

MINISTERIE VAN LANDBOUW
Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek
Kommissie voor T.W.O.Z.
Voorzitter : F. LIEVENS, Directeur-Generaal

Eigendom van het
V. es vicam. Ekonomisch Studiebureau
Brugge Reeks / Boek

**ORIENTERENDE PROEVEN OVER BAKTERIOLOGISCHE
KWALITEITSBEPALINGEN BIJ SCHOL (PLEURONECTES
PLATESSA L.) MET HET OOG OP DE VOORVER-
PAKKING.**

door

J. DEBEVERE

Publikatie nr. 1/1967

Werkgroep „Voorverpakking Vis” (I.W.O.N.L.)

Voorname Aande Bedrijven

MINISTERIE VAN LANDBOUW

Bestuur voor Landbouwkundig Onderzoek

Kommissie voor T.W.O.Z.

Voorzitter : F. LIEVENS, Directeur-Generaal

=====

Oriënterende proeven over bacteriologische kwaliteitsbepalingen
bij schol (*Pleuronectes Platessa L.*) met het oog op de voorver-
pakking.

=====

door

J. D E B E V E R E

Publikatie nr. 1/1967

Werkgroep "Voorverpakking Vis" (I.W.O.N.L.).

INLEIDING.

De jongste jaren is er een enorme ontwikkeling in de distributiesektor van de voedingswaren vast te stellen. Deze evolutie gaat gepaard met een verder doorgedreven stelsel van voorverpakking van de diverse levensmiddelen. Waar vlees, zuivelprodukten, fruit enz. reeds op grote schaal onder voorverpakte vorm verkocht worden, blijven vis en visserijprodukten hierop momenteel ten achter. Deze achterstand is te wijten aan een aantal moeilijkheden die hun oorzaak vinden in de verscheidenheid van de voor te verpakken grondstof, het verpakkingsmateriaal en de bewaaromstandigheden (temperatuur, relatieve vochtigheid). Deze drie factoren oefenen vanzelfsprekend een wisselwerking op elkaar uit, waarbij dan cruciaal is de kennis van de interactie tussen grondstof en verpakkingsmateriaal in functie van de bewaaromstandigheden.

Een kennis van deze interactie kan bekomen worden door een inzicht in de kwaliteit. Om de kwaliteit te kunnen bestuderen, zijn echter doeltreffende methoden voor kwaliteitsbepaling noodzakelijk. Er bestaan diverse methoden om, in objektieve zin, de kwaliteit van de vis te bepalen, nl. de fysische, de chemische en de bakteriologische. In deze bijdrage wordt de bakteriologische methode beschreven ; tevens wordt deze methode met de chemische vergeleken.

I. BAKTERIOLOGISCHE BEPALING.

Een veelvuldig aangewende methode voor bakteriologische kwaliteitsbepaling van voedingswaren bestaat in een telling van

het totaal aantal bacteriën. Deze methode slaat op vier punten, nl. de monstername, de voedingsbodem, de inkubatietempera-
tuur en de inkubatietijd ; de drie laatst genoemde punten worden inge-
schakeld in de techniek van de monstername.

A. Monstername van de huid.

De monstername werd op punt gesteld voor schol. Aan de hand van een reeks proeven kon worden bepaald dat er tussen de bleke of donkere kant en onder of boven de zijlijn van de vis geen wezenlijk verschil bestaat.

1. Ten aanzien van de plaats.

a) Proefomstandigheden.

- De monstername.

Talrijke onderzoekers deden bij een monstername op vis beroep op een huidmonster dat aseptisch weggenomen werd en van een bekende oppervlakte is (1) (2) (3) (4) (5). Deze methode blijkt de beste resultaten te geven en dit werd trouwens bevestigd door Trestven, die een reeks methoden met elkaar vergeleken heeft (6). Tot nog toe werd echter een belangrijk punt uit het oog verloren nl. de plaats van de monstername op het vislichaam met als doel een zo getrouw mogelijk beeld te verkrijgen van de besmettingsgraad van de vis. Hiervoor wordt met een zelfvervaardigde skabloon (raampje in aluminium met een binnenoppervlakte van 6 cm²), aseptisch een stukje huid van de kop, midden en staart weggesneden. Ieder stukje wordt in 36 ml Ringers oplossing gebracht en gedurende 15 minuten geschud. Hierdoor gaan de bacteriën in de oplossing

over en vormen zij een suspensie ; van deze suspensie wordt dan een verdunningsreeks aangelegd.

- De voedingsbodem.

Als voedingsbodem wordt trypton-glucose extract agar (T.G.E.A.) aangewend (1) (7).

- De inkubatietemperatuur.

De bakteriologische belasting omvat hoofdzakelijk de psychrofiele bacteriën (8) (9) (10) (11) (12), die groeien in een interval van 0° tot 30° C. Het komt er op aan een temperatuur te vinden, waarbij de psychrofiele bacteriën een optimale groei vertonen. Sommige onderzoekers werken bij 20° C (2) (4) (5) en andere bij 25° C (1) (3). In het onderzoek werd er beroep gedaan op een tussenliggende temperatuur nl. 23° C. Vergelijkende proeven bij 23° C en 30° C werden aangelegd met volgende resultaten (tabel 1).

Tabel 1 - Resultaten van de temperatuurproeven.

Monsternummer	23° C		30° C	
	Aantal	log	Aantal	log
1	$15 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	6.18	$61 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	5.79
2	$17 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	6.23	$61 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	5.78
3	$5 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$	6.70	$2 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$	6.30
4	$8 \cdot 10^6 / \text{cm}^2$	6.90	$11 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	6.04
5	$68 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	6.83	$13 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	6.11

De resultaten van ieder van de vijf proeven wijzen er op dat het inkuberen bij 23° C de hoogste resultaten geeft.

- De inkubatielijd.

Alvorens tot de tellingen over te gaan, duurt het inkuberen ca 3 x 24 u.

b) Resultaten.

De resultaten van de bepalingen ten aanzien van de plaats worden weergegeven in tabel 2.

Tabel 2 - Resultaten van de bepalingen ten aanzien van de plaats.

Monster- nummer	Kop		Midden		Staart	
	Aantal	log	Aantal	log	Aantal	log
1	$153 \cdot 10^5 / \text{cm}^2$	7.18	$54 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	5.73	$372 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	6.57
2	$135 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	5.13	$118 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.07	$348 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	6.54
3	$594 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.77	$119 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.08	$192 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.28
4	$81 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	4.91	$94 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	4.97	$159 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.20
5	$117 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	6.07	$108 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	6.03	$79 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	5.90
6	$186 \cdot 10^3 / \text{cm}^2$	5.27	$18 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	5.26	$234 \cdot 10^4 / \text{cm}^2$	6.37

Aan de hand van de gegevens van tabel 2 kan worden nagegaan of er een wezenlijk verschil bestaat tussen die drie verschillende plaatsen.

De gevonden zekerheidscoëfficiënt q (= 2,53) is kleiner dan de opgegeven 90,01 (= 4,93) en bijgevolg leert de analyse dat er geen significant verschil bestaat tussen de verschillende behandelingen, m.a.w. tussen de verschillende plaatsen van monstername.

2. Bemonstering van donkere of bleke kant bij schol onder of boven de zijlijn.

Een tweede aspect van de plaatsbepaling is de vraag of de monsternamen moet geschieden aan de donkere of bleke kant van de schol en onder of boven de zijlijn. Hiervoor werd een ska-bloon vervaardigd van 9 cm lang en 2 cm breed om een strook, die van de kop tot de staart loopt, te bemonsteren.

Tabel 3 - Analyseresultaten van de bemonstering van de donkere of bleke kant bij schol, onder of boven de zijlijn (a)

Monsternummer	BD	OD	BB	OB
1	6.11	5.90	5.90	5.95
2	4.51	4.51	4.45	4.60
3	4.91	4.30	4.26	4.15
4	5.30	5.52	4.51	4.83
5	5.81	5.88	5.04	5.26
6	5.54	5.92	5.46	5.40
7	5.90	5.57	5.58	5.52
8	4.91	4.65	4.04	4.48
9	5.23	5.26	4.51	4.08
10	4.53	4.43	4.38	4.63

BD = boven donker (boven zijlijn), OD = onder donker (onder zijlijn),
BB = boven bleek (boven zijlijn), OB = onder bleek (onder zijlijn).

(a) De waarden duiden het logarit~~h~~me aan van het aantal bacteriën per cm² huid.

De bekomen waarde van de zekerheidscoëfficiënt q ($= 2,5$) is kleiner dan 4,80, zodat er geen wezenlijk verschil bestaat,

m.a.w. er mag een monster genomen worden op gelijk welke plaats van de vis.

Aangezien er geen wezenlijk verschil bestaat tussen de plaatsen van de donkere of bleke kant, onder of boven de zijlijn en ook niet tussen de kop, midden en staart mag er op om het even welke plaats van de vis een monster genomen worden. Hoe groter het oppervlak echter, hoe beter de weergave is van de totale belasting. Daarom wordt er geopteerd voor een grote skabloon van 9 cm lang en 2 cm breed.

B. Monstername van het visvlees.

Met behulp van een scalpel wordt op verscheidene plaatsen, een willekeurig oppervlak van de huid van het aanklevend slijm ontdaan ; hierdoor wordt het grootste gedeelte van de bacteriën verwijderd. Daarna wordt de oppervlakte volledig steriel gewreven met katoenwol, doordrengd met ethanol. De huid wordt dan aseptisch verwijderd en van het blootgelegde vlees wordt een hoeveelheid afgewogen in een vooraf getareerde steriele petri-schaal. Vervolgens wordt met het visvlees een 10 % suspensie gemaakt door met Ringers oplossing gedurende 5 min. steriel te homogeniseren. Het aanleggen van de verdunningsreeks, de gebruikte bodem, de inkubatietijd en temperatuur zijn dezelfde als bij de bepaling op de huid.

III. VERGELIJKING MET DE CHEMISCHE METHODEN.

Bij deze vergelijkende proeven werd er beroep gedaan op twee chemische bepalingen, nl. de bepaling van het trimethyl-

aminegehalte en de bepaling van de hoeveelheid totale vluchtige basische stikstof.

A. Bepaling van het trimethylamine (TMA) (13).

Het TMA kan bepaald worden door destillatie, door microdiffusie of door kolorimetrie van het picraat. Deze laatste methode blijkt de vlugste en de handigste te zijn.

Het principe kan als volgt geschetst worden.

Het TMA, dat door extractie of destillatie uit de vis geïsoleerd werd, wordt in een organische solvent (bv. tolueen) overgebracht. Hiervoor is het echter noodzakelijk dat het TMA, dat als zout voorkomt, in vrije base zou worden omgezet; dit geschiedt door toevoeging van kaliumcarbonaat. Ammoniak, dat eveneens aanwezig is, stoort de reactie en wordt dan ook geblokkeerd door formaldehyde. Na deze bewerkingen volstaat het, het tolueen te drogen en het TMA te bepalen als picraat, door het toevoegen van een picrinezuuroplossing.

In het onderzoek wordt de extraktiemethode toegepast.

1. Proefomstandigheden.

a) Reagentia.

- Trichloorazijnzuuroplossing : 7,5 % in water.
- Tolueen p.a., gedroogd over watervrij natriumsulfaat.
- Picrinezuuroplossing : stockoplossing : los 2 g droog picrinezuur, p.a. in 100 ml watervrij tolueen op ; werkoplossing : verdun 1 ml tot 100 ml met watervrij tolueen.

- Kaliumcarbonaatoplossing : los 100 g in 100 ml water op.
- Formaldehydeoplossing : verdun 10 ml commercieel formol 35 % (geschud met magnesiumcarbonaat en gefiltreerd) tot 100 ml met water.
- Natriumsulfaat, korrelig, watervrij.

b) Apparatuur.

Coleman Junior Spectrofotometer met ronde buizen van 19 mm diameter.

2. Werkwijze.

Een homogeen door de vleesmolen gedraaide vismonster van 100 g wordt afgewogen en in een mixer gebracht ; 200 ml 7,5 % trichloorazijnzuuroplossing worden toegevoegd. De mixer laat men 2 min. draaien.

Vervolgens wordt 1 ml van de bovenste vloeistof afgepipeteerd en in een maatglas van 50 ml, voorzien van een polyethyleenstop, gebracht. Men voegt 4 ml water bij, 1 ml formaldehyde-reagens, 10 ml tolueen en 3 ml kaliumcarbonaatoplossing. Men sluit het maatglas en schudt heftig gedurende 30 sec. ; men pipeteert 5 ml van de tolueenlaag in een maatglas van 10 ml, voorzien van een polyethyleenstop en waarin 0,3 g korrelig natriumsulfaat gebracht wordt. Men sluit de buis en schudt zachtjes enkele malen om het tolueen te drogen. Het gedroogde tolueen wordt in een droge kolorimeterbuis gegoten, 5 ml picrinezuuroplossing worden toegevoegd en de oplossing wordt gemengd door voorzichtig schudden. Men leest de extinktie af bij een golflengte van 400 mu en vergelijkt met de ijkcurve.

Op te merken valt dat de methode enkel bruikbaar is voor hoeveelheden TMA-stikstof begrepen tussen 0,002 en 0,035 mg.

B. Bepaling van de totale vluchtige basische stikstof (TVB) (13).

De bepaling van de TVB is één van de oudste methoden om het bederf van de vis vast te stellen. Twee technieken kunnen aangewend worden om de TVB te bepalen, nl. de destillatie en de mikrodifusie. Bij de eerstgenoemde methode wordt de TVB door magnesiumoxyde vrijgesteld en overgedestilleerd in getitreerd zwavelzuur. Bij de tweede methode worden bijzondere Conway-schalen gebruikt, die bestaan uit twee concentrische kuvetten. In de buitenste kuvet wordt vissap gebracht en verzadigd kaliumcarbonaat toegevoegd, waardoor de TVB uitgedreven wordt. Dit wordt in de binnenste kuvet opgevangen in boorzuur en getitreerd. Er werd een vergelijkend onderzoek tussen de twee methoden doorgevoerd waaruit bleek, dat beide praktisch dezelfde resultaten geven. Tijdens de proefnemingen werd dan ook uitsluitend de destillatietechniek toegepast, daar deze werkwijze handiger voorkwam.

1. Proefomstandigheden.

a) Methode.

Er wordt een normale destillatie toegepast. Het is echter ook mogelijk een vacuum- of stoomdestillatie door te voeren. De stoomdestillatie werd voor deze proefnemingen echter verkozen, vermits deze methode minder tijdrovend is. Hiervoor moesten echter de proefomstandigheden opnieuw vastgelegd worden.

b) Reagentia.

- Magnesiumoxyde, zuiver
- Zwavelzuur 0,1 N

- Natriumhydroxyde, 0,1 N
- Gemengde indikator voor stikstoftitraties (Mischindikator 5, Merck).

c) Apparatuur.

De apparatuur door Antonacopoulos voorgesteld, werd gebruikt. De kolven van 2 l worden elektrisch verwarmd.

2. Werkwijze.

De te onderzoeken vis wordt door een vleesmolen gedraaid en zorgvuldig doorengemengd. Een homogeen monster van 10 g wordt in de reaktiekolf gebracht : 2 g magnesiumoxyde en een weinig silikoon-antischuimmiddel worden toegevoegd en de koeler, waarvan het uiteinde gedompeld wordt in 25 ml 0,1 N zwavelzuur, wordt onmiddellijk aangesloten. Van zodra het water in de stoomgenerator begint te koken, wordt de kraan gesloten en de destillatie juist 20 min. doorgevoerd. Na toevoeging van een achttal druppels indikator wordt het overtollig zwavelzuur teruggetitreerd met 0,1 N natriumhydroxyde.

Uit de proefnemingen is gebleken, dat de destillatiemethode goed reproduceerbaar is en het gebruik van een energieregelaar voor de elektrische verwarmingsmantels niet vereist is. Een destillatietijd van 20 min. blijkt voldoening te geven, maar dient nauwkeurig in acht genomen te worden ; per bijkomende minuut komt immers 2 à 3,5 % TVB bij.

Vier bewaringsproeven van schol werden aangelegd bij 0° C. Na respectievelijk 0, 3, 6, 8 en 10 dagen werden telkens 3 vissen genomen en ontleed op het aantal bacteriën per cm² huid, per gram visvlees, het TMA gehalte en TVB gehalte. De resultaten

zijn vermeld in tabel 4.

Tabel 4 - Resultaten van de bewaarproeven van schol bij 0° C (a).

Monster	dagen	huid(per cm ²)	vlees(per g)	TMA(mgN%)	TVB(mgN%)
1	0	4.10	-	0,6	18.5
	3	4.12	-	0.7	19.6
	6	6.33	3.30	5.9	23.4
	8	6.58	3.84	9.3	32.2
	10	6.66	3.72	11.6	39.2
2	0	4.12	-	0.6	16.4
	3	4.00	2.18	2.2	21.3
	6	6.70	3.81	11.5	24.1
	8	5.90	3.03	13.3	38.2
	10	7.30	3.09	15.7	42.7
3	0	4.18	1.30	1.0	20.3
	3	5.28	1.47	0.6	19.2
	6	7.00	2.97	4.2	21.0
	8	7.04	3.15	5.6	29.0
	10	7.15	3.60	17.7	42.0
4	0	5.11	1.47	1.1	18.5
	3	5.88	3.06	5.4	26.9
	6	6.00	4.23	21.2	42.7
	8	6.63	2.60	20.4	51.8
	10	7.08	6.38	16.6	56.0

(a) Het aantal bacteriën op de huid en in het vlees zijn logarit-
misch uitgedrukt.

Aan de hand van de waarnemingen uit tabel 4 werd een correlatieberekening tussen deze vier factoren uitgevoerd.

- Correlatie tussen het aantal bacteriën per gram vlees en TMA :
 $r = 0,764 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).
- Correlatie tussen het aantal bacteriën per gram visvlees en TVB :
 $r = 0,736 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).
- Correlatie tussen het aantal bacteriën per cm^2 huid en TMA :
 $r = 0,700 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).
- Correlatie tussen het aantal bacteriën per cm^2 huid en TVB :
 $r = 0,700 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).
- Correlatie tussen het aantal bacteriën per cm^2 huid en het aantal bacteriën per gram visvlees $r = 0,820 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).
- Correlatie tussen TMA en TVB : $r = 0,920 > 0,561$ (voor $n = 20$ en 0,5 % eenzijdige overschrijdingskans).

III. BESLUITEN.

1. De plaats van monstername op de vis voor bacteriologische bepalingen mag willekeurig gekozen worden, m.a.w.

aan de bleke of donkere kant, onder of boven de zijlijn.

2. Tussen de vier uitgewerkte kwaliteitsbepalingen (bacteriën per g voor vlees, bacteriën per cm² huid, TMA en TVB) bestaat er een goede correlatie.

LITERATUUR.

- (1) ANDERSON G. - Fish inspection service in Canada as is relates to the inspection of fresh and frozen fish and fish products. The Technology of Fish Utilization. Fishing News (Books) Ltd, London, 147-153, 1965.
- (2) SPENCER R. - The bacteriology of distant water cod landed at Hull. J. Appl. Bact. 24 (1), 4-11, 1961.
- (3) WATANABE K. - Technological problems of handling and distribution of fresh fish in Southern Brazil. The Technology of Fish Utilization. Fishing News (Books) Ltd., London, 44-46, 1965.
- (4) GEORGALA D.L. - The bacterial flora of the skin of north sea cod. J. Gen. Microbiol. 18, 84-91, 1958.
- (5) GEORGALA D.L. - Changes in the skin flora of cod after washing and icing. J. appl. Bact. 20 (1) 23-29, 1957.
- (6) TRETSEVEN W.I. - Bacteriological survey of filleting process in the Pacific Northwest. I. Comparison of methods of sampling fish for bacterial counts. J. of Milk (Food) Technology, 26, 302-306, 1963.
- (7) LERKE L., ADAMS R., FARBER L. - Bacteriology of spoilage of fish muscle. I. Sterile press juice as a suitable experimental medium. appl. Microbiol. 11, 458-462, 1963.

- (8) SCHOLES R.B., SHEWAN J.M. - The present status of some aspects of marine microbiology. *Adv. mar. Biol.* 2, 133-169, 1964.
- (9) SHEWAN J.M. - The microbiology of sea water fish. Department of scientific and industrial research. *Fish as Food*. Georg Borgstrom academic Press, New York and London. Volume 1, 487-560, 1965.
- (10) CASTELL C.H., ANDERSON G.W., PIVNICK H. - Relation of bacterial counts to quality of cod fillets. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 7 (6), 378-388, 1948.
- (11) HESS E. - Bacterial fish spoilage and its control. *Food Technology*, 4 (12), 477-480, 1950.
- (12) MASUROVSKY E.B. - Changes in the microflora of haddock fillets and shucked soft shelled clams after irradiation with Co^{60} gamma rays and storage at 0° C and 6° C. *Appl. Microbiol.* 11, 229-234, 1963.
- (13) VYNCKE W. - De objektieve kwaliteitsbepaling van vis. Proefstation voor Zeevisserij, publikatie nr. 5, 11-17, 1964.

Augustus 1967.

