



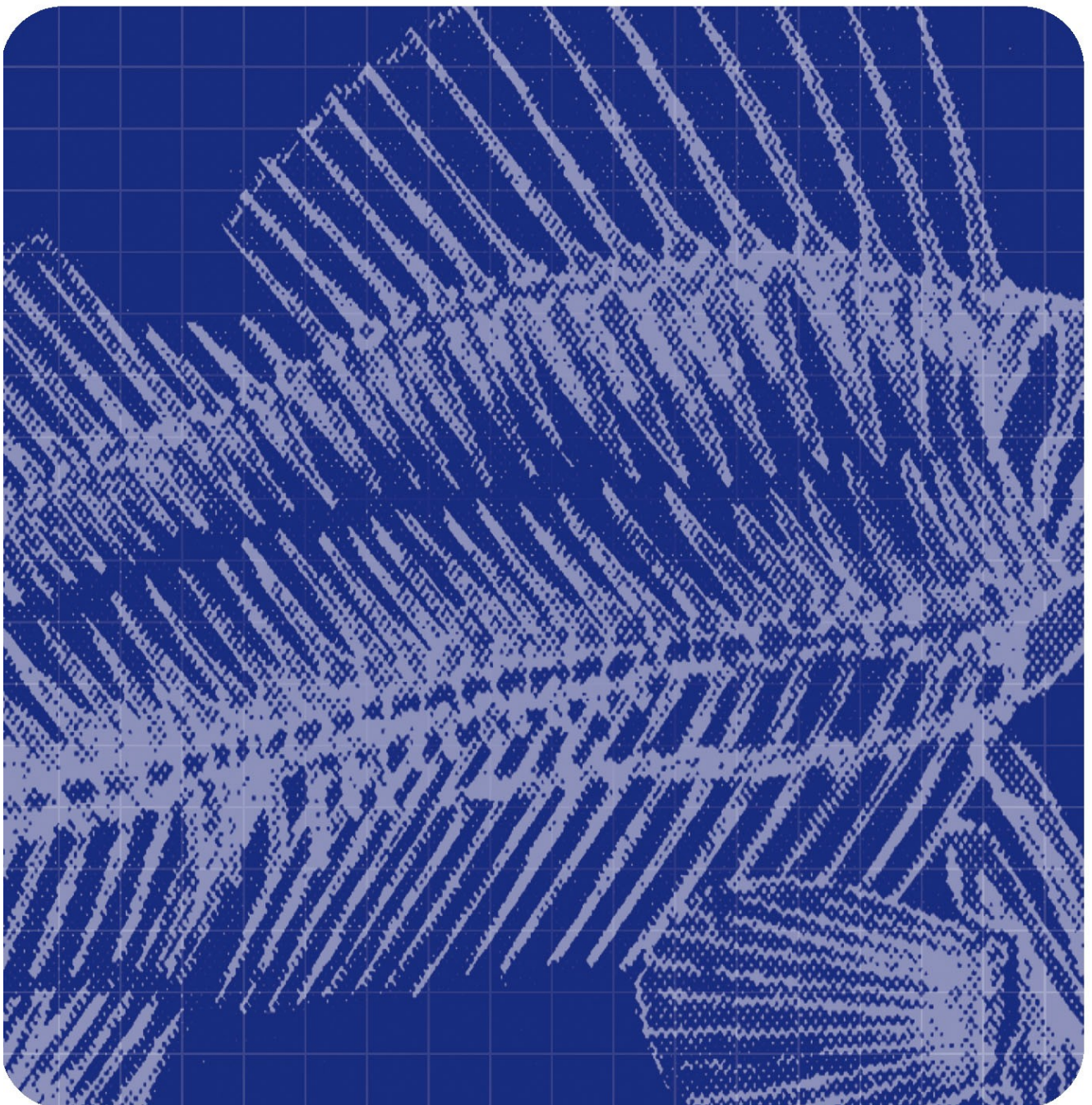
Fiskeriforskning

RAPPORT 7/2003 • Utgitt april 2003

FAST

Utvikling og ferdigstilling av en hurtigmetode for dokumentasjon av råvare- og produktkvalitet i sjømatindustrien

Grete Lorentzen, Fiskeriforskning og Ingun Tryland, Colifast AS





Norut Gruppen er et konsern for anvendt forskning og utvikling og består av morselskap og seks datterselskaper. Konsernet ble etablert i 1992 – fundamentert på daværende FORUTs fire avdelinger og Fiskeriforskning.

Konsernet består i dag av følgende selskaper:

Fiskeriforskning, Tromsø

Norut IT, Tromsø

Norut Samfunnsforskning, Tromsø

Norut Medisin og Helse, Tromsø

Norut Teknologi, Narvik

Norut NIBR Finnmark, Alta

Konsernet har til sammen vel 240 ansatte.



Fiskeriforskning (Norsk institutt for fiskeri- og havbruksforskning AS) utfører forskning og utvikling for fiskeri- og havbruksnæringen innen

- sjømat og industriell foredling
- marin bioteknologi og fiskehelse
- fôrutvikling og marin prosessering
- havbruk
- økonomi og marked

Fiskeriforskning har ca. 160 ansatte fordelt på Tromsø (110) og Bergen (50). Fiskeriforskning har velutstyrte laboratorier og forsøksanlegg i Tromsø og Bergen.

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9-13

Postboks 6122

N-9291 Tromsø

Telefon: 77 62 90 00

Telefaks: 77 62 91 00

E-post: post@fiskeriforskning.no

Avdelingskontor Bergen:

Kjerreidviken 16

N-5141 Fyllingsdalen

Telefon: 55 50 12 00

Telefaks: 55 50 12 99

E-post: office@fiskeriforskning.no

Internett: www.fiskeriforskning.no

RAPPORT

Tilgjengelighet:

Åpen

Rapportnr:

7/2003

ISBN:

82-7251-517-2

Tittel:

FAST
Utvikling og ferdigstillelse av en hurtigmetode for dokumentasjon av råvare- og produktkvalitet i sjømatindustrien

Dato:

29.04.03

Antall sider og bilag:

12 + 8

Forfatter(e):

Grete Lorentzen¹

Ingun Tryland²

Forskningssjef:

Even Stenberg

Avdeling:

¹Fiskeriforskning, ²Colifast AS

Prosjektnr.:

8576

Oppdragsgiver:

Colifast AS

Oppdragsgivers ref.:

3 stikkord:

Hurtigmetode, sulfidproduserende bakterier, sjømat

Sammendrag: (maks 200 ord)

Sjømatindustrien etterspør i dag enkle og billige hurtigmetoder for å fastsette kvaliteten på produktene. I påvente av slike metoder anvendes tradisjonelle analyser, f.eks platespredningsmetode ved mikrobiologiske analyser. Ulempen ved slike metoder er at det tar gjerne 2 til 3 dager før analyseresultatet er klart. I dette prosjektet er det utviklet en hurtigmetode for påvisning og kvantifisering av sulfidproduserende bakterier (SPB) i sjømat. SPB er en gruppebetegnelse på kvalitetsforringende bakterier i sjømat som ved vekst produserer hydrogensulfid gass (H₂S). I utviklingen av metoden har det vært viktig å ta hensyn til fiskeindustriens behov; enkelt å ta ut prøven, ingen krav til laboratorie fasiliteter, enkelt å lese av. Foruten basis sterilteknikk, kreves det ingen spesifikke kunnskaper i mikrobiologi for å anvende metoden. En prøve med et høyt antall SPB, f.eks 1 000 000 SPB/g detekteres og kvantifiseres innen 5 timer, mens et lavere antall, f.eks 1000 SPB/g, detekteres i løpet av 12 – 14 timer. Parallelle analyser utført på jernagar, referansemotoden, viser en tilfredsstillende sammenheng. I april 2003 ble det innvilget et US-patent på analyseprinsippet for hurtigmetoden.

INNHold

1	INNLEDNING.....	1
2	HURTIGMETODEN.....	2
3	BRUK AV METODEN.....	5
4	MÅL.....	6
5	FAGLIG GJENNOMFØRING OG RESULTATER	7
	5.1 Kravspesifikasjoner og prosedyrer.....	7
	5.2 Testkit; reagenser og forbruksvarer.....	7
	5.3 Uttesting i bedrift; teknisk evaluering av hurtigtesten mot referansemetoden.....	8
	5.4 Kartlegge bedriftenes erfaring med hurtigtesten; egnethet, tekniske krav, fremtidig nytteverdi osv.	8
	5.5 Kjølelagring av prøver før inkubering.....	9
6	RESULTATOPPFØLGING	10
7	KONKLUSJON.....	11
8	PÅSKJØNNELSE	11
9	REFERANSER.....	12

1 INNLEDNING

Sjømatindustrien etterspør i dag enkle og billige hurtigmetoder for å fastsette kvaliteten på produktene. I påvente av slike metoder anvendes tradisjonelle analyser, f.eks. platespredningsmetode ved mikrobiologiske analyser. Ulempen ved slike metoder er at det tar gjerne 2 til 3 dager før analyseresultatet er klart. Ellers er metoden arbeidskrevende og stiller krav til kompetanse på sterilteknikk hos den som skal utføre analysen.

Ved kjølelagring av fersk sjømat utvikles det etter hvert en bakterieflora som hovedsakelig består av kuldeelskende bakterier. Dette måles som total antall bakterier. Det er imidlertid bare en del av disse bakteriene som forårsaker kvalitetsforringelse (Gram et al., 1987). Det kan derfor være misvisende å bruke total antall bakterier som et direkte mål på kvalitetsforringelse av kjølte sjømatprodukter (Huss, 1974). Det er imidlertid funnet en direkte sammenheng mellom gjenværende holdbarhet og SPB for en rekke fiskeslag (Gram, 2002).

I dette prosjektet er det utviklet en hurtigmetode for påvisning og kvantifisering av sulfidproduserende bakterier (SPB) i sjømat. SPB er en gruppebetegnelse på kvalitetsforringende bakterier i sjømat som ved vekst produserer hydrogensulfid gass (H_2S). Noen produserer også trimetylamin (TMA). Både H_2S gass og TMA forårsaker den typiske lukten som kjennetegner forråtnelse. Gjennom et tidligere samarbeidsprosjekt mellom Colifast AS og Fiskeriforskning er det utviklet en instrumentell analysemetode for hurtig påvisning og kvantifisering av SPB (Lorentzen, Skjerdal, Bjørkevoll, 2001., Lorentzen, 2002., Lorentzen, Skjerdal, Berg, 2001., Skjerdal, Lorentzen, 2003). I dette prosjektet er analysemetoden videreutviklet fra å være instrumentell metode basert på fluorescens målinger til å bli en metode basert på visuell avlesning av analyseresultatet. Sammenlignet med den tradisjonelle platespredningsmetoden på jernagar (Gram et al., 1987), vil denne metoden gi et analyseresultat innen 14 timer.

Gjennom dette prosjektet har hurtigtesten vært testet ut ved to fiskeindustribedrifter; en som foredler hvitfisk og en som foredler laks. Resultater fra uttestingen og øvrige resultater presenteres i denne rapporten. Hurtigtesten er nå klar til bruk i sjømatindustrien.

2 HURTIGMETODEN

Ved å anvende det nye måleprinsippet på SPB vil analyseresultatet foreligge innen 14 timer. Den totale analysetiden avhenger av hvor mange SPB det er i prøven. Dersom råstoffet er flere dager gammelt eller har vært lagret ved høy temperatur, vil antallet SPB være høyt. Men i bedrifter med gode rutiner for håndtering og lagring av råstoff, j.fr ubrutt kjølekjede, vil antallet SPB være lavt. Ved å bruke denne hurtigtesten på et slikt råstoff vil den totale analysetiden være på ca 14 timer, dvs råstoffet inneholder ca 100 SPB/g. Hurtigmetoden er tidsbesparende sammenlignet med dagens tradisjonelle platesprednings-metode.

Hurtigmetoden er utviklet med tanke på at den skal være enkel å utføre. Uttak av prøven kan f.eks foregå i nærheten av produksjonslinjen. Til prøveuttaket trengs skalpell og en pinsett som begge er sterilisert. Prøven overføres direkte til prøveglasset med medium, og kan deretter plasseres direkte i et inkubator skap på 30 °C. Det er derfor ikke nødvendig med et eget

laboratorium for å utføre analysen. For nærmere beskrivelse av prosedyre for prøveuttak og avlesning av prøven, se vedlegg 1.

Hurtigmetodens måleprinsipp baseres på utfelling av jernsulfid som skyldes vekst av SPB. Utfelling av jernsulfid kan måles på to måter; enten instrumentelt ved hjelp av et fluorometer eller ved å se når vekstmediet endrer farge fra gult til svart (visuell måling). Vekstmediet inneholder blant annet treverdige jern (jerncitrat) og svovel (cystein og natrium-thiosulfat). Ved vekst av SPB omdannes treverdige jern (FeIII) til toverdige jern (FeII), samtidig som det dannes svovelioner (S^{2-}). Toverdige jern felles ut som jernsulfid (FeS) samtidig som det dannes hydrogensulfid gass (H_2S). Økt konsentrasjon av jernsulfid måles instrumentelt som en endring i fluorescens. Overgangen fra treverdige til toverdige jern måles som en økning i fluorescens, og utfellingen av jernsulfid måles som en reduksjon i fluorescens. Ved reduksjon i fluorescens endrer vekstmediet farge fra gult til grått og til slutt svart. Ved instrumentell måling defineres deteksjonstiden som tiden fra analysestart til maksimal verdi for fluorescens er oppnådd. Ved visuell måling defineres deteksjonstiden som den tiden det tar fra analysestart til vekstmediet er svart. Ved instrumentell måling vil deteksjonstiden være ca 30 minutter tidligere sammenlignet med en visuell måling. Uansett målemetode er deteksjonstiden proporsjonal med bakterieinnholdet, dvs at en prøve med et høyt antall SPB, f.eks 1 000 000 SPB/g detekteres og kvantifiseres innen 5 timer, mens et lavere antall, f.eks 1000 SPB/g, detekteres i løpet av 12 – 14 timer.

Det er utført målinger på utvikling av fluorescens i prøver av torsk med forskjellige nivå SPB. Resultatene er vist i figur 1.

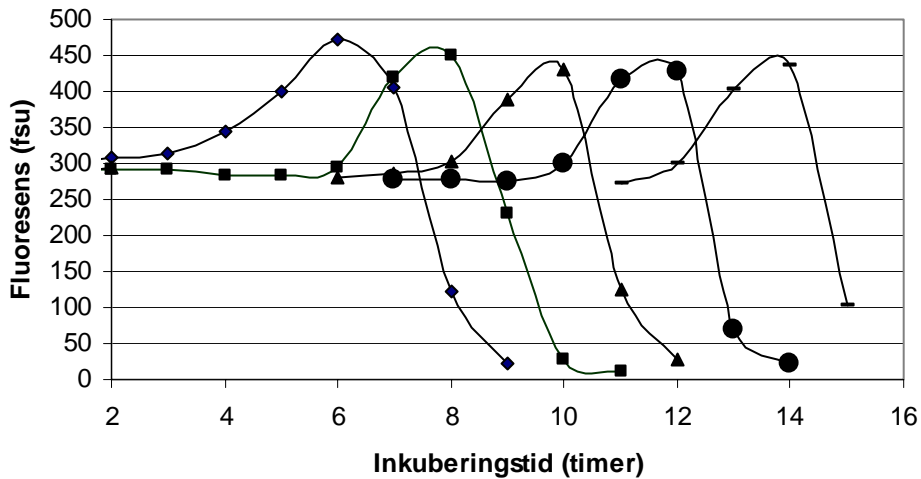
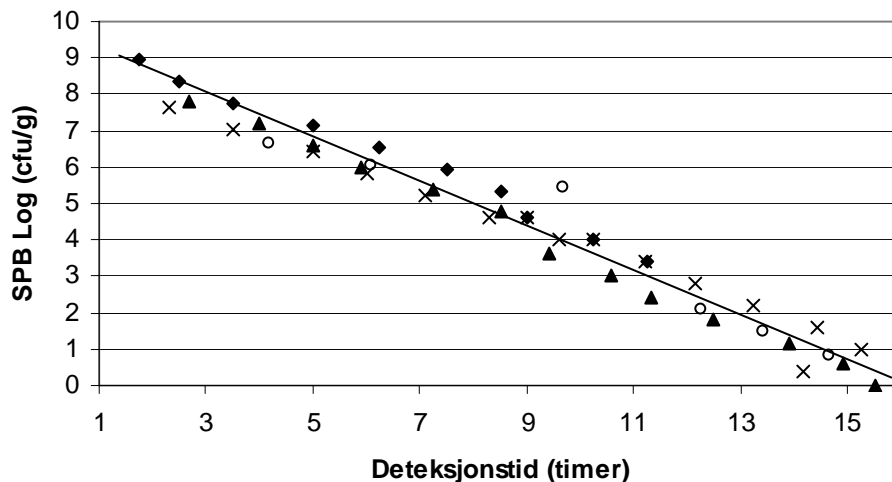


Fig 1. Utvikling av fluorescens i torsk med varierende nivå (cfu/g) SPB, hvor startantallet SPB var $1,4 \times 10^5$ (◆), $1,4 \times 10^4$ (■), $1,4 \times 10^3$ (▲), $1,4 \times 10^2$ (●) og $1,4 \times 10^1$ (—).

Figur 1 viser at prøven med det høyeste antallet SPB (kurven lengst til venstre, merket ◆) endrer fluorescens først. Deretter følger prøvene som har et lavere antall SPB. Alle prøvene viser samme utvikling i fluorescens; først en økning og deretter en reduksjon. Prøvene er gul og grå i det fluorescensen øker, fargen endres til svart like etter at maksimal verdi for fluorescens er passert.

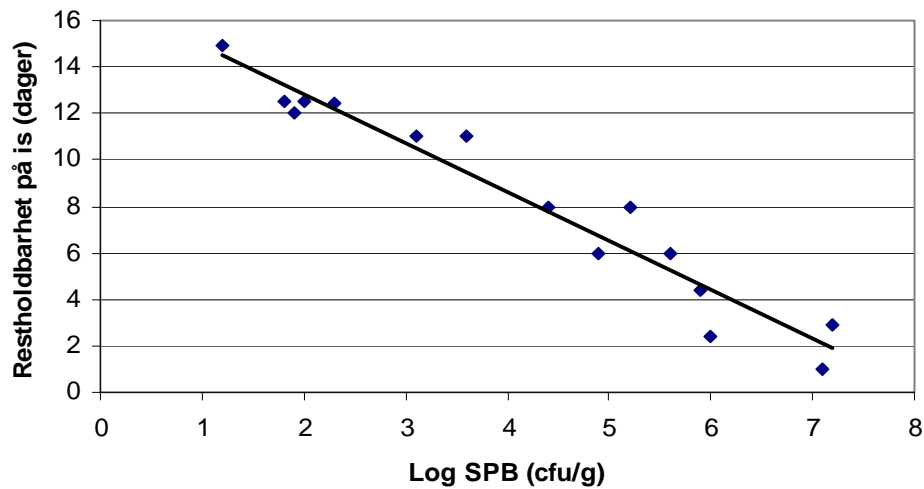
Sammenhengen mellom deteksjonstiden og SPB nivået i forskjellige typer sjømat er vist i figur 2.



Figur 2. Sammenheng mellom deteksjonstid og antall SPB i ulike typer sjømat. Korrelasjonskoeffisienten (R^2) for torsk (◆) er 0,99, for sei (■), steinbit (▲), for laks (X) og for alle prøvene 0,96.

Figur 2 viser en klar sammenheng mellom antall SPB og tiden det tar før fargeomslaget inntreffer (deteksjonstid). Denne sammenhengen er lik uansett om det er torsk, sei, steinbit eller laks.

I figur 3 vises sammenhengen mellom restholdbarhet i fersk iset marin fisk og SPB nivået.



Figur 3. Sammenhengen mellom restholdbarhet og SPB nivået i fersk iset marin fisk. Korrelasjonskoeffisienten (R^2) for linjen er 0,94. Restholdbarheten kan beregnes ved å bruke denne formelen: $\text{Restholdbarhet} = -2,13 \times \log(\text{SPB (cfu/g)}) + 17,7$ dager. Kilde: L.Gram, 2002.

Figur 3 viser sammenhengen mellom antall SPB og restholdbarhet på is for marin fisk. Ved å anvende formelen som er oppgitt i figurteksten, kan restholdbarheten beregnes. Med restholdbarhet menes gjenværende holdbarhet.

3 BRUK AV METODEN

Myndighetene stiller ikke krav til kvalitetsforringende bakterier i sjømat-produkter. I mikrobiologiske retningslinjer som er utarbeidet av Statens Næringsmiddeltilsyn (Anon, 2002), stilles det krav til maksimalt antall totale bakterier foruten krav til fravær eller lave nivå av sykdomsfremkallende bakterier i sjømat. Det totale antall bakterier er ment å være retningsgivende, men sjømatindustrien opplever ofte at kundene stiller strengere krav enn det retningslinjene gjør. Det er pr i dag ingen signaler som tyder på at de mikrobiologiske retningslinjene vil omfatte spesifikke kvalitetsforringende bakterier i nær fremtid.

Kunnskap om kvalitetsforringende bakterier i sjømat er ennå ikke så utbredt verken i sjømatindustrien eller hos kundene som kjøper produktene. Derfor vil neppe sjømatprodusenter oppleve at kunder stiller krav om å dokumentere f eks antall SPB i produktene med det første.

Inntil videre er det derfor mest aktuelt for bedriftene å anvende hurtigmetoden som et internt analyseverktøy. Noen eksempler på dette er vist nedenfor:

Dersom det i mottaket er usikkerhet på hvor gammelt råstoffet er og hvordan lagringsvilkårene har vært om bord, kan testen brukes til å gi svar på restholdbarheten ut i fra antallet SPB. I en optimal produksjonsplanlegging vil det være viktig å ha denne type informasjon.

I en bedrift som produserer flere typer produkter med ulike krav til råstoffkvalitet, vil metoden kunne brukes til å sortere ut rett råstoff til den rette anvendelsen. I ferskt råstoff som skal omsettes ferskt evt gjennomgå en lett konservering vil det være spesielt viktig med et lavt nivå SPB dersom produktet skal holde akseptabel kvalitet gjennom hele holdbarhetstiden.

Selv om kundene i dag ikke stiller krav til å dokumentere SPB nivået kan bedriftene likevel velge å gjøre det. Tilbakemeldinger vi har mottatt hittil tyder på at bedriftene ser på dokumentasjon av SPB nivået som et konkurransefortrinn.

I tillegg til at hurtigmetoden gir informasjon om selve produktet, vil resultatet også indikere den generelle produksjonshygiene i bedriften. Dersom det er store forskjeller i SPB nivået mellom råstoff og mellomprodukt / ferdigprodukt, tyder dette på svikt i produksjonshygiene. Svikt i produksjonshygiene kan f eks være unødig langt opphold ved høy temperatur, utilfredsstillende kjøling, ikke tilfredsstillende renhold i linjen osv.

4 MÅL

Hovedmålet med prosjektet har vært å utvikle og ferdigstille en hurtigmetode for sulfidproduserende bakterier (SPB) i sjømat tilpasset sjømatindustriens behov. Et viktig ledd i tilpasningen har vært å lage en enkel og sikker metode som ikke gir rom for usikkerhet hos den som skal lese av prøven.

For å oppnå dette skal 4 delmål realiseres:

1. Definere kravspesifikasjoner og prosedyrer for hurtigmetoden.
2. Produsere et testkit som består av reagenser og forbruksvarer.
3. Teknisk evaluering av hurtigmetoden mot referansemetoden.
4. Kartlegge bedriftenes erfaring med hurtigmetoden; egnethet, tekniske krav, fremtidig nytteverdi osv.

5 FAGLIG GJENNOMFØRING OG RESULTATER

5.1 Kravspesifikasjoner og prosedyrer

Hurtigmetoden baseres på en visuell avlesing. Dette gjør testen enklere og rimeligere enn en instrumentell avlesning. Testen skal selges og markedsføres som "ferdig til bruk" i form av plastrør fylt med vekstmedium. Hurtigtesten utføres ved å ta ut en prøve på 0,5 - 3 g (sterilt uttak), prøven overføres til testrøret med mediet og prøven inkuberes på 30 °C. Testrøret (medium pluss prøve) observeres jevnlig for å måle tiden det tar før prøven blir svart. Ved høye nivå av SPB vil fargeomslaget skje i løpet av et arbeidsskift, ved lave nivå opptil 14 timer.

I prosjektet er det utarbeidet en prosedyre som beskriver hvordan prøven skal tas ut og hvordan SPB nivået skal fastsettes. se vedlegg 1. Det er også utarbeidet et skjema for registrering av prøven som skal være til hjelp når prøven skal leses av, se vedlegg 2. Produktet, dvs sterile prøverør med flytende medium er beskrevet nærmere i en egen produktbeskrivelse, se vedlegg 3. I vedlegg 4 er produktdatablad for mediet beskrevet. Prosedyren, produktbeskrivelsen og produktdatabladet vil følge prøverørene ved salg av hurtigmetoden.

5.2 Testkit; reagenser og forbruksvarer

Sterile testrør (30 ml) med skrukork er valgt ut å være beholder for det flytende jernmediet. Testrøret har en vid hals, slik at en lettere skal unngå å forurense prøven i det den overføres til mediet. Testrøret er utformet slik at det kan stå på bordet, det er derfor ikke nødvendig å ha et eget stativ for å oppbevare og håndtere testrørene. Colifast AS produserer testrør ved at sterilt jernmedium (7 ml) overføres til hvert testrør. Testrørene er testet ut med hensyn på lekkasje, dvs ved at rørene er plassert skråstilt over tid. Ingen lekkasje ble observert. En kartong testrør består av 36 stk. Testrørene er plassert slik at de står i esken.

Testrørene er også kontrollert med hensyn på lagringsstabilitet. Det ble foretatt en test etter 6 måneder lagring ved henholdsvis romtemperatur (20 °C), kjøleskap (4 °C) og frys (-18 °C). Resultatene viste at jernmediet holder seg bra og det oppfører seg likt som nylaget jernmedium. Det var litt utfelling i noen få av testrørene, men utfellingen hadde ingen innvirkning på fargeomslaget eller tidspunktet for fargeomslag. Testkit'et ble testet ut på Fiskeriforskning før det ble prøvd ut i bedriftene.

Det er videre vist at mengden prøvemateriale som overføres til testrøret kan variere mellom 0,5 til 3,0 g uten at tidspunktet for fargeomslag påvirkes i nevneverdig grad. Det er derfor ikke nødvendig å veie inn prøven før den overføres til testrøret, uttaket av prøven kan skje på øyemål.

5.3 Uttesting i bedrift; teknisk evaluering av hurtigtesten mot referansemetoden

Uttesting av hurtigtesten ble foretatt i to bedrifter; en hvitfiskprodusent og en lakseprodusent. Uttestingen av hurtigmetoden foregikk i to omganger; desember 2002 og januar 2003. Referanseprøver ble utført på jernagarplater; tradisjonell platespredningsteknikk. I tillegg utførte bedriftene sine rutineanalyser av produktene; enten ved bruk av petrifilm eller ved at produktene ble sendt til det lokale næringsmiddeltilsyn.

En oversikt over resultatene fra uttestingen finnes i vedleggsdelen; første uttesting ved laksebedriften, se vedlegg 5, andre uttesting ved laksebedriften, se vedlegg 6, første uttesting ved hvitfiskbedriften, se vedlegg 7 og andre uttesting ved hvitfiskbedriften, se vedlegg 8.

Tabellene i vedlegg 5-8 viser analyseresultater ved å bruke hurtigmetoden, jernagar (referanseanalyse) og total antall bakterier, som er bedriftenes egne analyser. Langt de fleste fiskeprøvene som ble testet hadde et svært lavt antall SPB, og resultatene viser en klar sammenheng mellom hurtigmetodens analyseresultat og referansemetoden. Det ble registrert enkelte avvik på 1-2 log-enheter mellom referansemetoden og hurtigmetoden. Dette kan skyldes en ujevn fordeling av SPB i fiskemuskelen der prøveuttaket skjedde. Generelt viser analyseresultatene et samsvar mellom hurtigmetoden og referansemetoden som vurderes som tilfredsstillende. For å utjevne eventuelle ulikheter i antall SPB på en prøve som skal analyseres, er det viktig å ta ut to parallelle prøver, og beregne et gjennomsnitt antall SPB dersom tidspunktet for fargeomslag varierer.

Resultatene for total antall bakterier varierer fra å være likt eller høyere enn analyseresultatene med hurtigmetoden. Dette viser at andelen SPB av det totale antall bakterier varierer.

5.4 Kartlegge bedriftenes erfaring med hurtigtesten; egnethet, tekniske krav, fremtidig nytteverdi osv.

Generelle tilbakemeldinger fra bedriftene er at metoden er enkel å utføre. Det er positivt at prøveuttaket er enkelt, at analyseresultatet foreligger raskt og at det ikke er nødvendig å ha et eget laboratorium. I og med at prøveresultatet foreligger raskt, har bedriften en mulighet til å tilbakekalle produktene tidligere sammenlignet med en metode som tar lengre tid.

Utformingen av prøverøret er hensiktsmessig ved at det er en vid åpning i toppen og dermed lett å overføre prøven til røret uten å komme bort i kanten.

Det er pr i dag ingen kunder som stiller krav om å dokumentere SPB nivået i produktene. Utenom de sykdomsfremkallende bakteriene stiller kundene krav til at bedriftene skal dokumentere det totale antall bakterier i produktene. Utfordringen fremover blir derfor å informere både kunder og bedrifter om hva SPB er og hva som er forskjellen mellom SPB og total antall bakterier. Før hurtigmetoden kan tas i bruk er det en fordel at bedriften setter seg inn i hva SPB er og hvilken informasjon dette gir sammenlignet med andre analyser, f eks total antall bakterier. Bedriften bør definere noen interne grenser (terskelverdier) for hva som

er maksimalt akseptabelt nivå SPB. Dersom det f eks produseres flere produkter som det stilles ulike krav til, vil det være naturlig å differensiere denne terskelverdien.

Råstoff som er lagret og håndtert riktig holder lave nivåer SPB, dvs en prøve av dette råstoffet vil ikke gi et fargeomslag før etter ca 14 timer. I bedrifter som ikke arbeider skift er det upraktisk å vente til kvelden med å sjekke tidspunktet for fargeomslag. Prøven bør kunne være ferdig analysert i løpet av en arbeidsdag eller stå over til neste dag. På bakgrunn av dette ble det senere utført noen forsøk på Fiskeriforskning med lagring av prøver i kjøleskap før inkubering på 30 °C, se kap 5.5.

Det mest hensiktsmessige starttidspunktet for inkluderingen av prøvene vil avhenge av hva en forventer av SPB nivå. Dersom man antar at nivået SPB er på ca 100 000 SPB/g vil resultatet foreligge i løpet av 5-8 timer, dvs analyseresultatet vil foreligge i løpet av en arbeidsdag dersom man starter analysen om morgenen. Dersom man antar at nivået SPB er lavt, dvs ca 100 SPB/g, er det mest hensiktsmessig å starte analysen på ettermiddagen, og lese av prøven neste morgen. For bedrifter som arbeider skift er det ikke nødvendig å ta slike hensyn.

Metoden kan også anvendes semikvantitativt, dvs man kan definere terskelverdier for antall SPB som aksepteres. I praksis vil det være enklere å lese av slike prøver, siden det kun vil være ett avlesningstidspunkt man har å forholde seg til, se vedlegg 1.

Før hurtigmetoden kan tas i bruk viser alle disse eksemplene at bedriftene må vurdere:

- Hvilke produkter skal analyseres; råstoff, mellomprodukt, ferdigprodukt
- Hva er maksimalt nivå for SPB som aksepteres i de respektive produktene
- Hvor i linjen skal prøvene tas ut
- Når prøvene skal tas ut
- Når prøvene skal settes til inkubering

5.5 Kjølelagring av prøver før inkubering

Under uttestingen i bedriftene ble det tidlig klart at tidspunktene for avlesning av prøvene ikke var helt forenlig med en 8 timers arbeidsdag. Når prøvene ble tatt ut og satt til inkubering utover dagen, kunne det bli midnatt før de siste prøvene skulle leses av.

En måte å unngå dette var å plassere ferdige prøver i et kjøleskap (4 °C) noen timer før inkubering på 30 °C. Kjølelagring av prøver ble prøvd ut på Fiskeriforskning. Resultatene viser at prøver med et lavt SPB nivå tåler lagring i opptil 13 timer før plassering på 30 °C uten at tidspunktet for fargeomslag påvirkes. Dette skyldes at de fleste SPB vokser ca 20 ganger seinere ved 4 °C enn ved 30 ° (Dalgaard, 1993). I praksis betyr dette at prøver kan tas ut i løpet av dagen, plasseres fortløpende i kjøleskap og samlet plasseres i inkubatoren på ettermiddagen og leses av neste morgen. Dette vil naturligvis gjelde for prøver med et lavt nivå SPB, dersom nivået er høyere bør en heller vurdere å starte inkuberingen på morgenen, og ta sikte på at fargeomslaget i mediet inntreffer i løpet av arbeidsdagen.

6 RESULTATOPPFØLGING

Colifast AS har stor tro på FAST-metoden som er utviklet i MABIT prosjektet og vil inkludere den i sitt utvalg av hurtigmetoder som blir tilbudt vann- og næringsmiddelindustrien. Fordi Colifast AS ikke tidligere har hatt metoder som er spesialtilpasset fiskeindustrien ventes FAST-metoden å være en døråpner for dette markedet. FAST-metoden er svært enkel å utføre, den er billig og krever ingen instrumentering. Både små og store bedrifter vil derfor være aktuelle kunder. Colifast AS har allerede vært i møte med en større internasjonal distributør i Paris og planlegger å lansere hurtigmetoden både nasjonalt og internasjonalt umiddelbart etter at MABIT prosjektet er avsluttet. I april 2003 ble det innvilget et US-patent på metoden (Lorentzen, Skjerdal, Berg, 2001).

7 KONKLUSJON

En hurtigmetode for påvisning og kvantifisering av sulfidproduserende bakterier (SPB) er gjennom dette prosjektet ferdig utviklet og tilpasset fiskeindustriens behov. SPB er en gruppebetegnelse på bakterier som forårsaker redusert holdbarhet og kvalitetsforringelse av sjømat. Det er lett å ta ut prøven, og det kreves ingen laboratorie fasiliteter. Foruten basis sterilteknikk, kreves det ingen spesifikke kunnskaper i mikrobiologi for å utføre analysen. Analyseresultatet vil foreligge innen 14 timer ved inkubering på 30 °C, og den totale analysetiden bestemmes av antall SPB i prøven. Parallell analyse utført på jernagar, referansemotoden, viser en tilfredsstillende sammenheng.

Selv om det ikke er et myndighetskrav å dokumentere SPB nivået i sjømat produktene, kan bedriftene anvende metoden som et internt analyseverktøy og / eller dokumentere dette overfor sine kunder. Et analyseresultat på det totale antall bakterier gir ingen informasjon om hvor mange bakterier som forårsaker kvalitetsforringelse. Informasjon om antall SPB kan brukes når restholdbarhet og grad av kvalitetsforringelse skal fastsettes.

8 PÅSKJØNNELSE

En stor takk rettes til Hilde Herland og Jan Vidar Olsen, begge forskere ved Fiskeriforskning, for å ha gjennomført utprøvingen av hurtigmetoden i fiskeindustribedriftene. Tilbakemeldingene fra utprøvingen har vært av stor betydning i arbeidet med å tilpasse metoden industriens behov.

9 REFERANSER

- Anon, 2002. Mikrobiologiske retningslinjer. Statens Næringsmiddeltilsyn.
- Dalgaard, P., Gram, L. Huss, H.H., 1993. Spoilage and shelf-life of cod fillets packed in vacuum or modified atmospheres. *International Journal of Food Microbiology* 19, 283 – 294.
- Gram, L. 2002. Fisk og fiskprodukters mikrobiologi-fordærv og sikkerhedsmessige risici. Mikrobiologisk Sektion, Afd. For Fiskeindustriell Forskning, Danmarks Fiskeriundersøgelser. Forelesning 1, våren 2002. <http://www.dfu.min.dk/micro/lg.htm>
- Gram, L., Trolle, G., Huss, H.H., 1987. Detection of specific spoilage bacteria from fish stored at low (0°C) and high (20°C) temperatures. *International Journal of Food Microbiology* 4, 65 - 72.
- Gram, L., Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology* 33, 121 – 137.
- Huss, H.H., Dalsgård, D., Hansen, L., Ladefoged, H., Pedersen, A., og Zittan, L. 1974. The influence of hygiene in catch handling on the storage life of cod and plaice. *J. Food Technol.* 9, 213 – 221.
- Lorentzen, G. & Skjerdal, T. & Bjørkevoll, I. 2001. Hurtig påvisning av *S.putrefaciens* i fisk. Forsøk utført ved Fiskeriforskning, Tromsø i tidsrommet mars - mai 2001. Foredrag m/lysark Presentasjon i forb. med prosjektet "Utvikling av mikrobiologiske hurtighetoder for forbedret kontroll av hygiene- og produktkvalitet i fiskeindustrien" Colifast Nye AS Oslo 25.06.2001
- Lorentzen, G. 2002. New and rapid method for detection and enumeration of sulphide-producing bacteria in fish products. Poster abstract Food Micro 2002
- Lorentzen, G., Skjerdal, T. & Berg, J.D. 2001. Rapid method of detection and enumeration of sulfide-producing bacteria in food products. Submitted 14 December 2001. No EV010196029 US-patent application, Dunlop, Coddling & Rogers, S.P.C., Oklahoma City, Oklahoma, USA.
- Skjerdal, O.T., Lorentzen, G. 2003. Rapid detection and enumeration of sulphide producing bacteria in selected marine fish species. Artikkelen er under arbeid.

Hurtigmetode for påvisning av kvalitetsforringende bakterier

FAST

FAst Sulphide producing bacteria Test
(Versjon 1)

Beskrivelse




FAST-metoden er utviklet for å måle graden av kvalitetsforringelse i ulike typer næringsmidler. Metoden påviser Sulfidproduserende bakterier (SPB), f. eks *Shewanella putrefaciens*, som er en av de viktigste bakteriene forbundet med kvalitetsforringelse i sjømat og andre næringsmidler. SPB påvises ved et fargeomslag fra hvitt til grått/svart i mediet der prøven dyrkes. En prøve med et høyt antall SPB vil gi et raskere fargeomslag i mediet enn en prøve med færre SPB. Det er derfor mulig å fastslå antallet SPB ut fra tiden det tar før fargeomslaget inntreffer.

FAST består av 7 ml flytende medium i 30 ml plastrør som er ”ferdig-til-bruk”, og et farge/tidskart (vist i tabellen på neste side). Metoden gir informasjon om graden av kvalitetsforringelse på et produkt. Sammenlignet med tradisjonelle analysemetoder som tar opp til 2-3 døgn før et analyseresultat foreligger (Gram et al., 1987), vil det ved hjelp av denne metoden foreligge et resultat innen 14 timer.

Prosedyre

1. Plasser ca 1,0 g av en representativ prøve i et prøverør. Bruk sterilteknikk. Plasser prøverøret i varmeskap ved 30°C. Som kontrollprøve kan et rør uten prøve også plasseres i varmeskap. Det anbefales å ta ut to parallelle prøver.
2. Rør med prøver kan eventuelt plasseres i kjøleskap (4°C) i opptil 13 timer før plassering i varmeskap. Dette kan være aktuelt der det tas ut prøver spredt ut over dagen og at man ønsker å lese av alle prøverørene samtidig. I sjømat med et lavt SPB nivå (ca 14 timer før fargeomslaget inntreffer), kan det være hensiktsmessig å starte inkubering på 30 °C ut på ettermiddagen, slik at prøverørene kan leses av neste morgen.
3. Observer fargen på mediet periodisk og sammenlign med fargekartet under. En blakking av mediet er et tegn på bakterievekst, og fargeomslag til grått og deretter svart inntreffer kort tid etter blakkingen.

Tabell for fastsettelse av antall SPB per gram prøve:

Inkuberingstid (timer)	Farge på mediet		
	Uforandret 	Grå 	Svart 
<5	<1 000 000	1 000 000	>1 000 000
5-8	<1 000 000	100 000 – 1 000 000	>1 000 000
8-10	<100 000	10 000 – 100 000	>100 000
10-12	<10 000	1 000 – 10 000	>10 000
12-14	<1 000	100 – 1 000	>1 000
>14	<100	100	>100

Skjema for registrering av fargeomslag ved bruk av FAST metoden

Prøve	Start (dato / kl)	Tidspunkt for sjekk (kl)	Mediet: Uendret / Grått / Svart	
			Parallell A	Parallell B
		(Etter 5 timer)		
		(Etter 8 timer)		
		(Etter 10 timer)		
		(Etter 12 timer)		
		(Etter 14 timer)		
		(Etter 5 timer)		
		(Etter 8 timer)		
		(Etter 10 timer)		
		(Etter 12 timer)		
		(Etter 14 timer)		

Produktbeskrivelse

FAST-testen består av sterile prøverør med flytende FAST-medium.

Spesifikasjoner for prøverør:

Materiale:	polystyren
Høyde:	90mm
Diameter:	24mm
Volum:	30ml

NB! Påse at brukte prøverør destrueres etter gjeldende regler.

Prøverørene smelter ved autoklaving (121°C). Dersom en slik destruksjons metode benyttes må prøverørene plasseres i tette autoklavposer.

Spesifikasjoner for FAST-medium: se eget produktdatablad

Volum medium per prøverør: 7ml

Prøverørene er pakket i esker.

Nødvendig ekstra utstyr:

- Inkubatorskap (30°C)
- Standard laboratorieutstyr for et sterilt prøveuttak, f.eks. skalpellblad, skalpellskaft og spritflamme

VED NØDSTILFELLE: TLF +47 67 10 05 10

PRODUKTDATABLAD

1. Produkt Colifast FAST Medium

2. Produktdatablad N-14

Dato:

22 oktober 2002

Revisjonsdato:

3. Produsent

Colifast AS, Pb 31, 1324 Lysaker, Norge

Tlf +47 67 10 05 10, Fax +47 67 10 05 20, e-post: post@colifast.no

4. Anvendelse

Biologiske analyser for påvisning av sulfid-produserende bakterier i sjømat.

5. Produktbeskrivelse

Aggregattilstand: Flytende.

Stoffets utseende ved romtemperatur: Gulaktig medium.

6. Sammensetning

Peptone	40-70 %	
Yeast Extract	5-20 %	
Lab Lemco powder	5-20 %	
Ferric citrate	< 5 %	
Sodium thiosulphate	< 5 %	CAS # 7772-98-7
Sodium chloride, NaCl	5-20 %	CAS # 7647-14-5
L-cysteine	< 5 %	CAS # 7048-04-6

7. Toksikologisk informasjon

Ingen irriterende effekt for øyne og hud.

Ved bruk i henhold til spesifikasjoner, har produktet ingen skadelig effekt i følge den informasjon som er tilgjengelig for oss.

8. Helsefare

Dette produktet inneholder ingen helsefarlige stoffer, eller konsentrasjonen av alle kjemiske stoffer er så lave at de ikke medfører noen helsefare.

9. Førstehjelp

Generell informasjon: ingen spesielle tiltak er påkrevd.

Ved kontakt med øynene, skylk rikelig med vann i flere minutter. Dersom symptomer vedvarer, kontakt en lege.

Ved svelging, skylk pasientens munn med vann hvis han/hun er ved bevissthet.

Ved hudkontakt, vask med såpe og vann og skylk grundig med vann.

10. Vernetiltak

Forhåndsregler ved bruk: Unngå kontakt med øyne og hud, svelging og innånding. Benytt beskyttelsesutstyr som latexhansker og vernebriller. Vask bort eventuelt søl.

11. Reaktivitet og spesielle forholdsregler

Stabilt ved 4-8 °C under normalt trykk.

Helsefarlige forbrennings- og dekomposisjonsprodukter: ingen helseskadelige produkter er kjent.

12. Transport og lagring

Produktet kan transporteres uten kjøling i opptil 3 uker. Deretter må produktet lagres ved 4-8°C. Holdbarhetstid er 6 måneder dersom mediet ikke er kontaminert (vekst, hvit eller grå/svart farge).

13. Destruksjon og rengjøring

Kontaminert medium (vekst, grå/svart farge) desinfiseres med for eksempel klor. Forøvrig følges statlige og kommunale regler for avfallsbehandling.

NB! Plastrørene smelter ved autoklaving, slik at dersom en slik destruksjonsmetode benyttes må rørene være pakket inn i minst to autoklavposer.

14. Tiltak ved søl og lekkasje

Søl tørkes opp med en fuktig klut og overflater desinfiseres med f.eks. sprit.

15. Fysikalske data

Aggregattilstand: Flytende medium. Tetthet: ikke tilgjengelig. Vannløselighet: Løselig.

16. Brann tekniske opplysninger

Brannslukningsutstyr: vannslange, karbondioksid, pulverapparat eller skum til brannslukningsformål.

17. Transport-informasjon

RID/ADR: Ufarlig ved veifrakt

IMDG: Ufarlig ved sjøfrakt

ICAO/IATA: Ufarlig ved flyfrakt.

18. Offentlige lover og bestemmelser

EUROPEAN INFORMATION; ikke tilgjengelig

TLV og SOURCE; ikke tilgjengelig

U.S. INFORMATION; ikke tilgjengelig

Vedlegg 4 forts.

19. Egne opplysninger

All informasjon nevnt i produktdatabladet skal være korrekt i henhold til våre nåværende opplysninger. Colifast AS gir derimot ingen garanti i henhold til denne informasjonen, og står ikke til ansvar for noe tap eller skade som følge av bruk av denne informasjonen. Brukere av produktet må selv avgjøre hvordan informasjonen skal tolkes.

18 - november, 2002.**Vedlegg 5; første uttesting ved laksebedriften**

Produkt	FAST (SPB/g)	Jernagar (SPB/g) *)	Totalkim (cfu/g) *)	Totalkim (cfu/g) **)
Fersk filet med skinn, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	-
Fersk filet med skinn, vakuumert	$1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$1,3 \times 10^3$	-
Frossen, porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,7 \times 10^3$	-
Sløyd fisk, slakteriet	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	-
Fersk filet med skinn, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	-
Fersk filet med skinn, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$	-
Fersk filet, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
Sløyd fisk, slakteriet	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$9,5 \times 10^3$
Sløyd fisk, slakteriet	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
Frossen filet, u/skinn, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
Frossen filet, u/skinn, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$
Fersk filet, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$4,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,4 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$8,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Frossen porsjon, vakuumert	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^1$	$< 1,0 \times 10^2$

*) Parallelle analyser på jernagar (tradisjonell platespredning); andelen svarte kolonier er SPB, mens alle koloniene utgjør totalantallet.

**) Utført av Næringsmiddeltilsynet

29 januar, 2003.

Produkt	FAST (SPB/g)	Jernagar (SPB/g) *)	Totalkim (cfu/g) *)
Fryst filet, produsert 27/1 Vaakumert gullbrett	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
Fryst filet, produsert 27/1 Vaakumert gullbrett	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$
Fryst filet, produsert 28/1 Vaakumert gullbrett	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
Fryst filet, produsert 28/1 Vaakumert gullbrett	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Porsjon vaakumpakket fryst Produsert 29/1	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$
Porsjon vaakumpakket fryst Produsert 29/1	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$
Porsjon vaakumpakket fryst Produsert 29/1	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$
Porsjon vaakumpakket fersk Produsert 29/1	$1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^2$

*) Parallell analyse på jernagar (tradisjonell platespredning); andelen svarte kolonier er SPB, mens alle koloniene utgjør totalantallet.

Uttak ved hvitfiskbedriften, 19 og 20 november, 2002.

Produkt	FAST (SPB/g)	Jernagar (SPB/g) *)	Totalkim (cfu/g) **)	Kommentarer
Torsk, loins (frosset / tint)	$1,0 \times 10^2$	$1,4 \times 10^5$	$3,1 \times 10^4$	
Sei, bitblokk (frosset / tint)	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^4$	
Sei, kutt (tint)	$< 1,0 \times 10^2$	$5,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^4$	
Torskefarse (kjølt)	$1,0 \times 10^2$	< 1	$1,7 \times 10^5$	
Sei, bitblokk (fersk / kjølt)	$< 1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^3$	
Torsk, loins (frosset / tint)	$< 1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^2$	
Torsk, lettsaltet (frosset / tint)	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^3$	
Hyse, røkt (fersk / kjølt)	$< 1,0 \times 10^2$		$1,8 \times 10^4$	Vanskelig å fastsette SPB på jernagar på grunn av våt prøve

*) Parallell analyse på jernagar (tradisjonell platespredning); antall svarte kolonier er SPB

***) Utført på petrifilm

Analyser av hvitfisk og produkter av hvitfisk, januar og februar, 2003.

Produkt	FAST (SPB/g)	Jernagar (SPB/g) *	Totalkim (cfu/g) **)
Torsk- loins	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$
Sei- bitblokk	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$
Torsk- farse	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$7,0 \times 10^3$
Torsk- våtfilet	$< 1,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$
Torsk- lettsaltet	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^3$
Torsk- våtfilet	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^3$
Hyse	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	Ikke påvist
Torsk- loins	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	Ikke påvist
Sei- bitblokk	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$
Sei- kutt	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$2,0 \times 10^3$
Torsk- lettsaltet	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	Ikke påvist
Røkt hyse	$< 1,0 \times 10^2$	$< 1,0 \times 10^2$	Ikke påvist
Torsk- loins	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$
Loins sei	$< 1,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	$9,0 \times 10^2$
Torsk- våtfilet	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$

Vedlegg 8, andre uttesting ved hvitfiskbedrift forts.

Produkt	FAST (SPB/g)	Jernagar (SPB/g) *)	Totalkim (cfu/g) **)
Sei- kutt	$< 1,0 \times 10^3$	$5,5 \times 10^2$	$7,5 \times 10^2$
Torsk – tails	$< 1,0 \times 10^3$	$< 1,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$

*) Parallell analyse på jernagar (tradisjonell platespredning); antall svarte kolonier er SPB

***) Analyseresultater petrifilm



Fiskeriforskning

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9-13

Postboks 6122

N-9291 Tromsø

Telefon: 77 62 90 00

Telefaks: 77 62 91 00

E-post: post@fiskeriforskning.no

Avdelingskontor Bergen:

Kjerreidviken 16

N-5141 Fyllingsdalen

Telefon: 55 50 12 00

Telefaks: 55 50 12 99

E-post: office@fiskeriforskning.no

Internett: www.fiskeriforskning.no

ISBN 82-7251-517-2

ISSN 0806-6221