهای ۳۷ ±۰/۵°C و ۴۴ ±۰/۵°C، بمدت ۲۴ ساعت در گرمخانه قرار داده شدند. پس از گذشت این زمان به‌وسیله سوزن کشت سترون از هر محیط، بصورت خطی بر روی محیطهای جامد سالمونلا شیگلا آگار[7] و بریلیانت گرین آگار[8] کشت داده شد و بار دیگر بمدت ۴۸ ساعت در ۳۷ ±۰/۵°C گرمخانه گذاری گردید. پس از گذشت این زمان بر روی کلونیهای مشکوک، آزمونهای بیوشیمیایی تأییدی صورت پذیرفت.

ابتدا محیط کشتهای TSI[9] و LA[10] در لوله‌های آزمایش توزیع شده و پس از سترون سازی در اتوکلاو بمدت ۱۵ دقیقه به صورت مورب منجمد شدند. سوزن کشت سترون آغشته شده به کلونیهای مشکوک ابتدا در سطح مایل کشیده شده و سپس به عمق فرو برده شد. سپس مدت ۲۴ ساعت در گرمخانه با دمای ۳۷ ±۰/۵°C نگهداری گردید.

از آنجا که پرگنه‌های مربوط به سالمونلا، سطح مایل محیط را به رنگ قرمز و عمق محیط را به رنگ زرد تغییر می دهند، و احتمالا نیز گاز و رنگ سیاه تولید خواهند کرد؛ لذا، پرگنه‌های مشکوک دارای این اوصاف تحت آزمونهای تکمیلی اندول و اوره آز قرار داده می‌شد.

1 .Double Birilliant Green (Merck Co., Germany)
2. Dourham

3 .Indole (Merck Co., Germany)
4 .Lactose broth (Merck Co., Germany)
5 .Celenite (Merck Co., Germany)
6 .Tetrathionate (Merck Co., Germany)
7 .Salmonella Shigella Agar (Merck Co., Germany)
8 .Birilliant Green Agar (Merck Co., Germany)
9 .Triple Sugar Iron Agar (Merck Co., Germany)
10. Lysine Iron Agar (Merck Co., Germany)

**آزمون SIM [1]:** محیط SIM در اتوکلاو به‌مدت ۱۵ دقیقه سترون شده و پس از انجماد، سوزن کشت آغشته به کلونیهای مشکوک بصورت مستقیم در آن فرو برده شد. در صورت مثبت بودن آزمون پس از گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ ±۰/۵°C، بمدت ۲٤ ساعت، در اثر افزودن معرف اندول، حلقه قرمز تشکیل نخواهد شد. همچنین با توجه به متحرک بودن *سالمونلا*، در صورت پهن شدن خط کشت مستقیم که نشانه حرکت باکتری است، پرگنه‌ها مشکوک خواهند بود.

**آزمون اوره آز:** محیط کشت اوره براث در همان لحظه تهیه و بدون نیاز به استریل کردن در لوله‌های آزمایش توزیع می‌گردید. پرگنه‌های مشکوک به‌وسیله سوزن سترون وارد آن شده و پس از گرمخانه گذاری بمدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ ±۰/۵°C رنگ محیط بررسی و نتایج تفسیر می گردید.

از آنجا که سالمونلاها قادر به تجزیه اوره نمی باشند، در صورت پیدایش رنگ ارغوانی که نشانه تجزیه اوره است، نمونه منفی گزارش می شد [۱٦].

نهایتاً نمونه‌هایی که دارای قدرت تخمیر گلوکز، تولید گاز و H2S بودند اما قادر به تخمیر لاکتوز نبوده و اندول منفی و اوره آز منفی نیز بودند، سالمونلا مثبت تفسیر گردید [۱۷،۱٦].

### ۲-۵- نحوه تشخیص نقاط کنترل بحرانی

برای تشخیص نقاط بحرانی از درخت تصمیم گیری (شکل ۱) استفاده شد

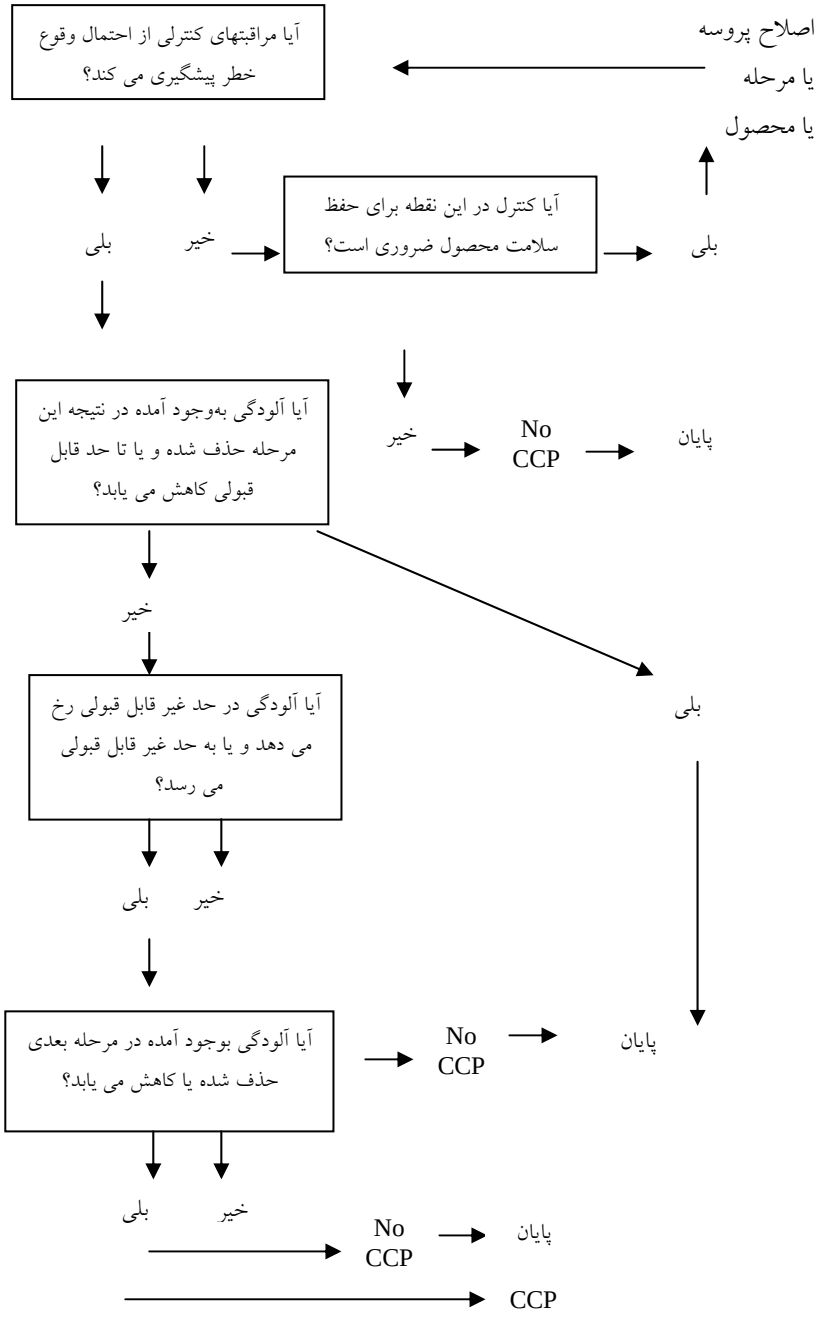
### ۲-٦- آنالیز آماری

میزان کلونیهای شمارش شده همگی به‌صورت log N برگردانده شد و نتایج بر حسب $\log cfu.cm^{-2}$ گزارش شد؛ همچنین از نرم‌افزار Excel برای محاسبه میانگینها و انحراف استاندارد استفاده شد [۱۸]. تعیین و شمارش میزان کلی باکتریها بر اساس طرح بلوکهای تصادفی انجام گرفت و میانگینها بر اساس مقایسه میانگین دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ مقایسه شدند. لازم به ذکر است که کلیه آزمایشها در سه تکرار انجام پذیرفته است.

## ۳- نتایج

در جدول یک نتایج میزان شمارش کلی بار میکروبهای هوازی نقاط مختلف لاشه در مراحل مختلف کشتار آمده است. مشاهده می شود که در اولین مرحله کشتار که پوست کنی است، میزان بار میکروبی گردن، ران، سردست، سینه، ماهیچه پا بترتیب ۲/۸٦، ۲/۷۷، ۳/۰٦، ۲/۰۷، ۳/۸۹ $logcfu/cm^2$ می باشد. که به طور معناداری قسمت سینه پاکترین ناحیه و قسمت ماهیچه پا آلوده‌ترین ناحیه بعد از پوست کنی است.

1 .Sulphate Indole Motility Medium




**شکل ۱** شمایی از یک درخت تصمیم‌گیری CCP [۱۸]

**جدول ۲** میزان مبه‌وسیله بار میکروبی نقاط مختلف لاشه در هر مرحله از عملیات کشتار

| مراحل کشتار / نقا ط لاشه | پوست کنی | تخلیه امعاء و احشاء | شقه کردن | چربی گیری | شستشوی نهایی |
|---|---|---|---|---|---|
| گردن | ۲/۸٦± ۰/۱۲ | ۲/۹± ۰/۰۳ | ۳/۰۳± ۰/۰٤ | ۲/۸۱± ۰/۱ | ۲/٦۰± ۰/۰۵ |
| ران | ۲/۷۷± ۰/۱۰ | ۲/٦۲± ۰/۱۱ | ۲/٦۵± ۰/۰۲ | ۲/۵۵± ۰/۰٦ | ۲/۳٤± ۰/۰۳ |
| سردست | ۳/۰٦± ۰/۰٤ | ۳/۵۵± ۰/۰۳ | ۳/۵۱± ۰/۰۷ | ۳/۳۱± ۰/۰۹ | ۲/۹۵± ۰/۱ |
| سینه | ۲/۰۷± ۰/۱۳ | ۲/۹۵± ۰/۱۰ | ۲/۷۰± ۰/۰۹ | ۲/۵۰± ۰/۰٦ | ۲/۳۸± ۰/۰۸ |
| قلوه گاه | _ | ۱/۹٦± ۰/۰۷ | ۱/۸۹± ۰/۰۷ | ۱/۹۵± ۰/۰۱ | ۱/٦۸± ۰/۰۷ |
| دنده ها | _ | ۱/۹۳± ۰/۰۲ | ۱/۸۱± ۰/۰۷ | ۱/۷۲± ۰/۰٦ | ۱/٤۸± ۰/۰۵ |
| ماهیچه پا | ۳/۸۹± ۰/۰۸ | ۳/۷٦± ۰/۱۱ | ۳/۷۳± ۰/۰٦ | ۳/۷٦± ۰/۰۷ | ۳/۷۳± ۰/۰۳ |

± انحراف معیار

بعد از مرحله تخلیه امعاء و احشاء، تنها ناحیه سردست به‌طور معناداری حدوداً نیم سیکل لگاریتمی و ناحیه سینه حدود یک سیکل لگاریتمی افزایش نشان داد. اما در سایر نقاط تغییر معناداری دیده نشد. در این مرحله نتایج اولین نمونه برداری از نقاط داخلی لاشه (قلوه گاه و دنده‌ها) به‌ترتیب میزان آلودگی را $\log cfu.cm^{-2}$ ۱/۹۳ و ۱/۹٦ نشان داد.

پس از مرحله شقه کردن تغییر معناداری در نقاط نمونه برداری شده به‌جز ناحیه گردن دیده نشد. این منطقه افزایش معنادار حدود ۰/۲ سیکل لگاریتمی نشان داد. پس از مرحله چربی‌گیری که توأم با یک شستشوی اولیه در قسمتهای تحتانی لاشه آویزان بود، میزان بار میکروبی نواحی گردن، سردست و سینه به‌طور معنادار، $cfu.cm^{-2}$ $\log$ ۰/۲ کاهش یافت و به ترتیب به $\log cfu.cm^{-2}$ ۲/۸۱ و ۳/۳۱ و ۲/۵ در آخرین مرحله نیز که شستشوی نهایی است، بار میکروبی تمامی نقاط به‌طور معنادار $cfu.cm^{-2}$ $\log$ ۰/۲ کاهش یافت اما برای ناحیه ماهیچه پا، تغییر معناداری دیده نشد. در مورد آلودگی میکروبی گوشت تازه و حد مجاز آن در استاندارد شماره ۲۳۹٤ ایران، ذکر شده است که وجود ۱۰۷ و کمتر از آن در هر گرم گوشت تازه قابل قبول است در حالی که در این استاندارد تاکید شده است وجود سالمونلا در نمونه گوشت تازه غیر قابل قبول می‌باشد [۱۹].

در جدول ۳ میزان حضور پاتوژنهای سالمونلا و اشرشیاکلی در نمونه های سوآب لاشه پس از پایان هر مرحله نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود، بعد از پوست کنی کمترین میزان سالمونلا (۲/۳٪) و در مرحله شقه کردن و تخلیه امعاء و احشاء به‌ترتیب بیشترین میزان سالمونلا شناسایی گردید (۱٤/۳٪ و ۱۱/۹٪). در طی دو مرحله شستشوی مقدماتی و نهایی، این میزان کاهش یافته و به ۷٪ رسید.

**جدول ۳** میزان حضور پاتوژنهای سالمونلا و اشرشیاکلی در نمونه‌های سوآب لاشه پس از هر مرحله کشتار

| مراحل کشتار | درصد حضور *اشرشیاکلی* در نمونه‌های سوآب | درصد حضور *سالمونلا* در نمونه‌های سوآب |
|---|---|---|
| بعد از پوست کنی | ٪۱٦/٦ | ٪۲/۳ |
| بعد از تخلیه امعاء و احشاء | ٪۱۹ | ٪۱۱/۹ |
| بعد از شقه کردن | ٪۲۰/۲ | ٪۱٤/۳ |
| بعد از چربی گیری و شستشوی اولیه | ٪۱٦/٦ | ٪۸/۳ |
| بعد از شستشوی نهایی | ٪۱۱/۹ | ٪۷/۱٤ |

میکروارگانیسم *اشرشیا کلی* نیز بعد از پوست کنی در ۱۶/۶٪ از نمونه‌های سوآب لاشه شناسایی شد. این میزان پس از مرحله تخلیه امعاء و احشاء و شقه کردن به‌ترتیب، ۱۹٪ و ۲۰٪ و پس از شستشوی نهایی به ۱۱/۹٪ تغییر یافت.

## ٤- بحث

یکی از مهمترین مراحل اجرای سیستم HACCP تعیین نقاط کنترل بحرانی یا CCPs می باشد. در این نقاط کنترلی برای حذف یا کاهش میکروارگانیسمها و حفظ ایمنی ماده غذایی اقداماتی به عمل می آید. در فرآوری و تولید گوشت خام، آلودگی را نمی توان به طور کامل حذف کرد، اما می‌توان از بروز آلودگی جلوگیری کرد و یا میزان بار میکروبی را کاهش داد [۱۹]. کیفیت سطح لاشه از لحاظ بهداشتی درسه سطح "غیر قابل قبول" ($>10^4 cfu/cm^2$) و " خوب " ($<10^4 cfu/cm^2$) و " عالی " ($10^3 cfu/cm^2$) ارزیابی شده، اما از لحاظ وجود باکتریهای بیماریزایی مانند سالمونلا بایستی کاملا عاری باشد ( کلاووس[1] و همکاران، ۱۹۹۷).

در این مطالعه پس از پوست کنی علی رغم مکانیکی بودن عملیات تمامی قسمتهای سطحی لاشه حدودا" دارای $2/5-3/5 \log cfu.cm^{-2}$ سیکل لگاریتمی بار میکروبی شدند که با توجه به اینکه سطح لاشه به خودی خود استریل است؛ بنابراین، می توان گفت که منشاء پیدایش این آلودگی پوست دام است که در حین فرایند پوست کنی به سطح لاشه منتقل شده است. مشابهاً در گزارشاتی اعلام شده بود که بیشترین احتمال آلودگی لاشه در حین فرایند جداسازی پوست از لاشه اتفاق می افتد [۲۱]. پوست دام ممکن است در هر سانتیمتر مربع حاوی ۹ سیکل لگاریتمی باکتری با منشأی خاک و یا مدفوع باشد [۲۲] . در این مرحله میزان اشرشیا کلی نیز در حد بالایی گزارش شد که نشانه آلودگی پوست دام با منشاء مدفوعی است؛ بنابراین، با توجه به اینکه کنترل و پاک کردن سطح پوست دام زنده تأثیر نهایی و قطعی بر سلامت محصول نداشته، اما می‌تواند خطر را به حداقل رساند؛ لذا، مرحله بازرسی پوست دام قبل از ورود به خط کشتار به‌عنوان اولین CP مطرح می‌شود. با توجه به عدم توزیع یکنواخت میکرو ارگانیسمهای پوست دام در سطح لاشه [۲۳] ناحیه ماهیچه پا آلوده ترین ( $3/89 \log cfu.cm^{-2}$) و ناحیه سینه ($2/07 \log cfu.cm^{-2}$) پاکترین ناحیه تشخیص داده شد.

در اینجا یک عملیات مناسب فراوری (GMP[2]) نیز در با رابطه با پوست کنی وجود دارد و آن این است که باید به منظور جلوگیری از وقوع آلودگیهای متقاطع از پوست به لاشه تمام تجهیزات و چاقوها در آب $82^{\circ}C$ سترون شوند. تماس دست کارگران یا دستکشها و چاقوها با مدفوع و یا مواد خارجی روی پوست با سطح لاشه، از عوامل مهم انتقال آلودگی به‌شمار می رود [۲٤]. از آنجا که انجام این مساله خصوصا در سیستمهای کشتارگاهی صنعتی بسیار مشکل است؛ لذا، وجود تجهیزات خاص برای این منظور ضروری است. تمیز نمودن دستها و پاستوریزه کردن چاقوها برای هر لاشه می‌تواند از تعداد باکتریها خصوصاً اشرشیا کلی بکاهد [۲۵].

در مرحله بعدی کشتار که تخلیه امعاء و احشای است، بار میکروبی نواحی سردست و سینه به ترتیب $0/5 \log cfu.cm^{-2}$ و ۱ افزایش معنادار یافت. در مطالعه مشابهی نیز چنین افزایشی گزارش شده است [۲٦]. در این مرحله سالمونلا و اشرشیا کلی نیز به ترتیب تا میزان ۱۰٪ و ۳٪ افزایش یافتند. علت این افزایش ناگهانی پاره شدن تصادفی روده و آغشته شدن این مناطق به محتویات داخل آن است که این مساله در اثر عدم دقت و زمان کافی و نیز نداشتن مهارت لازم برای اجرای این عملیات رخ می دهد لذا این مرحله بایستی تحت کنترل قرار گیرد. تولید گوشت با کیفیت بالای بهداشتی بشدت وابسته به اعمال دقت در عملیات تخلیه امعاء و احشای است [۲۷]. با این وجود

1. Klaus *et al.*

2. Good Manufacture Processing

کنترل آن عدم وقوع خطر را تضمین نمی کند؛ بنابر این، نقطه نیز دومین CP خط کشتار است.

عملیات مناسب فراوری (GMP) بسیاری در این CP مطرح است، که می‌توان به‌استریل کردن متناوب تجهیزات و بستن و سنجاق زدن روده پاره شده اشاره کرد.

در مرحله بعد (شقه کردن) لاشه از ناحیه ستون فقرات دو نیم می‌شود. در مورد احتمال میکروبی این عملیات نکته در خور توجه این است که در صورت رعایت مقرراتی که قبل از ورود دام به سالن وجود دارد، مثلا با تعلیف نشدن دام در محوطه انتظار، کنترل میکروبی این مرحله بسیار آسان شده و این عملیات در بالا بردن بار میکروبی نقش چندانی نخواهد داشت. اما در صورت عدم رعایت این نکته آلودگیهای اتفاقی قابل دیدن (مدفوع دام) باعث آلودگی شدید لاشه خواهد شد. متاسفانه همبستگی ضعیفی بین آلودگیهای قابل دیدن روی لاشه و شمارش باکتریایی سطح لاشه وجود دارد [۲۸]؛ لذا، در صورت رؤیت آلودگی قابل دیدن، برای شناسایی اشرشیا کلی و سالمونلا، نمونه برداری موردی در منطقه برش صورت گرفت که نهایتاً میزان اشرشیاکلی و سالمونلا به‌بیشترین میزان یعنی به ۲۰٪ و۱٤٪ در لاشه های مورد بررسی رسید؛ بنابراین، اگر چه اجرای صحیح این مرحله منوط به اقدامات کنترلی قبل از ورود دام به خط کشتار است، اما رفع موضعی آلودگیهای قابل رؤیت با سطح چاقو می تواند در کاهش بار میکروبی بسیار موثر عمل کند. اما این کنترل، تضمین کننده عدم وقوع خطر نیست؛ بنابراین، نقطه به‌عنوان سومین CP مطرح است.

مرحله بعد چربی‌گیری و پیرایش سطحی است. دراین نقطه، بخشهای غیر خوراکی لاشه و نخاع دام حذف می‌گردد و سپس یک شستشوی مختصر برای قسمتهای تحتانی لاشه آویزان صورت می‌گیرد. در این مرحله چون تیماری بر روی نقاط نمونه برداری شده انجام نشد، میزان بار میکروبی اکثر نقاط لاشه افزایش معناداری نشان نداد و حتی به‌دلیل انجام شستشو، بار میکروبی نواحی سینه و سردست حدود ۰/۲ $\log cfu.cm^{-2}$ کاهش نشان داد. در صد نمونه‌های سالمونلا و اشرشیاکلی مثبت نیز کاهش یافت.

اگر چه تا کنون هیچ موردی از بیماری جنون گاوی در کشور گزارش نشده است، با این حال بدلیل وجود احتمالی عامل BSE [1](جنون‌گاوی) در نخاع دام [۲۹] که قابل سرایت به انسان نیز است، کنترل حذف کامل نخاع از اهمیت خاصی برخوردار است؛ بنابراین، این نقطه نیز چهارمین CP خط کشتار است.

مرحله بعد شستشوی لاشه است. در این کشتارگاه، لاشه‌ها به‌مدت ۳۰ ثانیه در معرض دوش آب سرد قرار می‌گرفتند. نتایج آزمون پس از پایان این مرحله نشان داد که از میزان بار میکروبی نقاط مختلف لاشه فقط حدود $\log cfu.cm^{-2}$ ۰/۲ به‌طور معنادار کاسته می‌شود و حتی در ناحیه ماهیچه پا هیچ تغییر معناداری دیده نمی‌شود؛ همچنین، با انجام آزمونهای تشخیص سالمونلا و اشرشیاکلی، در ۱۲٪ و ۷٪ از نمونه‌ها، سالمونلا و اشرشیاکلی شناسایی شد. در مطالعات دیگری نیز مشابهاً اعلام شده بود تفاوت زیادی در میزان بار میکروبی و میزان حضور پاتوژنها در شستشوی لاشه‌ها با آب سرد وجود ندارد [۳۰]. از طرفی اختصاص دادن زمان طولانی تر برای شستشو تنها منجر به مرطوب شدن بیشتر و کاهش کیفیت میکروبی گوشت می گردد [۳۱]؛ لذا، روش بکار گرفته شده در این نقطه کنترلی چندان کارامد به‌نظر نمی رسد.

مرحله بعد بازرسی از لاشه است که در اکثر کشتارگاههای مدرن اعمال می شود. کنترل این مرحله از آنجا که نقش بحرانی و حساسی در حفظ ایمنی و سلامت محصول دارد و آلودگیهای باقیمانده در هیچ مرحله دیگری حذف نمی شوند؛ لذا، این نقطه مهمترین و تنها CCP در خط کشتار است که کنترل صحیح آن عدم وقوع خطر را تضمین می‌کند.

اما چون در کشتارگاه مورد مطالعه مرحله بازرسی وجود نداشت؛ لذا، مرحله قبل یعنی شستشوی نهایی تنها نقطه ایست که کنترل آن نقش قطعی در سلامت محصول

1. Bovine Spongiform Encephapathy

ایفا می کند؛ بنابراین، در ایـن کـشتارگاه نقطـه شستـشوی نهایی به‌عنوان تنها CCP در نظر گرفته می‌شود که نظر بـه اهمیـت آن لازم اسـت کـه روش کـار آن تغییـر یافتـه و دستورات آن مانند درجه حرارت آب و مدت زمان فراینـد و کاملا به‌صورت مدون و استاندارد درآید.

از روشهای مؤثر شستشو استفاده از آب داغ اسـت کـه می توانـد بـه میـزان ۰/۸ log cfu.cm$^{-2}$ بـار میکروبـی را کـاهش دهـد از طرفـی تغییـر رنـگ مـوقتی سـطح لاشـه می‌تواند در پایش عملیات، برای اینکه تمـام نـواحی مـورد شستشو قرار گیرند، مفید باشد [۳۲].

بر اساس اصول HACCP به‌کارگیری حداقل یک ترکیب ضـد میکروبـی طبیعـی ماننـد اسـید لاکتیـک کـه می‌تواند تا۳/۵ log cfu.cm$^{-2}$ بار میکروبی را کاهش دهد، پیشنهاد مـی‌گـردد [۳۳]. گـزارش شـده اسـت اسـتفاده از روشهای شستـشو بـا آب داغ، تیمـار بـا مـواد شـیمیایی و اسیدهای آلی مانند اسید استیک و یا اسید لاکتیـک (کـه از متابولیتهای طبیعی عضله است) و برطرف کـردن موضـعی آلودگی، و یا به‌کارگیری کلیه روشـها بـه‌صـورت ترکیبـی می‌تواند میزان پاتوژنها را حتی بـه صـفر برسـاند [۳٤]. در استانداردهای موجود ایران اشـاره‌ای بـه اسـتفاده یـا عـدم استفاده از روش‌های فوق نشده است ولی در استانداردهای کشورهای بزرگ تولید کننـده گوشـت ماننـد زلانـد نـو و استرالیا استفاده از این روشها مجاز شناخته می شود.

## ۵-تشکر و قدردانی

درخاتمه نویسندگان بر خود لازم میدانند از معاونت پژوهشی دانشکده کشاورزی دانشگاه تهران که با کمکهای خویش موجبات انجام این تحقیق را طی طرح شماره ۷۱٦/۳/٦۹۹ فراهم آوردند، نهایت تشکر و سپاسگزاری را به‌عمل آورند.

## ٦- منابع

[1] Jay, J. M. 2000. Modern Food Microbiology, 6th ed. Aspen Publishers, Inc., Gaithersburg, MD, pp. 181-183.

[2] Roberts, T. 2005. Economics of private strategies to control food borne pathogens. Choices 2nd Quarter. 20 (2): 117-122.

[3] Kukay, C. C., Holcamb, L. H., Sofos, J. N., Morgan, J. B., Tatum, J. D., Clayton, P. P. and Smith, J. C. 1996. Application of HACCP by small-scale and medium-scale meat processors. Dairy, Food and Environmental Sanitation. 16 (2): 74-80.

[4] Pearson, A. M. and Dutson, T. R. 1995. HACCP in meat, poultry and fish processing. Blackie Academic and Professional. Chapman and Hall, 9- 20.

[5] Gill, C. O. and Jones, T. 1997. Assessment of the hygiene characteristics of a process for dressing pasteurized pig carcasses. Food Microbiology 14: 81-91.

[6] Vanne, L., Karwoski, M., Karppinen, S., Sjoberg, A. M., 1996. HACCP-based quality control and rapid detection methods for micro-organisms. Food Control. 7(6): 263-276.

[7] Jericho, K. W. F., Kozub, G. C., Gannon, P. J. and Thoomas, E. J. 1997. Verification of the level of microbiological control for the slaughter and cooling processes of beef carcass production at a high-line-speed abattoir. Journal of Food Protection, 60 (12): 1509-1514.

[8]Sumner, J., Petternas, E., Dean, P., Dowsett, P., West, G., Wiering, R. and Raven, G. 2003. Microbial contamination on beef and sheep carcasses in South Australia. International Journal of Food Microbiology. 81: 255-260.

[9] Pearse, R. A., Bolton, D. J., Sheridan, J. J., Mcdowell, D. A., Blair, I. S. and Harrington, D. 2004. Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point system. International Journal of Food Microbiology. 90: 331-339.

[10] Donkersgoed, J. 1998, Preslaughter hide status of cattle and the microbiology ofcarcass. Jounal of Food Protection. 60 (12): 1502-1508.

[11] Swenberge, M., Urlings, H. A. P., Snijders, J. M. A., Keuzenkamp, D. A., Knapen, F. V. 2001. Salmonella in slaughter pigs: prevalence, serotypes and critical control

points during slaughter in two slaughterhouses. International Journal of Food Microbiology. 70: 243-254.

[۱۲] روحی، پیمان. ۱۳۷۹. جستجو و جداسازی باکتریهای بیماریزا در نقاط بحرانی خط کشتار طیور بر اساس سیستم HACCP، پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تهران.

[۱۳] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۹. میکروبیولوژی مواد غذایی و خوراک دام- روش شمارش کلی میکروارگانیسمها در ۳۰ درجه سلسیوس. شماره استاندارد ۵۲۷۲.

[۱٤] کیانی، غلامعلی. ۱۳۷۸. مسائل کیفی گوشت و میکرو بیولوژیکی گوشت. انتشارات سازمان دامپزشکی کشور. ۱۳۵ ص.

[۱۵] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۷. روش جستجو و شمارش بیشترین تعداد احتمالی اشرشیا کلی در مواد غذایی، شماره استاندارد ۲۹٤٦.

[۱٦] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. روش جستجو و جداسازی سالمونلا در مواد غذایی. ۱۳۸۱. شماره استاندارد ۱۸۱۰.

[17] Varnam, A. H, 1991, Food Borne Pathogens, Wolfe Publishing Ltd. pp. 256, 274.

[18] Hilbebcandi, G., Weiss, H., 1994. Sampling plans in microbiology general quality control: 2 Review and future prospect. Fleischwinschaft International. 74(2): 165-168.

[۱۹] مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۷۱. حد مجاز آلودگی های میکروبی در انواع گوشت، شماره استاندارد ۲۳۹٤.

[20] Sheridan, J. J. 2000. Monitoring CCPs in HACCP systems. In: Brown, M. (Ed.) HACCP in the Meat Industry. CRC Press, Boca Raton. pp: 203-230.

[21] Gill, C. O, and McGinnis, J. C. 1999. Improvement of hygienic performance of the hindquarters skinning operations at a beef packing plant. International Journal of Food Microbiology. 51: 123-132.

[22] Jericho, K. W. F., Kozub, G. C., Loeven, K. G. and Ho, J. 1996. Comparison of methods to microbiologically evaluate surfaces of beef carcasses by hydrophobic grid membrane filters, standard pour plates and flow cytometery. Food Microbiology. 13: 303-309.

[23] Biss, M. E. and Hathaway, S. C. 1995. Microbiological and visible contamination of lamb carcasses according to preslaughter presentation statues: implication for HACCP. Journal of Food protection. 58: 776-783.

[24] Gannon, V. P. J. 1999. Control of Escherichia coli O157:H7 at slaughter. In: Escherichia coli O157:H7 in Farm Animals, Eds: Stewart G. C. and H. J. Flint, CABI Publishing. Wallingford, UK, pp. 169-193.

[25] Bell, K. Y., Cutter, C. N. and Sumner, S. S. 1997. Reduction of food borne micro-organisms on beef carcass tissue using acetic acid, sodium bicarbonate, and hydrogen peroxide spray washes. Food Microbiology. 14: 439-448.

[26] Gill, C. O, and McGinnis, J. C. 1996. Assessment of the hygienic characteristic of a beef carcass dressing process. Journal of Food Protection. 59: 114-119.

[27] Mead, G. C. (1994). Microbiological hazards from red meat and their control. British Food Journal. 96 (8): 33-36.

[28] Jericho, K. W. F., Kozub, G. C., Gannon, P. J. and Thoomas, E. J. 1997. Verification of the level of microbiological control for the slaughter and cooling processes of beef carcass production at a high-line-speed abattoir. Journal of Food Protection, 60 (12): 1509-1514.

[29] Knipe, L. 2001. An update on the proposed rule for ready-to-eat performance standards. A Technical Newsletter from OSU Meats Extension. 2 (2): 54-59.

[30] Hudson, W. R., Roberts, T. A. and Whelehan, P. O. 1983. Risk factors for for Escherichia coli infection in an urban community. Journal of Hygiene. 91: 459-466.

[31] Sofos, J. N., S. L. Kochevar., G. R. Bellinger, D. R. Buege, D. D. Hancock, S. C. Ingham, J. B. Morgan, J. O. Reagan and G. C. Smith. 1999. Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants. Journal of Food Protection. 62 (2): 140-145.

[32] Castillo, A., Lucia, L. M., Goodson, K. J., Savell, J. W. and Acuff, G. R. 1998. Use of hot water for beef carcasses decontamination. Journal of Food Protection. 61: 19-25.

[33] Ransom. J. R, K. E. Belk, J. N. Sofos, J. D. Stopforth, J. A. Scanga, and G. C. Smith. 2003. Comparison of intervention Technologies for reducing Escherichia coli O157: H7 on beef cuts and trimmings. Food Protection Trends. 23 (1): 24-36.

[34] Cabedo, L., J. N. Sofos and Smith, G. C. 1996. Removal of bacteria from beef tissue by spray washing after different times of exposure to fecal material. Journal of Food Protection. 59 (12): 1284-1287.

# Study to Determine the Critical Control Points in Beef Slaughter Line in order to Establish a HACCP system

**Kafili T.[1], Emam-Djomeh Z.[2*], Kazerouni Timsar J.[3]**

1. M. Sc, Graduate of Food Science and Technology, Agricultural Campus, Biosystem Engineering, Faculty/ University of Tehran
2. Assistant Prof, of Food Science and Technology, Agricultural Campus, Biosystem Engineering, Faculty/ University of Tehran
3. Associate Prof, of Food Science and Technology, Agricultural Campus, Biosystem Engineering, Faculty/ University of Tehran

Aerobic mesophilic counts (AMC), were obtained by swabbing 25 $cm^2$ areas at seven site (neck, brisket, leg, flank, rib set, forehand, hind quarter) on beef carcasses, after each Slaughter process (skinning, evisceration, splitting, trimming and primary washing, final washing). Reduction in counts at individual sites were observed after trimming and primary washing (about 0.2 log $cfu.cm^{-2}$ ) and final washing (about 0.2 log $cfu.cm^{-2}$ ) similarly. Increases in counts at most outside sites were observed after skinning, (about 2.5 - 3.5 log $cfu.cm^{-2}$) and after evisceration, at brisket (about 1 log $cfu.cm^{-2}$) and forehand (about 0.5 log $cfu.cm^{-2}$) respectively. The incidence of Salmonella and E. coli on beef carcasses were also obtained by swabbing the outside surfaces of 12 carcasses after each stage. A large number of increases in positive samples for E.coli and Salmonella was observed after skinning and after evisceration (16.6% and 9.2% respectively). After final washing Salmonella and E. coli were detected on 11.9% and 7.1% of samples. The impact of beef slaughter processes on carcass microbiology and their potential use as critical control points (CCPs) during beef production are discussed.

**Key words:** Beef slaughter, HACCP, Salmonella, E. coli, Critical Control Points

* Corresponding author E-mail address: emamj@ut.ac.ir