

## ارزیابی بار میکروبی سبزیجات تازه طی مراحل فرآوری با روش حداقل فرآیند در یک واحد بسته بندی

معصومه بحرینی<sup>۱</sup> - محمد باقر حبیبی نجفی<sup>۲\*</sup> - محمد رضا باسامی<sup>۳</sup> - مرتضی عباس زادگان<sup>۴</sup> - احمد رضا بهرامی<sup>۵</sup> - حمید رضا اجتهادی<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۱۱/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۰/۷/۱۲

### چکیده

در سالهای اخیر تعداد کارگاه‌هایی که بر روی بسته بندی سبزیجات تازه و برش زده فعالیت می‌کنند در بسیاری از کشورها از جمله ایران افزایش یافته است. سبزیجات تازه نسبت به آلودگی میکروبی بعد از برداشت، فرآیندهای شستشو، بسته بندی و توزیع حساس می‌باشند. هدف از این مطالعه، تعیین و ارزیابی سطح آلودگی میکروبی طی مراحل شستشو و بسته بندی سبزیجات تازه و برش زده در یک کارگاه بسته بندی بود تا منابع آلودگی و نقاط بحرانی طی فرآیند و در محیط کارگاه شناسایی شوند. نمونه‌ها از مراحل قبل از شستشو، بعد از شستشو و ضدعفونی، خردکن، خشک کن و بسته بندی در یک کارگاه در شرایط استریل تهیه و سپس طبق روش‌های استاندارد، از نظر تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، باکتری‌های اسید لاکتیک، باکتری‌های کلی فرمی، آنتروباکتریاسه، اشرشیاکلی، سالمونلا، استافیلوکوکوس اورئوس و کپک و مخمر بررسی شدند. همچنین سطوح مختلف کارگاه و فضای آن از نظر تعداد باکتری‌های مزوفیل هوازی، آنتروباکتریاسه و کپک و مخمر بررسی شد. نتایج نشان داد که مرحله شستشو و ضدعفونی حداکثر تا یک سیکل لگاریتمی جمعیت باکتریایی و ۱/۵ سیکل لگاریتمی کپک و مخمر را کاهش می‌دهد ولی در مراحل بعد از شستشو و ضدعفونی به علت آلودگی ثانویه مجدداً بار میکروبی افزایش می‌یابد. سالمونلا در هیچیک از مراحل شستشو دیده نشد ولی اشرشیاکلی در بعضی از نمونه‌ها تشخیص داده شد. استافیلوکوکوس اورئوس در تمام مراحل دیده شد. باکتری‌های مزوفیل هوازی، آنتروباکتریاسه، کپک و مخمر در ظروف و تجهیزات مورد استفاده در فرآیند شستشو دیده شدند. از نتایج مشاهده می‌شود که کارگاه نیاز به بکارگیری یک سیستم عملیات بهداشتی خیلی قوی در خطوط تولید سبزیجات و بسته بندی دارد. چندین توصیه عملی برای عملیات سالم سازی، طراحی خطوط تولید، آموزش کارگران و بهبود کیفیت و بالا بردن بهداشت سطوح وسایل مورد استفاده در تولید سبزیجات بسته بندی ارائه شده است.

واژه‌های کلیدی: سبزیجات بسته بندی، ارزیابی میکروبی، کیفیت میکروبی، حداقل فرآیند، سطح بهداشت

### مقدمه

ارزش تغذیه‌ای زیادی دارند و مصرف آنها در سلامت انسان موثر است. در بسیاری از کشورها به مردم توصیه زیادی می‌کنند که در رژیم غذایی روزانه خود، حداقل روزی پنج نوبت از سبزیجات و میوه‌های تازه استفاده کنند (Abadias, et al. 2008)

علت این توجه زیاد به مصرف مواد غذایی تازه، ارزش تغذیه‌ای بالای آنها و ایجاد تغییرات عمده در سبک زندگی مردم می‌باشد. این تغییرات باعث شده است که مردم وقت کمتری را در آشپزخانه صرف کنند و اغلب بیرون از خانه غذا بخورند و در نتیجه تقاضا برای مواد غذایی تازه مثل انواع سالادها و سبزی خوردن بسته بندی شده و آماده مصرف و سایر موادی که فرآیند کمی روی آنها انجام می‌شود و سریعتر آماده می‌شود، بیشتر گردد. در میان آنها، مصرف سبزیجات

سبزیجات و میوه‌های تازه جزو مواد غذایی ضروری در رژیم غذایی انسان می‌باشند و امروزه به خوبی ثابت شده است که این مواد

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد  
(<sup>\*</sup>نویسنده مسئول: Email: habibi@ferdowsi.um.ac.ir)

۳- استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۴- استاد گروه مهندسی محیط زیست، دانشگاه ایالتی آریزونا، ایالات متحده آمریکا

۵- عضو هیات علمی گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فردوسی مشهد.

عنوان مثال در سال ۲۰۰۶ میلادی در آمریکا، ۲۰۰ نفر در اثر خوردن سبزی خام (اسفناج) آلوده به *شرشیا کلی* O157:H7<sup>۸</sup> دچار عفونت ادراری<sup>۹</sup> شدند که منجر به مرگ ۳ نفر شد (FDA, 2006).

بنابراین سبزیجات و میوه های تازه یکی از عوامل مهم ریسک پذیر برای سلامتی انسان هستند، چون بصورت خام مصرف می شوند و در معرض آلودگی در هر نقطه ای از مسیر مزرعه تا سفره می باشند (FDA, 2008).

برای کنترل آلودگی ابتدا باید منابع آلوده کننده و نقاط بحرانی را در مسیر فرآیند شناسایی نمود. ظروف و تجهیزات مورد استفاده یکی از منابع عمده آلودگی هستند که حتی باعث آلودگی ثانویه محصول می شوند. باکتری ها قادرند در سطوح مختلف بیوفیلم تشکیل دهند که با عملیات شستشوی روزانه نیز تمیز نمی شوند و ممکن است باقی بمانند و به عنوان یک منبع آلودگی در محیط کارگاه عمل کنند.

هدف این پژوهش، ارزیابی میزان حذف میکروبه‌ها در مراحل شستشو و بسته بندی سبزیجات تازه و برش زده در یک کارگاه تولید سبزیجات و سالاد بسته بندی بود. برای این منظور از تمام مراحل کار (از ابتدای ورود سبزی تا خروج آن به صورت بسته بندی) نمونه برداری شد و میزان آلودگی به باکتری ها و کپک و مخمر بررسی گردید. همچنین از تمام سطوحی که محصول در تماس با آن بود نمونه برداری شد تا نقاط بحرانی مراحل از نظر منبع آلودگی بررسی گردد و راهکار مناسب ارائه شود.

## مواد و روش ها

### مراحل کار

مراحل کار در یک کارگاه تولید سبزی و سالاد بسته بندی در شکل ۱ نشان داده شده است. سبزی خوردن بسته بندی شده بیشتر شامل ریحان، گشنیز، شاهی، تربچه، بادنجنویه، پیازچه و نعنا می باشد و سالاد بسته بندی نیز عمدتاً شامل کاهو، کلم سفید، کلم قرمز، هویج خرد شده، گوجه فرنگی و خیار حلقه شده می باشد. در کارگاه مراحل شستشو نمونه سبزی خوردن با نمونه سبزی سالادی کمی فرق می کند، در سبزی خوردن تعداد دفعات شستشو با آب بیشتر است چون گل ولای بیشتری دارد و همچنین مرحله برش زدن را ندارد. علاوه بر آن، طبق توصیه اداره بهداشت برای شستشوی سبزی خوردن از ماده نانوسیل<sup>۱۰</sup> که همان آب اکسیژنه پایدار شده با یون نقره است و برای نمونه سالادی از هیپوکلریت سدیم<sup>۱۱</sup> برای ضدعفونی استفاده می شود (Artes, et al., 2009; Gil, et al., 2009; IFPA, 2001; Sapers, 2003).

تازه و برش زده بیشتر از همه موارد، مورد تقاضا قرار گرفته است. آمار نشان می دهد که مصرف سبزیجات تازه آماده مصرف در کشورهای مختلف یکسان نیست و از ۱/۵-۱ کیلوگرم تا ۳۰ کیلوگرم به ازای هر شخص در سال متفاوت است (اسپانیای ۱-۱/۵ کیلوگرم، انگلیس ۲ کیلوگرم، فرانسه ۶ کیلوگرم، ایتالیا ۴ کیلوگرم، آلمان و بلژیک ۳ کیلوگرم و آمریکا ۳۰ کیلوگرم به ازای هر شخص در سال) (Anonymous, 2007). در ایران هر چند آمار رسمی در دسترس نیست ولی به نظر می رسد که میانگین مصرف از مقدار فوق کمتر باشد ولی آنچه مسلم است این است که با تغییرات شدیدی که در روش زندگی در کشور ما ایجاد شده است این مقدار هر ساله افزایش می یابد، بطوریکه در چند سال اخیر کارگاه های تولید محصولات تازه و بسته بندی چندین برابر شده است که نشانه تقاضای زیاد برای این نوع محصولات می باشد.

با توجه به افزایش تعداد این کارگاه ها، سلامت و کیفیت میکروبی محصول تولید شده اهمیت زیادی پیدا کرده است و این نه تنها به خود سبزیجات بلکه به بهداشت وسایل و محیط کارگاه نیز بستگی دارد، چون در آماده سازی و فرآوری سبزی و تا زمان مصرف هیچ فرآیند سالم سازی موثر مانند حرارت اعمال نمی شود. بنابراین خطر آلودگی این محصولات تازه به میکروبهای بیماریزا بسیار زیاد است و باید اصول HACCP و همچنین قوانین بهداشت در تمام مراحل زنجیره تولید توسط کارگاه های تولید کننده بکار گرفته شود. این محصولات تازه و بدون فرآیند و یا با حداقل فرآیند، می توانند یک ناقل مناسب برای انتقال باکتری ها، انگل ها و ویروس های بیماریزا به انسان باشند. گزارشات متعددی وجود دارد که سبزیجات خام عامل انتقال عوامل بیماریزا هستند (Beuchat, 1996; Nguyen-the, et al., 1994). *سالمونلا* (Doyle, 1990) و *شرشیا کلی* (Nguyen-the, et al., 1994) را توانسته اند از سبزیجات خام جدا کنند. این باکتری ها قادرند سبزی ها را در مراحل کاشت، داشت، برداشت، نگهداری، شستشو و توزیع آلوده کنند. هر ساله تعداد زیادی اپیدمی در اثر مصرف سبزیجات و میوه های تازه گزارش می شود (Mukherjee, et al., 2006). عوامل بیماریزایی که اغلب با این اپیدمی ها همراه هستند شامل باکتری ها (*سالمونلا*<sup>۱</sup>، *شرشیا کلی*<sup>۲</sup>، *لیستریا منوسایتوژن*<sup>۳</sup>)، ویروس ها (*نروویروس*<sup>۴</sup>، *ویروس هپاتیت A*<sup>۵</sup>) و پارازیت ها (*کریپتوسپوریدیوم*<sup>۶</sup>، *سیکلوسپورا*<sup>۷</sup>) (Schlech, et al., 1983; Tauxe, et al., 1997) می باشند. به

- 1- Salmonella
- 2- Escherichia coli
- 3- Listeria monocytogenes
- 4- Norovirus
- 5- Hepatite A virus
- 6- Cryptosporidium
- 7- Cyclospora

8- E.Coli O157:H7

9- Hemorrhagic Uremia Syndrome

10- Nanosil

11- Sodium hypochlorite

## نمونه برداری

نمونه برداری از مراحل قبل از شستشو، بعد از شستشو و ضدعفونی، بعد از خردکن، بعد از خشک کن و بسته بندی در شرایط استریل انجام و نمونه ها در داخل ظرف یخ به آزمایشگاه منتقل شد و آزمایش های میکروبیولوژی بر طبق روشهای استاندارد بر روی آنها انجام گرفت (HPA, 2005b; HPA, 2005a; HPA, 2004a; HPA, 2004b; Sapers, 2003; Abadias, 2008).

پورپلیت به ترتیب کشت شدند و سپس یک لایه نازک از محیط کشت روی آنها ریخته شد تا شرایط میکروآنروفل<sup>۴</sup> ایجاد شود و پتری ها در دمای C ۳۰° به مدت ۴۸ ساعت گرمخانه گذاری و سپس کلنی های قرمز شمارش شدند. باکتری های خانواده اسید لاکتیک بر روی محیط کشت MRS آگار به روش پورپلیت کشت شدند و به مدت ۴۸ ساعت در دمای C ۳۵° قرار داده شدند. اشرشیا کلی بر روی محیط کشت کروم آگار اشرشیاکلی<sup>۵</sup> کشت و در دو دمای C ۳۰° و C ۴۴° به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد و فقط کلنی های سبز-آبی شمارش شد.

کپک و مخمر در محیط کشت یست گلوکز کلرامفنیکل آگار<sup>۶</sup> به روش پورپلیت کشت و به مدت ۳-۵ روز در دمای C ۲۵° گرمخانه گذاری شدند.

جهت شناسایی *استافیلوکوکوس اورئوس* از محیط کشت برد-پارکر<sup>۷</sup> حاوی امولسیون زرده تخم مرغ استفاده شد. بعد از کشت به صورت پورپلیت، پتری ها در دمای C ۳۵° به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری شدند و سپس کلنی های سیاه شمارش شدند. سپس از هر پتری یک یا دو کلنی سیاه انتخاب و بر روی آنها تست کواگولاز انجام شد.

برای شناسایی جنس *سالمونلا* از چهار مرحله کشت استفاده شد. ابتدا ۲۵ گرم نمونه در ۲۲۵ میلی لیتر بافر پپتون واتر هموژنیزه شد و به مدت ۲۴-۱۶ ساعت جهت تقویت اولیه *سالمونلا* در دمای C ۳۷° قرار داده شد، سپس ۰/۱ میلی لیتر از آن برداشته و در دو محیط آبگوشتی راپاپورت واسیلیادیس (۹ میلی لیتر) و تتراتیونات برات حاوی محلول ید و آنتی بیوتیک نوبیوسین (۱۰ میلی لیتر) منتقل و در دمای C ۴۱/۵° به مدت ۲۴ ساعت دیگر گرمخانه گذاری شد تا اگر *سالمونلا* حضور دارد نسبت به سایر باکتری ها بیشتر رشد کند. برای جداسازی و شناسایی *سالمونلا*، از دو محیط فوق بر روی سه محیط افتراقی برلیانت گرین بایل برات، XLD<sup>۸</sup> و سولفیت آبرون آگار به روش خطی کشت شد و به مدت ۴۸-۲۴ ساعت در دمای C ۳۷° قرار داده شدند. کلنی های قرمز با یک هاله روشن بر روی محیط برلیانت گرین بایل برات، کلنی های قرمز با یا بدون مرکز سیاه بر روی XLD و یا کلنی های سیاه با جلای فلزی بر روی محیط سولفیت آبرون آگار بعنوان *سالمونلا* انتخاب شد و از هر پلیت مثبت یک یا دو کلنی برداشته و جهت تأیید نهایی آنها را بر روی محیط های لیزین دکربوکسیلاز آگار، تربیل شوگر آبرون آگار و اوره برات کشت داده شد و در صورت مثبت بودن نتایج تستهای بیوشیمیایی، نمونه *سالمونلا*



شکل ۱- نمایش شماتیک مراحل کار در یک کارگاه بسته بندی سبزیجات.

## آزمون های میکروبی

در شرایط استریل ۱۰ گرم از هر نمونه وزن و به مخلوط کن استریل منتقل گردید و ۹۰ ml بافر پپتون نمکی (۱٪ پپتون، ۸/۵ گرم نمک کلرید سدیم در یک لیتر آب مقطر) به آن اضافه و ۲ دقیقه هموژنیزه شد، سپس از آن در بافر پپتون نمکی رقت های ده تایی تا ۱۰<sup>-۷</sup> تهیه و برای آنالیزهای میکروبی استفاده گردید. تمام محیط کشت های مورد استفاده از شرکت لیوفیلچم<sup>۱</sup> کشور ایتالیا تهیه گردید. باکتری های مزوفیل هوازی در محیط کشت پلیت کانت آگار به روش پورپلیت کشت و به مدت ۴۸ ساعت در دمای C ۳۰° قرار داده شدند. باکتری های کلی فرمی و انتروباکتریاسه بر روی محیط کشت ویوله رد بایل لاکتوز آگار<sup>۲</sup> و ویوله رد بایل گلوکز آگار<sup>۳</sup> به روش

3- Violet red bail glucose agar  
4- Microaerophile  
5- Chromagar ECC  
6- YGCA  
7- Baird-Parker  
8- Xylose lysine desoxycholate

1- Liofilchem co.  
2- Violet red bail lactose agar

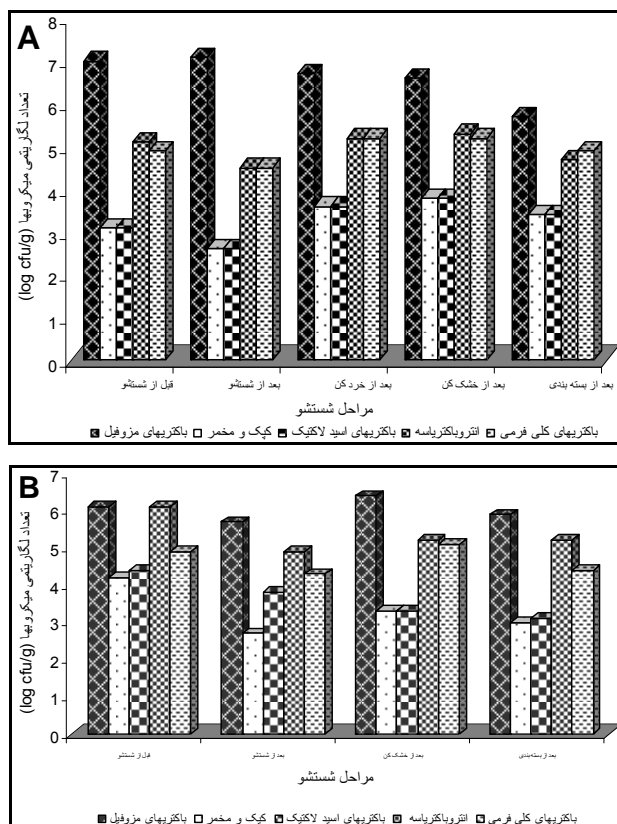
تشخیص داده شد و تست‌های آنتی سرم O و H بر روی آنها انجام گردید.

نمونه‌های سطحی توسط سواپ استریل از سطوح ماشین‌های پوست کنی، ساتریفوژ، خرد کن کاهو، خردکن هویج، میز سورتینگ و سبدهای حمل و نقل سبزیجات شسته شده، دست کارگران، دستکش، ظروف بسته بندی و روکش پلاستیکی مورد استفاده برای بسته بندی برداشته و در ۱ میلی لیتر بافر پپتون نمکی به آزمایشگاه حمل شد و سپس جهت سنجش نسبی تعداد باکتری‌ها و کپک و مخمر از آنها رقت تهیه و در محیط‌های پلیت کانت آگار، ویوله رد بایل گلوکز آگار، کروم آگار اشرشیا کلی و یست گلوکز کلرامفنیکل آگار، به ترتیب برای شناسایی باکتری‌های مزوفیل هوازی، انتروباکتریاسه، اشرشیا کلی، کپک و مخمر کشت گردید.

## نتایج و بحث

شکل ۲ میزان آلودگی سبزیجات سالادی و خوردن را در مراحل مختلف شستشو نشان می‌دهد. همانطور که مشخص شده است تعداد

باکتری‌های مزوفیل هوازی در نمونه اولیه سبزی خوردن بطور میانگین بین ۴/۶-۶/۹ سیکل لگاریتمی بود و در مرحله شستشو وضد عفونی تا ۰/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت. در نمونه کاهو که به عنوان سبزی سالادی بررسی گردید بار آلودگی به باکتری‌های مزوفیل طی مرحله شستشو چندان کاهش نیافت و میانگین آلودگی در قبل و بعد از شستشو ۷ سیکل لگاریتمی بود. در مراحل بعد از شستشو و ضد عفونی میزان آلودگی در هر دو نمونه بیشتر شد. تعداد باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک که در هر دو سری نمونه سبزی و کاهو بطور میانگین به ترتیب ۴/۴ و ۳/۱ سیکل لگاریتمی بود طی مرحله شستشو در هر دو سری نمونه حداکثر تا ۰/۵ سیکل لگاریتمی نسبت به نمونه شسته نشده کاهش یافت و در نمونه سبزی این کاهش ادامه داشت و تا مرحله بسته بندی جمعیت باکتری‌های خانواده اسید لاکتیک ۱/۳ سیکل لگاریتمی کم شد. ولی در نمونه کاهو بعد از شستشو در مراحل بعدی (خردکن و خشک کن) آلودگی ثانویه پیدا کرده و مجدداً بار آلودگی افزایش پیدا کرد.



شکل ۲- نمایش میزان فراوانی هر یک از میکروب‌های آزمایش شده در مراحل مختلف شستشوی سبزیجات، بالا (A) نمونه سبزی سالادی، پائین (B) نمونه سبزی خوردن.

جدول ۱- نتایج در صد فراوانی باکتریهای بیماریزایی که از طریق مواد غذایی انتقال مییابند در مراحل شستشوی سبزیجات

مراحل شستشو	درصد نمونه های مثبت		
	<i>Salmonella spp.</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
قبل از شستشو	-	۱۷/۶	۱۰۰
بعد از شستشو و ضد عفونی	-	۱۰	۱۰۰
بعد از خردکن	-	۴۰	۱۰۰
بعد از خشک کن	-	۲۲/۲	۱۰۰
بعد از بسته بندی	-	۲۰	۱۰۰

اسید لاکتیک و انتروباکتریاسه و ۱/۵ سیکل لگاریتمی در جمعیت کپک و مخمر کاهش ایجاد می شود. البته نتایج بالا در شرایط آزمایشگاهی بدست آمده است و با نتایج حاصل در شرایط واقعی (تحقیق حاضر) فرق می کند و شاید تفاوت نتایج به این دلیل باشد.

مراحل بررسی روش شستشو و ضد عفونی در کارگاه بنحوی انجام شد که از ابتدای ورود نمونه تا انتها که بصورت بسته بندی از کارگاه خارج می گردید نمونه برداری انجام گرفت و در بررسی ها مشخص شد که نمونه های آلوده به *اشرشیا کلی* در طی مراحل شستشو آلودگیشان را از دست نمی دهند و حتی تا مرحله بسته بندی نیز آلودگی را حفظ می کنند و همچنین مشخص شد که با ورود نمونه های آلوده به باکتری های بیماریزا در مراحل شستشو، آلودگی می تواند در مسیر باقی بماند و نمونه های غیر آلوده را نیز آلوده کند چون نمونه هایی که در ابتدا آلوده نبودند در مسیر شستشو آلوده شده بودند. همانطور که در جدول ۲ نشان داده شده است درصد فراوانی باکتری *اشرشیا کلی* در نمونه های اولیه سبزیجات که وارد کارگاه شده اند ۱۷/۶٪ می باشد ولی در مرحله خرد کن و خشک کن به ترتیب به ۴۰٪ و ۲۲/۲٪ می رسد، و حتی در نمونه های بسته بندی شده نیز آلودگی بیشتر از نمونه های بدون فرآیند می باشد (۲۰٪).

بوچت (Beuchat, 1996) معتقد است حضور باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* در ماده غذایی نشانه شرایط غیر بهداشتی مراحل کار می باشد و نشان می دهد که ماده غذایی در مراحل تولید با دست های آلوده بیشتر در تماس بوده است. در بررسی های انجام شده مشاهده شد که نه تنها تعداد *استافیلوکوکوس اورئوس* در مسیر فرآیند کاهش پیدا نمی کند بلکه جمعیت آن در مراحل آخر کار افزایش می یابد.

این نتایج مشخص می کند که سیستم شستشو و ضد عفونی با روش موجود در واحد مذکور که غوطه ور کردن در آب شستشو حاوی ماده ضد عفونی است زیاد مناسب نمی باشد و قادر به کاهش باکتری های کلی فرمی و باکتری های مزوفیلی که از عوامل اصلی فساد سبزیجات است، نمی باشد چون در این روش باکتری های جدا شده از سطح سبزیجات در آب شستشو باقی مانده و می توانند سطح سبزی را مجدداً آلوده کنند و در نتیجه بار آلودگی کاهش چندان در

باکتری های خانواده انتروباکتریاسه و باکتری های کلی فرمی نیز به ترتیب ۱/۶ تا ۰/۶ سیکل لگاریتمی در مرحله شستشو کاهش یافتند ولی در مراحل بعدی دوباره تعداد آنها زیاد شد.

جمعیت کپک و مخمر در مرحله شستشو و ضد عفونی در نمونه سبزی خوردن ۱/۵ سیکل لگاریتمی کاهش یافت و از میانگین ۴/۲ سیکل لگاریتمی در نمونه شسته نشده به میانگین ۲/۷ سیکل لگاریتمی در مرحله شستشو و ضد عفونی رسید و در مراحل بعدی افزایش زیادی پیدا نکرد. نمونه سالادی نیز تا ۱/۳ سیکل لگاریتمی در مرحله شستشو و ضد عفونی کاهش نشان داد.

Behrsing و همکاران (۲۰۰۰) نشان دادند با تاثیر غلظت های مختلف هیپوکلریت سدیم در زمان های مختلف بین ۲/۸-۱/۷ سیکل لگاریتمی جمعیت *اشرشیا کلی* تلقیح شده به کاهو کاهش می یابد. Velazquez و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند هیپوکلریت سدیم قادر است جمعیت *اشرشیا کلی O157:H7* تلقیح شده به گوجه فرنگی و کاهو را ۲/۵ و ۱/۳ سیکل لگاریتمی به ترتیب کاهش دهد. Ukuku (2006) نیز گزارش کرد آب اکسیژنه ۲/۵٪ میتواند جمعیت باکتری های مزوفیل هوازی، باکتری های اسید لاکتیک و کپک و مخمر سطح هندوانه را به ترتیب تا ۲/۷، ۲/۱ و ۰/۱ سیکل لگاریتمی را کاهش دهد. Crowe و همکاران (۲۰۰۷) از دو باکتری *پسودوموناس فلورسانس* و *انتروباکتر آگلومرانس* که فلور طبیعی سطح سبزیجات هستند استفاده کردند و تاثیر آب اکسیژنه ۱٪ را بر روی آنها بررسی کردند و نشان دادند که تا ۲ سیکل لگاریتمی جمعیت آنها کاهش می یابد. Abadias و همکاران (۲۰۰۸) در بررسیهای خود ثابت کردند که آب اکسیژنه ۲٪ می تواند تا ۲/۵ سیکل لگاریتمی جمعیت *اشرشیا کلی* و *سالمونلا* تلقیح شده به قطعات سیب را کاهش دهد. سایرین نیز نشان داده اند که هیپوکلریت سدیم (Albrecht, et al., 1995; Artes, et al., 2009; Beuchat, et al., 1998; Soriano, et al., 2000) تا ۲ سیکل لگاریتمی و نانوسیل (Ukuku, 2004) تا ۳ سیکل لگاریتمی باکتری های مزوفیلی و کلی فرمی را به ترتیب کاهش می دهند، ولی از نتایج بدست آمده از این مطالعه مشخص شد که حداکثر تا ۰/۵ سیکل لگاریتمی در جمعیت باکتری های مزوفیل، ۱/۵ سیکل لگاریتمی در باکتری های خانواده

مستقیم با نمونه هستند بسیار آلوده اند. این آلودگی های زیاد وسایل و تجهیزات می تواند دلیلی برای آلودگی های ثانویه باشد و مشخص می شود که چرا سبزیجات تازه بسته بندی شده آلوده تر از سبزیجات خام می باشند. Abadias و همکاران (۲۰۱۱) نیز در بررسی های خود نشان دادند که سبزیجات بسته بندی شده از سبزیجات خام آلوده تر هستند.

اثر شستشو پیدا نمی کند.

با نگاهی به جدول ۳ مشخص می شود که ماشین های مورد استفاده در مراحل کار بسیار آلوده هستند و حتی بعضی از آنها بار آلودگیشان به باکتری های مزوفیل هوازی، انتروباکتریاسه و کپک و مخمر خیلی بیشتر از خود نمونه ها می باشد، بعنوان مثال میز سورتینگ که محل بسته بندی سبزیجات است و یا ماشین پوست کنی هویج، ماشین خشک کن (سانتریفوژ)، ماشین خرد کن و سبدهای حمل و نگهداری نمونه های شسته شده که در تماس

جدول ۲- نتایج بهداشت سطوح مختلف و فضای کارگاه بر حسب شدت آلودگی

میزان آلودگی سطوح*			سطوح
کپک و مخمر	خانواده انتروباکتریاسه	باکتریهای مزوفیل	
++++	+++	+++	ماشین پوست کنی
+++	+++	+++	ماشین خرد کن هویج
++++	++++	++++	ماشین خرد کن کاهو
+++	+++	++++	ماشین خشک کن
+++	+++	++++	سبد حمل سبزی
+++	+++	++++	میز سورتینگ
++	++	+++	ظرف نگهداری سبزیجات
+	-	+	ظرف بسته بندی
+	-	+	روکش ظرف بسته بندی
-	-	-	دستکش پلاستیکی
++	+	+++	دست کارگر

\*میزان آلودگی سطوح : ++++ خیلی آلوده، +++ آلوده، ++ نسبتاً آلوده، + کمی آلوده، - بدون آلودگی

میکروبی کم می شود. بنابر عقیده Sapers (۲۰۰۳) و Gil و همکاران (۲۰۰۹) بهترین روش، استفاده از روش دوش و سورتینگ است که ابتدا نمونه در حال حرکت با آب شسته شده و سپس در حوض حاوی ماده ضدعفونی غوطه ور و دوباره با دوش آب تمیز شسته شود. علاوه بر این، برای کاهش آلودگی ثانویه بهتر است موارد زیر نیز رعایت شود.

نواحی ورود مواد خام، شستشوی سبزیجات و بسته بندی برای جلوگیری از آلودگی ثانویه از یکدیگر کاملاً جدا باشد و همچنین سبدهای مورد استفاده در قسمت شستشو با سایر سبدها جدا گردد و تا حد امکان سبدها روی هم قرار نگیرند، چون سطح زیرین سبدها بعلت تماس با زمین آلوده می شوند و آلودگی را به سبد بعدی منتقل می کنند.

دست کارگران یکی دیگر از مسائل مهمی است که باید به آن توجه ویژه نمود. به عنوان مثال بهتر است طی روز دستکش ها دائماً تعویض شود واز ماده ضدعفونی برای شستشوی دست ها استفاده شود و رفت و آمد کارگران از بخش غیر تمیز به بخش تمیز حتماً با

Lehto و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که سطوح وسایل در ماشین برش، پوست کنی، سانتریفوژ و قسمت سورتینگ بیشترین آلودگی را دارند و بنابراین می توانند باعث آلودگی ثانویه سبزیجات شوند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است نمونه ها بعد از شستشو و ضدعفونی دوباره افزایش آلودگی دارند و حتی تا ۲ سیکل لگاریتمی آلودگی افزایش می یابد که ناشی از آلودگی ثانویه است و وسایل و سطوح آلوده یکی از علل این آلودگی ثانویه می باشند.

Allende و همکاران (۲۰۰۸) و López-Gálvez و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که آلودگی ثانویه در تمام مسیر میتواند وجود داشته باشد و باعث افزایش میزان آلودگی محصول نهایی شود و معتقدند که باید به این مورد توجه ویژه ای نمود.

یک راه حل تغییر روش شستشو (Sapera, 2003; Gil, et al., 2009) می باشد. همانطور که گفته شد در واحد مورد بررسی همانند تمام واحدهای دیگر، نمونه ها در آب شستشو غوطه ور می شوند و این آب طی روز دائماً استفاده می شود و این یعنی افزایش تعداد میکروب و کاهش اثر عامل ضد میکروبی و در نتیجه کارایی ماده ضد

بیماریزا به ماده غذایی می باشد Lehto و همکاران (۲۰۱۱). بنابراین بهتر است کیفیت آن دائم کنترل شود. استفاده از سیستم فشار مثبت یا منفی هوا برای دور کردن عوامل بیماریزایی که می توانند از طریق هوا منتقل شوند در مکانهای حساس نیز می تواند مفید باشد.

یک سری تمهیدات همراه باشد. سطوح بطور دائم از نظر آلودگی کنترل شود و در انتهای هر مرحله از کار با مواد ضد عفونی قوی و برس شسته شود. هوای سالن یکی دیگر از عواملی است که می تواند در آلودگی ثانویه نقش داشته باشد و ناقل خوبی در انتقال کپک، مخمر، گرد و غبار و باکتری های

## منابع

- Abadias, M., Usall, J., Anguera, M., Solsona, C., Vinas, I. 2008. Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments. *Food Microbiology*, 123: 121-129.
- Abadiasa, M., Alegreb, I., Usall, J., Torresa, R. and Viñasb, I. 2011. Evaluation of alternative sanitizers to chlorine disinfection for reducing food-borne pathogens in fresh-cut apple. *Postharvest Biology and Technology*, 59: 289-297.
- Albrecht, J. A., Hamouz, F. L., Summer, S. S., Melch, V. 1995. Microbial evaluation of vegetable ingredients in salad bars. *Journal of Food Protection*, 58: 683-685.
- Allende, A., Selma, M. V., López-Gálvez, F., Villaescusa, R., Gil, M. I., 2008. Impact of wash water quality on sensory and microbial quality, including *Escherichia coli* cross-contamination, of fresh-cut escarole. *Journal of Food Protection*, 71: 2514-2518.
- Anonymous, 2007. Fresh-cut. The sector takes off in a big way but there is still a long road ahead. URL: [http://www.fruittoday.com/articulos.php?id=1184161180215227 & idioma=E](http://www.fruittoday.com/articulos.php?id=1184161180215227&idioma=E).
- Artes, F., Gomez, P., Aguayo, E., Escalona, V., Artez-herandez, F., 2009. Sustainable sanitation techniques for keeping quality and safety of fresh-cut plant commodities. *Post harvest Biology and Technology*, 51: 287-296.
- Behrsing, J., Winkler, S., Franz, P., Premier, R., 2000. Efficacy of chlorine for inactivation of *Escherichia coli* on vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 19: 187-192.
- Beuchat, L. R. 1996. Pathogenic microorganism associated with fresh product. *Journal of Food Protection*, 59: 204-216.
- Beuchat, L. R., Nai, B. V., Clavero, M. R. S., 1998. Efficacy of spray application of chlorinated water in killing pathogenic bacteria on raw apples, tomatoes, and lettuce. *Journal of Food Protection*, 61: 1305-1311.
- Crowe, K. M., Bushway, A. A., Bushway, R. J., Davis-Dentici, K. Hazen, R. A., 2007. A comparison of single oxidants versus advanced oxidation processes as chlorine alternatives for wild blueberry processing (*Vaccinium angustifolium*). *International Journal of Food Microbiology*, 116: 25-31.
- Doyle, M. P., 1990. Fruits and vegetables safety-microbiological considerations. *Horticulture science*, 25: 1478-1481.
- FDA (Food and Drug Administration, USA), 2006. Spinach and *E. coli* outbreaks. URL: <http://www.fda.gov/oc/opacom/hottopics/spinach.html>. > (accessed 06.02. 2009).
- FDA (Food and Drug Administration, USA), 2008. Guidance for industry. Guide to minimize microbial food safety hazards of fresh-cut fruits and vegetables. URL: <http://www.fda.gov/food/guidance-compliance-regulatory-in-formation/guidance-documents/>> (accessed 06.02. 2009).
- Gil, M. I., Selma, M. V., Lopez-Glavez, F., Allende, A., 2009. fresh-cut product sanitation and wash water disinfection: Problems and solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 134: 37-45.
- HPA (Health Protection Agency). 2004. Direct Enumeration of *Escherichia coli*. National Standard Method Standard F20, Issue 1 Available from: <http://www.hpa-standard-methods.org.uk/documents/food/pdf/F20.pdf> > (accessed 06.02.2009).
- HPA (Health Protection Agency), 2004b. Enumeration of *Staphylococcus aureus*. National Standard Method: F12, Issue 1 Available from: <http://www.hpa-standard-methods.org.uk/documents/food/pdf/F12.pdf> > (accessed 06.02. 2009).
- HPA (Health Protection Agency), 2005a. Standard Methods for Food Products. Detection of *Salmonella* Spp. F13, Issue 3.1. HPA, London. Available from: <http://www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/food/pdf/F13.pdf> < (accessed 06.02.2009).
- HPA (Health Protection Agency), 2005b. Standard Methods for Food Products. Enumeration of *Bacillus cereus* and Other *Bacillus* species. F15, Issue 1. HPA, London. Available from: <http://www.hpa->

- standardmethods.org.uk/documents/food/pdf/F15.pdf> (accessed 06.02.2009).
- IFPA (International Fresh-cut Produce Association). 2001. Food safety guidelines for the fresh-cut produce industry. 4th ed. Alexandria, VA: IFPA.
- Lehto, M., Kuisma, R., Maata, J., Kymalainen, H. R., Maki, M. 2011. Hygienic level and surface contamination in fresh-cut vegetable production plants. *Food Control*, 22: 469-475.
- López-Gálvez, F., Allende, A., Selma, M. V., Gil, M. I., 2009. Prevention of *Escherichia coli* cross-contamination by different commercial sanitizers during washing of fresh-cut lettuce. *International Journal of Food Microbiology* doi: 10.1016/j.ij food micro. 2009.05.017.
- Mukherjee, A., Speh, D., Jones, A. T., Buesing, K. M., Diez-Gonzalez, F., 2006. Longitudinal microbiological survey of fresh produce grown by farmers in the upper Midves. *Journal of Food Protection*, 69: 1928-1936.
- Nguyen-the, C., Carlin, F. 1994. The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical reviews in food science and nutrition*, 34: 371-401.
- Nguz, K., Shindano, J., Samapundo, S., Huyghebaert, A., 2005. Microbiological evaluation of fresh-cut vegetables produced in Zambia. *Food Control*, 16: 623-628.
- Sapers, G.M. 2003. Washing and sanitizing raw materials for minimally processed fruits and vegetables. In Novak, J.S., G.M. Sapers, and V.K. Juneja. (Eds). *Microbial Safety of Minimally Processed Foods*. Boca Raton, FL: CRC Press: 221-253.
- Schlech, W. F., Levigne, P. M., Bortolussi, R. A., Allen, A. C., Haldane, E. V., Wort, A. J., Hightower, A. W. 1983. Epidemic Listeriosis-evidence for transmission by food. *New England Journal of Medicine*, 308: 203-206.
- Soriano, J. M., Rico, H., Molto, J. C., Manes, J., 2000. Assessment of the microbiology quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology*, 58: 123-128.
- Tauxe, R., Kruse, H., Hedberg, C., Potter, M., Madden, J., Wachsmuth, K., 1997. Microbial hazards and emerging issues associated with produce. A preliminary report to the national advisory committee on microbiological criteria for foods. *Journal of Food Protection*, 60: 1400-1408.
- Ukuku, D. O., 2004. Effect of hydrogen peroxide treatment on microbial quality and appearance of whole and fresh-cut melons contaminated with *Salmonella* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 95: 137-146.
- Ukuku, D. O., 2006. Effect sanitizing treatments on removal of bacteria from cantaloupe surface, and re-contamination with *Salmonella*. *Food Microbiology*, 23: 289-293.
- Velazquez, L. D. C., Barbini, N. B., Escudero, M. S., Estrada, C. L., De Guzman, M. S., 2009. Evaluation of chlorine, benzalkonium chloride and lactic acid as sanitizers for reducing *Escherichia coli* O157:H7 and *Yersinia enterocolitica* on fresh vegetables. *Food Control*, 20: 262-268.



## Microbial Load Evaluation of Fresh-Cut Vegetables During Processing Steps in A Vegetable Processing Plant Using Minimally Processing Approach

M. Bahreini<sup>1</sup> - M.B. Habibi Najafi<sup>2\*</sup> - M.R. Bassami<sup>3</sup> - M. Abbaszadegan<sup>4</sup> - A.R. Bahrami<sup>5</sup> - H. Ejtehad<sup>5</sup>

Received: 13-02-2011

Accepted: 04-10-2011

### Abstract

The number of vegetable processing plants has been increased during recent years in Iran as many other countries. On the other hand, fresh vegetable products are susceptible to microbial contamination after harvest, processing, handling, packing and distribution. The aim of this study was to determine and evaluate the level of microbial load of vegetables during different cleaning steps in a fresh-cut vegetable processing plant and to identify the critical points in the process lines and operating areas. Samples were taken from the plant before and after washing, disinfection, cutter, drying and packaging and kept in ice pack and delivered to the laboratory. The samples were analyzed for mesophilic aerobic count, yeasts and moulds, lactic acid bacteria, total coliforms, Enterobacteriaceae, *E. coli* and *Staphylococcus aureus* as well as for the presence of *Salmonella*, according to the standard guideline. The amounts of total aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, *E. coli*, yeasts and moulds on surfaces and air were also determined. Results showed that bacteria as well as yeasts and moulds levels were decreased after washing and disinfection up to 1 and 1.5 log<sub>10</sub>, respectively, but after that, the microbial load was increased due to secondary contamination. During all steps, salmonella was not detected, but *E. coli* detected in some of the steps and *S. aureus* was detected at all steps. The highest levels of total aerobic bacteria, Enterobacteriaceae, *E. coli*, yeasts and moulds were detected on the equipments (cutters, peeling, centrifuge machines, etc.). Different Hygienic areas should be separated enough to allow maintenance of good hygiene in cleaner areas in primary washing steps. Despite this, the results showed that there is a vital need to improve cleaning and hygienic practices in vegetable processing plants. Several practical recommendations were given for cleaning, design of production lines, training of employees and surface hygiene.

**Keywords:** Ready to eat vegetables, Microbial evaluation, Microbial quality, Minimal processing, Hygienic level

1- Ph.D Student , Dept. of Food Science and Technology, and Instructor of Department of Biology, Ferdowsi University of Mashhad.

2- Prof., Dept. of Food science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad.

(\*- Corresponding author Email: habibi@ferdowsi.um.ac.ir)

3- Prof., Dept. of Biotechnology, Faculty of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad.

4- Prof., Dept. of Civil and Environmental Engineering, Arizona State University, Tempe, AZ 85287-5306, USA

5- Prof., Dept. of Biology, Faculty of Science, Ferdowsi University of Mashhad.