

بررسی نقش سرد کن های آبی در چگونگی وضعیت آلودگی لیستریا مونو سیتوجنز لاشه های مرغ در کشتار گاههای صنعتی استان آذربایجان غربی

افشین آخوندزاده^{۱*}، علی میثاقی^۱

۱- گروه آموزشی بهداشت و کنترل مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران

چکیده

گزارشات زیادی از جدا شدن گونه های مختلف لیستریا از جمله لیستریا مونو سیتوجنز از گوشت تازه طیور، گوشت قرمز، محصولات گوشتی مانند گوشت چرخ کرده و ماهی در بسیاری از کشورها وجود دارد. با توجه به جداشدن لیستریا مونو سیتوجنز از آب و از یخ های مورد استفاده جهت سرد نگه داشتن محصولات غذایی از یک طرف و افزایش بار آلودگی باکتریایی لاشه های طیور بعد از خروج از سردکن های آبی در کشتار گاههای طیور از طرف دیگر، نقش سرد کن های آبی را در احتمال آلودگی لیستریا مونو سیتوجنز لاشه های مرغ در زنجیر کشتار، بارز می سازد.

در این مطالعه نقش سرد کن های آبی در چگونگی وضعیت آلودگی لیستریا مونو سیتوجنز لاشه های مرغ در ۴ کشتار گاه صنعتی استان آذربایجان غربی مورد بررسی قرار گرفت. به این ترتیب که تعداد ۹۰ لашه مرغ از ۴ کشتار گاه صنعتی در استان آذربایجان غربی قبل از ورود و بعد از خروج از سرد کن های آبی از نظر جستجو و شمارش لیستریا مونو سیتوجنز، طبق روش اصلاح شده کانادایی انجمن غذا و دارو آمریکا مورد آزمایش قرار گرفتند. از ۹۰ نمونه مرغ مورد آزمایش قبل از ورود به سردکن یک نمونه مرغ از نظر لیستریا مونو سیتوجنز سروتیپ مثبت بود که نتیجه شمارش Most Probable Number (MPN) لیستریا مونو سیتوجنز g^{-1} MPN $1/8$ بود. در حالیکه نتیجه شمارش (بر حسب g^{-1} MPN) لیستریا مونو سیتوجنز لاشه مذکور و شش لاشه مرغ دیگر (که قبل از ورود به سردکن آبی از نظر لیستریا مونو سیتوجنز منفی بودند) بعد از خروج از سردکن آبی به ترتیب ۱۸ و ۱۸، ۲۸، ۴۳ و ۱۱، ۱۴، ۲۱ و ۹۲ بود. که همگی متعلق به سروتیپ یک بودند. با انجام آزمون T دوطرفه، تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) در سطح اطمینان ۹۵٪ در نتایج فوق مشاهده شد. همچنین در اندازگیری کل آزاد آب، هیچ میزان کلری اندازه گیری نشد.

با توجه به نتایج بدست آمده چنین بیان می شود که در صورت عدم توجه به وضعیت بهداشتی آب سرد کن های آبی، امکان آلودگی لیستریا مونو سیتوجنز لاشه های مرغ بعد از خروج از سرد کن وجود دارد.

کلید واژگان: لاشه های مرغ، سرد کن آبی، لیستریا مونو سیتوجنز، کشتار گاه طیور

۱- مقدمه

مرغ به حساب می آید [۱]. بعد از کشتار تغییرات بیوشیمیایی، فیزیکی، شیمیایی و هیستولوژیکی حاصل از سرد کردن لاشه های مرغ در مراحل آخر زنجیر کشتار، یکی از فاکتور های مهم حفظ و نگهداری کیفیت گوشت

بیماری لیستریا مرتبط با گوشت تازه طیور و گوشت قرمز وجود ندارد ولی جستجو این ارگانیسم در این مواد غذایی از نظر حفظ سلامت غذایی مصرف کننده به دلیل امکان رشد و تکثیر این ارکانسیم در این محصولات غذایی در شرایط نگهداری در یخجال وجود دارد [۹]. در ضمن علی رغم درمان موثر بر علیه بیماری لیستریا، این بیماری با مرگ و میری حدود ۳۰ درصد به عنوان یک مشکل و خطر سلامت عمومی در نظر گرفته میشود [۹]. بنابر این، این طبیعت خطرزای بیماری Listeria موجب شد که سازمان بهداشت World Health organization (WHO) در سال ۱۹۹۰ لزوم بررسی گاه به گاهی کلیه مواد غذایی را از نظر وجود لیستریا مونوسیتوجنز بر اساس یک دستور العمل جهانی پیشنهاد نمود [۹].

با عنایت به جدا شدن لیستریا مونوسیتوجنز از آب و از یخ های مورد استفاده جهت سرد نگه داشتن محصولات غذایی از یک طرف (۱) و وضعیت بهداشت نامطلوب سردکن های آبی و افزایش بار آلدگی باکتریایی، لشه های طیور بعد از خروج از سردکن های آبی در کشتارگاههای طیور از طرف دیگر [۱۰]، توجه به امکان نقش سرد کن های آبی را در احتمال آلدگی لیستریا مونوسیتوجنز لشه های مرغ و یا حتی احتمال افزایش بار آلدگی لیستریا مونوسیتوجنز در زنجیره کشتار، بارزی ساخت. بنابر این در این مطالعه، جستجو و شمارش لیستریا مونوسیتوجنز در تعدادی از لشه های مرغ، قبل ورود به سردکن و بلا فاصله بعد از خروج از سردکن آبی در کشتارگاههای صنعتی در استان آذربایجان غربی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش کار

۹۰ لشه مرغ از ۴ کشتارگاه صنعتی طیور در استان آذربایجان غربی بلا فاصله قبل از ورود به سردکن آبی و بلا فاصله بعد از خروج از سرد کن نمونه برداری شدند و از نظر جستجو لیستریا مونوسیتوجنز، طبق روش اصلاح شده کانادایی انجمن غذا و دارو آمریکا and U.S. Food Drug Administration (FDA) مورد آزمایش قرار گرفتند [۶،۵]. برای مشخص نمودن

فعالیتهای اتو لیتیکی و باکتریایی اتفاق می افتد. درجه حرارت یکی از فاکتورهای مهم و مؤثر در تسريع این تغییرات می باشد. هرچه گوشت طیور به درجه حرارت پائین مطلوب (عمق عضله سینه ۰/۵ تا ۴ درجه سانتی گراد) سريعتر برسد، تغیيرات مورد نظر به کمترین ميزان خود خواهد رسید [۱]. بنابرین سرد کردن لشه های مرغ یکی از مراحل مهم در زنجیره کشتار مرغ به حساب می آيد.

بطور کلی در خط کشتار، میکروگانیسم های موجود در سطوح کار و پوست سبب آلدگی گوشت مرغ میشود [۱۲]. مهمترین فاکتور مرتبط با بار میکربی و آلدگی لشه ها در روش سرد کردن با استفاده از روش غوطه وری در آب سرد (سرد کن آبی): بار آلدگی لشه ها قبل از سرد کردن، ميزان جريان آب جاري و جايگزین به ازای هر لشه، نسب تعداد لشه به ميزان آب سرد کن و مقدار كلر آزاد آب سرد کن ها می باشد [۳]. چنین بيان شده است که در صورت آلدگی حتى تعداد کمی از لشه ها به برخی از باكتريهای بيماريزي غذایي، و يا آلدگی آب و يخ مورد استفاده در سرد کن آبی احتمال پخش اين آلدگی در سرد کن آبی و در نتيجه آلدگی متقطع ساير لشه ها در سرد کن وجود دارد [۱]. با توجه به مطالب گفته شده، از آنجائيكه در كشور ما، اصلي ترين و متداولترین روش جهت سرد کردن اوليه لشه های مرغ در کشتارگاههای صنعتي، غوطه ور کردن لشه ها در سرد کن های آبی می باشد و با عنایت به احتمال آلدگی باكتريایي و بار میکربی بالاي لشه های مرغ قبل از ورود به سرد کن، نسبت بالاي لشه به حجم آب و نبود يا کمبود سطح كلر آزاد آب سرد کن ها، احتمال بار میکربی بالاتر و آلدگی به برخی از باكتري های بيماريزي غذایي و سرمادوست مهم، لشه های مرغ بعد از خروج از سردکن آبی وجود دارد. در اين ميان لیستریا مونوسیتوجنز (Listeria monocytogenes) يك ميكروارگانیسم با گستردگی وسیع می باشد که از بسياري از مواد غذایي مثل گوشت تازه طیور، گوشت قرمز، محصولات گوشتی مانند گوشت جرج کرده و ماهی و صدف در بسياري از كشورها از جمله ايران جدا شده است [۲،۵،۶،۷،۸]. اگر چه گزارشات مستند از

٣- نتایج

از ۹۰ نمونه مرغ مورد آزمایش قبیل از ورود به سردکن یک نمونه مرغ از نظر لیستریا مونوسیتوجنز مثبت بود که نتیجه شمارش Most Probable Number (MPN) لیستریا مونوسیتوجنز $4/9$ MPN g^{-1} بود. در حالیکه نتیجه شمارش (MPN) لیستریا مونوسیتوجنز لاثه مذکور و شش لاثه مرغ دیگر (که مونوسیتوجنز از ورود به سردکن آبی از نظر لیستریا مونوسیتوجنز منفی بودند) بعد از خروج از سردکن آبی در جدول نشان داده شده است. که با انجام آزمون T دوطرفه (SPSS 10.0)، تفاوت معنی داری ($P < 0.05$) در سطح اطمینان ۹۵٪ در آلودگی لیستریا مونوسیتوجنز لاثه های مرغ قبل و بعد از خروج از سرد کن آبی مشاهده شد. همگی لیستریا مونوسیتوجنز شناسایی شده متعلق به سروتیپ یک بودند. همچنین در اندازگیری کلر آزاد آب، هیچ میزان کلری اندازه گیری نشد.

جدول ۱ نتایج شمارش (بر حسب g^{-1} MPN) لیستریا مونوستیوجنز در ۷ لاشه مرغ (از ۹۰ لашه مورد مطالعه) آلوده به لیستریا مونوستیوجنز در ۴ کشتارگاه صنعتی در استان آذربایجان غربی

نمونه	قبل از خروج از سرد	بعد از خروج از سرد	کن آبی
۱	۴۹	۱۸	
۲	<۰/۰۲	۴۳	
۳	<۰/۰۲	۲۸	
۴	<۰/۰۲	۲۱	
۵	<۰/۰۲	۱۴	
۶	<۰/۰۲	۱۱	
۷	<۰/۰۲	۹۲	

٤-بحث

بررسیهای متعددی در مورد آلودگی لشه های مرغ در طی مراحل مختلف زنجیر کشتار و نقش انواع مختلف سرد کن ها مورد استفاده در کشتارگاههای طیور در وضعیت بار میکری و آلودگی باکتریایی لشه های مرغ

لاشه ها از نوارهای رنگی استریل شده استفاده شد. بطور خلاصه، یک نمونه ۲۵ گرمی از بخشهای مختلف مرغ (با پوست) به ۲۲۵ میلی لیتر ماده آبگوشت غنی کننده Listeria Enrichment (LEB, Merck) لیستریا حاوی تیوسیانات پتاسیم (۳۷/۵ گرم در لیتر، شرکت مرك): و اسید نالیدیکسیک (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر، شرکت سیگما) افزوده گردید. LEB به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. بعد از نگهداری، ۰/۱ میلی لیتر از LEB بصورت خطی بر روی محیط جامد انتخابی لیستریا (Listeria Selective Agar)(LSA, Merck) نالیدیکسیک (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) و محیط پالکام (PALCAM Listeria selective agar) (PLA, Merck) کشته داده شد. پلیت های کشت به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. پرگنه های مشکوک به لیستریا مونوسیتوجنز با ظاهر زرد مایل به سبز شفاف در LSA و پرگنه های سیاه مشکوک به لیستریا مونوسیتوجنز در PLA، مورد آزمایش لام مرطوب با بزرگنمایی ۱۰۰۰ برابر، بصورت میکروسکوپی (میکروسکوپ فاز کتراست) از نظر حرکت چرخشی مشخص، رنگ آمیزی گرام، تست حرکت در دو درجه حرارت (۲۵ و ۳۵ درجه سانتی گراد)، کاتالاز، همولیز، آزمایش تخمیر قند برای (رامنوز، گزیلوز و مانیتول) آزمایش گردیدند و با آنتی سرم پلی والان (Bacto-Listeria-O polyvalent antiserum,Difco) و آنتی سرم تیپ ۱ او۴ تعیین سروتیپ شدند^(۴). جهت شمارش لیستریا مونوسیتوجنز، از رقیق کننده آب پیتونه ۱/۰ درصد برای تهیه رقت های سریال ۱۰ تابی از نمونه ها استفاده شد. و از رقت های ۱-۲-۳- تهیه شده جهت شمارش Most Probable Listeria مونوسیتوجنز به روش LEB Number (MPN) دارای تیوسیانات پتاسیم (۳۷/۵ گرم در لیتر) و اسید نالیدیکسیک (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) استفاده شد^[۵]. جهت اندازه گیری کل آزاد آب از کیت های تجاری در همان محل کشتارگاه (در هنگام نمونه برداری) استفاده شد.

Geornaras و همکاران (۱۹۹۴) گزارش نمودند که کلر زنی مناسب آب سرد کن نقش بسیار مهمی در جلو گیری از آلودگی لیستریایی و سالمونولا بی لاشه مرغ در سرد کن آبی دارد [۱۴]. طالعات انجام شده توسط Allen و همکاران در سال ۲۰۰۰ همچنین نشان داد که کترل سرد کن های آبی (از نظر درجه برودت و میزان کلر آزاد آب) سبب کاهش بار میکربی کلی و کاهش کلی فرمها بر روی پوست و محوطه داخلی لاشه و کاهش و یا از بین رفتن کامل باکتری های عامل فساد مهم از قبیل پژودوموناس (*Pseudomonas*) می گردد [۲۱]. این نتایج با یافته های Mead و همکاران (۱۹۸۹) هم خوانی داشت [۱۷].

با توجه به آلودگی لاشه های مرغ در طی مراحل اولیه کشتار از قبیل اسکالدینگ، پر کنی و تخلیه نامناسب امعاء و احشاء، لاشه های مرغی که وارد سرد کن آبی می شوند دارای بار میکربی بالایی می باشد [۱۱، ۱۵، ۱۷ و ۱۸]. آز طرفی نتایج کار ما و دیگران نشان داد که در سرد کن های آبی غیر بهداشتی و نامناسب، لاشه های مرغ بعد از خروج از سرد کن دارای بار میکربی و آلودگی باکتریایی بالاتری می باشند. بنابراین در صورتیکه عمل کلر زنی آب سرد کن بخوبی انجام نپذیرد و کترل بهداشتی بر روی آب سرد کن ها، یخهای مورد استفاده بعمل نیاید، این سرد کن ها نه تنها در کاهش بار آلودگی و بالا بردن کیفیت و عمر نگهداری (*shelf life*) نقش ندارند بلکه در افزایش بار میکربی، و آلودگی باکتریایی ثانویه لاشه مؤثر میباشند. بنابراین کترول سرد کن ها از نظر میزان کلر مناسب (کلر آزاد آب ۲۰ ppm) و درجه برودت مناسب آب (۵ درجه سانتی گراد) (۳) و تعویض به موقع آب سرد کن ها امری ضروری می باشد.

۵-منابع

- [1] Petrak, T., Kalodera, Z., Novaković, P. and Karolyoi, L. G. 1999. Bacteriological comparison of parallel and counter flow water chilling of poultry meat. Meat science. 53: 269-271.
- [2] Cason, J. A., Bailey, J. S., Stern, N. J., Whittemre, A. D., and Cox, N. A. 1997. relationship between aerobic

انجام شده است [۱۶ و ۱۵، ۱۳، ۱۲، ۱۱]. در مطالعه ای Abu-Ruwaida و همکاران در کویت (۱۹۹۴)، شمارش کلی باکتریایی، آنتروباکتریاسه و کلی فرمها، جستجوی اشرشیا کلی، سالمونولا، کمپیلو باکتر (Campylobacter) و استافیلوقوک طلا بی (Staphylococcus aureus) در لاشه های مرغ در مراحل مختلف کشتار بررسی شد. بیشترین میزان آلودگی بعد از اسکالدینگ (scalding) و پرکنی بود. سطوح باکتریایی بعد از سرد کن های هوایی، آبی و بسته بندی تغییر نکرد (۲). این نتایج با نتایج بدست آمده توسط محققین دیگر هم خوانی داشت [۱۱، ۱۷، ۱۸ و ۱۹]. در حالیکه Mead و همکاران در سال ۲۰۰۰ نشان دادند سرد کن ها نقش بسیار مهمی در آلودگی ثانویه لاشه های مرغ در خط کشتار دارد [۸]. محققین دیگر بیان گزارش نمودند که میزان بار میکربی لاشه مرغ در روش سرد کردن لاشه بوسیله سرد کن های هوایی کمتر از سرد کن های آبی که در آن لاشه در آب، سرد کن غوطه ور می شود، می باشد (۲). مطالعات دیگر نشان داد، در صورتیکه روش کلر زنی مناسب در سرد کن های آبی اجراء شود کاراتر و مؤثرتر از سرد کن های هوایی در کاهش بار میکربی لاشه میباشد [۱۱ و ۱۷]. James و همکاران در سال ۱۹۹۲، هیجگونه کاهشی را در میزان آلودگی سالمونولا بی لاشه های مرغ بعد از غوطه ور شدن در سرد کن های آبی پیدا نکردند [۷]. علاوه بر این که Jones و همکاران (۱۹۹۱) آلودگی بالای کمپیلو باکتریایی را بعد از خروج لاشه های مرغ از سرد کن آبی پیدا کردند [۲۰]. در بررسی دیگری، Geornaras و همکاران (۱۹۹۶) در کشتارگاههای طیور جنوب آفریقا، نشان دادند که سرد کن های آبی از نظر انتقال آلودگی اشرشیاکلی به لاشه های مرغ وارد شده در سرد کن نقش داشت (۹). و همکاران (۱۹۹۶) نشان دادند که آب سرد کن های آبی نقش مهم در انتقال آلودگی سالمونولا بی، کمپیلو باکتر و لیستریا به لاشه های مرغ داشت [۱۷]. تمامی ایت مطالعات نماینگر نقش سرد کن های آبی بر افزایش بار میکروبی و آلودگی باکتریایی لاشه های مرغ بعد از خروج از سرد کن های آبی بود که با نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر هم خوانی داشت.

- [12] Carraminana, J. J., Yanguela, J., Blaanco, D., Rota, C. Agustin, A. I., Ariona, A. and Herrera, A. Salmonella incidence and distribution of serotypes throught processing in a Spanish poulrrry slaughterhouse. *Journal of Food Protection.* 60 (11): 1312-1317.
- [13] Geornaras, G. and Holly, A. V. 1994. Bacterial contamination in poultry processing. *Food industries.* 47(9): 31-34.
- [14] Geornaras, I. And Gesus, A. E. 1996. Bacterial populations associated with poultry processing in a south African abattoir. *Food Microbiology.* 13(6): 457-465.
- [15] Kotula, K. L. and Pandya, Y. 1995. Bacterial contamination of broiler chickens before scalding. *Journal of Food Protection.* 58(12): 1326-1329.
- [16] Mead, G. C. and Scott, M. J. 1994. Coagulase-negative staphylococci and coliform bacteria associated with mechanical defeathering of poulrry carcasses. *Letters in Applied Microbiology.* 18(1): 62-64.
- [17] Mead, G. C. 1989. Hygiene problems and control of process contamination. pp. 183-220. In G. C. Mead (Ed). *Processing of poultry.* Elsevier Applied Science, London.
- [18] Mead, G. C. 1990. Food poisoning Salmonella in the poultry-meat industry. *British Food Journal.* 92(4): 32-36.
- [19] Schmitt, R. E., Gallo, L. and Schmidt-Lorenz, W. 1988. Microbial spoilage of refrigerated fresh broilers. IV. Effect of slaughtering procedure on the microbial association of poultry carcasses. *Lebensm-Wiss. u.-Technol.* 21: 234-238.
- [20] Jones, F. T., Axtell, R. C., Rives, D. V., Scheideler, S. E., Tarver Jr., F. R., Walker, R. L. and wineland, M. J. 1991. A survey of Campylobacter jejuni contamination in modern broiler production and processing system. *Journal of Food Protection.* 54(4): 259-262.
- [21] Allen, V. M., Corry, J. E. L., Burton, C. H., Whyte, R. T. and Mead, G. C. 2000. Hygiene aspects of modern poultry chilling. *International Journal of Food Microbiology.* 58: 39-48.
- bacteria, *Salmonella* and *Campylobacter* on broiler carcasses. *Poultry science.* 76 (70): 1037-1041.
- [3] Ristić, M. 1997. Application of chilling methods on slaughtered poultry. *Die Fleischwirtschaft.* 77(9): 810-811.
- [4] Mulder, R. W. A. W. 1996. The impact of slaughter technologies on microbial contamination of poultry meat. *Misset Wourel Poultry.* 12: 44-46.
- [5] APHA, 1997. *Compendium of methods for the Microbiological Examination,* 3rd ed. M. L. Speak. American Public Health Association, Washington.
- [6] Dillon, R.M., Patel, T.R., Rattam, S., 1992. Prevalence of *Listeria* in smoked fish. *J. Food Prot.* 55 (11): 866-870.
- [7] James, W. O., Williams Jr., W. O., Prucha, J. C., Johnston, R., and Christensen, W. 1992. Profile of selected bacterial counts and *Salmonella* prevalence on raw poultry in poultry slaughter establishment. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 200(1): 57.
- [8] Mead, G. C., Allen, V. M., Burton, C. H. and Corry, J. E. L. 2000. Microbial cross contamination during air chilling of poulrry. *British poultry sscience.* 41 (2): 158-162.
- [9] Yucel, N., Cltak, S. and Onder, M. 2005. Prevalence and antibiotic resistance of *Listeria* species in meat products in Ankara, Turkey. *Food Microbiology.* 22: 241-245.
- [10] بررسی نقش سرد کن های آبی در وضعیت باکتریایی لاثه های مرغ در کشتار گاههای صنعتی استان تهران و گیلان، دکتر افشن آخوندزاد، دکتر علی میناقی، دکتر تقی زهراei، دکتر سعید بکایی، دکتر هادی اشپری. مجله دانشکده دامپزشکی تهران دوره ۵۹ شماره ۳ صفحات ۱-۴
- [11] Abu-Ruwaida, A. S., Sawaya, W. N., Daashti, B. H., Murad, M. and Al-Othman, H. A. 1994. Microbiological quality of broilers during processing in a modern commercial slaughterhouse in kuwait. *Journal of Food Protection.* 57(10): 887-892.

Effects of Water Chiller on Listeria Monocytogenes Contamination of Poultry Carcasses in Industrial Slaughterhouses of Western Azerbaijan Province

Akhondzadeh, B. A. *¹, Misaghi, A.¹

1-Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran

Listeria spp. has been isolated from poultry, red meat and meat products and fish in many countries around the world. According to the reports of isolation of Listeria monocytogenes in water and ice used for retaining freshness of food products and possibility of the increasing of bacterial contamination of poultry carcass after cooling in water chiller in poultry slaughter house, the effects of water chiller on Listeria monocytogenes contamination of poultry carcasses before and after chilling process in four industrial slaughter houses of western Azerbaijan province was investigated.

Ninety poultry carcasses from 4 industrial slaughter houses in western Azerbaijan was investigated for Listeria monocytogenes before and after chilling process using the modified Canadian version of U.S. Food and Drug Administration (FDA) *Listeria* isolation method. Listeria monocytogenes contamination was 4.9 MPN g-1 in one sample before chilling process in water chiller. The result of Listeria monocytogenes contamination in the same positive sample and 6 other samples which did not show positive result before chilling process were 18, 43, 28, 21, 14, and 92, respectively. All of the isolated belongs to the serogroup 1. Paired-samples T test indicated significant difference ($P<0.05$) between the contamination levels before and after chilling process.

Free available chlorine content of water in water chiller of these slaughter houses was not measurable.

Key words: Poultry carcasses, Water chiller, Listeria Monocytogenes, Poultry slaughterhouses.

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