



---

# Analysemethoden voor de bepaling van authenticiteit in visketens

M. Staats, J. van der Roest, A.M. Pustjens, M.M. Voorhuijzen, J.P. van Dijk, T.W. Prins,  
R. Boerrigter-Eenling, A. Koot, H.M.L. van Pelt-Heerschap, M. van der Spiegel, S.M. van Ruth en E.J. Kok



---

# Analysemethoden voor de bepaling van authenticiteit in visketens

M. Staats<sup>1</sup>, J. van der Roest<sup>1</sup>, A.M. Pustjens<sup>1</sup>, M.M. Voorhuijzen<sup>1</sup>, J.P. van Dijk<sup>1</sup>, T.W. Prins<sup>1</sup>,  
R. Boerrigter-Eenling<sup>1</sup>, A. Koot<sup>1</sup>, H.M.L. van Pelt-Heerschap<sup>2</sup>, M. van der Spiegel<sup>1</sup>, S.M. van Ruth<sup>1,3</sup> en E.J. Kok<sup>1</sup>

1 RIKILT Wageningen UR

2 IMARES Wageningen UR

3 Food Quality and Design Wageningen UR

Dit onderzoek is uitgevoerd door RIKILT Wageningen UR in opdracht van North Sea Fish Center en gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken, en het Europees visserijfonds in het kader van de subsidie 'Collectieve acties in de Visketen'. Dit project is geselecteerd in het kader van het Nederlands Operationeel Programma 'Perspectief voor een duurzame visserij'.

RIKILT Wageningen UR

Wageningen, november 2015

---

RIKILT-rapport 2015.015

---

Staats, M., J. van der Roest, A.M. Pustjens, M.M. Voorhuijzen, J.P. van Dijk, T.W. Prins, R. Boerrigter-Eenling, A. Koot, H.M.L. van Pelt-Heerschap, M. van der Spiegel, S.M. van Ruth en E.J. Kok, 2015. *Analysemethoden voor de bepaling van authenticiteit in visketens*. Wageningen, RIKILT Wageningen UR (University & Research centre), RIKILT-rapport 2015.015. 68 blz.; 10 fig.; 22 tab.; 20 ref.

© 2015 RIKILT Wageningen UR

Het is de opdrachtgever toegestaan dit rapport integraal openbaar te maken en ter inzage te geven aan derden. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van het RIKILT Wageningen UR is het niet toegestaan:

- a. *dit door RIKILT Wageningen UR uitgebrachte rapport gedeeltelijk te publiceren of op andere wijze gedeeltelijk openbaar te maken;*
- b. *dit door RIKILT Wageningen UR uitgebrachte rapport, c.q. de naam van het rapport of RIKILT Wageningen UR, geheel of gedeeltelijk te doen gebruiken ten behoeve van het instellen van claims, voor het voeren van gerechtelijke procedures, voor reclame of antireclame en ten behoeve van werving in meer algemene zin;*
- c. *de naam van RIKILT Wageningen UR te gebruiken in andere zin dan als auteur van dit rapport.*

Postbus 230, 6700 AE Wageningen, T 0317 48 02 56, E info.rikilt@wur.nl, www.wageningenUR.nl/rikilt. RIKILT is onderdeel van Wageningen UR (University & Research centre).

RIKILT aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van de adviezen.

RIKILT-rapport 2015.015

Verzendlijst:

- André de Vries, North Sea Fish Center
- Christien Absil, Stichting De Noordzee
- Sabrina van der Enden, Rijksdienst voor Ondernemend Nederland, Ministerie van Economische Zaken

---

# Inhoud

	<b>Woord vooraf</b>	<b>5</b>
	<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>Ketenanalyse naar vermenging van schol in de Noordzeevisketen</b>	<b>9</b>
1.1	Kritische punten in de visketen	9
1.2	Visvangst	10
1.2.1	Proces	10
1.2.2	Monitoring	12
1.2.3	Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie	13
1.3	Visveiling	13
1.3.1	Proces	13
1.3.2	Monitoring	14
1.3.3	Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie	15
1.4	Fileren	15
1.4.1	Proces	15
1.4.2	Monitoring	16
1.4.3	Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie	17
1.5	Visverwerking	17
1.5.1	Bedrijf 1	17
1.5.2	Bedrijf 2	18
1.6	Retail	21
1.6.1	Proces	21
1.6.2	Monitoring	21
1.6.3	Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie	21
1.7	Inzet van analysemethoden en bemonsteringsstrategie	21
1.7.1	Wettelijke eisen	21
1.7.2	Private eisen	21
1.7.3	Borgen van een keurmerk voor schol uit de Noordzee	21
1.7.4	Identificatie van fraude	22
1.7.5	Selecteren van nieuwe toeleveranciers	22
1.7.6	Periodieke monitoring	22
1.8	Monsterneming van vis in de praktijk	23
1.8.1	Algemene richtlijnen bemonstering	23
1.8.2	Relevante wetgeving	23
1.8.3	Bemonsteringsplan/Richtlijnen Codex Alimentarius (CAC/GL 50-2004)	24
1.8.4	Type, aantal en frequentie van monsters	25
1.8.5	MSC traceerbaarheid standaard	25
1.8.6	Rapportage bemonstering	26
1.9	Voorstel bemonstering keurmerk NSFC	26
<b>2</b>	<b>Ontwikkeling en initiële validatie van een moleculaire barcoding methode om Noordzeevissoorten in gemengde monsters te identificeren</b>	<b>28</b>
2.1	DNA barcodes voor het identificeren van vissoorten	28
2.2	Procedures voor het identificeren van vissoorten.	29
2.2.1	Procedure voor het maken van experimentele mengmonsters	29
2.2.2	DNA extractie procedure	29
2.2.3	PCR amplificatie procedure	30
2.2.4	Ion Torrent sequencing procedure	30
2.2.5	Illumina MiSeq sequencing procedure	30
2.2.6	Data analyse procedure voor het identificeren van vissoorten	31

---

2.3	Identificatie van vissoorten in de 'Test monsters'	32
2.3.1	Ion Torrent NGS	32
2.3.2	Illumina MiSeq NGS	33
2.3.3	Vergelijking van DNA metabarcoding methoden	33
2.4	Pre-validatie van de DNA metabarcoding methode	34
2.4.1	Resultaten laboratorium 1	34
2.4.2	Resultaten laboratorium 2	35
2.4.3	Reproduceerbaarheid van de DNA metabarcoding methode	35
<b>3</b>	<b>Bepaling van de geografische herkomst van schol en productiemethode van tarbot met behulp van isotopratio's en chemische fingerprint</b>	<b>37</b>
3.1	Materialen en methoden	37
3.1.1	Vismonsters	37
3.1.2	PTR-MS	37
3.1.3	GC-FID	38
3.1.4	IRMS	38
3.1.5	Multivariate data-analyse	38
3.2	Resultaten geografische herkomst schol	38
3.2.1	PTR-MS resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol	38
3.2.2	GC-FID resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol	40
3.2.3	IRMS resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol	41
3.2.4	Alle resultaten gecombineerd voor het bepalen van de geografische herkomst van schol	42
3.3	Resultaten productiewijze tarbot	44
3.3.1	PTR-MS resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot	44
3.3.2	GC-FID resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot	44
3.3.3	IRMS resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot	46
3.4	Conclusies	46
<b>4</b>	<b>Toepassing van de ontwikkelde analytische methoden in Noordzeevisketens</b>	<b>48</b>
4.1	DNA metabarcoding van de praktijkmonsters.	48
4.2	Bepaling geografische herkomst van de praktijkmonsters	49
<b>5</b>	<b>Conclusies</b>	<b>52</b>
	<b>Literatuur</b>	<b>53</b>
	<b>Bijlage 1</b>	<b>55</b>
	<b>Bijlage 2</b>	<b>59</b>
	<b>Bijlage 3</b>	<b>63</b>
	<b>Bijlage 4</b>	<b>64</b>
	<b>Bijlage 5</b>	<b>67</b>

---

# Woord vooraf

Dit rapport beschrijft de resultaten van onderzoek dat is uitgevoerd binnen het project 'Analysemethoden voor de bepaling van authenticiteit in visketens'. Het project is gefinancierd door het ministerie van Economische Zaken en het Europees Visserijfonds en is uitgevoerd in opdracht van het North Sea Fish Center. Het project heeft als doel om methoden te ontwikkelen waarmee de authenticiteit (soort, geografische herkomst en productiewijze) van Noordzeevissen kan worden vastgesteld. In dit project is gewerkt aan vier deelprojecten: ketenanalyse naar vermenging van schol (*Pleuronectes platessa*) uit de Noordzee met andere vissoorten, ontwikkeling en initiële validatie van een moleculaire barcoding methode om Noordzeevissoorten in gemengde monsters te identificeren, bepaling van de geografische herkomst van schol en productiemethode van tarbot met behulp van isotoopratio's en chemische fingerprint en toepassing van de ontwikkelde analytische methoden in Noordzeevisketens. De resultaten van deze onderzoeken zijn in dit rapport weergegeven.

Dr. Martijn Staats, projectleider  
Wageningen, november 2015





---

# Samenvatting

Het doel van dit project is om methoden te ontwikkelen waarmee de authenticiteit (vissoort, geografische herkomst en productiewijze) van Noordzeevissen kan worden vastgesteld. In de visketens kunnen vissoorten worden vermengd of verwisseld, waardoor de vissoort of herkomst niet altijd juist op het etiket staat vermeld. Een reden hiervoor kan zijn dat het niet altijd mogelijk is om tijdens het verwerkingsproces vis op basis van uiterlijke kenmerken te identificeren. Een andere reden kan zijn dat duurdere vissoorten en vissoorten waarvoor een quotum is vastgesteld, verwisseld of vermengd worden met goedkopere vissoorten.

De consument vindt het steeds belangrijker dat vis op een verantwoorde manier wordt gevangen en verwerkt. Om consumenten in staat te stellen goed geïnformeerde keuzes te maken en om misleiding te voorkomen, is het noodzakelijk dat visproducten worden voorzien van duidelijke en betrouwbare etiket-informatie wat betreft vissoort, geografische herkomst en productiewijze. De etiketteringswetgeving (EU 1169/2011) is recentelijk op deze aspecten aangescherpt.

In dit project is gewerkt aan vier deelprojecten: 1) ketenanalyse naar vermenging van schol (*Pleuronectes platessa*) uit de Noordzee, 2) ontwikkeling en initiële validatie van een moleculaire barcoding methode om Noordzeervissoorten in gemengde monsters te identificeren, 3) bepaling van de geografische herkomst van schol en productiemethode van tarbot (*Psetta maxima*) met behulp van isotoopratio's en chemische fingerprint en 4) toepassing van de ontwikkelde analytische methoden in Noordzevisketens.

In de ketenanalyse gericht op vermenging van schol is op basis van literatuur en interviews een overzicht gemaakt van de verschillende ketens die betrokken zijn bij de productie van schol uit de Noordzee. Er zijn bij de Urker visafslag en verschillende visverwerkende bedrijven in Urk mogelijke locaties van vermenging en verwisseling van schol met andere vissoorten vastgesteld. Uit het onderzoek komt naar voren dat met name de herkomst van bewerkte diepgevroren filets en van vis na onthuiden moeilijk te identificeren is. Bij de vangst en op de visveiling is de vis visueel nog goed herkenbaar. Bij het sorteren kan verwisseling van vissoorten nog gecorrigeerd worden, maar de labelling zou geprofessionaliseerd kunnen worden, zodat de traceerbaarheid gewaarborgd kan worden. Binnen de ketenanalyse is ook een bemonsteringsstrategie opgesteld, dat enerzijds een kwaliteitskeurmerk kan borgen en anderzijds fraude kan helpen voorkomen. In het bemonsteringsplan staat beschreven hoe op verantwoorde wijze risico-gebaseerd bemonsterd kan worden. Het bemonsteringsplan geeft een advies over het type, aantal en frequentie van monsternamen ter bepaling van authenticiteit van de betreffende vissoort.

Binnen dit project is een analysemethode (DNA metabarcoding) opgezet waarmee op basis van DNA verschillende Noordzeervissoorten gelijktijdig in gemengde visproducten kunnen worden geïdentificeerd. Hiervoor zijn experimentele monsters gemaakt waarin verschillende platvissoorten en andere vissoorten zijn gemengd. De ontwikkeling van de methode richt zich met name op de detectie van schol (*P. platessa*), schar (*Limanda limanda*), bot (*Platichthys flesus*), yellowfin sole (*Limanda aspera*) en rocksole (*Lepidopsetta bilineata*). Protocollen zijn opgesteld voor het extraheren van DNA uit mengmonsters, voor de PCR amplificatie van de DNA barcodes cytochrome c oxidase subunit 1 (COI) en cytochrome b (cytB), en voor next-generation sequencing (NGS) data analyse. Er zijn twee verschillende NGS methoden getest waaruit blijkt dat de gevoeligheid van beide NGS methoden hoog genoeg is om vissoorten met een gewichtsperscentage van 1% in mengmonsters te kunnen identificeren. Uit de initiële validatie van de DNA metabarcoding methode komt naar voren dat het belangrijk is om preventieve maatregelen te nemen om fout-positieve uitslagen te voorkomen en dat de methode door een breder consortium getest moet worden voordat een DNA metabarcoding protocol voor de definitieve validatie kan worden vastgesteld.

---

Binnen dit project zijn verder drie analytische technieken (PTR-MS, GC-FID, IRMS) geëvalueerd om de geografische herkomst van schol te bepalen. Met behulp van PTR-MS, GC-FID en IRMS kunnen respectievelijk de natuurlijk aanwezige vluchtige stoffen, vetzuren en isotopen in de vis worden vastgesteld. Voor het opzetten van de drie chemische fingerprinting- en isotoopratio methoden zijn extractie- en analyseprotocollen ontwikkeld. Er is een beperkte monsterset van 24 schollen afkomstig uit 5 geografische locaties geanalyseerd. Van de drie geëvalueerde methoden voorspelt vetzuurprofilering (GC-FID) de geografische herkomst per locatie het beste. Met deze methode werden 20 van de 24 geanalyseerde schollen correct geclassificeerd. Met een gecombineerde analyse van alle drie de methoden werden ook 20 van de 24 schollen correct geclassificeerd. Indien men alleen wil weten of schol uit de Noordzee afkomstig is of uit andere zeeën dan lijkt IRMS de meest geschikte methode. Hiermee konden alle geanalyseerde schollen correct worden geclassificeerd. Met dezelfde drie fingerprinting- en isotoopratio methoden is ook geëvalueerd of de productiemethode van tarbot kan worden bepaald. Hiervoor is een beperkte monsterset van 5 stuks wilde tarbot uit de Noordzee en 5 stuks in Nederland gekweekte tarbot geanalyseerd. Met IRMS analyse kon de productiemethode van tarbot in alle gevallen correct worden vastgesteld. De in deze studie onderzochte analytische methoden voor het bepalen van de geografische herkomst en productiemethode hebben potentie, maar er moeten meer gevarieerde monstersets worden geanalyseerd om de methoden verder te kunnen ontwikkelen en te valideren.

De analytische methoden die zijn ontwikkeld voor het vaststellen van vissoort en geografische herkomst zijn, bij wijze van pilot, toegepast op 28 praktijkmonsters. Hiervoor zijn 28 diepgevroren supermarktproducten verzameld in Italië, Duitsland en Nederland. Voor het vaststellen van de vissoort met de DNA metabarcoding methode zijn van alle supermarktproducten mengmonsters gemaakt, waardoor in totaal van 163 filets met één analyse op efficiënte wijze een compleet beeld is verkregen van de soortensamenstelling per verpakking. In alle gevallen kon de soortenidentiteit van de praktijkmonsters met '*Pleuronectes platessa*' op het etiket worden bevestigd. In twee gevallen kwam de laboratoriumuitslag niet overeen met etiket. DNA metabarcoding wijst uit dat het in beide gevallen *Lepidopsetta polyxystra* betreft, terwijl het etiket de nauw verwante soort '*Lepidopsetta bilineata*' vermeldt. De afwijkende uitslagen konden worden bevestigd met onafhankelijke analyses op individuele platvisfilets op basis van DNA barcoding.

Daarnaast is gekeken of de geografische herkomst van deze supermarktmonsters bepaald kon worden met behulp van het vluchtige stoffen profiel (PTR-MS) en het vetzuurprofiel (GC-FID). Op basis van het vluchtige stoffen profiel werden 21 van de 23 geanalyseerde schollen (*P. platessa*) geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee, onafhankelijk of deze gepaneerd en/of gemarineerd waren. Op basis van het vetzuurprofiel werden 14 van de 18 geanalyseerde schollen geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee. Deze methode lijkt echter niet geschikt voor monsters die gepaneerd zijn. De monsters die niet geclassificeerd werden als zijnde afkomstig uit de Noordzee zijn volgens de verpakking gevangen in het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen uit welk specifiek geografisch gebied binnen het Noordoostelijk deel van de Atlantische oceaan deze afwijkende monsters afkomstig zijn.

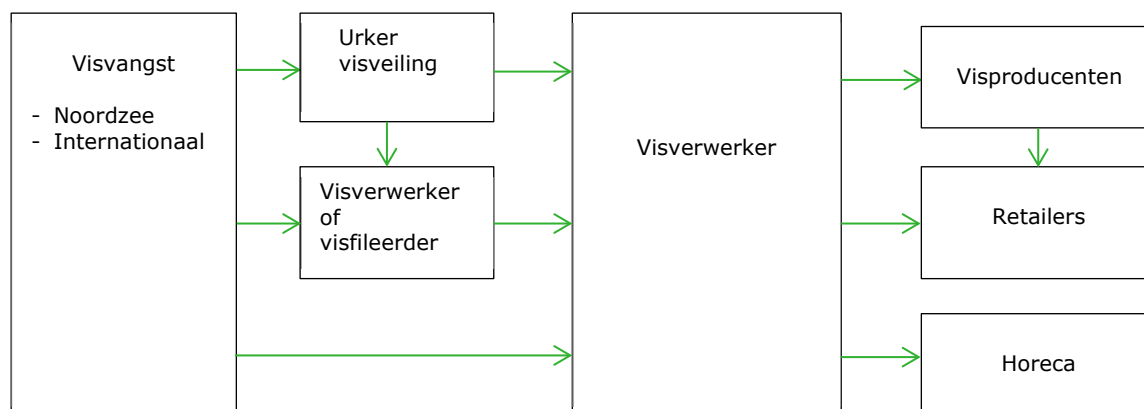
In dit project is een begin gemaakt met de ontwikkeling van robuuste analytische methoden die ingezet kunnen worden om de juistheid wat betreft vissoort, geografische herkomst en productiewijze te controleren. Er is meer onderzoek nodig om de verschillende methoden te valideren, zodat ze in de praktijk toegepast kunnen worden voor de controle van de juistheid van de etikettering van visproducten. Hierdoor wordt het mogelijk om de ongewenste vermenging en verwisseling van vissoorten in de productieketen te reduceren, waardoor de authenticiteit van vissoorten uit de Noordzee beter kan worden gegarandeerd. Dit komt de kwaliteitsgarantie visproducten ten goed en dit is gunstig voor de concurrentiepositie van producerende en verwerkende visbedrijven.

# 1 Ketenanalyse naar vermenging van schol in de Noordzeevisketen

In dit hoofdstuk wordt een ketenanalyse beschreven waarbij de mogelijke locaties van vermenging en verwisseling van vissoorten in verschillende Noordzeevisketens vastgesteld worden. De analyse richt zich op schol (*Pleuronectes platessa*) uit de Noordzee en de Atlantische Oceaan, en op goedkopere en minder duurzame vissen zoals schar (*Limanda limanda*), bot (*Platichthys flesus*), yellowfin sole (*Limanda aspera*), en rocksole (*Lepidopsetta bilineata*). Het doel van deze ketenanalyse is om een overzicht te geven wat de kritische punten in de visketen zijn, hoe nieuwe analysemethoden in de visketen ingezet kunnen worden, en hoe risico-gebaseerd bemonsterd kan worden om te garanderen dat de visproducten duurzaam zijn.

## 1.1 Kritische punten in de visketen

De visketen bestaat uit visvangst, visveiling, visverwerkers, en afnemers zoals visproducenten, retailers, en horeca (zie Figuur 1.1). Schol wordt gevangen in de Noordzee en via de visveiling verkocht aan verwerkers. Internationaal gevangen andere vissoorten worden direct of indirect via veiling of verwerker geleverd aan de visverwerkers. Visverwerkers bewerken de visproducten door middel van processen als fileren, glaceren, diepvriezen, frituren, en verpakken. De meeste producten worden geëxporteerd naar retailers, visproducenten en horeca in Scandinavië, Italië, UK, Frankrijk, Oostenrijk, en Duitsland.



**Figuur 1.1** Visketen bestaande uit de visvangst, visveiling, visverwerkers, en afnemers zoals visproducenten, retailers, en horeca.

Dit hoofdstuk beschrijft per schakel hoe processen verlopen, hoe vermenging momenteel gemonitord wordt, en wat de kritische punten voor vermenging zijn.

---

## 1.2 Visvangst

### 1.2.1 Proces

Voor de vangst van schol in de Noordzee wordt gebruikt gemaakt van boomkorvisserij, waarbij aan weerszijden van het schip een vistuig over de bodem van de zee wordt gesleept.



De vissen belanden in de achterkant van het net (kuil). De kuil wordt na elke trek binnengehaald en de inhoud ervan in stortbakken geleegd.



De inhoud van deze stortbakken wordt naar de opvoerbanden gespoeld en beland op de sorteerbanden in de verwerkingsruimte in de boeg van het schip.





Op de sorteerbanden wordt de marktwaardige (maatse) vis door de bemanning eruit geselecteerd, gestript (van ingewanden ontdaan) en per soort vis in opvangbakken gedeponeerd. Ondermaatse vis en overig materiaal (stenen, plastic, schelpen, zeesterren e.d.) verdwijnt via een stortkoker in zee.

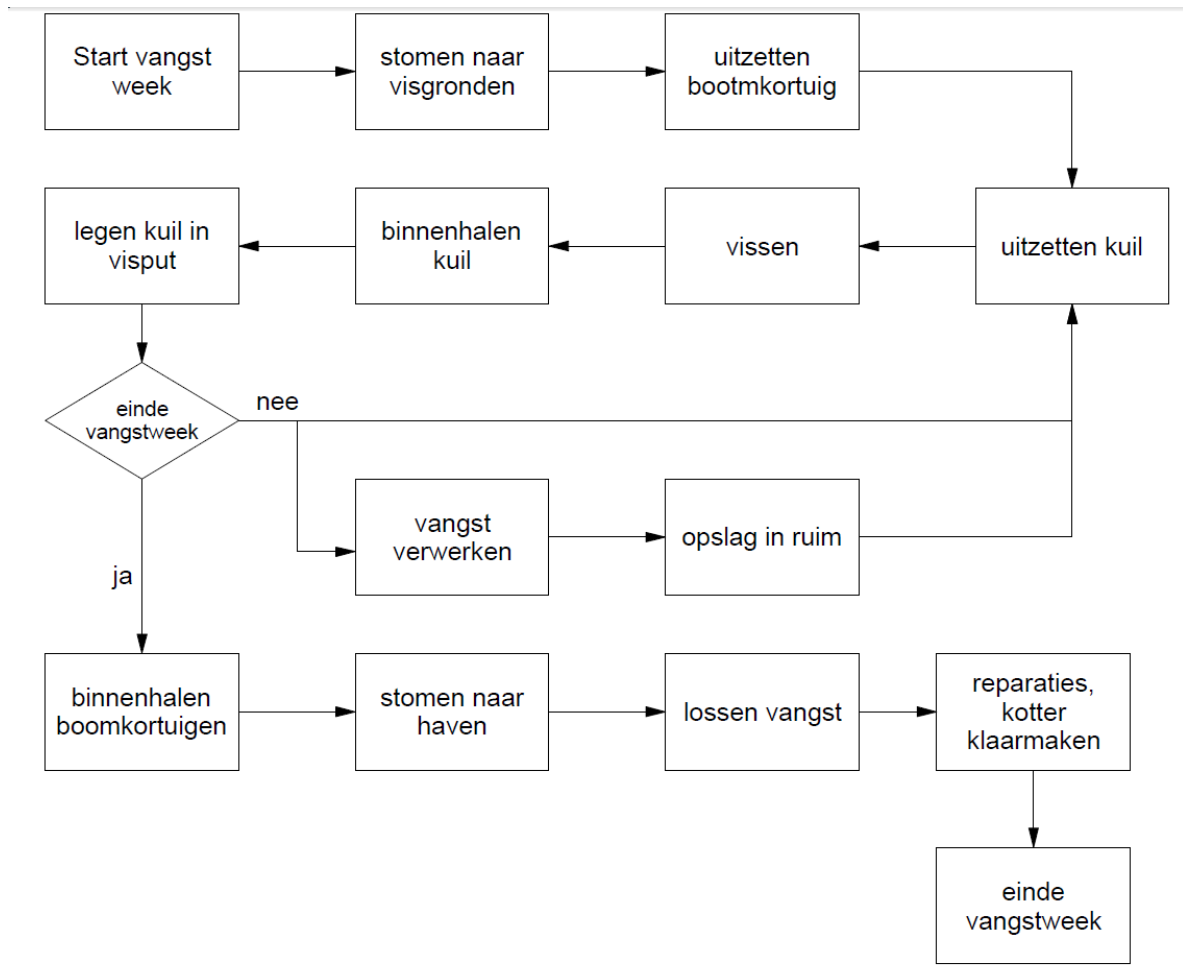


Na het strippen wordt de maatse vis gespoeld in een spoelmachine en in stortkeeën verzameld. Deze stortkeeën bevinden zich benedendeeks in de koelruimte, waar ook een scherfijsinstallatie aanwezig is.



De vis wordt samen met het scherfijs in plastic bakken opgeslagen tot het moment van aanlanding.

In Figuur 1.2 zijn de vangst- en verwerkingsprocessen aan boord weergegeven. Na het stomen naar de visgronden, wordt het boomkortuig uitgezet. De kuil wordt uitgezet, waarna er gevist wordt. Vervolgens wordt de kuil binnengehaald en gelegd in de visput. De vangst wordt verwerkt en opgeslagen in het ruim. Aan het einde van de vangstweek worden de boomkortuigen binnengehaald, gestoomd naar de haven, en wordt de vangst gelost. Uiteindelijk wordt de kotter klaargemaakt voor de volgende vangstweek.



**Figuur 1.2** Vangst- en verwerkingsprocessen aan boord van de kotter.

### 1.2.2 Monitoring

Het monitoren van de vissoort en beoordeling van de kwaliteit vindt visueel door de bemanning plaats gedurende het sorteren en strippen van de vis. Er is geen specifiek bemanningslid belast met toezicht op het sorteringsproces.

In het logboek van de kotter, op basis van het format voor de NVWA, worden de volgende gegevens genoteerd:

- vaartuinummer;
- plaats van aanlanding;
- datum van aanlanding;
- vistuig;
- vissoorten;
- vangstgebied;
- totale hoeveelheid vis in bakken.

De vermelding van de vissoorten is van belang voor de monitoringsgegevens op het gebied van eventuele vermenging. Op het etiket van de bak voor aanlanding staat het vaartuinummer en de afslag vermeld. De schipper heeft uiteindelijke verantwoordelijkheid voor het monitoringsresultaat.

Per januari 2014 is nieuwe EU wetgeving in werking getreden over traceerbaarheid van schol. Partijen schol zullen getraceerd moeten kunnen worden naar partijen per kotter.

### 1.2.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie

Op basis van de beschreven processen en monitoring kan geconcludeerd worden dat kritische punten tijdens de vangst zijn:

- Sorteren op het vissersvaartuig
- Opvang in bakken met scherfijs
- Labelling

## 1.3 Visveiling<sup>1</sup>

### 1.3.1 Proces

Nadat de Noordzeevis is gevangen en op de kotters is gesorteerd op vissoort, wordt de gesorteerde vis in bakken getransporteerd.



Vrachtwagens leveren de bakken gesorteerde vis aan de visveiling.



Op de visveiling worden de vissen per vissoort gesorteerd op grootte (1 (groot) t/m 5 (klein)).

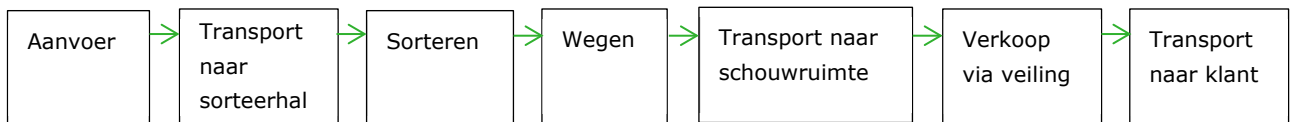
<sup>1</sup> De foto's van paragraaf 1.3 zijn afkomstig van <http://www.visveilingurk.nl>





Bakken met een vissoort van dezelfde grootte worden gewogen. Vervolgens kunnen de inkopers de vissen bekijken (schouwen) in de schouwruimte. De verkoop gebeurt via de veiling. De gekochte bakken worden getransporteerd naar handels- en verwerkingsbedrijven.

In Figuur 1.3 zijn de processtappen van de visveiling schematisch weergegeven.



**Figuur 1.3** Processtappen van de visveiling.

### 1.3.2 Monitoring

Monitoring van de vissoort en kwaliteit vindt visueel plaats tijdens het sorteren en het schouwen door de inkoper van de handels- en verwerkingsbedrijven. Factoren (per kottier aangestelde controleurs) hebben toezicht op het sorteren.



Gegevens worden via labelling en losse briefjes vermeld. Gegevens die aangeleverd worden zijn het vissersbedrijf, vangstdatum, en soort vis. Na het sorteren worden de grootte aangegeven, na het wegen wordt het gewicht per bak hieraan toegevoegd. Na de veiling worden alle gegevens per bak vermeld inclusief de koper.

Ca. 10-15 jaar geleden was er sprake van vermenging bij het sorteren op de afslag door gemakzucht. Nu is er incidenteel vermenging omdat factoren (controleurs) het proces bewaken.



### 1.3.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie

Op basis van de beschreven processen en monitoring kan geconcludeerd worden dat kritische punten op de visveiling zijn:

- Transport en plaatsen van bakken in de sorteerhal
- Sorteren
- Labelling

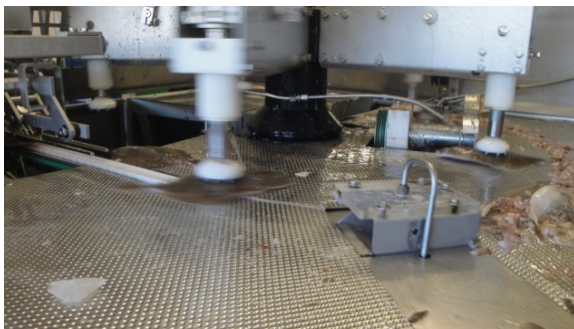
## 1.4 Fileren

### 1.4.1 Proces

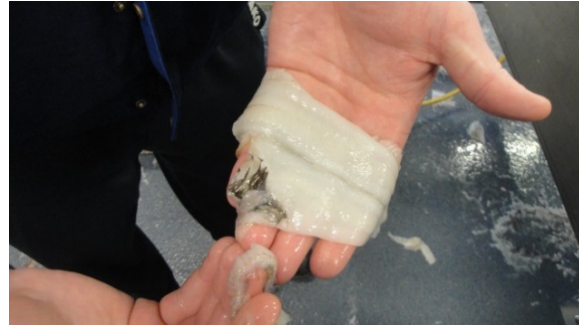
Schol (90%) en schar, en een klein deel tong en bot worden op maandag en vrijdag aangeleverd via visveiling in Urk en andere afslagen in Nederland, Denemarken en Engeland, of rechtstreeks van de kotter.



Zodra de vis bij het visverwerkend bedrijf arriveert, wordt de vis overgezet van 40 kg boxen zonder ijs (7-8°C) in roestvrijstalen containers van 600 kg vis gevuld met water en ijs van 0-2°C. De vis die op vrijdag wordt aangeleverd wordt opgeslagen in de koelcel (capaciteit 200 ton) bij een temperatuur van 0-2°C. Bij aankomst van de vis op het bedrijf wordt er meteen een label met artikelcode, soort en datum op de stalen container geplakt.



Vervolgens worden de vissen gefileerd. De machine meet de lengte en verwijdert de kop en de staart. De vissen worden overlangs doorgesneden in twee filets.



Productiemedewerkers verwijderen handmatig kuit en resten huid en slijm.



De gefileerde vis wordt machinaal gesorteerd op gewicht in 4 categorieën.

De filets worden als halffabricaat verkocht aan andere visverwerkende bedrijven in Urk die de verwerkte vissen in het buitenland verkopen. Een deel van de eindproducten wordt ook rechtstreeks naar het buitenland geleverd. Hiervan gaat een deel naar winkels en het overige deel wordt omgepakt.

#### 1.4.2 Monitoring

Monitoring vindt visueel plaats. Verschillen tussen de ongefileerde vissoorten worden herkend, evenals wanneer vis op een andere locatie gevangen wordt. Scholfilet is afkomstig uit de Noordzee, schar is naast de Noordzee ook afkomstig uit de Oostzee. Schar uit de Oostzee is herkenbaar aan een donkerdere kleur en bevat veel kuit. In de zomer is de schol dikker en witter dan in januari. In de winter bevat de vis veel bloedspots.

Preventieve maatregelen genomen om vermenging te voorkomen door middel van etikettering en registratie. Daarnaast worden schol en schar nooit tegelijkertijd gefileerd.

Vermenging kan plaatsvinden bij opzet. Vooral de witte kant van verschillende vissoorten is niet te onderscheiden. Bij de zwarte kant is dat wel mogelijk door de structuur.

---

### 1.4.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie

Op basis van de beschreven processen en monitoring kan geconcludeerd worden dat kritische punten tijdens de visverwerking zijn:

- Etiketgeving van gefileerde vis met een witte kant.
- Registratie in het traceerbaarheidssysteem en massabalansen.
- Fileren van verschillende vissoorten in dezelfde verwerkingsruimte.
- Bij storing tijdens de productie worden producten verzameld en later opnieuw op de band gelegd.

## 1.5 Visverwerking

### 1.5.1 Bedrijf 1

#### 1.5.1.1 Proces

Verschillende vissoorten worden aangeleverd via de visafslag (Noordzeevis), via handelsbedrijven (import), of via verwerkingsbedrijven (gefileerd, geportioneerd, diepgevroren).

Verse vis van de afslag wordt in tubs samengevoegd en vervolgens verwerkt. In het viswerkingsbedrijf zijn er verschillende ruimten waar verschillende processtappen plaatsvinden, zoals fileren, toevoeging van topping, glaceren, diepvriezen, verpakken, en pallettiseren. De kans op vermenging is groter wanneer er met meerdere vissoorten en/of visgroottes tegelijkertijd gewerkt wordt. De fileerruimte is een locatie waar dit kan voorkomen: schol wordt machinaal gefileerd, terwijl ook andere platvissen en/of vissen van andere grootte handmatig op aparte tafels of via andere machines kunnen worden gefileerd.

Rocksole wordt in de Beringzee gevangen. De vis wordt in 60 kg diepgevroren blokken aangevoerd in de USA. Vervolgens wordt de rocksole in China gefileerd. Na twee tot drie maanden na de vangst wordt de rocksolefilet ongeglaceerd in Nederland aangevoerd om vervolgens verder verwerkt te worden (zoals gecoat of gepaneerd).

Yellowfin sole is ook afkomstig uit Azië, maar wordt alleen in kleine hoeveelheden afgenomen / verkocht, onder het MSC label.

#### 1.5.1.2 Monitoring

Monitoring vindt plaats door DNA-analyses, IEF, en sensorische proeven. De analyses worden door externe labs uitgevoerd.

- Met DNA-analyses wordt de vissoort aangetoond aan de hand van het DNA-profiel.
- Met Iso Electric Focusing (IEF) wordt de vissoort gescreend aan de hand van het eiwitprofiel. Deze methode is goedkoper dan DNA analyses.
- Onbehandelde rocksole en yellowfin sole zijn sensorisch te onderscheiden aan de hand van smaak: rocksole is zoeter. Proeven is vooral moeilijk na behandeling van filets, bijv. met citroenzuur, of met zout. Visueel is scholfilet niet te onderscheiden van grietfilet en tongchar.

Verschillende studies hebben onderzoek gedaan naar specifieke kenmerken van verschillende vissoorten zoals vetzuurprofiel (Cheng, *et al.*, 2013; Sirot, Oseredczuk, Bemrah-Aouachria, Volatier & Leblanc, 2008), eiwitprofiel (Cheng, *et al.*, 2013; Craig, Ritchie, & Mackie, 1995; Etienne, *et al.*, 2001), RNA (Pascoal, Barros-Velázquez, Cepeda, Gallardo, & Calo-Mata, 2008; Tognoli, Saroglia, Terova, Gornati, & Bernardini, 2011), en DNA (Yang, Huang, Hsieh, Huang, & Chen, 2012). Deze technieken zijn echter niet specifiek toegepast op platvissen.

Unilever heeft gekeken naar de relatie tussen vluchtige verbindingen en versheid van platvis. Er werd geen relatie gevonden tussen versheid en het profiel van vluchtige verbindingen.

In Italië is het gehalte aan omegavetzuren in platvissen onderzocht. Schol bevat 0,64-1,8% omegavetzuren in het vlees, in de huid is dat hoger. Rocksole heeft een vetpercentage van 0,7%. Ook in Denemarken wordt het vetgehalte bepaald en vetzuurprofielen geanalyseerd.

---

Naast het analyseren van de vissoort, worden preventieve maatregelen genomen om vermenging te voorkomen door middel van etikettering en registratie in een systeem als Enterprise Resource Planning (ERP). Bij binnenkomst wordt de vis direct gelabeld door middel van artikelnummers. Daarnaast worden er eisen gesteld aan Chinese toeleveranciers zodat alleen vis van de vangst van het huidige jaar wordt geleverd.

Tot nu toe is er nauwelijks vermenging bij leveranciers aangetroffen. Wel is er het vermoeden dat vis behandeld wordt met additieven (zoals citroenzuur), terwijl dit niet vermeld wordt. Wanneer er vermenging wordt aangetroffen, wordt in het algemeen schol verwisseld met yellowfin sole, schar of bot. Daarnaast kan er vermenging van oude en nieuwe rocksole plaatsvinden: een oranje kleur, ontstaan door vetzuuroxidatie, kan de oudere vis verraden.

#### **1.5.1.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie**

Op basis van de beschreven processen en monitoring kan geconcludeerd worden dat kritische punten tijdens de visverwerking zijn:

- Aanlevering door toeleveranciers: bewerkte diepgevroren filets zijn moeilijk visueel te identificeren.
- Fileren van vissen: meerdere vissoorten kunnen gelijktijdig in eenzelfde ruimte aanwezig zijn. Na het onthuiden is het verschil tussen een schol en schar niet meer te zien.
- Bij storing tijdens de productie worden producten verzameld en later opnieuw op de band gelegd.

### **1.5.2 Bedrijf 2**

#### **1.5.2.1 Proces**

Het visverwerkend bedrijf 2 handelt in vijf platvissoorten: schol, schar, bot, tong en tongschar.

Daarnaast worden ook diverse soorten rondvis en kreeften en krabben verwerkt.

De platvissen worden in één dag geleverd vanuit veilingen rondom de Noordzee in boxen van 40 kg.

Eenmaal aangeleverd wordt de 40 kg vis omgeslagen in roestvrijstalen containers met 100 kg ijswater van 0°C en een vaststaand bruto gewicht (container + ijswater). Het aan te brengen label (met speciaal ontwikkelde lijmlaag) bevat informatie als barcode, soort, gewicht, tijd van aankomst en herkomst (haven). Soms worden ingevroren producten gekocht, die worden ontdooid en verwerkt. Op het label voor de klant wordt gemeld dat het product bevroren en ontdooid is geweest.



De aangeleverde vis wordt gesorteerd op gewicht. Via een tussenschot kunnen er twee soorten op twee lijnen gesorteerd worden. Vermenging kan niet plaatsvinden door het aansturen van apparatuur op basis van receptuur en barcodes.





In de fileerhal staan drie machines die vissen van verschillende gradaties en vissoorten fileren. Ook is er een lijn waarbij te kleine of te grote vissen handmatig gefileerd worden. Hierbij worden boxen per fileerder samengesteld op gewicht, uitgestort, en na het fileren weer verzameld en gewogen. Na het fileren kunnen er verschillende processen plaatsvinden: diepvriezen (met huid of zonder huid), vacuüm verpakken, paneren.



Bij het glaceren van dubbeldekkers worden halve filets op elkaar gelegd.



Vervolgens wordt de vis geglacéerd door eerst de producten te bevochtigen en daarna in een vriestunnel te bevriezen. Dit gebeurt in twee fasen.



Na het glaceren worden de vissen gesorteerd op gewicht in een sorteermachine met 12 uitgangen.

Producten worden afgevuld in een zak, gevacuumeerd, of direct verpakt in een doosje. Vervolgens is er een check via de metaaldetector, om achtergebleven schroefjes, vishaken, etc. te detecteren. Uiteindelijk worden de dozen verzameld op een pallet. In de opslag voor diepvriesproducten worden ca. 85 soorten vis opgeslagen.

#### **1.5.2.2 Monitoring**

In het gehele productieproces geldt dat vermenging niet kan plaatsvinden door het gebruik van receptuur en barcodes. Massabalansen worden gebruikt om te controleren of het aansturen op receptuur ook werkelijk goed is gegaan. De administratieve checks zijn stringent, bovendien heeft men te maken met een administratieve audit van MSC, die de balans van input, throughput, en output van vis controleert.

Daarnaast vindt er visuele controle plaats. De aangeleverde schol is alleen afkomstig uit de Noordzee, en is lichter dan schol uit de Oostzee, Denemarken, en Atlantische Oceaan. Schol in de Oostzee is donkerder doordat de grond bepaalde mineralen en zouten bevatten. Schol uit de Atlantische Oceaan is ook donkerder doordat ze dieper leven, en daardoor minder licht en voedsel hebben.

De geïnterviewden zijn van mening dat als er sprake is van vermenging van vis, dan wordt dit bewust gedaan. De goedkopere aanvoer van schol uit Azië, is hier debet aan. De prijs staat onder druk door de Aziatische platvissen. Malversatie door handelaren moet te allen tijde worden tegengegaan. De Nederlandse vloot is geslonken van 250 naar 150 kotters. Daarom is Nederland nu afhankelijk van België en Duitsland. De Nederlandse vloot leverde in 2014 37% (2700 ton) van het total Allowable Catch (Totale Toegestane Vangst, TAC).

#### **1.5.2.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie**

Op basis van de beschreven processen en monitoring kan geconcludeerd worden dat kritische punten tijdens de visverwerking zijn:

- Aanlevering door toeleveranciers: bewerkte diepgevroren filets zijn moeilijk visueel te herkennen.
- Invoeren van de vissoort in de computer en het toekennen van een barcode.
- Bij storing tijdens de productie worden producten verzameld en later opnieuw op de band gelegd.

---

## 1.6 Retail

### 1.6.1 Proces

De visproducten worden vervolgens geëxporteerd naar retailers en bedrijven die de producten onder hun eigen label doorverkopen in Scandinavië, Italië, UK, Frankrijk, Oostenrijk, en Duitsland. Hierbij vindt geen verwerking meer plaats. Wel kunnen de producten omverpakt worden.

### 1.6.2 Monitoring

Bij de ingangscntrole wordt geverifieerd of op het label de juiste vissoort vermeld staat.

### 1.6.3 Kritische punten van verwisseling van vissoorten/vangstlocatie

De producten worden verpakt geleverd door de verwerkende bedrijven. Daarom zal er in deze schakels naar verwachting geen vermenging meer optreden, tenzij de producten omverpakt worden.

## 1.7 Inzet van analysemethoden en bemonsteringsstrategie

De ontwikkelde analysemethoden van dit project kunnen in de keten gebruikt worden voor verschillende doelen. Om te voldoen aan wettelijke aspecten, private eisen, om een garantie te kunnen geven dat werkelijk schol geleverd wordt ter verificatie van een keurmerk, en om fraude op te sporen. In dit hoofdstuk wordt voor deze verschillende doelen een bemonsteringsstrategie beschreven die gebruikt zou kunnen om de analysemethoden te gebruiken om schol van andere platvissen te kunnen onderscheiden.

### 1.7.1 Wettelijke eisen

Voor het analyseren van de authenticiteit van visproducten bestaan er geen wettelijke vereisten voor een bemonsteringsstrategie. Een producent mag zijn afnemers echter niet misleiden door andere producten te leveren dan genoemd wordt. Daarnaast moet de vis in de keten traceerbaar zijn. EU wetgeving beschrijft wel bemonsteringsplannen voor de veiligheid van vis (zie 4.2). Deze plannen zijn echter niet geschikt voor het bepalen van de authenticiteit, omdat ze gerelateerd zijn aan de analytische metingen in het laboratorium.

### 1.7.2 Private eisen

Het Global Food Safety Initiative (GFSI) zal in het GFSI Guidance Document 7e Editie (dat in 2016 uitgegeven zal worden) eisen voor het voorkomen en beheersing fraude opnemen. Hierdoor zullen in kwaliteitssystemen als BRC en IFS de eisen geïntegreerd worden met de eisen voor voedselveiligheid. Deze eisen betreffen een gedocumenteerd assessment en beheersplan op het gebied van potentiële fraude. Ook MSC-standaard voor traceerbaarheid in de visketen (MSC chain of custody standard for seafood traceability) stelt eisen aan het beheersen van de product-authenticiteit van vis. Bij zowel GFSI als MSC zullen de komende jaren bemonsteringsplannen ontwikkeld worden.

### 1.7.3 Borgen van een keurmerk voor schol uit de Noordzee

Een keurmerk kan gebruikt worden om te kunnen garanderen dat de aangesloten visbedrijven werkelijk schol uit de Noordzee leveren. Voor deze garantie zal ten eerste beschreven moeten worden waar vermenging in het proces kan optreden en welke preventieve maatregelen er genomen worden om vermenging te voorkomen. Dit zal minimaal eenmaal per jaar geëvalueerd moeten worden door de eigenaar van het keurmerk. Als tijdens een inspectie blijkt dat een bedrijf op één of meerdere onderdelen niet voldoet, kan een extra inspectie uitgevoerd worden.

---

Daarnaast zullen de aangesloten bedrijven regelmatig hun producten steekproefsgewijs moeten laten analyseren door een onafhankelijk laboratorium om te bewijzen dat het werkelijk schol uit de Noordzee betreft.

Voorbeelden van plaatsen in het productieproces waar vermenging kan optreden zijn: sorteren, opvangen in bakken, labelling, transport, registratie, verwerking van verschillende vissoorten in dezelfde ruimte, hergebruik van grondstof (bij storingsen), aanlevering door toeleveranciers. Deze locaties zullen steekproefsgewijs bemonsterd moeten worden.

De Codex Alimentarius Commissie (CAC) (2004) beschrijft richtlijnen voor bemonstering (CAC/GL 50-2004) om het aantal monsters vast te stellen (zie paragraaf 1.8.3), rekening houdend met de variabiliteit van een batch. Tabel 14 uit de Codex Alimentarius is bruikbaar voor een situatie waar geen informatie uit het verleden (periodieke analyses) beschikbaar is. Gebaseerd op deze tabel, zullen vijf vissen in een batch van 500 kg steekproefsgewijs genomen moeten worden.

Wanneer uit de resultaten blijkt dat een andere vissoort is of dat de vis uit een andere locatie afkomstig is, moeten er corrigerende maatregelen genomen worden (informerend klant, eventueel recall).

Vervolgens zal er verder onderzoek moeten plaatsvinden hoe dit heeft kunnen gebeuren. Ook zullen meerdere monsters bekeken moeten worden en zal de frequentie verhoogd moeten worden.

De inspectie voor het keurmerk voor schol uit de Noordzee zou tegelijk kunnen plaatsvinden met de inspectie van MSC certificeringseisen voor traceerbaarheid.

#### 1.7.4 Identificatie van fraude

Wanneer fraude plaatsvindt, gaat dit meestal om grote partijen die verwisseld of gemengd zijn. Het opsporen van fraude zal daarom plaatsvinden wanneer er een verdenking is. Wanneer een batch verdacht is, kan de betreffende batch bemonsterd worden volgens Codex richtlijn CAC/GL 50-2004. In het geval van positieve resultaten, zal de toeleverancier geïnformeerd moeten worden en mogelijk zal een tweede test uitgevoerd moeten worden als een second opinion.

#### 1.7.5 Selecteren van nieuwe toeleveranciers

Nieuwe toeleveranciers hebben geen geschiedenis van het voldoen aan de eisen. Daarom kunnen ze gemonitord worden gedurende een specifieke periode. Als geen verwisseling van schol wordt gevonden, kan de frequentie verlaagd worden.

#### 1.7.6 Periodieke monitoring

Periodieke monitoring van authenticiteit kan geïntegreerd worden in het productiesysteem van de organisatie. Hierdoor kan de producent zeker zijn dat alle producten voldoen aan de specificaties. Het risicoprofiel voor vermenging bepaalt de frequentie van bemonstering. In het algemeen zou elke batch bemonsterd moeten worden. Als er echter geen geschiedenis van vermenging is, kan er gekozen worden om batches te verifiëren. Als er wel vermenging wordt aangetroffen, zou de frequentie verhoogd moeten worden.



## 1.8 Monsterneming van vis in de praktijk

### 1.8.1 Algemene richtlijnen bemonstering

Bemonstering is niet zo maar een activiteit die even tussendoor wordt uitgevoerd. Er zijn tal van voorschriften en richtlijnen op nationaal, EU of mondiaal (Codex) niveau, die ervoor zorgdragen dat bemonstering op de veiligheid van vis op een (statistisch) verantwoorde manier wordt gedaan. De monsternemer dient uiteraard onafhankelijk te zijn en liefst van een daartoe bevoegde instantie afkomstig te zijn, bijvoorbeeld van een controlerende of certificerende organisatie. Het niveau van de bemonstering is in algemene zin afhankelijk van het volume van de partij en de eigenschappen van productie, handels- en consumptiepatronen.

Het type of soort monster hangt nauw samen met de te beoordelen grondstof of product. Immers bemonstering van een bulkproduct (graan) of voorverpakte producten (vis) zal totaal verschillend zijn. De wijze van bemonstering is afhankelijk van het aantal eenheden dat binnen een partij kunnen worden onderscheiden en het tijdstip van bemonstering in relatie tot de houdbaarheid van het product en de te onderzoeken parameters (type contaminanten of andere tekortkomingen of kwaliteitseisen) die hieraan zijn gekoppeld. Zo zal de variatie van het aantal eenheden voor de bepaling van dioxine veel groter zijn dan bij die van de bepaling van bijvoorbeeld authenticiteit.

De hoeveelheid monstermateriaal heeft betrekking op het (minimale) gewicht van het product per aparte eenheid (vis). De frequentie van bemonstering het aantal keren dat er per jaar wordt bemonsterd voor een bepaald type contaminanten of kwaliteitsonderzoek.

Daarnaast is het nog van belang om de plaats (en datum) van de bemonstering te vermelden, bijvoorbeeld bij verwerkende bedrijven of detailhandel. Zijn de monsters eenmaal genomen dan is het van groot belang dat de monsters onder koele omstandigheden worden bewaard en als zodanig ook onmiddellijk naar het laboratorium worden getransporteerd.

### 1.8.2 Relevante wetgeving

Het mag duidelijk zijn dat onveilige levensmiddelen niet in de handel mogen worden gebracht (Verordening (EG) Nr. 178/2002). Voor diverse chemische contaminanten zoals dioxinen, PCB's, en zware metalen en pathogene micro-organismen zijn daarom wettelijke normen vastgesteld. Door de lidstaten dient er regelmatig gecontroleerd te worden of (primaire) producenten de normen in acht nemen (Verordening (EG) Nr. 882/2004). Om te voorkomen dat lidstaten de monsternamen en analyse op zeer uiteenlopende wijzen uitvoeren, zijn ook hiervoor regels vastgelegd in regelgeving. De EU regelgeving inzake monsternamen waarin iets vermeld staat over vis is samengevat in Tabel 1.1.

Tabel 1.1

*Wetgeving inzake monsternamen (en analyse).*

Document	Contaminant/residu in matrix c.q. onderwerp	Bijlage
Verordening (EU) nr. 252/2012	Dioxinen, furanen en dioxineachtige PCB's en niet dioxineachtige PCB's in levensmiddelen, waaronder vis	1
Verordening (EG) nr. 333/2007	Lood, cadmium, kwik, anorganisch tin, 3-MCPD, PAK's en melamine in levensmiddelen, waaronder vis	2
Verordening (EG) nr. 2074/2005	O.a. visuele controle vis op aanwezigheid van parasieten,	3
Richtlijn 96/23/EG	Residuen van diergeneesmiddelen en hormonen in kweekvis (aquacultuur)	4
Verordening (EG) nr. 1224/2009	Officiële controle op gemeenschappelijk visserijbeleid	5

Deze richtlijnen laten zien dat er voor verschillende doeleinden op een verschillende manier bemonsterd wordt. Het is dus van belang om vooraf het doel van de bemonstering te formuleren en daarop het bemonsteringsplan af te stemmen

### 1.8.3 Bemonsteringsplan/Richtlijnen Codex Alimentarius (CAC/GL 50-2004)

Voorafgaand aan het maken van een bemonsteringsplan is het nuttig om eerst te bepalen wat de specifieke aard van de bemonstering is. Hier volgen acht criteria die van toepassing zijn:

1. Gerelateerde internationale referentie documenten.
2. Aard van de inspectie (bepaald item van de partij of gehele partij).
3. Aard van de karakteristiek van de inspectie (kwalitatief of kwantitatief).
4. Kwaliteitsniveau (AQL = Acceptance Quality Limits and LQ = Limiting Quality).
5. Aard van de partij (bulk of verpakt; homogeniteit van karakteristieken die worden geïnspecteerd).
6. Samenstelling van het monster (één of meerdere eenheden).
7. Keuze van type bemonsteringsplan (statistische kwaliteitscontrole of pragmatisch).
8. Regels voor beslissingen of partij geaccepteerd of geweigerd wordt.

Daarnaast is het van belang of het bemonsteringsplan bestemd is voor gebruik door officiële voedselinspectie instanties of voor gebruik door het bedrijfsleven zelf (zelf-inspectie door producenten en/of handelaren).

De Codex Alimentarius heeft ook een bemonsteringsplan strategie geadopteerd van ISO 3951, waarin wordt uitgegaan van partijgrootte en verwachte inspectie situaties (waarin het niveau van inspectie wordt uitgedrukt in 3 klassen: gereduceerd, normaal en strikt). Zie onderstaand voorbeeld:

Tabel 14

*Variable sampling plans with unknown standard deviation (uit Codex Alimentarius).*

Lot size (Number of items)	n and k at AQLs (%)	Inspection level		
		Reduced	Normal	Tightened
2 - 8	n	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	k at 0,65	1,45	1,65	1,88
	k at 2,5	0,958	1,12	1,34
9 - 15	n	<b>3</b>	<b>3</b>	<b>5</b>
	k at 0,65	1,45	1,65	1,88
	k at 2,5	0,958	1,12	1,40
16 - 25	n	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>7</b>
	k at 0,65	1,45	1,65	1,88
	k at 2,5	0,958	1,17	1,50
26 - 50	n	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>10</b>
	k at 0,65	1,45	1,65	1,98
	k at 2,5	0,958	1,24	1,58
51 - 90	n	<b>3</b>	<b>7</b>	<b>15</b>
	k at 0,65	1,45	1,75	2,06
	k at 2,5	0,958	1,33	1,65
91 - 150	n	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>20</b>
	k at 0,65	1,45	1,84	2,11
	k at 2,5	0,958	1,41	1,69
151 - 280	n	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>25</b>
	k at 0,65	1,45	1,91	2,14
	k at 2,5	1,01	1,47	1,72
281 - 500	n	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>35</b>
	k at 0,65	1,53	1,96	2,18
	k at 2,5	1,07	1,51	1,76
	k at 6,5	0,617	1,09	1,35
	k at 6,5	0,675	1,12	1,39

---

#### 1.8.4 Type, aantal en frequentie van monsters

Er kunnen vier type monsters worden onderscheiden. De Canadian Food Inspection Agency (CFIA, section 7) geeft hiervan een praktische beschrijving in haar nationaal bemonsteringsplan en beoordelingscriteria 2014 – 2015.

1. Monitoring monsters worden routinematig genomen in het kader van inspecties (publiek of privaat).
2. Surveillance monsters worden in ad hoc situaties genomen, maar ook om andere inspectie activiteiten te verifiëren.
3. Wettelijke monsters zijn aanbevolen als een wettelijke vervolgactie wordt geanticipeerd in geval van overschrijding van bepaalde normen. Bemonsteringsplannen moeten in zo'n geval strikt worden opgevolgd om er zeker van te zijn dat het monster ontvankelijk is bij eventuele rechtszaak.
4. Niet-geplande en ad hoc monsters kunnen voortkomen uit een klacht of een (tweede) inspectie.

Wat betreft het aantal monsters dat in aanmerking komt bij het vaststellen van authenticiteit van vis, wordt verwezen naar FEN0 59 (CFIA section 7), waar een specifiek aantal is opgenomen voor de verificatie van claims van vissoorten in de aanvoer. Hierbij gaat men uit van 1 monster en een minimum gewicht van 100 gram.

Voorts kan hier ook worden uitgegaan van de monsteraantallen zoals die worden genoemd in Tabel 14 van de bemonsteringsrichtlijnen van de Codex Alimentarius (CAC/GL 50-2004), waarbij het inspectieniveau op 'gereduceerd' is gesteld en een gewicht van de vis van 1 kg, een partij van 500 eenheden, hetgeen dan overeenkomt met een inspectieniveau van 5 te nemen monsters.

De frequentie van bemonstering voor verificatie van een keurmerk is afhankelijk van de aard van de activiteit. Bij routinematige bemonstering (monitoring) wordt de frequentie aangehouden die in het monitoringsplan staat aangegeven. Bij routine controle voor een keurmerk kan met één keer per jaar bemonsteren worden volstaan. In het geval van vermenging of verwisseling is het gebruikelijk dat er extra wordt bemonsterd binnen de verdachte partij.

#### 1.8.5 MSC traceerbaarheid standaard

Het MSC keurmerk kent een traceerbaarheidsstandaard om aan te tonen dat de vis afkomstig is van duurzame visserij (MSC, 2013b). Sinds 2009 worden DNA-testen gebruikt op soort en populatie niveau om de effectiviteit van de MSC traceerbaarheidsstandaard te monitoren. Hiermee wordt de soort en/of het vangstgebied van MSC visproducten geverifieerd. De resultaten van DNA-testen kunnen in combinatie met traceerbaarheidsdocumenten of met gegevens over volumes en ketens, een indicatie geven over het voldoen aan eisen van de MSC traceerbaarheidsstandaard.

In 2013 heeft MSC resultaten van DNA-testen op MSC producten gepubliceerd. De monsters kwamen uit 15 landen en van verschillende sectoren zoals restaurants, cafetaria's, supermarkten (MSC, 2013b). De landen waren geselecteerd om op basis van het grootst mogelijk aantal ketens dat geanalyseerd kon worden. Het grootste aantal monsters was verkregen uit de landen en sectoren waar de meeste MSC producten worden verkocht, namelijk Nederland, Duitsland, USA en de UK. Het doel was om 400 producten te bemonsteren, met 10% niet-MSC producten als controlegroep (MSC, 2013c). Uiteindelijk zijn 320 producten getest, waarbij minder dan 1% van de MSC producten verkeerd was geëtiketteerd (3 uit 320 testresultaten). De drie monsters werden verder onderzocht middels documentatie in de keten, waarbij certificatiebedrijven en de merkeigenaren geïnformeerd werden. Bij bewijs van vervanging door niet-MSC gecertificeerde producten wordt de certificering geschorst (MSC, 2013c). Van de controlegroep was 5% niet juist geëtiketteerd (MSC, 2013b). In dit onderzoek zijn ook schol (*Pleuronectes platessa*, n=24 MSC, 3 non-MSC) en rocksole (*Lepidopsetta bilineata/polyxystra*, n=5 MSC, n=1 non-MSC) getest. Deze vissen waren goed geëtiketteerd (MSC, 2013c).

MSC is op zoek naar andere technieken om de geografische oorsprong te kunnen bepalen. Voor het bepalen van de soort wil MSC de efficiëntie vergroten zodat meer gemengde producten kunnen worden getest. Ook willen ze graag een testkit ontwikkelen die direct door de gebruiker voor een

---

product gebruikt kan worden. Daarnaast wil MSC de bemonstering niet alleen aan het einde van de keten laten plaatsvinden, maar op die plaatsen waar de vermenging kan plaatsvinden, tijdens audits door certificeerders, of op een ad hoc basis wanneer nodig. Op deze manier kan MSC meer doelgericht meten en wordt het makkelijker om te identificeren waar de vermenging plaatsvindt (MSC, 2013c).

### 1.8.6 Rapportage bemonstering

Van elke bemonstering en navolgende analyse in het laboratorium moet een rapport worden opgesteld, waarin het doel en de methodiek van de bemonstering uiteen worden gezet. Verder moet het resultaat van de analyse worden vermeld evenals de eventuele vervolgstappen.

Het format van deze rapportage kan er als volgt uitzien:

Inleiding:	<p>hierin wordt beschreven wat het doel van de bemonstering is en het kader (project / onderzoek) waarin dit plaatsvindt. Er kan ook achtergrondinformatie worden verstrekt met betrekking tot de problematiek (authenticiteit, traceerbaarheid of contaminatie).</p> <p>Verder kan melding worden gemaakt van relevante wetgeving in het kader waarvan de bemonstering plaatsvindt, met inbegrip van de parameters waarop dient te worden onderzocht.</p>
Materiaal en methoden:	<p>alle monster technische gegevens kunnen hier worden vermeld. Dit betreft veelal gegevens over het monstermateriaal zoals de wijze van monsternamen, soort monster, plaats en datum van monsternamen en hoeveelheid monsters. Tevens wordt hier vermeld door wie de monsters zijn genomen.</p> <p>Wat betreft de methoden zal idealiter worden verwezen naar relevante wetgeving en de paragrafen die het betreft.</p>
Resultaten:	<p>de resultaten zullen verwijzen naar de uiteindelijke aantallen monsters die zijn genomen en in het laboratorium zijn onderzocht. De uitslagen hiervan kunnen overzichtelijk in een tabel worden verwoord. Ook kunnen extra uitspraken worden gedaan over aantoonbaarheid en betrouwbaarheid van waarden.</p>
Discussie:	<p>in dit deel van de rapportage kunnen uitspraken worden gedaan over het resultaat van de bemonstering zelf of de analyses van het laboratorium met betrekking tot overschrijdingen van grenswaarden of afwijkingen die zijn geconstateerd en de verklaring daaromtrent.</p>
Conclusie:	<p>kort weergegeven wat de aanleiding van de bemonstering is geweest alsmede de resultaten hiervan. Het vermelden van vervolgstappen in het kader van toezicht of handhaving van kwaliteitseisen van een keurmerk of wettelijke regeling hoort hier ook thuis.</p>

## 1.9 Voorstel bemonstering keurmerk NSFC

Zoals eerder aangegeven worden er in de verschillende EU-regelgevingen en in de Codex Alimentarius verschillende bemonsteringsplannen voorgesteld afhankelijk van het doel van de bemonstering. In geval het gaat om routinematige bemonstering op authenticiteit lijkt de bemonstering uit verordening (EU) 333/3007 het meest geschikt:

Tabel 1.2

Minimumaantal van de partij of subpartij te nemen basismonsters.

Gewicht of volume van de partij/subpartij (in kg of liter)	Minimumaantal basismonsters
< 50	3
≥ 50 en ≤ 500	5
> 500	10

Indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat, wordt voor het verzamelmonster een aantal verpakkingen of eenheden genomen overeenkomstig Tabel 1.3.

Tabel 1.3

Aantal verpakkingen of eenheden (basismonsters) waaruit het verzamelmonster wordt samengesteld indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat.

Aantal verpakkingen of eenheden in de partij/subpartij	Aantal te nemen verpakkingen of eenheden
≤ 25	Minimaal 1 verpakking of eenheid
26-100	Circa 5 %, minimaal 2 verpakkingen of eenheden
> 100	Circa 5 %, maximaal 10 verpakkingen of eenheden

Wanneer uit de resultaten blijkt dat de vis een andere vissoort is dan vermeld op het etiket of dat de vis uit een andere locatie afkomstig is, moeten er corrigerende maatregelen worden genomen (informereren klant, eventueel recall). Vervolgens zal er verder onderzoek moeten plaatsvinden, hoe dit heeft kunnen gebeuren. Ook zullen meerdere monsters moeten worden geanalyseerd en zal de frequentie van bemonstering moeten worden verhoogd. De inspectiefrequentie gaat dan van normaal naar verhoogd. Andersom kan de inspectiefrequentie gereduceerd worden indien resultaten (gedurende opvolgende jaren) laten zien dat de juiste etikettering gevoerd is (analoog aan de Codex Alimentarius).

Analoog aan het CODEX document is een de volgende aanvulling op Tabel 1.3 voor te stellen:

Gewicht/volume	Gereduceerd	Normaal	Verhoogd
<50	3	3	4
>50 en <500	3	5	10
>500	3	10	20

Het zelf nemen van monsters door de visondernemingen en die naar een laboratorium verzenden, zal worden geïnterpreteerd als het zelf keuren van eigen vlees. Het is daarom van belang dat bedrijven hun bemonsteringsplan laten goedkeuren door de NSFC (als ze dat keurmerk willen hebben). En dat er elk jaar/elke 2 jaar een onafhankelijke audit wordt uitgevoerd door een gecertificeerde instantie.

---

## 2 Ontwikkeling en initiële validatie van een moleculaire barcoding methode om Noordzeevissoorten in gemengde monsters te identificeren

Het bepalen van de authenticiteit van vissoorten krijgt wereldwijd veel aandacht (o.a. Filonzi *et al.*, 2010; Jacquet & Pauly, 2008; Jerome *et al.*, 2008; Ogden, 2008; Rasmussen en Morrissey, 2008). Schol (*Pleuronectes platessa*) en andere platvissoorten die tot de orde Pleuronectiformes behoren, worden regelmatig vervangen door soorten met lagere commerciële en organoleptische waarde. Uit recent onderzoek blijkt dat Europese schol regelmatig wordt vervangen door Europese bot (*Platichthys flesus*), Japanse schar (*Limanda aspera*) of Alaska schol (*Pleuronectes quadrituberculatus*). Vooral na verwerking van deze vissoorten is het vaak niet meer mogelijk om de vis te identificeren op basis van morfologische kenmerken (Berrini, 2009), waardoor verwisseling van soorten visueel onopgemerkt kan blijven. Naast het volledig verwisselen van vissoorten komt het ook voor dat soorten gedeeltelijk worden vervangen. Het is daarom belangrijk om methoden te ontwikkelen waarmee ook de soortensamenstelling van gemengde producten kan worden achterhaald.

DNA barcoding is een methode om soorten te identificeren op basis van DNA sequenties (zogenaamde 'DNA barcode'). DNA barcoding is bewezen effectief in het identificeren van vissoorten (Galimberti *et al.*, 2013). Op basis van de mitochondriële DNA barcode regio cytochroom c oxidase subunit 1 (COI), kan 98% van de mariene soorten en 93% van de zoetwatervissen worden geïdentificeerd (Ivanova *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2009). DNA barcoding op basis van Sanger sequencing is echter alleen geschikt voor het identificeren van individuele vissoorten en niet geschikt voor het analyseren van complexe monsters. Next-generation sequencing (NGS) technologie daarentegen is wel geschikt voor het analyseren van mengsels waarin meerdere vissoorten zijn verwerkt. NGS gecombineerd met DNA barcoding wordt DNA metabarcoding genoemd (Ji *et al.*, 2013). DNA metabarcoding wordt toegepast in ecologisch en milieu-onderzoek (o.a. Epp *et al.*, 2012; Haijabbai *et al.*, 2011), maar het is nog geen standaard methode voor onderzoek naar de authenticiteit van visproducten.

In dit hoofdstuk is een DNA metabarcoding methode opgezet waarmee vissoorten gelijktijdig in gemengde vismonsters kunnen worden geïdentificeerd. Hiervoor zijn experimentele monsters gemaakt waarin verschillende platvissoorten en andere vissoorten zijn gemengd. De ontwikkeling van de methode richt zich, in overleg met het NSFC, met name op de detectie van schol, en op goedkopere vissoorten zoals Japanse schar, bot, yellowfin sole en rocksole. Voor het opzetten de methode zijn twee verschillende NGS methoden getest en vergeleken. Protocollen zijn opgesteld voor het extraheren van DNA uit mengmonsters, voor de PCR amplificatie van de DNA barcodes COI en cytochrome b (cytB), en voor NGS data analyse. De protocollen voor DNA metabarcoding zijn vervolgens getest op een nieuwe set mengmonsters en praktijkmonsters en er is een begin gemaakt met het valideren van de DNA metabarcoding methode voor het identificeren van Noordzeevissoorten in mengmonsters in een interlaboratorium-test.

### 2.1 DNA barcodes voor het identificeren van vissoorten

DNA barcoding van vissoorten is geïnitieerd door verschillende internationale consortia. In het EU-project FishTrace (2005-2009) is van ongeveer 200 Europese mariene vissoorten een DNA barcode vastgesteld op basis van de DNA regio cytB. De methode is binnen het FishTrace consortium gevalideerd (Sevilla *et al.*, 2007) en deze methode wordt standaard gebruikt voor het identificeren van vissoorten binnen IMARES-WUR. De DNA barcodes van dit project zijn opgeslagen in de publiek toegankelijke GenBank database (Benson *et al.*, 2013).

In het 'Fish Barcode of Life initiative' project (FISH-BOL; <http://www.fishbol.org/>; Hanner *et al.*, 2011) is een DNA barcoding methode opgezet op basis van COI. De DNA barcodes van dit project zijn opgeslagen in de database 'Barcode of Life Data systems' (BOLD; <http://www.boldsystems.org/>; Ratnasingham and Hebert, 2007) en Genbank. In BOLD staan 182.194 COI sequenties opgeslagen

---

(oktober 2015) van straalvinnige vissen (Actinopterygii). PCR primers voor de amplificatie van de COI zijn beschreven door Ivanova *et al.* (2007).

Kockzius *et al.* (2010) heeft de bruikbaarheid van de 16S rDNA, cytB en de COI regio voor DNA barcoding van 50 Europese marine vissoorten met elkaar vergeleken, en concludeerde dat cytB en COI het meest geschikt zijn voor een eenduidige identificatie van soorten. Zhang en Hanner (2012) hebben een vergelijk gemaakt van 16S, cytB, 18S rRNA en COI voor de identificatie van 242 vissoorten uit de Zuid-Chinese Zee, en concludeerden dat de COI barcode regio het meest informatief was.

Uit onze initiële experimenten is gebleken dat zowel COI als cytB niet voor alle vissoorten kunnen worden geamplificeerd met de in deze studie geselecteerde PCR primers (zie hieronder). Zo kan bijvoorbeeld COI niet of alleen zeer zwak worden geamplificeerd voor *Psetta maxima*, *Scophthalmus rhombus* en *Hippoglossoides platessoides*, terwijl cytB niet kan worden geamplificeerd voor *Osmerus eperlanus*. In deze studie is daarom gebruik gemaakt van zowel de COI als de cytB regio voor de identificatie van platvissoorten.

## 2.2 Procedures voor het identificeren van vissoorten.

Binnen dit project zijn de volgende procedures opgezet voor het identificeren vissoorten in complexe mengmonsters.

### 2.2.1 Procedure voor het maken van experimentele mengmonsters

Schol (*Pleuronectes platessa*) en bijvangst vissen (Tabel 2.1) zijn verzameld door IMARES op de Noordzee en de Atlantische oceaan in september 2013, en ingevroren bij -20°C. Verder zijn referentiematerialen voor het maken van de mengmonsters verkregen van de NVWA. De soortenidentiteit van alle individuele vissoorten is vastgesteld op basis van Sanger sequencing met COI en cytB, zoals hieronder beschreven. De soorten *P. platessa* en *Limanda limanda* zijn niet gebarcodet, maar deze soorten zijn taxonomisch geïdentificeerd door specialisten bij IMARES. In totaal zijn er 18 mengmonsters gemaakt met een bekende samenstelling bestaande uit 2 -11 verschillende vissoorten en variërend in concentratie. Er zijn 9 mengmonsters ('Test monsters') gemaakt voor het opzetten van de DNA metabarcoding methode (Tabel 2.1) en vervolgens zijn er 9 andere mengmonsters ('Pre-validatie monsters') gemaakt voor het valideren van de methode (Tabel 2.4). De volgende procedure is gebruikt voor het maken van de mengmonsters: gedeeltelijk ontdooide vissen zijn eerst gefileerd en in kleine stukje gesneden. De verschillende vissoorten zijn vervolgens gemengd op basis van vers gewicht. Voor het maken van de mengmonsters is alleen gebruik gemaakt van spierweefsel, behalve in het geval van *Zoarces viviparus*, *Scophthalmus rhombus*, *Myoxocephalus scorpius* en *Agonus cataphractus*. Van deze vissoorten was onvoldoende materiaal aanwezig om mengsels te maken alleen op basis van spierweefsel. De mengmonsters zijn daarna gevriesdroogd, tot poeder vermalen en opgeslagen bij -20°C.

### 2.2.2 DNA extractie procedure

DNA is geïsoleerd volgens een gedeeltelijk aangepaste cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) procedure zoals beschreven door Murray en Thomson (1980), die in het korte bestaat uit de volgende stappen: mix 100 mg (gevriesdroogd) vismateriaal, 300 µl MilliQ (MQ) en 700 µl CTAB buffer (20 g/L CTAB; 1.4 M NaCl; 0.1 M Tris-HCL; 20 mM EDTA) samen met 5 µl RNaseA (Qiagen) en incubeer bij 65°C voor 15 minuten. Voeg daarna 20 µl Proteinase K (20ng/µl; Fermentas Molecular Biology, Germany) toe en incubeer bij 65°C voor 15 minuten. Centrifugeer het extract bij 14,000 rpm voor 10 minutes. Pipeteer het supernatant in een nieuwe schoon epje en voeg 500 µl chloroform toe. Schud de oplossing voor 30 seconden en centrifugeer. Herhaal de laatste stap en meng het supernatant met 2 volumes CTAB precipitatie buffer (5 g/L CTAB, 0.04 M NaCl) op kamertemperatuur voor 1 uur. Centrifugeer vervolgens het monster en was het precipitaat met 350 µl NaCl (1.2M). Voeg chloroform (350 µl) toe, mix voor 30 seconden en centrifugeer. Pipeteer de bovenstaande vloeistof in een nieuwe schoon epje. Precipiteer en was daarna het DNA met ethanol. Het DNA wordt vervolgens opgelost in TE buffer en opgeslagen bij 4°C. De DNA concentratie en zuiverheid is bepaald met een NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, DE, USA).

---

### 2.2.3 PCR amplificatie procedure

De PCR primers die gebruikt zijn voor de amplificatie van COI voor Sanger sequencing staan beschreven in Ivanova *et al.* (2007). Voor NGS zijn COI primers gebruikt zonder M13 sequenties (Tabel 2.2). PCR is uitgevoerd in een reactie volume van 25 µl met daarin: 50 ng genomisch DNA, 1X HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) en 0.1 µM van elke primer. De volgende PCR amplificatie condities zijn gebruikt: 95°C voor 900 s, gevolgd door 35 cycli bij 94°C voor 30 s, 52°C voor 40 s, en 72°C voor 60 s, en eindigend met 72°C voor 600 s.

Voor de PCR amplificatie van CytB zijn de primers FishcytB-F en CytB1-5R gebruikt (Sevilla *et al.*, 2007). PCR is uitgevoerd in een reactie volume van 25 µl met daarin: 50 ng genomisch DNA, 1X HotStarTaq Master Mix (Qiagen, Valencia, CA) en 0.1 µM van elke primer. De volgende PCR amplificatie condities zijn gebruikt: 95°C voor 900 s, gevolgd door 35 cycli bij 94°C voor 30 s, 50°C voor 40 s, en 72°C voor 60 s, en eindigend met 72°C voor 600 s.

De COI en cytB PCR producten (amplicons) zijn gevisualiseerd op 1% agarose gels met ethidium bromide. De COI en cytB amplicons zijn respectievelijk 737 nucleotiden (nt) en 716 nt groot. De PCR producten zijn opgezuiverd met de QIAquick PCR purification kit (Qiagen) en de DNA concentratie is vervolgens bepaald met een NanoDrop 1000. Voor NGS zijn 3 tot 6 onafhankelijke PCR reacties van hetzelfde sample (DNA extract) gemengd en opgezuiverd. Sanger sequencing reacties zijn uitgevoerd bij Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Sanger sequencing van COI is uitgevoerd met M13 primers zoals beschreven door Ivanova *et al.* (2007). Voor cytB is alleen de cytB1-5R primer gebruikt voor Sanger sequencing.

### 2.2.4 Ion Torrent sequencing procedure

Voordat de COI en cytB PCR producten zijn gesequenced met Ion Torrent technologie (Life Technologies) zijn de opgezuiverde amplicons eerst gemengd op basis van equimolaire concentraties. Een shotgun DNA bank is gemaakt met behulp van de NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set voor Ion Torrent™ (New England Biolabs, Inc. Ipswich, MA) en Ion Torrent Xpress barcode adapters (Life Technologies) door het Naturalis Biodiversity Center. Emulsie PCR is uitgevoerd met de Ion PGM™ Sequencing 400 Kit op een Ion OneTouch™ 2 System (Life Technologies). De COI en cytB amplicons zijn vervolgens gesequenced op een '316' chip in een Ion Personal Genome Machine® [PGM™] (Life Technologies).

### 2.2.5 Illumina MiSeq sequencing procedure

Voordat de COI en cytB PCR producten zijn gesequenced met Illumina MiSeq technologie (Illumina) zijn de opgezuiverde amplicons eerst gemengd op basis van equimolaire concentraties. Een DNA bank is gemaakt met behulp twee-staps PCR en de Nextera XT Index kit (Illumina) door het Central Veterinary Institute (CVI) van Wageningen UR (Lelystad, the Netherlands). Illumina paired-end (PE) 300-bp sequencing is uitgevoerd op een Illumina MiSeq V2 machine.



Tabel 2.1

Samenstelling en gewichtspercentages van de 'Test monsters' en de resultaten van de soortenidentificatie op basis van Ion Torrent en Illumina MiSeq NGS.

Monster naam	Soort	Gewichtspercentage (%)	Soortenidentificatie op basis van COI en cytB		
			Ion Torrent	Illumina MiSeq	
				Forward reads	Reverse reads
Sample 1	<i>Pleuronectes platessa</i>	98.98	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	1.02	COI	COI	COI
Sample 2	<i>Pleuronectes platessa</i>	74.91	COI/cytB	COI/cytB	COI
	<i>Limanda limanda</i>	4.92	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Microstomus kitt</i>	4.97	COI/cytB	COI/cytB	cytB
	<i>Limanda aspera</i>	5.13	COI/cytB	COI	COI
	<i>Platichthys flesus</i>	5.12	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Scophthalmus rhombus</i>	4.95	cytB	cytB	cytB
Sample 3	<i>Pleuronectes platessa</i>	8.39	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	8.36	COI	COI	COI
	<i>Limanda aspera</i>	8.25	COI	COI	COI
	<i>Platichthys flesus</i>	8.19	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Agonus cataphractus</i>	8.15	cytB	cytB	cytB
	<i>Microstomus kitt</i>	16.70	COI/cytB	COI/cytB	cytB
	<i>Myoxocephalus scorpius</i>	8.27	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	Hippoglossoides platessoides	8.39	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Zoarces viviparus</i>	8.45	COI/cytB	cytB	COI/cytB
	<i>Osmerus eperlanus</i>	8.43	COI	COI	COI
	<i>Psetta maxima</i>	8.41	cytB	cytB	cytB
	Sample 4/	<i>Pleuronectes platessa</i>	90.25	COI/cytB	COI/cytB
sample 10	<i>Limanda limanda</i>	2.00	COI/cytB	COI/cytB	COI
	<i>Microstomus kitt</i>	2.02	COI/cytB	COI/cytB	cytB
	<i>Limanda aspera</i>	0.95	COI	COI	COI
	<i>Platichthys flesus</i>	1.01	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Scophthalmus rhombus</i>	3.77	cytB	cytB	cytB
Sample 5	<i>Pleuronectes platessa</i>	95.00	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	1.16	COI	COI	COI/cytB
	<i>Microstomus kitt</i>	0.99	COI/cytB	COI/cytB	cytB
	<i>Limanda aspera</i>	0.96	COI	COI	COI
	<i>Platichthys flesus</i>	0.92	COI/cytB	cytB	COI/cytB
	<i>Scophthalmus rhombus</i>	0.98	cytB	cytB	cytB
Sample 6	<i>Pleuronectes platessa</i>	90.04	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	9.96	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
Sample 7	<i>Pleuronectes platessa</i>	89.94	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda aspera</i>	10.06	COI/cytB	COI/cytB	COI
Sample 8	<i>Pleuronectes platessa</i>	100	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB
Sample 9	<i>Platichthys flesus</i>	100	COI/cytB	COI/cytB	COI/cytB

### 2.2.6 Data analyse procedure voor het identificeren van vissoorten

De Ion Torrent NGS data is eerste gefilterd op basis van Phred score, waarbij nucleotide posities met een kwaliteitsscore lager dan 20 zijn verwijderd vanaf de 3'-uiteinde in PRINSEQ v0.20.4 (Schieder en Edwards, 2011). Daarna zijn de nucleotide sequenties (reads) gefilterd met de FASTX-toolkit v0.0.14 ([http://hannonlab.cshl.edu/fastx\\_toolkit/download.html](http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/download.html)) waarmee reads zijn geselecteerd met een Phred score van tenminste 20 voor tenminste 80% van de nucleotide posities. Tenslotte zijn de COI en cytB primers verwijderd met Cutadapt v1.5 (Martin, 2011) en zijn reads verwijderd die korter zijn dan 300 nt.

Voor de MiSeq data zijn dezelfde kwaliteitsfiltering stappen gebruikt, alleen zijn reads geselecteerd met een Phred score van tenminste 20 voor 95% van de nucleotide posities en zijn reads verwijderd die korter zijn dan 200 nt.

De reads zijn vervolgens geclusterd in USEARCH v7.0.1090 (Edgar, 2010; Edgar, 2013), waarbij een minimale clustergrootte van 4 is gehanteerd. De Ion Torrent data is geclusterd op basis van 97% minimum identiteit, terwijl voor de MiSeq data een minimum identiteit van 98% is gebruikt. Chimerische reads zijn verwijderd door de representatieve reads te filteren tegen een referentie database bestaande uit 122.211 Actinoptergii (Straalvinnigen) COI en cytB GenBank sequenties met een minimale lengte van 600 nt.

De overgebleven representatieve reads (OTUs) zijn vervolgens geBLAST (standalone blast v2.2.29+; Altschul *et al.*, 1997) tegen de GenBank nucleotide database. OTUs werden geclassificeerd op basis van de database sequentie met de hoogste bit-score, en met tenminste 98% sequentie identiteit voor tenminste 90% van de OTU. Daarnaast zijn OTUs gefilterd op basis het percentage reads dat door USEARCH is toegewezen aan elke representatieve sequentie. Deze OTU detectie drempel is experimenteel bepaald op basis van de 'Test monsters' en is voor Ion Torrent vastgesteld op 0.1% en voor Illumina MiSeq op 0.5%.

Tabel 2.2  
PCR primers

Code	Primer sequence (5'-3')	Reference
<b>Primer cocktail COI-3 (Sanger sequencing)</b>		
VF2_t1	TGTA AACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAGACATTGGCAC	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
FishF2_t1	TGTA AACGACGGCCAGTCAACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
FishR2_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
FR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACACTTCAGGGTGTCGGAARAAYCARAA	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
<b>Primer cocktail COI-3 (NGS)</b>		
FishF1	TCAACCAACCACAAGACATTGGCAC	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishF2	TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC	Ward <i>et al.</i> (2005)
FishR2	ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	Ward <i>et al.</i> (2005)
FR1d_NGS	ACCTCAGGGTGTCGGAARAAYCARAA	Ivanova <i>et al.</i> (2007)
<b>cytB primers (Sanger sequencing / NGS)</b>		
FishcytB-F	ACCACCGTTGTTATTCAACTACAAGAAC	Sevilla (2007)
CytB1-5R	GGTCTTTGTAGGAGAAGTATGGGTGGAA	Sevilla (2007)
<b>M13 primers (Sanger sequencing)</b>		
M13F(-21)	TGTA AACGACGGCCAGT	Messing (1983)
M13R(-27)	CAGGAAACAGCTATGAC	Messing (1983)

## 2.3 Identificatie van vissoorten in de 'Test monsters'

Van de 9 mengmonsters ('Test monsters') die zijn gemaakt voor het opzetten van de DNA metabarcoding methode, zijn COI en cytB barcodes geamplificeerd en gesequenced met Ion Torrent en Illumina MiSeq NGS. Van monsters 4 is een onafhankelijke DNA isolatie en PCR gedaan en verder verwerkt als een onafhankelijk (monster 10). Vervolgens is er een vergelijk gemaakt tussen beide NGS methoden, om te bepalen welke methode het meest geschikt is voor het identificeren van vissoorten in complexe monsters.

### 2.3.1 Ion Torrent NGS

Voor de 'Test monsters' zijn tussen de 151,896 en 387,846 ruwe reads gegenereerd met Ion Torrent NGS waarvan tussen de 49.040 en 120.496 reads zijn geselecteerd na kwaliteitsfiltering. De lengte van de reads waren tussen de 300 en 535 nt groot. Alle vissoorten in alle mengmonsters konden worden geïdentificeerd op basis van de beschreven bioinformatica procedure (Tabel 2.1). In de monsters 1 en 2 is *Columba palumbus* (houtduif) geïdentificeerd met respectievelijk 0.049% en 0.065% van de reads. Houtduif was niet opzettelijk toegevoegd aan deze monsters (Tabel 2.1) en er is vastgesteld dat de contaminatie van deze monsters zeer waarschijnlijk heeft plaatsgevonden tijdens de DNA isolatie procedure. In monsters 9 is een contaminatie met *P. platessa* (0.49% van de reads)

---

vastgesteld. Deze contaminatie heeft vermoedelijk plaatsgevonden tijdens de monstervoorbereidingen of gedurende de DNA isolatie, maar het ook niet worden uitgesloten dat monster 9 is besmet tijdens PCR of een van de andere moleculaire stappen. Op basis van de resultaten is een OTU detectie drempel van 0.1% vastgesteld, waardoor alle soorten in alle monsters konden worden geïdentificeerd, terwijl het aantal fout-positieven werd beperkt tot de identificatie van *P. platessa* in monster 9.

### 2.3.2 Illumina MiSeq NGS

De Illumina MiSeq NGS analyse van de 'Test monsters' is uitgevoerd met een flow cell (sequencing plaat) capaciteit van 25%. Er zijn afzonderlijke bioinformatica analyses uitgevoerd voor de Illumina MiSeq NGS data in de 5'-3' ('Forward') en de 3'-5' ('Reverse') leesrichting. Voor de 'Forward' data zijn tussen de 636,896 en 233,958 ruwe reads gegenereerd waarvan ten minste 79% is geselecteerd na kwaliteitsfiltering. De reads waren tussen de 200 en 301 nt groot. Alle vissoorten in alle mengmonsters konden worden geïdentificeerd op basis van de COI en/of de *cytB* DNA barcode (Tabel 2.1). Een groot aantal vissoorten konden worden geïdentificeerd die niet opzettelijk waren toegevoegd aan de monsters. In monster 2, bijvoorbeeld, zijn 16 fout-positieven geïdentificeerd, waaronder *Buglossidium luteum*, *Solea solea*, *Liparis fabricii*, maar ook *Homo sapiens* en de bekende contaminant *C. palumbus* (houtduif). Contaminaties kunnen hebben plaatsgevonden tijdens het maken van de Illumina MiSeq DNA bank of gedurende het sequencen. Er is vastgesteld dat een groot deel van de gedetecteerde fout-positieven in een eerdere NGS run en voor een ander project zijn gesequenced, waaronder *Marenzelleria viridis* (Polychaeta: borstelworm) in monster 9. Op basis van de resultaten is een OTU detectie drempel van 0.5% vastgesteld, waardoor alle soorten in alle monsters konden worden geïdentificeerd, terwijl het aantal fout-positieven werd beperkt tot de identificatie van *Marenzelleria viridis* in monster 9 met 2.7% van de reads.

De 'Reverse' reads waren van significant lagere kwaliteit dan de 'Forward' reads, vooral aan het einde van de reads. De Phred kwaliteitsscore was gemiddeld lager dan 20 vanaf nucleotidepositie 250 en verder. Dit resulteerde in een relatief laag percentage bruikbare reads, en tenminste 65% van de reads werden verwijderd tijdens de kwaliteitsfiltering. Desondanks konden alle vissoorten in alle monsters worden geïdentificeerd (Tabel 2.1). Door een OTU detectie drempel van 0.5% toe te passen, kon het aantal fout-positieven worden beperkt tot de identificatie van *Marenzelleria viridis* (5.4% van de reads) en *Zoarces viviparus* (0.9% van de reads) in monster 9.

### 2.3.3 Vergelijking van DNA metabarcoding methoden

In Tabel 2.3 is een vergelijking gemaakt tussen de Ion Torrent en Illumina MiSeq methoden op basis van NGS data gegenereerd voor de 'Test monsters'. Het belangrijkste voordeel van de Ion Torrent methode is dat reads met een lengte van maximaal 500 nt kunnen worden gegenereerd, terwijl de reads van de Illumina MiSeq methode maximaal 300 nt lang zijn. De langere reads van de Ion Torrent methode hebben als voordeel dat, in theorie, soorten beter geïdentificeerd kunnen worden. Onze resultaten tonen aan dat het mogelijk is om vissoorten betrouwbaar te kunnen identificatie op basis van de data van beide NGS methoden. De gemiddeld langere reads van het Ion Torrent platform zijn daarom niet beslissend in de keuze voor een geschikte NGS methode voor DNA metabarcoding van vissoorten.

Een belangrijk nadeel van de Ion Torrent methode is dat de PCR amplicons eerste enzymatisch moeten worden gefragmenteerd tot fragment lengtes van ~480 nt, en dat sequencing adapters moeten worden geligeerd voordat de COI en *cytB* fragmenten kunnen worden gesequenced. Het nadeel hiervan is dat de reads niet efficiënt kunnen worden geclusterd in OTUs omdat de fragmentatie random is, waardoor er relatief veel OTUs worden gegenereerd voor niet-overlappende sequenties. Een extra nadeel is dat deze extra handelingen ten opzichte van illumina MiSeq NGS relatief tijdrovend en kostbaar zijn. De kosten per monster zullen hierdoor relatief hoog blijven, terwijl de kosten voor Illumina MiSeq NGS zullen afnemen met toenemende monstervolumes.

Tabel 2.3

Vergelijking van de Illumina MiSeq and Ion Torrent methoden op basis van de NGS data gegenereerd voor de 'Test monsters'.

NGS methode	Methode voor het maken van DNA bank	Read lengte	Totaal aantal reads gegenereerd	OTU detectie drempel	Geschatte kosten / Mb
Ion Torrent PGM (316 chip)	Enzymatic shearing and adapter ligation	400 (max. 500)	2.3 miljoen reads (50% bruikbaar)	0.1%	€4.7
Illumina MiSeq	Two-step PCR	300	9.2 miljoen reads (87% bruikbaar)*	0.5%	€1.4

\* Alleen 'Forward' reads.

De gevoeligheid van beide DNA metabarcoding methoden was hoog genoeg om vissoorten met een vers gewicht van 1% te kunnen identificeren. Beide methoden genereerden hiervoor meer dan genoeg data (Tabel 2.3).

Contaminatie van monsters tijdens de verschillende monsterverwerkingsstappen is een potentieel nadeel van DNA metabarcoding. Aanvullende preventieve maatregelen moeten worden genomen vooral tijdens de DNA isolatie, PCR en NGS om het aantal fout-positieven uitslagen te voorkomen. Vooral de Illumina MiSeq methode was gevoelig voor contaminaties, die door de grote aantallen reads per monster gemakkelijk konden worden gedetecteerd. Een OTU detectie drempel van 0.5% is afdoende om het aantal fout-positieven te reduceren, schijnbaar zonder de gevoeligheid van de methode nadelig te beïnvloeden. Concluderend kunnen we stellen dat beide NGS methoden geschikt zijn voor DNA metabarcoding van vissoorten. De Illumina MiSeq methode is echter in potentie een meer kostenefficiënte methode waarmee veel monsters met een beperkte verwerkingstijd tegelijkertijd kunnen worden geanalyseerd. De 'Pre-validatie monsters' zijn daarom geanalyseerd op basis van Illumina MiSeq technologie.

## 2.4 Pre-validatie van de DNA metabarcoding methode

Om de reproduceerbaarheid van de DNA metabarcoding methode vast te stellen zijn 9 nieuwe 'Pre-validatie monsters' gemaakt. De samenstelling van de 'Pre-validatie monsters' is beschreven in Tabel 2.4. Monster 9 is in duplo geanalyseerd. Van de 10 monsters zijn onafhankelijke DNA isolaties en PCR amplificaties (COI en cytb barcodes) gedaan door twee laboratoria. Vervolgens zijn de COI en cytb barcodes van elk laboratorium afzonderlijk gesequenced met Illumina Miseq technologie (PE300 en met 10% flow cell capaciteit) en geanalyseerd zoals beschreven in paragraaf 2.2. Voor beide NGS analyses is gebruik gemaakt van dezelfde Illumina MiSeq machine.

### 2.4.1 Resultaten laboratorium 1

Voor de 'Pre-validatie monsters' zijn door laboratorium 1 tussen de 240,744 en 596,773 ruwe 'Forward' en 'Reverse' reads gegenereerd. Hiervan zijn ten minste 73% van de 'Forward' reads en 37% van de 'Reverse' reads geselecteerd na kwaliteitsfiltering. De reads waren tussen de 200 en 301 nt groot. Er zijn afzonderlijke bioinformatica analyses uitgevoerd voor beide datasets. De vissoorten die zijn gedetecteerd op basis van de 'Forwards' en/of de 'Reverse' data zijn samengevat in Tabel 2.4. Alle vissoorten in alle mengmonsters konden worden geïdentificeerd op basis van de COI en/of cytb DNA barcode. Echter, vijf soorten in vier mengmonsters en het duplomonster mix 10 vallen echter onder de detectiewaarde van 0.5% die wordt gehanteerd om vals-positieve uitslagen te voorkomen. De soorten *Glyptocephalus cynoglossus* in mix 3, *Lepidopsetta polyxystra* en *Psetta maxima* in mix 4, *Psetta maxima* in mix 5, en *Limanda aspera* in mix 9 en duplo-monster 10 moeten die reden worden gekwalificeerd als 'niet aangetoond'. Er waren geen fout-positieve resultaten, m.a.w. alle aangetoonde vissoorten bevonden zich daadwerkelijk in de geteste mengsels.

---

## 2.4.2 Resultaten laboratorium 2

Voor de 'Pre-validatie monsters' zijn door laboratorium 2 tussen de 157,638 en 272,598 ruwe 'Forward' en 'Reverse' reads gegenereerd. De kwaliteit van de Illumina MiSeq data was lager dan verwacht waardoor tussen de 11% en 60% van 'Forward' reads, en slechts tussen de 0.6% en 3.6% van de 'Reverse' reads bruikbaar zijn na kwaliteitsfiltering. De reads waren tussen de 200 en 301 nt groot. Op basis van de bruikbare sequentie informatie konden, op een na, alle soorten in alle mengmonsters worden aangetoond (Tabel 2.4). De vissoort *Psetta maxima* in monster 4 kon niet worden gedetecteerd. Echter, 8 soorten in 5 mengmonsters en het duplomonster mix 10 vielen onder de detectiewaarde van 0.5% en zijn daarom gekwalificeerd als 'niet aangetoond'. Vijf soorten (in drie mengmonsters) werden gedetecteerd terwijl deze geen onderdeel waren van de mengmonsters (fout positieven), vermoedelijk door contaminaties die zijn opgetreden gedurende het verwerken van de mengmonsters in één van de labs waar de analyses zijn uitgevoerd. Het betreft de soorten *Lepidopsetta polyxystra* in mix 1, *Homo sapiens* in mix 2, en de soorten *Lepidopsetta polyxystra*, *Pleuronectes platessa* en *Lophius piscatorius* in mix 8.

## 2.4.3 Reproduceerbaarheid van de DNA metabarcoding methode

De MiSeq multi-barcoding methode zal in een breder consortium getest moeten worden voordat een DNA metabarcoding protocol voor de definitieve validatie kan worden vastgesteld. Op basis van het pre-validatie experiment met twee laboratoria is de methode niet volledig reproduceerbaar gebleken. Afhankelijk van het laboratorium dat de analyse heeft uitgevoerd konden 5 en 8 vissoorten in de complexe mengmonsters niet worden aangetoond, waarbij het aantal fout-negatieve uitslagen tussen beide laboratoria verschilt (Tabel 2.4). Zo kon bijvoorbeeld *Limanda aspera* in mix 1 wel worden aangetoond door laboratorium 1, maar niet door laboratorium 2 (Tabel 2.4). Het verschil in fout-negatieve uitslagen kan mogelijk worden verklaard door het verschil in NGS data kwaliteit tussen de datasets van beide laboratoria. Op basis van de huidige resultaten lijkt er geen correlatie te zijn met de gewichtspercentages van de niet gedetecteerde vissoorten, de complexiteit van de monstersamenstelling, als ook niet met vissoort (Tabel 2.4). Mogelijk kan een verschil in relatieve amplificatie-efficiëntie tussen PCR experimenten een rol spelen. Echter, het PCR protocol probeert een eventuele amplificatie-bias zoveel mogelijk te voorkomen door de PCR producten van meerdere (3 – 6) onafhankelijk PCR reacties te mengen (zie paragraaf 2.2). Belangrijk is het verschil in het aantal gedetecteerde fout-positieve uitslagen tussen beide laboratoria, waarbij door laboratorium 2 vissoorten zijn gedetecteerd die geen onderdeel waren van de mengmonsters. Fout-positieve uitslagen kunnen worden voorkomen door preventieve maatregelen te nemen gedurende het verwerken van de monsters tijdens de DNA isolatie, PCR en NGS. Mogelijk is extra training of het gebruik van speciale instrumentaria zoals een PCR UV-kast nodig om fout-positieve uitslagen te voorkomen.

Tabel 2.4

Samenstelling en gewichtspercentages van de 'Pre-validatie monsters' en de resultaten van de soortenidentificatie op basis van Illumina MiSeq NGS.

Monster naam	Soort	Gewichtspercentage (%)	Soortenidentificatie op basis van COI en cytB met een OTU detectie drempel van 0.5%	
			Instituut 1	Instituut 2
Mix 1	<i>Pleuronectes platessa</i>	98	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda aspera</i>	2	COI	Niet aangetoond
Mix 2	<i>Pleuronectes platessa</i>	89,5	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	10,5	COI/cytB	COI/cytB
Mix 3	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	75,5	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Gadus morhua</i>	5,3	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lophius piscatorius</i>	4,7	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Raja brachyura</i>	4,9	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	4,6	COI	COI
	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	5,1	Niet aangetoond	Niet aangetoond
Mix 4	<i>Pleuronectes platessa</i>	89,2	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	2,3	Niet aangetoond	COI
	<i>Limanda aspera</i>	2,0	COI	Niet aangetoond
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	2,6	cytB	Niet aangetoond
	<i>Psetta maxima</i>	2,1	Niet aangetoond	Niet aangetoond
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	1,9	COI	COI
Mix 5	<i>Pleuronectes platessa</i>	13,8	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	9,8	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda aspera</i>	9,3	COI	COI
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	9,5	cytB	Niet aangetoond
	<i>Psetta maxima</i>	9,9	Niet aangetoond	Niet aangetoond
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	9,4	COI	COI
	<i>Gadus morhua</i>	9,0	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lophius piscatorius</i>	10,3	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Raja brachyura</i>	10,0	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	9,1	COI/cytB	COI
Mix 6	<i>Pleuronectes platessa</i>	47,8	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Solea solea</i>	18,0	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lophius piscatorius</i>	5,5	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	11,8	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Gadus morhua</i>	9,4	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda aspera</i>	7,7	COI	COI
Mix 7	<i>Pleuronectes platessa</i>	97,0	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	1,3	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	1,7	COI	COI
Mix 8	<i>Platichthys flesus</i>	24,2	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Glyptocephalus cynoglossus</i>	26,4	COI/cytB	COI
	<i>Hippoglossus hippoglossus</i>	12,5	COI/cytB	COI
	<i>Hippoglossoides platessoides</i>	24,3	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Limanda limanda</i>	12,7	COI/cytB	COI
Mix 9 / Mix 10	<i>Pleuronectes platessa</i>	96,1	COI/cytB	COI/cytB
	<i>Lepidopsetta polyxystra</i>	2,1	COI/cytB	COI
	<i>Limanda aspera</i>	1,8	Niet aangetoond	Niet aangetoond

---

# 3 Bepaling van de geografische herkomst van schol en productiemethode van tarbot met behulp van isotoopratio's en chemische fingerprint

Schol (*Pleuronectes platessa*) leeft op de bodem van de zee, niet ver uit de kust, voornamelijk in de Noordzee, maar ook verder in de Witte zee, Barentszee en de zee rond Ierland en IJsland. Voor vis die in zee gevangen is, dient sinds december 2014 het gebied (FAO-zone en sub-zone of divisie) waar deze gevangen wordt op de verpakking vermeld te worden. Om dit te kunnen controleren, zijn analytische methoden nodig welke onderscheid kunnen maken tussen verschillende leefgebieden van de schol. In dit onderzoek wordt een aantal technieken geëvalueerd dat dit onderscheid mogelijk zou kunnen maken, namelijk isotoop ratio massa spectrometrie (IRMS), proton transfer reactie massa spectrometrie (PTR-MS) en gas chromatografie met vlamionisatie detector (GC-FID).

De isotoopratio van vis wordt bepaald door het voer dat de vis gegeten heeft en het water waarin deze geleefd heeft. Aangezien vissen in verschillende leefgebieden ook ander voer eten, kan hiermee mogelijk het onderscheid gemaakt worden. Met behulp van PTR-MS wordt het vluchtige stoffen profiel gemeten. Deze techniek wordt vaak gebruikt in onderzoek naar de geografische herkomst van producten, zoals boter (Maçatelli *et al.*, 2009) en olijfolie (Araghipour *et al.*, 2008). Met behulp van de GC-FID wordt het vetzuurprofiel van de vis bepaald. Het vetzuurprofiel wordt, net als de isotoopratio, bepaald door het voer dat de vis gegeten heeft. Daarmee is ook dit een techniek die mogelijk onderscheid kan maken in de geografische herkomst van vis.

Een aantal van deze technieken is eerder gebruikt om onderscheid te kunnen maken tussen gekweekte en wild gevangen vis (Capuano *et al.*, 2013). Daarom zijn ook een aantal tarbotten (*Psetta maxima*) onderzocht met bovenstaande technieken om te kijken of deze in staat zijn de productiemethode van tarbot aan te tonen.

In dit hoofdstuk worden een aantal analytische technieken geëvalueerd om te onderzoeken of deze in staat zijn om de geografische herkomst van schol te bepalen en of deze wild gevangen en gekweekte vis van elkaar kunnen onderscheiden.

## 3.1 Materialen en methoden

### 3.1.1 Vismonsters

In 2014 zijn 24 schollen uit de Noordzee (n=6), Oostzee (n=3), Barentszee (n=5), de zee rond Ierland (n=5) en de zee rond IJsland (n=5) verzameld. Daarnaast zijn er in 2014 tarbotten verzameld, waarvan er vijf in Nederland zijn gekweekt en vijf zijn in de Noordzee gevangen. Alle monsters zijn gefileerd en bewaard bij -18°C tot zij geanalyseerd konden worden.

### 3.1.2 PTR-MS

Met behulp van PTR-MS werd het profiel van vluchtige stoffen geanalyseerd. Hiervoor werd ongeveer 1 gram visfilet ontdooid en daarna gedurende 30 minuten bij 25°C gehouden. Monsters zijn vervolgens in duplo geanalyseerd met PTR-MS (Ionicon GmbH), zoals beschreven door Lindinger *et al.*, 1993. Van elk monster werden 5 volledige massa spectra opgenomen. De headspace concentraties die gemeten werden tijdens de tweede, derde en vierde cyclus werden berekend volgens Hansel *et al.* (1995). Vervolgens werd het gemiddelde berekend van deze drie cycli.

---

### 3.1.3 GC-FID

Met behulp van GC-FID werd het profiel van vetzuren geanalyseerd. Hiervoor dient het vet uit de vis geëxtraheerd te worden, de vetzuren werden gemethyleerd en vervolgens geanalyseerd. Hiervoor werd eerst de vis gevriesdroogd en bewaard bij  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Het vet werd geëxtraheerd door ongeveer 2 gram gevriesdroogd materiaal te mengen met  $\text{NaSO}_4$ . Vervolgens werd een mengsel van chloroform en methanol (2:1) toegevoegd. Dit werd geroerd en gefilterd. Hiervan werd 5 mL in een buisje gepipetteerd en oplosmiddelen werden onder stikstof afgedampt.

Methylering werd uitgevoerd in een Gerstel MPS injector. Nadat de oplossing is afgekoeld werd in duplo 1  $\mu\text{L}$  geïnjecteerd in een Agilent 7890A GC systeem met een CP7419 50m x 0.25 mm FAME kolom (Agilent).

### 3.1.4 IRMS

IRMS werd gebruikt om de ratio's van stabiele isotopen (waterstof, koolstof, stikstof en zwavel) te bepalen in de vetvrije fractie. De vetvrije fractie werd drie maal gespoeld met water om de natriumsulfaat te verwijderen en vervolgens nogmaals gevriesdroogd.

Voor de analyse van koolstof en stikstof isotoopratio's ( $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ) werden monsters geanalyseerd op een elemental analyser, gekoppeld aan een isotoop ratio massa spectrometer (Delta V Advantage, Thermo Scientific).

Voor de analyse van  $\delta^2\text{H}$  werden monsters geanalyseerd op een duale ingang isotoop ratio massa spectrometer (Europa Geo 20-20).

Voor de analyse van  $\delta^{34}\text{S}$  werden monsters geanalyseerd op elemental analyser (Eurovector) gekoppeld aan een isotoop ratio massa spectrometer (Isoprime).

De waarden van de isotoopratio's zijn uitgedrukt als  $\delta$  (‰) ten opzichte van internationale standaarden (V-SMOW voor  $\delta^2\text{H}$ , V-PDB voor  $\delta^{13}\text{C}$ , lucht voor  $\delta^{15}\text{N}$  en V-CDT voor  $\delta^{34}\text{S}$ ) met behulp van de volgende formule:  $\delta$  (‰) =  $1000 \times (R_{\text{monster}} - R_{\text{standaard}}) / R_{\text{standaard}}$ , waar R staat voor de ratio tussen de hoogste massa en de laagste massa van de isotopen.

### 3.1.5 Multivariate data-analyse

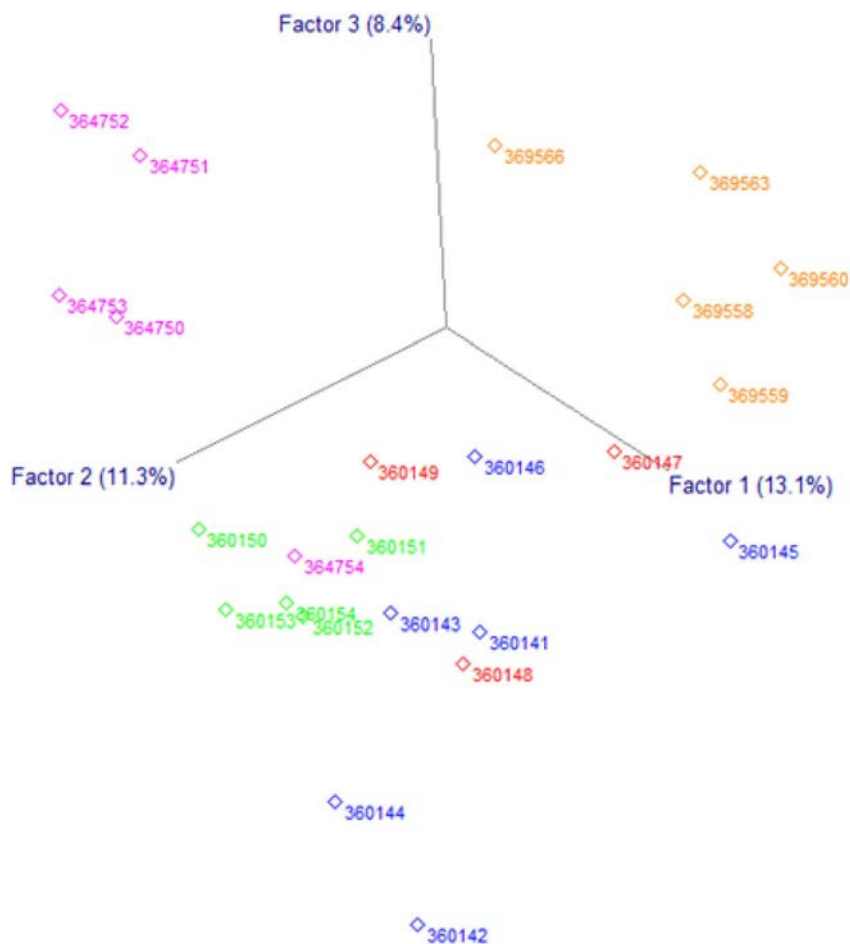
Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de schollen naar classificeert geografische herkomst dan wel tarbotten naar productiemethode op basis van de resultaten van bovenstaande analytische methoden. Dit is uitgevoerd in het chemometrische software programma Pirouette.

## 3.2 Resultaten geografische herkomst schol

### 3.2.1 PTR-MS resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol

De ruwe PTR-MS resultaten bestaan uit een massa spectrum van  $m/z$  20 tot en met  $m/z$  200, met op de y-as de intensiteit van de betreffende component. De hoogste intensiteit werd gevonden voor  $m/z$  33, 45 en 59. De intensiteit van specifieke pieken in het spectrum van de schollen uit de Noordzee die in 2015 geanalyseerd zijn, wijken iets af van de schollen die geanalyseerd zijn in 2013. Dit geldt met name voor de lage massa's. Het hele profiel blijft echter vergelijkbaar. Met behulp van Principale Component Analyse (PCA) werden groepen zichtbaar van schollen van verschillende geografische herkomst (Figuur 3.1).





**Figuur 3.1** PCA score plot van de PTR-MS data. Blauw is Noordzee, rood is Oostzee, groen is Barentszee, roze is de zee rond Ierland en oranje is de zee rond IJsland.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de schollen classificeert naar geografische herkomst op basis van deze data. De resultaten voor de schollen uit de Oostzee zijn hierbij niet meegenomen, omdat hier te weinig monster van geanalyseerd zijn. Met behulp van een intern gevalideerd Partial Least Squares – Discriminant Analysis (PLS-DA) model kon 73% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden (Tabel 3.1).

**Tabel 3.1**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6), Barentszee (n = 5), de zee rond Ierland (n = 5) en de zee rond IJsland (n = 5) op basis van het vluchtige stoffen profiel na log transformatie.*

	Noordzee	Barentszee	Ierland	IJsland	Totaal
Correcte classificatie	50%	80%	80%	80%	73%

Als men alleen geïnteresseerd is in het vaststellen of schol uit de Noordzee komt of niet en dus niet uit welke andere zee deze afkomstig is, kan 90% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden op basis van het vluchtige stoffen profiel (Tabel 3.2).

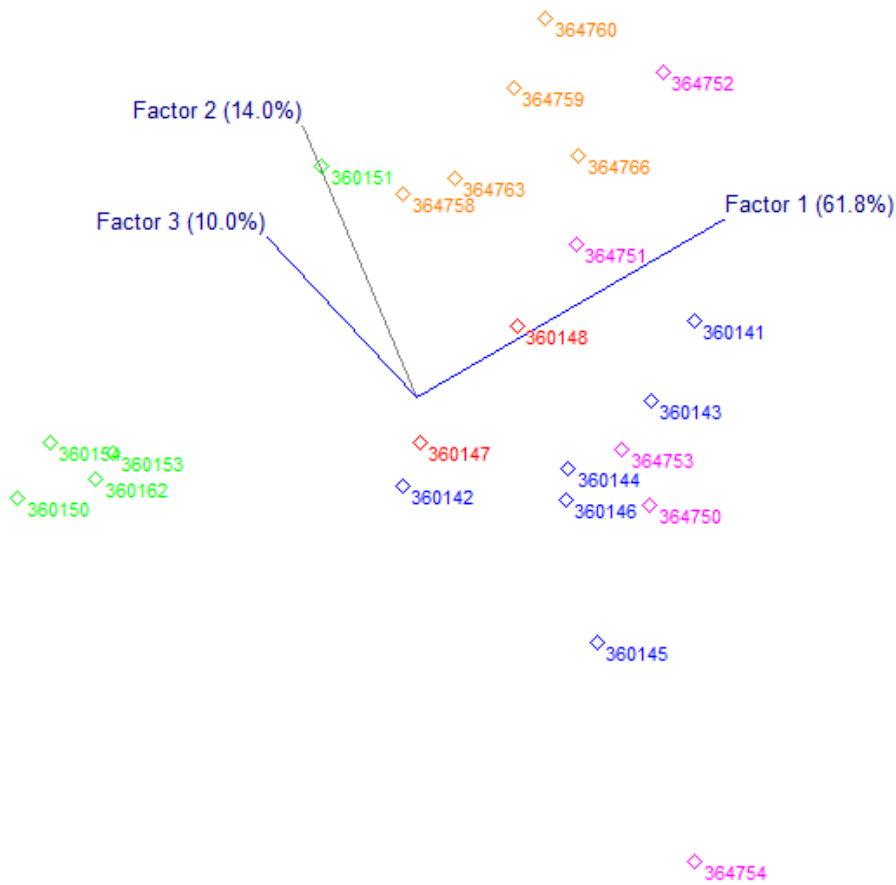
Tabel 3.2

Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee ( $n = 6$ ) versus de overige zeeën ( $n = 15$ ) op basis van het vluchtige stoffen profiel na log transformatie.

	Noordzee	Overige zeeën	Totaal
Correcte classificatie	67%	100%	90%

### 3.2.2 GC-FID resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol

De relatieve concentratie van 67 bekende en onbekende vetzuren is bepaald met behulp van een GC-FID. De meest voorkomende vetzuren in de onderzochte schollen zijn C16:0, C18:1n9, C20:5n3 en C22:6n3. De gevonden profielen komen overeen met de profielen die gevonden zijn in de scholmonsters die in 2013 zijn onderzocht. Met behulp van PCA konden groepen worden onderscheiden van schollen van verschillende geografische herkomst (Figuur 3.2).



**Figuur 3.2** PCA score plot van de GC-FID data. Blauw is Noordzee, rood is Oostzee, groen is Barentszee, roze is de zee rond Ierland en oranje is de zee rond IJsland.

Ook voor de GC data kan met multivariate data-analyse een model gemaakt worden dat de schollen classificeert naar geografische herkomst. Ook hierbij zijn de resultaten voor de schollen uit de Oostzee hierbij niet meegenomen, omdat hier te weinig monster van geanalyseerd zijn. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 86% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden (Tabel 3.3).

Tabel 3.3

Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6), Barentszee (n = 5), de zee rond Ierland (n = 5) en de zee rond IJsland (n = 5) op basis van het vetzuurprofiel.

	Noordzee	Barentszee	Ierland	IJsland	Totaal
Correcte classificatie	83%	100%	60%	100%	86%

Als men alleen geïnteresseerd is in het vaststellen of schol uit de Noordzee komt of niet en dus niet uit welke andere zee deze afkomstig is, kan 86% van de onderzochte schollen correct geïdentificeerd worden op basis van het vetzuurprofiel (Tabel 3.4).

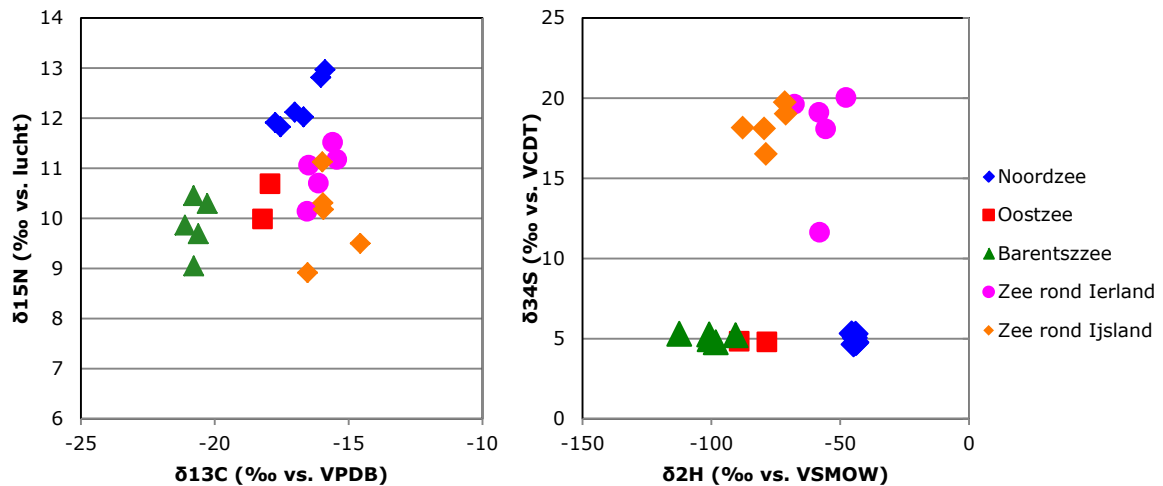
Tabel 3.4

Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6) versus de overige zeeën (n = 15) op basis van het vetzuurprofiel.

	Noordzee	Overige zeeën	Totaal
Correcte classificatie	83%	93%	90%

### 3.2.3 IRMS resultaten voor het bepalen van de geografische herkomst van schol

In Figuur 3.3 zijn de resultaten van de IRMS analyse weergegeven. Koolstof en stikstof (A) en waterstof en zwavel (B) isotoopratio zijn tegen elkaar uitgezet. De  $\delta^{13}\text{C}$  ratio gemeten in schollen uit de Noordzee die in 2015 gemeten zijn, is vergelijkbaar met de ratio in de schollen die in 2013 geanalyseerd zijn. De  $\delta^{15}\text{N}$  ratio gemeten in schollen uit de Noordzee in 2015 geanalyseerd zijn, is ongeveer 2,6‰ lager dan de schollen die in 2013 geanalyseerd zijn. In Figuur 3,3 is duidelijk te zien dat schollen uit de Noordzee, de Oostzee en de Barentszee groeperen. Schollen uit de zee rond Ierland en IJsland zijn minder goed van elkaar te onderscheiden.



**Figuur 3.3** Scatterplot van de IRMS data:  $\delta^{13}\text{C}$  versus  $\delta^{15}\text{N}$  (A) en  $\delta^2\text{H}$  versus  $\delta^{34}\text{S}$  (B). Blauw is Noordzee, rood is Oostzee, groen is Barentszee, roze is de zee rond Ierland en oranje is de zee rond IJsland.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de schollen classificeert naar geografische herkomst. De resultaten voor de schollen uit de Oostzee zijn hierbij niet meegenomen, omdat hier te weinig monster van geanalyseerd zijn. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 71% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden (Tabel 3.5).

**Tabel 3.5**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6), Barentszee (n = 5), de zee rond Ierland (n = 5) en de zee rond IJsland (n = 5) op basis van analyses met IRMS.*

	Noordzee	Barentszee	Ierland	IJsland	Totaal
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ en $\delta^{15}\text{N}$	100%	100%	0%	80%	71%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^1\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	20%	20%	62%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ , $\delta^1\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	0%	80%	71%

Als men alleen geïnteresseerd is in het vaststellen of schol uit de Noordzee komt of niet en dus niet uit welke andere zee deze afkomstig is, kunnen alle onderzochte schollen correct geclassificeerd worden (Tabel 3.6).

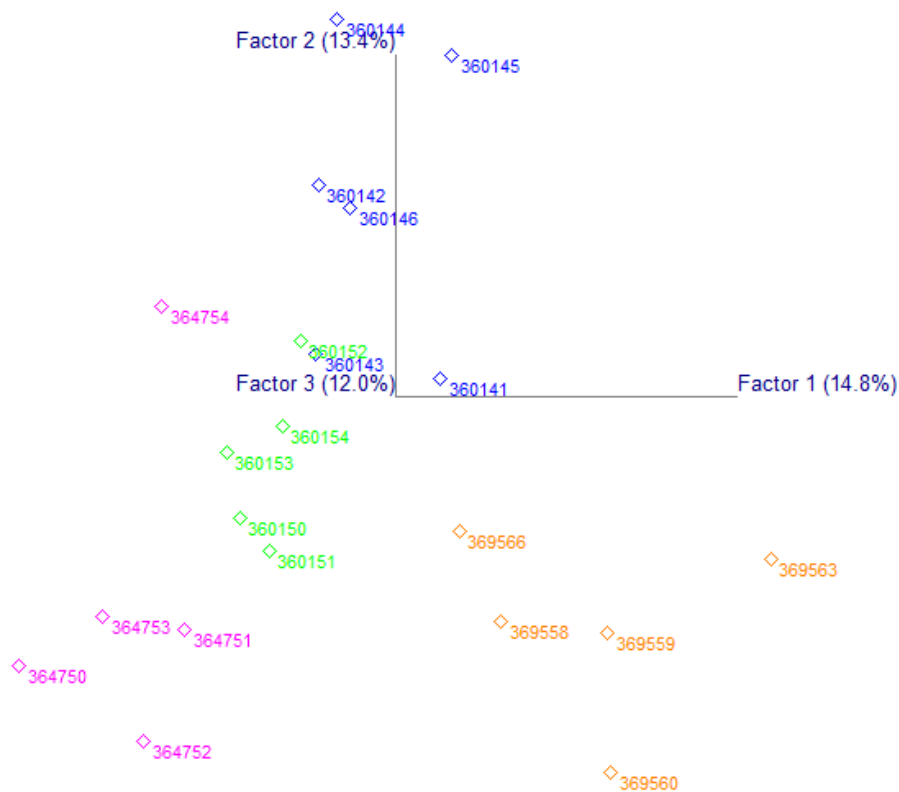
**Tabel 3.6**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6) versus de overige zeeën (n = 15) op basis van analyses met IRMS  $\delta^{13}\text{C}$ ,  $\delta^{15}\text{N}$ ,  $\delta^1\text{H}$  en  $\delta^{34}\text{S}$ .*

	Noordzee	Overige zeeën	Totaal
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ en $\delta^{15}\text{N}$	100%	93%	95%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^1\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	100%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ , $\delta^1\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	100%

### 3.2.4 Alle resultaten gecombineerd voor het bepalen van de geografische herkomst van schol

Wanneer alle resultaten van de geëvalueerde methoden gecombineerd worden, kan onderstaande PCA geplotted worden (Figuur 3.4). Hierin is te zien dat de schollen afkomstig uit verschillende geografische gebieden duidelijk groeperen.



**Figuur 3.4** PCA score plot van alle data gecombineerd. Blauw is Noordzee, rood is Oostzee, groen is Barentszee, roze is de zee rond Ierland en oranje is de zee rond IJsland.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de schollen classificeert naar geografische herkomst. De resultaten voor de schollen uit de Oostzee zijn hierbij niet meegenomen, omdat hier te weinig monster van geanalyseerd zijn. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 86% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden (Tabel 3.7).

**Tabel 3.7**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6), Barentszee (n = 5), de zee rond Ierland (n = 5) en de zee rond IJsland (n = 5) op basis van alle data na log transformatie.*

	Noordzee	Barentszee	Ierland	IJsland	Totaal
Correcte classificatie	83%	100%	80%	80%	86%

Als men alleen geïnteresseerd is in het vaststellen of schol uit de Noordzee komt of niet en dus niet uit welke andere zee deze afkomstig is, kan 90% van de onderzochte schollen correct geclassificeerd worden op basis van alle resultaten (Tabel 3.8).

**Tabel 3.8**

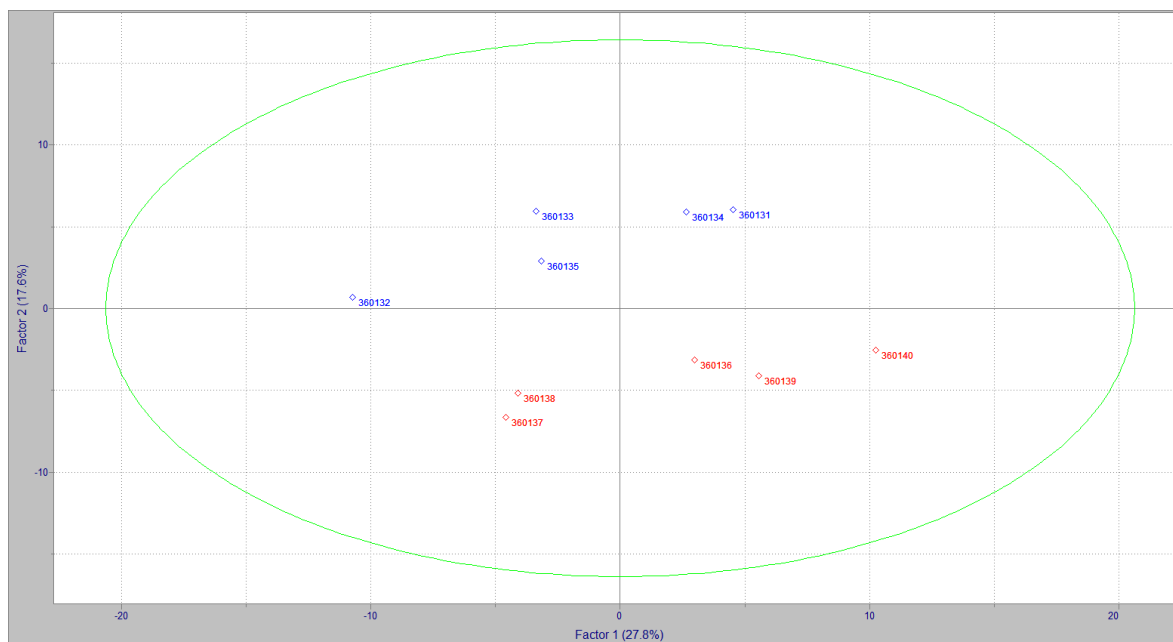
*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de geografische herkomst van schol uit de Noordzee (n = 6) versus de overige zeeën (n = 15) op basis van alle data na log transformatie.*

	Noordzee	Overige zeeën	Totaal
Correcte classificatie	83%	93%	90%

### 3.3 Resultaten productiewijze tarbot

#### 3.3.1 PTR-MS resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot

Wild gevangen en gekweekte tarbot zijn ook geanalyseerd met PTR-MS. Ook hier is een massa spectrum van  $m/z$  20 tot en met  $m/z$  200 verkregen. Voor de geanalyseerde tarbotten zijn de meest intense massa's  $m/z$  39, 41, 45 en 59. Met behulp van PCA werden de twee groepen duidelijk zichtbaar (Figuur 3.5).



**Figuur 3.5** PCA score plot van de PTR-MS data. Blauw: gekweekte tarbot, rood: wild gevangen tarbot.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de tarbotten classificeert naar productie methode op basis van het vluchtige stoffen profiel. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 80% van de onderzochte tarbotten correct geclassificeerd worden (Tabel 3.9).

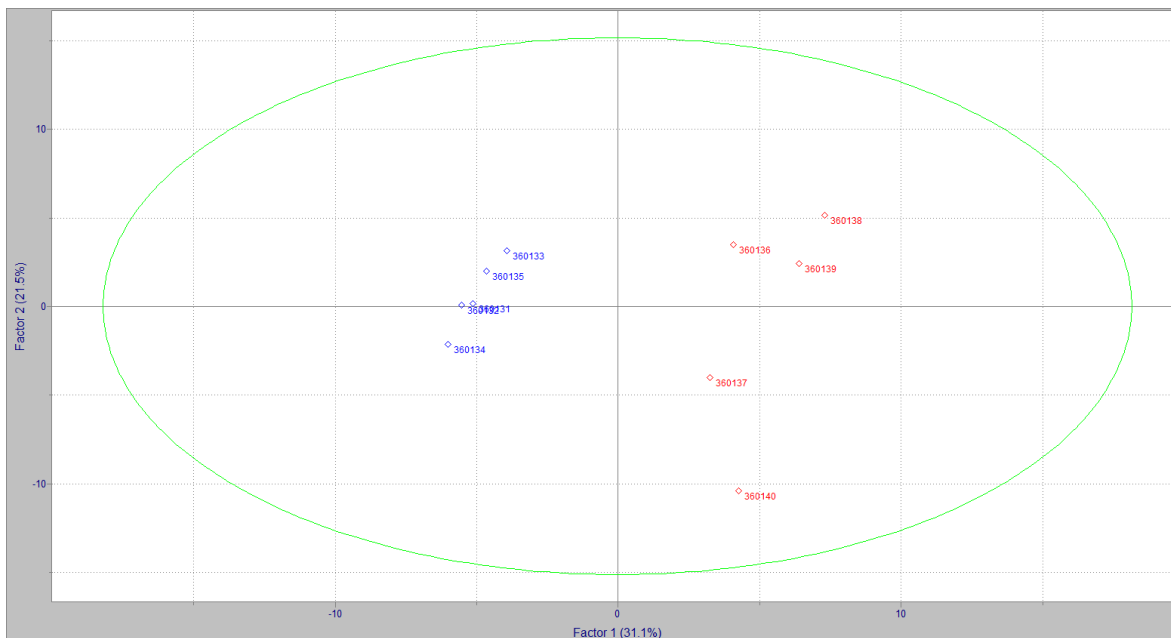
**Tabel 3.9**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de productiemethode van tarbot: gekweekt ( $n = 5$ ) versus wild gevangen ( $n = 5$ ) op basis van het vluchtige stoffen profiel.*

	Kweek	Wild	Totaal
Correcte classificatie	100%	60%	80%

#### 3.3.2 GC-FID resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot

Het vetzuurprofiel van gekweekte en wild gevangen tarbotten is bepaald. De meest voorkomende vetzuren in de onderzochte tarbotten zijn C16:0, C18:1n9 en C22:6n3, net als voor de onderzochte schollen. Met behulp van PCA werden de twee groepen duidelijk zichtbaar (Figuur 3.6).



**Figuur 3.6** PCA score plot van de GC-FID data. Blauw: gekweekte tarbot, rood: wild gevangen tarbot.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de tarbotten classificeert op productie methode. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 100% van de onderzochte tarbotten correct geclassificeerd worden (Tabel 3.10).

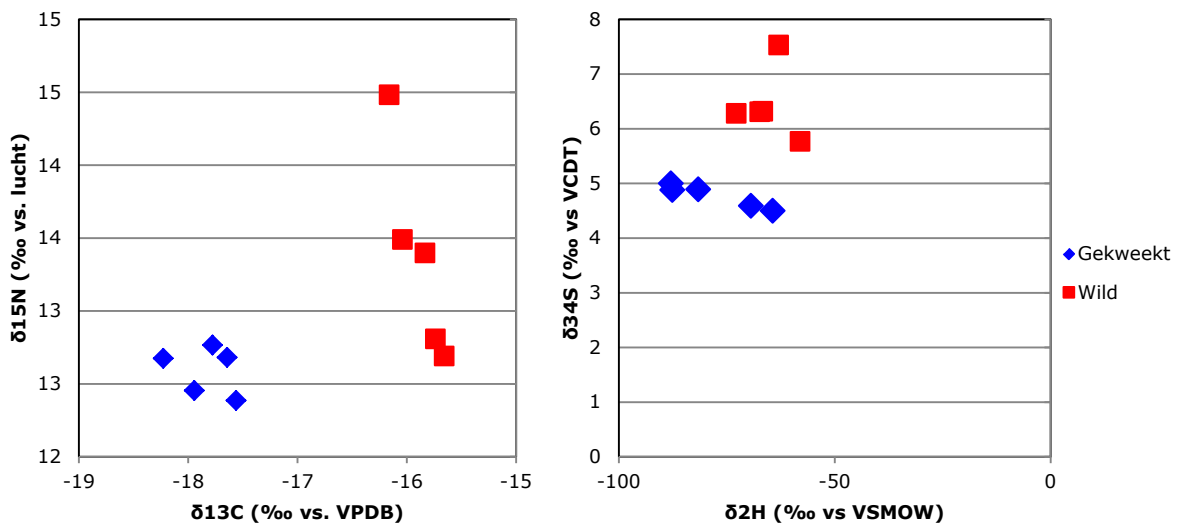
**Tabel 3.10**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de productiemethode van tarbot: gekweekt (n = 5) versus wild gevangen (n =5) op basis van het vetzuurprofiel.*

	Kweek	Wild	Totaal
Correcte classificatie	100%	100%	100%

### 3.3.3 IRMS resultaten voor het onderscheiden van de productiewijze van tarbot

In Figuur 3.7 zijn de resultaten van de IRMS analyse weergegeven. Koolstof en stikstof (A) en waterstof en zwavel (B) isotoopratio zijn tegen elkaar uitgezet. Daarbij zijn de twee groepen duidelijk zichtbaar (Figuur 3.7).



**Figuur 3.7** Scatterplot van de IRMS data  $\delta^{13}\text{C}$  versus  $\delta^{15}\text{N}$  (A) en  $\delta^2\text{H}$  versus  $\delta^{34}\text{S}$  (B). Blauw: gekweekte tarbot, rood: wild gevangen tarbot.

Met multivariate data-analyse kan een model gemaakt worden dat de tarbotten classificeert op productie methode. Met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model kon 100% van de onderzochte tarbotten correct geclassificeerd worden (Tabel 3.11).

**Tabel 3.11**

*Classificatie met behulp van een intern gevalideerd PLS-DA model van de productiemethode van tarbot: gekweekt ( $n = 5$ ) versus wild gevangen ( $n = 5$ ) op basis van analyse van  $\delta^{13}\text{C}$  en  $\delta^{15}\text{N}$  ratio's en/of op basis van  $\delta^2\text{H}$  en  $\delta^{34}\text{S}$  ratio's.*

	Kweek	Wild	Totaal
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ en $\delta^{15}\text{N}$	100%	100%	100%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^2\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	100%
Correcte classificatie o.b.v. $\delta^{13}\text{C}$ , $\delta^{15}\text{N}$ , $\delta^2\text{H}$ en $\delta^{34}\text{S}$	100%	100%	100%

## 3.4 Conclusies

Het doel van dit onderzoek was om een aantal analytische technieken te evalueren of deze in staat zijn om geografische herkomst van schol kunnen bepalen en of deze wilde en gekweekte tarbot van elkaar kunnen onderscheiden. Er dient te worden opgemerkt dat de resultaten die hieronder zijn samengevat gebaseerd zijn op beperkte monstersets. Er dienen daarom dus meer gevarieerde monstersets geanalyseerd te worden om de methoden verder te testen en te valideren.

In Tabel 3.12 zijn de resultaten van de classificatie modellen voor het bepalen van de geografische herkomst van schol samengevat. Van de drie geëvalueerde methoden blijkt het vetzuurprofiel (GC-FID) het meest geschikt. Wanneer alle data meegenomen worden in het model, kan 86% van de hier geanalyseerde schollen correct geclassificeerd worden naar geografische herkomst.



**Tabel 3.12**

*Correcte classificatie van geografische herkomst van schollen (n = 21) op basis van PTR-MS, GC-FID en/of IRMS data.*

	Noordzee	Barentszee	Ierland	IJsland	Totaal
O.b.v. PTR-MS	50%	80%	80%	80%	73%
O.b.v. GC-FID	83%	100%	60%	100%	86%
O.b.v. IRMS	100%	100%	0%	80%	71%
O.b.v. alle data	83%	100%	80%	80%	86%

Als men alleen geïnteresseerd is in het vaststellen of schol uit de Noordzee komt of niet en dus niet uit welke andere zee deze afkomstig is, zijn de resultaten anders. Deze resultaten zijn samengevat in Tabel 3.13. Dan blijkt de analyse op basis van isotoopratio's (IRMS) het meest geschikt te zijn. Daarmee kunnen namelijk alle van de hier geanalyseerde schollen correct geclassificeerd worden. Alle in deze studie onderzochte methoden voor het bepalen van geografische herkomst hebben potentie, maar er moeten meer gevarieerde monstersets worden geanalyseerd om de methoden verder te kunnen ontwikkelen en te valideren.

**Tabel 3.13**

*Correcte classificatie van schollen uit de Noordzee (n = 6) versus schollen uit andere zeeën (n = 15) op basis van PTR-MS, GC-FID en/of IRMS data.*

	Noordzee	Overige zeeën	Totaal
O.b.v. PTR-MS	67%	100%	90%
O.b.v. GC-FID	83%	93%	90%
O.b.v. IRMS	100%	100%	100%
O.b.v. alle data	83%	93%	90%

Naast het bepalen van de geografische herkomst is er ook gekeken of de beschikbare methoden geschikt zijn voor het onderscheiden van gekweekte en wild gevangen tarbot. Daarvan zijn de resultaten samengevat in Tabel 3.14. Zowel op basis van het vetzuurprofiel als op basis van de analyse van isotoopratio's kunnen alle van de hier geanalyseerde tarbotten correct geclassificeerd worden. Ook in dit geval moeten er nog meer monsters worden geanalyseerd om de methode voor het bepalen van de productiemethode verder te kunnen ontwikkelen en te valideren.

**Tabel 3.14**

*Correcte classificatie van productiemethode van tarbotten (n = 10) op basis van PTR-MS, GC-FID of IRMS data.*

	Kweek	Wild	Totaal
O.b.v. PTR-MS	100%	60%	80%
O.b.v. GC-FID	100%	100%	100%
O.b.v. IRMS	100%	100%	100%

---

## 4 Toepassing van de ontwikkelde analytische methoden in Noordzeevisketens

De methoden voor het vaststellen van soort en geografische oorsprong die zijn ontwikkeld in de hoofdstukken 2 en 3 zijn, bij wijze van pilot, toegepast op 28 praktijkmonsters (Tabel 4.1). Hierbij moet worden opgemerkt dat de ontwikkelde methoden nog niet zijn gevalideerd en daarom kunnen de hier gepresenteerde resultaten niet worden beschouwd als officiële uitslagen.

In oktober en december 2014 zijn 15 monsters verzameld in supermarkten in Italië, 11 in Duitsland en 2 in Nederland. Het betreft verpakte, diepgevroren platvisfilets, waarvan 9 gepaneerde of anderszins behandelde vis. De overige verpakkingen bevatten alleen onbehandelde filets. Van de monsters zijn de volgende etiket gegevens geregistreerd: verzamel locatie, merk, product type, aantal filets per verpakking, gewicht, soort en vangstgebied (Tabel 4.1). Vervolgens is in dit hoofdstuk van elk monster de vissoort bepaald met behulp van de ontwikkelde DNA metabarcoding methode en is de geografische herkomst bepaald met behulp van de ontwikkelde chemische fingerprint methoden.

### 4.1 DNA metabarcoding van de praktijkmonsters.

Voor het vaststellen van de vissoort met de DNA metabarcoding methode zijn van alle verpakkingen mengmonsters gemaakt. Van alle filets per verpakking is 1 gram materiaal bemonsterd en gemengd. De mengmonsters zijn daarna gevriesdroogd, tot poeder vermalen en opgeslagen bij -20°C. Vervolgens is de procedure zoals beschreven in hoofdstuk 2 (paragraaf 2.2) gebruikt voor het isoleren van DNA, PCR amplificatie van de DNA barcodes, Illumina MiSeq NGS en NGS data analyse. De Illumina MiSeq NGS analyse van de 28 praktijkmonsters is uitgevoerd met een flow cell capaciteit van 10%. In totaal zijn tussen de 63,566 en 237,622 ruwe 'Forward' en 'Reverse' reads gegenereerd. Na kwaliteitsfiltering was ten minste 21% van de 'Forward' data bruikbaar. De kwaliteit van de 'Reverse' data was lager dan verwacht waardoor slechts tussen de 0.8% en 5.3% van de data bruikbaar was. Ondanks dat de Illumina MiSeq data van relatief lage kwaliteit was, was het nog wel mogelijk om alle datasets te analyseren.

In alle gevallen kon de soortenidentiteit van de praktijkmonsters met '*Pleuronectes platessa*' op het etiket worden bevestigd (Tabel 4.1). Voor de monsters 16 en 17 is de laboratorium uitslag '*Lepidopsetta polyxystra*' overeenkomstig met het etiket waarop '*Lepidopsetta bilineata*' of '*Lepidopsetta polyxystra*' staat vermeld. Voor de monsters 18 en 19 komt de laboratoriumuitslag niet overeen met het etiket, d.w.z. DNA metabarcoding wijst uit de het in beide gevallen '*Lepidopsetta polyxystra*' betreft, terwijl het etiket '*Lepidopsetta bilineata*' vermeldt. Voor zowel monster 18 als 19 kon de laboratoriumuitslag worden bevestigd met DNA barcoding met *cytB* voor respectievelijk 4 en 2 individuele filets per verpakking. '*Lepidopsetta polyxystra*' is een soort die zeer nauw verwant is aan '*Lepidopsetta bilineata*', en een deels overlappend verspreidingsgebied heeft in de (Noordoostelijke) Pacifische Oceaan. De monsters 18 en 19 zijn niet verwerkt en verpakt in Nederland, maar afkomstig uit respectievelijk Duitsland en China.

In totaal konden 163 filets van 28 praktijkmonsters op efficiënte wijze worden geanalyseerd. Met de DNA metabarcoding methode kan met één analyse een compleet beeld worden verkregen van soortensamenstelling per verpakking, iets wat niet mogelijk is met alternatieve methoden zoals DNA barcoding. Een volledige validatie van de methode is echter noodzakelijk om de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de methode te kunnen vaststellen. Optimalisatie van de procedure moet erop gericht zijn om fout-positieve en fout-negatieve uitslagen te kunnen uitsluiten. Vervolg onderzoek zal verder ook moeten uitwijzen of de in deze studie ontwikkelde DNA metabarcoding methode ook geschikt is voor het analyseren van complexe en verwerkte monsters waarin schol en andere platvissoorten zijn verwerkt.

---

## 4.2 Bepaling geografische herkomst van de praktijkmonsters

Voor het vaststellen van geografische oorsprong van scholfilet (*P. platessa*) is 5 gram van 1 filet per verpakking bemonsterd en opgeslagen bij -20°C. De monsters 16 t/m 19 zijn niet bemonsterd, omdat deze volgens de etiketten geen *P. platessa* filets bevatten. Vervolgens is de procedure zoals beschreven in hoofdstuk 3 (paragraaf 3.1) gebruikt voor PTR-MS en GC-FID analyse.

Het vluchtige stoffen profiel gemeten met PTR-MS van de praktijkmonsters was vergelijkbaar met dat van de monsters waarmee het model opgezet is (paragraaf 3.2.1). Wanneer het model gebruikt wordt waarmee schollen uit de Noordzee onderscheiden worden van schollen uit andere zeeën, werden 21 van de 23 geanalyseerde monsters geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee. Dat past in de informatie die op deze verpakkingen staat, namelijk het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan, FAO zone 27 en/of Noordzee. Enkele schollen waren gepaneerd of gemarineerd. Zelfs deze monsters konden correct worden geclassificeerd met het gebruikte model.

Twee monsters (nummer 7 en 8; Tabel 4.1) werden geclassificeerd als zijnde afkomstig uit andere zeeën dan de Noordzee. Volgens de verpakking is het vangstgebied het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen uit welk specifiek gebied binnen het Noordoostelijk deel van de Atlantische oceaan deze afwijkende monsters afkomstig zijn.

Het vetzuurprofiel gemeten met GC-FID van de praktijkmonsters was vergelijkbaar met dat van de monsters waarmee het model opgezet is (paragraaf 3.2.2). Wanneer het model gebruikt wordt waarmee schollen uit de Noordzee onderscheiden worden van schollen uit andere zeeën, werden 14 van de 18 geanalyseerde monsters geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee. Dat past in de informatie die op deze verpakkingen staat, namelijk het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan, FAO zone 27 en/of Noordzee.

Vier monsters (nummer 4, 15, 21 en 25) werden geclassificeerd als zijnde afkomstig uit andere zeeën dan de Noordzee. Drie daarvan (nummer 15, 21 en 25) zijn gepaneerde monsters. De paneer-laag is zoveel mogelijk verwijderd voordat de monsters werden geanalyseerd, maar mogelijk heeft dit toch een dusdanige invloed op de vetzuursamenstelling dat het moeilijk wordt de geografische herkomst van deze monsters te voorspellen. Monster nummer 4 is volgens de verpakking gevangen in het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen uit welk specifiek gebied binnen het Noordoostelijk deel van de Atlantische oceaan deze afwijkende monsters afkomstig zijn.

In dit project is een begin gemaakt met de ontwikkeling van robuuste analytische methoden die ingezet kunnen worden om de juistheid wat betreft vissoort en geografische herkomst te controleren. De analytische methoden moeten eerst worden gevalideerd, waarna ze in de praktijk toegepast kunnen worden voor de controle van de juistheid van de etikettering van visproducten. Hierdoor wordt het mogelijk om de ongewenste vermenging en verwisseling van vissoorten in de productieketen te reduceren, waardoor de authenticiteit van vissoorten uit de Noordzee beter kan worden gegarandeerd.

Tabel 4.1

*Etiketinformatie van 28 praktijkmonsters verzameld in verschillende supermarkt in Italië, Duitsland en Nederland.*

Monster nummer	Locatie	Merk	Product type	Filets per verpakking	gewicht	Soort	Vangstgebied
1	Cocquio Trevisago (VA), Italië	Carrefour	filets	6	500	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
2	Cocquio Trevisago (VA), Italië	Gioia di Mare	filets alla mugnaia	3	300	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan, zone FAO 27
3	Cocquio Trevisago (VA), Italië	Mare fresco (Nestle)	filets	8	400	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
4	Brescia (VA), Italië	Unes	filets	11	600	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
5	Brescia (VA), Italië	Unes	filets	8	300	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
6	Brescia (VA), Italië	Findus	filets	10	400	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
7	Besozzo (VA), Italië	Tigros-Primia	filets	9	500	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
8	Besozzo (VA), Italië	Tigros-Primia	gepaneerde filets	4	300	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
9	Besozzo (VA), Italië	findus	gepaneerde filets	2	275	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
10	Varese, Italië	Ocean Trader	filets	6	500	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
11	Varese, Italië	Ocean Trader	gepaneerde filets	2	250	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
12	Varese, Italië	Ocean Trader	filets	5	250/225	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027
13	Casciago (VA), Italië	zonder merk	filets	16	1000/800	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan (Noordzee)
14	Casciago (VA), Italië	Findus	filets	16	600	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan (Noordzee)
15	Casciago (VA), Italië	Findus - that's amore	filets alla mugnaia	4	300	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
16	Kleve, Duitsland	Edeka	filets	2	250/225*	L.bilineata of L. polyxystra	Noordoost Pacific, Golf van Alaska

Monster nummer	Locatie	Merk	Product type	Filets per verpakking	gewicht	Soort	Vangstgebied
17	Kleve, Duitsland	Edeka	gepaneerde filets	2	250	L.bilineata of L. polyxystra	Noordoost Pacific, Golf van Alaska
18	Kleve, Duitsland	Paulus	filets	10	800/720*	Lepidopsetta bilineata	Pacific (FAO 67)
19	Kleve, Duitsland	PTC	filets	2	250/225*	Lepidopsetta bilineata	Noordoost pacific FAO 067
20	Kleve, Duitsland	Femeg	filets	2	225*	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL
21	Kleve, Duitsland	Femeg	gepaneerde filets	2	250	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL
22	Kleve, Duitsland	Edeka	filets	3	250/225*	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL
23	Kleve, Duitsland	Atlantic	filets	10	675	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL
24	Kleve, Duitsland	Followfish	filets	2	250/200*	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan
25	Kleve, Duitsland	Seagold	gepaneerde filets	2	250	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan, Nord See
26	Kleve, Duitsland	Sea Gold	filets	3	250/225*	Pleuronectes platessa	Nordsee
27	Rhenen, Nederland	Meindert's	filets met pesto	4	275/250*	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL
28	Wageningen, Nederland	Ocean Trader	filets	9	500	Pleuronectes platessa	Noord-Oostelijk deel van de Atlantische oceaan zone FAO 027: Noordzee NL

\* gewicht / uitlek-gewicht

---

## 5 Conclusies

In dit project is een aantal aspecten met betrekking tot authenticiteitsbepalingen (soort, geografische herkomst, productie wijze) van Noordzeevissen onderzocht. Er is een ketenanalyse uitgevoerd waarbij mogelijk locaties van vermenging en verwisseling van schol (*Pleuronectes platessa*) met andere Noordzeevissoorten in de productieketen zijn vastgesteld. Hieruit blijkt dat vooral tijdens de visverwerking de herkomst van met name bewerkte diepgevroren filets en van vis na onthuiden moeilijk te herkennen zijn. Bij het sorteren kan verwisseling van vissoorten nog gecorrigeerd worden, maar de labelling zou geprofessionaliseerd kunnen worden, zodat de traceerbaarheid beter gewaarborgd kan worden. Binnen de ketenanalyse is een bemonsteringstrategie met betrekking tot type, aantal en frequentie van monstername voor authenticiteitsbepaling opgesteld. De voorgestelde bemonsteringstrategie kan enerzijds een kwaliteitskeurmerk borgen en anderzijds fraude in de productieketen helpen voorkomen. Binnen het project is verder onderzocht welke analytische methoden kunnen worden ingezet voor het bepalen van authenticiteit van vissoorten.

Er is een moleculaire DNA barcoding methode (DNA metabarcoding) opgezet waarmee verschillende Noordzeevissoorten gelijktijdig in gemengde visproducten en bulkmonsters kunnen worden geïdentificeerd. Vissoorten zoals schol (*P. platessa*), schar (*Limanda limanda*), bot (*Platichthys flesus*), yellowfin sole (*Limanda aspera*), en rocksole (*Lepidopsetta bilineata*) kunnen met de DNA metabarcoding methode worden geïdentificeerd. Een validatie van de methode is echter noodzakelijk om de nauwkeurigheid en reproduceerbaarheid van de methode te kunnen vaststellen.

Verder zijn drie analytische methoden (PTR-MS, GC-FID, IRMS) geëvalueerd om de geografische herkomst van schol (*P. platessa*) te bepalen. GC-FID is het meest geschikt om schollen naar geografische herkomst in te delen. IRMS analyse lijkt het meest geschikt om schol uit de Noordzee te kunnen onderscheiden van schol uit andere zeeën. Met dezelfde drie fingerprinting- en isotopratio methoden is ook geëvalueerd om de productiewijze van tarbot (*Psetta maxima*) te bepalen. Met zowel GC-FID als IRMS analyse kan, op basis van een beperkte set monsters, een goed onderscheid worden gemaakt tussen wild gevangen en gekweekte tarbot. Er moeten meer monsters worden geanalyseerd om de methoden voor het bepalen van geografische oorsprong en productiewijze verder te kunnen ontwikkelen en te valideren.

Tenslotte zijn de analytische methoden die zijn ontwikkeld voor het vaststellen van vissoort en geografische herkomst toegepast op 28 supermarktmonsters uit Italië, Duitsland en Nederland. De soortenidentiteit van alle scholfilets kon met de DNA metabarcoding worden bevestigd, terwijl twee supermarktmonsters met '*Lepidopsetta bilineata*' op het etiket een andere vissoort bleken te bevatten. Daarnaast is gekeken of de geografische herkomst van deze supermarktmonsters bepaald kon worden met behulp van het vluchtige stoffen profiel en het vetzuurprofiel. Op basis van het vluchtige stoffen profiel werden 21 van de 23 geanalyseerde schollen (*P. platessa*) geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee, onafhankelijk of deze gepaneerd en/of gemarineerd waren. Op basis van het vetzuurprofiel werden 14 van de 18 geanalyseerde schollen geclassificeerd als zijnde afkomstig uit de Noordzee. Deze methode lijkt echter niet geschikt voor monsters die gepaneerd zijn. De monsters die niet geclassificeerd werden als zijnde afkomstig uit de Noordzee zijn volgens de verpakking gevangen in het Noordoostelijke deel van de Atlantische oceaan. Aanvullend onderzoek is nodig om te bepalen uit welk specifiek gebied binnen het Noordoostelijk deel van de Atlantische oceaan deze afwijkende monsters afkomstig zijn.

In dit project is een begin gemaakt met de ontwikkeling van analytische methoden die ingezet kunnen worden om de juistheid wat betreft vissoort, geografische herkomst en productiewijze te controleren. De verschillende analytische methoden hebben potentie maar moeten eerst worden gevalideerd voordat ze in de praktijk toegepast kunnen worden voor handhaving en regelgeving.

---

# Literatuur

- Araghipour N, Colineau J, Koot A, Akkermans W, Rojas J M M, Beauchamp J, Wisthaler A, Märk TD, Downey G, Guillou C, Mannina L, van Ruth S (2008) Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry* 108:374-383.
- Benson DA, Cavanaugh M, Clark K, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research* 41:D36-42.
- Capuano E, Heenan SP, de la Dura A, van Ruth SM (2013) Authentication of wild processed salmon by means of fatty acid and volatile profiles. *Foods & Food Ingredients Journal of Japan*, 218:61-73.
- Cheng J-H, Dai Q, Sun D-W, Zeng X-A, Liu D, Pu H-B (2013) Applications of non-destructive spectroscopic techniques for fish quality and safety evaluation and inspection. *Trends in Food Science & Technology* 34:18-31.
- Craig A, Ritchie AH, Mackie IM (1995) Determining the authenticity of raw reformed breaded scampi (*Nephrops norvegicus*) by electrophoretic techniques. *Food Chemistry* 52:451-454.
- Etienne M, Jérôme M, Fleurence J, Rehbein H, Kündiger R, Mendes R, Costa H, Martínez I (2001) Species identification of formed fishery products and high pressure-treated fish by electrophoresis: a collaborative study. *Food Chemistry*, 72:105-112.
- Hanner R, Becker S, Ivanova NV, Steinke D (2011) FISH-BOL and seafood identification: geographically dispersed case studies reveal systematic market substitution across Canada. *Mitochondrial DNA* 22:106-122.
- Hansel A, Jordan A, Holzinger R, Prazeller P, Vogel W, Lindinger W (1995). Proton transfer reaction mass spectrometry: on-line trace gas analysis at the ppb level. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 149-150:609-619.
- Lindinger W, Hirber J, Paretzke H (1993) An ion/molecule-reaction mass spectrometer used for on-line trace gas analysis. *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* 129(C):79-88.
- Maçatelli M, Akkermans W, Koot A, Buchgraber M, Paterson A, van Ruth S (2009) Verification of the geographical origin of European butters using PTR-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2):169-175.
- MSC (2013a) Bijlage BD. Uittreksel van de MSC certificeringseisen, versie 1.3. In (pp. 9). London: MSC.
- MSC (2013b) DNA results confirm supply chain integrity for MSC certified sustainable seafood. In (Vol. 2014).
- MSC (2013c) MSC DNA testing report 2013. In: MSC.
- Pascoal A, Barros-Velázquez J, Cepeda A, Gallardo JM, Calo-Mata P (2008) Survey of the authenticity of prawn and shrimp species in commercial food products by PCR-RFLP analysis of a 16S rRNA/tRNAVal mitochondrial region. *Food Chemistry* 109(3):638-646.
- Ratnasingham RS, Hebert PDN (2007) BOLD: The Barcode of Life Data Systems ([www.barcodinglife.org](http://www.barcodinglife.org)). *Molecular Ecology Notes* 7(3):355-364.

- 
- Sevilla RG, Diez A, Noren M, Mouchel O, Jerome M, Verrez-Bagnis V, van Pelt H, Favre-Krey L, Krey G, Bautista JM & consortium (2007) Primers and polymerase chain reaction conditions for DNA barcoding teleost fish based on the mitochondrial cytochrome b and nuclear rhodopsin genes. *Molecular Ecology Notes*. 7:730-734.
- Sirot V, Oseredczuk M, Bemrah-Aouachria N, Volatier J.-L, Leblanc J-C (2008). Lipid and fatty acid composition of fish and seafood consumed in France: CALIPSO study. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(1):8-16.
- Tognoli C, Saroglia M, Terova G, Gornati R, Bernardini G (2011). Identification of fish species by 5S rRNA gene amplification. *Food Chemistry*, 129:1860-1864.
- Yang Y-C, Huang Y-W, Hsieh C-H, Huang Y-R, Chen C-H (2012) A unique specification method for processed unicorn filefish products using a DNA barcode marker. *Food Control*, 25:292-302.
- Zhang J, Hanner R (2012) Molecular approach to the identification of fish in the South China sea. *PLoS ONE* 7(2):e30621.



---

# Bijlage 1

Uit: Verordening (EU) nr. 252/2012

## **Bemonsteringsmethoden voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen (PCDD's/PCDF's) en dioxineachtige en niet-dioxineachtige pcb's in bepaalde levensmiddelen**

### I. TOEPASSINGSGEBIED

De monsters voor de officiële controle op het gehalte aan dioxinen (PCDD's/PCDF's) en dioxineachtige en niet-dioxineachtige pcb's, hierna dioxinen en pcb's genoemd, in levensmiddelen worden genomen overeenkomstig de in deze bijlage beschreven methoden. De op die manier verkregen verzamelmonsters worden geacht representatief te zijn voor de partijen of subpartijen waarvan zij zijn genomen. Op basis van de gehalten die in de laboratoriummonsters worden geconstateerd, wordt bepaald of de partijen voldoen aan de maximumgehalten zoals vastgesteld bij Verordening (EG) nr. 1881/2006 tot vaststelling van de maximumgehalten aan bepaalde verontreinigingen in levensmiddelen.

### II. ALGEMENE BEPALINGEN

#### 1. **Personeel**

De monsters worden genomen door een door de lidstaat aangewezen gemachtigde.

#### 2. **Te bemonsteren materiaal**

Elke partij of subpartij die moet worden geanalyseerd, wordt afzonderlijk bemonsterd.

#### 3. **Voorzorgsmaatregelen**

Bij de bemonstering en de voorbehandeling van de monsters moet worden voorkomen dat zich veranderingen voordoen waardoor het gehalte aan dioxinen en pcb's kan veranderen of de analytische bepaling of de representativiteit van het verzamelmonster kan worden beïnvloed.

#### 4. **Basismonsters**

De basismonsters worden zoveel mogelijk op verschillende plaatsen uit de partij of de subpartij genomen. Als hiervan wordt afgeweken, wordt dit in het in punt II.8 van deze bijlage bedoelde verslag vermeld.

#### 5. **Voorbehandeling van het verzamelmonster**

Het verzamelmonster wordt verkregen door de basismonsters door elkaar te mengen. Het moet een gewicht van minimaal 1 kg hebben, behalve als dat niet uitvoerbaar is, bijvoorbeeld als één enkele verpakking bemonsterd is of wanneer het product een zeer hoge handelswaarde heeft.

#### 6. **Identieke monsters**

Van het gehomogeniseerde verzamelmonster worden identieke monsters voor controle-, verhaal- en referentiedoeleinden genomen, mits deze procedure in overeenstemming is met de regelgeving van de lidstaat inzake de rechten van de exploitant van het levensmiddelenbedrijf. De grootte van de laboratoriummonsters voor controledoeleinden moet zodanig zijn dat ten minste duploanalyses mogelijk zijn.

#### 7. **Verpakking en verzending van de monsters**

Elk monster wordt in een schone recipiënt van inert materiaal geplaatst die een degelijke bescherming biedt tegen verontreiniging, verlies van analyten door adsorptie aan de binnenwand van de recipiënt en beschadiging tijdens het vervoer. Voorts worden de nodige voorzorgsmaatregelen genomen om verandering in de samenstelling van het monster tijdens vervoer of opslag te voorkomen.

#### 8. **Verzegeling en etikettering van de monsters**

Elk officieel monster wordt op de plaats van bemonstering verzegeld en geïdentificeerd volgens de in de lidstaten geldende voorschriften.

Van elke bemonstering wordt een verslag opgesteld aan de hand waarvan de bemonsterde partij onduidelijk kan worden geïdentificeerd; hierin worden de bemonsteringsdatum en -plaats en alle andere voor de analist nuttige gegevens vermeld.

### III. BEMONSTERINGSPLAN

Bij de gebruikte bemonsteringswijze wordt ervoor gezorgd dat het verzamelmonster representatief is voor de te controleren (sub)partij.

#### 1. Verdeling van partijen in subpartijen

Grote partijen worden in subpartijen verdeeld, mits de subpartij fysiek van de partij kan worden gescheiden. Voor producten die in grote bulkzendingen worden verhandeld (zoals plantaardige oliën) geldt Tabel 1. Voor andere producten geldt Tabel 2. Aangezien partijen niet altijd een gewicht hebben dat een exact veelvoud is van het gewicht van de subpartijen, mag het gewicht van de subpartijen het aangegeven gewicht met maximaal 20% overschrijden.

Tabel 1

*Onderverdeling van partijen in subpartijen bij in bulkzendingen verhandelde producten*

Gewicht van de partij (ton)	Gewicht van de subpartijen of aantal subpartijen
$\geq 1\ 500$	500 ton
$> 300$ en $< 1\ 500$	3 subpartijen
$\geq 50$ en $\leq 300$	100 ton
$< 50$	—

Tabel 2

*Onderverdeling van partijen in subpartijen bij andere producten*

Gewicht van de partij (ton)	Gewicht van de subpartijen of aantal subpartijen
$\geq 15$	15-30 ton
$< 15$	—

#### 2. Aantal basismonsters

Het verzamelmonster (totaal van alle basismonsters) moet een gewicht van minstens 1 kg hebben (zie punt II.5 van deze bijlage).

Het minimumaantal basismonsters dat van de partij of subpartij dient te worden genomen, is in de Tabellen 3 en 4 aangegeven.

In geval van onverpakte vloeibare producten moet de partij of subpartij voor zover mogelijk en voor zover dit de kwaliteit van het product niet beïnvloedt, net vóór de bemonstering goed worden gemengd, hetzij handmatig, hetzij mechanisch. In dat geval wordt verondersteld dat de verontreinigingen homogeen over de partij of subpartij zijn verdeeld. Drie basismonsters van een partij of subpartij zijn daarom voldoende om het verzamelmonster te vormen.

De basismonsters moeten van vergelijkbaar gewicht zijn. Het gewicht van het basismonster moet minimaal 100 gram zijn.

Als van deze procedure wordt afgeweken, wordt dit in het in punt II.8 van deze bijlage bedoelde verslag vermeld. Overeenkomstig Beschikking 97/747/EG van de Commissie van 27 oktober 1997 tot

vaststelling van de niveaus en frequenties van de monsternemingen zoals bedoeld in Richtlijn 96/23/EG van de Raad, ten behoeve van de controle op bepaalde stoffen en residuen daarvan in bepaalde dierlijke producten ( 1 ) bedraagt de omvang van het samen te stellen verzamelmonster voor kippeneieren ten minste 12 eieren (voor onverpakte partijen en voor partijen die uit afzonderlijke verpakkingen bestaan, zijn de Tabellen 3 en 4 van toepassing).

**Tabel 3**

*Minimumaantal van de partij of subpartij te nemen basismonsters*

Gewicht of volume van de partij/subpartij (in kg of l)	Minimumaantal basismonsters
< 50	3
50 t/m 500	5
> 500	10

Indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat, wordt voor het verzamelmonster een aantal verpakkingen of eenheden genomen overeenkomstig Tabel 4.

**Tabel 4**

*Aantal verpakkingen of eenheden (basismonsters) waaruit het verzamelmonster wordt samengesteld indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat*

Aantal verpakkingen of eenheden in de partij/subpartij	Aantal te nemen verpakkingen of eenheden
1 t/m 25	minimaal 1 verpakking of eenheid
26 t/m 100	circa 5 %, minimaal 2 verpakkingen of eenheden
> 100	circa 5 %, maximaal 10 verpakkingen of eenheden

### **3. Bijzondere bepalingen voor de bemonstering van partijen die gehele vissen van vergelijkbaar gewicht en vergelijkbare grootte bevatten**

Vissen worden geacht een vergelijkbare grootte en een vergelijkbaar gewicht te bezitten, indien het verschil in grootte en gewicht niet meer dan 50% bedraagt.

In Tabel 3 wordt aangegeven hoeveel basismonsters van de partij moeten worden genomen. Het verzamelmonster (totaal van alle basismonsters) moet een gewicht van minstens 1 kg hebben (zie punt II.5).

- Als de te bemonsteren partij kleine vissen (met een gewicht tot circa 1 kg per vis) bevat, wordt de hele vis als basismonster genomen om het verzamelmonster te vormen. Als het resulterende verzamelmonster meer dan 3 kg weegt, mogen de basismonsters bestaan uit het middendeel (met een minimumgewicht van 100 gram per stuk) van de vissen van het verzamelmonster. Het deel waarop het maximumgehalte van toepassing is, wordt in zijn geheel gebruikt voor de homogenisering van het monster.  
Het middendeel van de vis is waar het zwaartepunt ligt. Dit is meestal gelegen bij de rugvin (als de vis een rugvin bezit) of halverwege tussen de kieuwopening en de aars.
- Als de te bemonsteren partij grotere vissen (met een gewicht van meer dan circa 1 kg per vis) bevat, bestaat het basismonster uit het middendeel van de vis. Elk basismonster weegt minstens 100 gram.

---

Bij middelgrote vissen (circa 1-6 kg) wordt als basismonster een moot van de vis van de ruggengraat tot de buik in het middendeel van de vis genomen.

Bij zeer grote vissen (> circa 6 kg) wordt het basismonster genomen van het vlees van de rechterdorsolaterale spier (vooraanzicht) in het middendeel van de vis. Als er ernstige economische schade ontstaat doordat een dergelijk gedeelte van het middendeel van de vis wordt genomen, wordt het voldoende geacht om drie basismonsters van minstens 350 gram per stuk te nemen, onafhankelijk van de omvang van de partij, dan wel een gelijk gedeelte van het spiervlees dichtbij het staartdeel en het spiervlees dichtbij het kopdeel van één vis te nemen om een basismonster te vormen dat representatief is voor het gehalte aan dioxinen in de hele vis.

#### **4. Bemonstering van partijen vis die gehele vissen van verschillend gewicht en/of verschillende grootte bevatten**

- De bepalingen van punt III.3 over de monstersamenstelling zijn van toepassing.
- Als een grootte- of gewichtsklasse/-categorie overheerst (circa 80% of meer van de partij), wordt het monster genomen van vissen van de overheersende grootte of het overheersende gewicht. Dit monster wordt beschouwd als representatief voor de gehele partij.
- Indien geen bepaalde grootte- of gewichtsklasse/-categorie overheerst, moet erop worden toegezien dat de voor het monster uitgekozen vissen representatief voor de partij zijn. Het „Guidance on sampling of whole fishes of different size and/or weight”<sup>2</sup> bevat specifieke richtsnoeren voor dergelijke gevallen.

#### **5. Bemonstering in de detailhandel**

De bemonstering in de detailhandel wordt zo mogelijk verricht overeenkomstig de bemonsteringsvoorschriften in punt III.2 van deze bijlage.

Is dit niet mogelijk, dan kan in de detailhandel een alternatieve bemonsteringsmethode worden toegepast, mits deze een voldoende representativiteit voor de bemonsterde partij of subpartij biedt

---

<sup>2</sup> [http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/dioxins_en.htm)

---

# Bijlage 2

Uit: Verordening (EG) nr. 333/3007

## DEEL A

### DEFINITIES

In deze bijlage zijn de volgende definities van toepassing:

„partij”: een identificeerbare, in één keer geleverde hoeveelheid van een bepaald levensmiddel waarbij de ambtenaar gemeenschappelijke kenmerken heeft geconstateerd [zoals herkomst, soort, verpakkingstype, verpakker, verzender of merktekens]. In geval van vissen dienen ook de afmetingen van de vissen vergelijkbaar te zijn;

„subpartij”: aangeduid deel van een grote partij waarop de bemonsteringsmethode zal worden toegepast. Elke subpartij moet fysiek van de hoofdpartij gescheiden zijn en identificeerbaar zijn;

„basismonster”: hoeveelheid materiaal die op één plaats uit de partij of de subpartij is genomen;

„verzamelmonster”: het totaal van alle uit de partij of de subpartij genomen basismonsters; verzamelmonsters worden geacht representatief te zijn voor de partijen of subpartijen waaruit ze zijn genomen;

„laboratoriummonster”: voor het laboratorium bestemd monster.

## DEEL B

### BEMONSTERINGSMETHODEN

#### B.1. ALGEMENE BEPALINGEN

##### B.1.1. **Personeel**

De monsters worden genomen door een door de lidstaat aangewezen gemachtigde.

##### B.1.2. **Te bemonsteren materiaal**

Elke partij of subpartij die moet worden geanalyseerd, wordt afzonderlijk bemonsterd.

##### B.1.3. **Voorzorgsmaatregelen**

Bij de bemonstering wordt voorkomen dat zich veranderingen voordoen waardoor het gehalte aan verontreinigingen kan veranderen en de analyses of de representativiteit van het verzamelmonster kunnen worden beïnvloed.

##### B.1.4. **Basismonsters**

De basismonsters worden zoveel mogelijk op verschillende plaatsen uit de partij of de subpartij genomen. Als hiervan wordt afgeweken, wordt dit in het in punt B.1.8 van deze bijlage bedoelde verslag vermeld.

##### B.1.5. **Voorbehandeling van het verzamelmonster**

Het verzamelmonster wordt verkregen door de basismonsters door elkaar te mengen.

##### B.1.6. **Monsters voor controle-, verhaal- en arbitrage doeleinden**

Van het gehomogeniseerde verzamelmonster worden monsters voor controle-, verhaal- en referentiedoeleinden genomen, mits dit in overeenstemming is met de regelgeving van de lidstaat inzake de rechten van de exploitant van het levensmiddelenbedrijf.

##### B.1.7. **Verpakking en verzending van de monsters**

Elk monster wordt in een schone recipiënt van inert materiaal geplaatst die een degelijke bescherming biedt tegen verontreiniging, verlies van analyten door adsorptie aan de binnenwand van de recipiënt en beschadiging tijdens het vervoer. Voorts worden de nodige voorzorgsmaatregelen genomen om verandering in de samenstelling van het monster tijdens vervoer of opslag te voorkomen. ▼M1

Bij bemonstering voor PAK-analyse worden kunststof recipiënten zo mogelijk vermeden, aangezien deze het PAK-gehalte van het monster kunnen beïnvloeden. Waar mogelijk worden inerte, PAK-vrije glazen recipiënten gebruikt die het monster voldoende beschermen tegen het licht. Als dit praktisch gezien onmogelijk is, moet ten minste direct contact van het monster met kunststof worden

vermeden, door bv. in geval van vaste monsters het monster in aluminiumfolie in te pakken voordat het in de bemonsteringsrecipiënt wordt geplaatst. ▼B

#### B.1.8. Verzegeling en etikettering van de monsters

Elk officieel monster wordt op de plaats van bemonstering verzegeld en geïdentificeerd volgens de in de lidstaten geldende voorschriften.

Van elke bemonstering wordt een bemonsteringsverslag opgesteld aan de hand waarvan de bemonsterde partij of subpartij ondubbelzinnig kan worden geïdentificeerd (het partijnummer moet worden vermeld); hierin worden de bemonsteringsdatum en -plaats en alle andere voor de analist nuttige gegevens vermeld. ▼M1

### B.2. STEEKPROEFPLANNEN

#### B.2.1. Verdeling van partijen in subpartijen

Grote partijen worden in subpartijen verdeeld, mits de subpartij en de partij fysiek van elkaar kunnen worden gescheiden. Voor producten die in bulkzendingen worden verhandeld (bv. granen) geldt Tabel 1. Voor de overige producten geldt Tabel 2. Aangezien de partijen niet altijd een gewicht hebben dat een exact veelvoud is van het gewicht van de subpartijen, mag het gewicht van de subpartijen het aangegeven gewicht met maximaal 20% overschrijden.

#### B.2.2. Aantal basisonsters

Het verzamelmonster heeft een gewicht van ten minste 1 kg of een volume van ten minste 1 liter, tenzij dat niet mogelijk is, bv. als het monster uit één verpakking of eenheid bestaat. Het minimumaantal basisonsters dat van de partij of subpartij moet worden genomen, is in Tabel 3 aangegeven.

In geval van onverpakte vloeibare producten wordt de partij of subpartij, voor zover mogelijk en voor zover dit de kwaliteit van het product niet beïnvloedt, net vóór de bemonstering handmatig of mechanisch goed gemengd. In dat geval wordt verondersteld dat de verontreinigingen homogeen over de partij of subpartij zijn verdeeld. Drie basisonsters van een partij of subpartij zijn daarom voldoende om het verzamelmonster te vormen. ▼B

De basisonsters moeten van vergelijkbaar gewicht/volume zijn. Een basisonster heeft een gewicht van ten minste 100 g of een gewicht/ volume van ten minste 100 g of 100 ml, zodat een verzamelmonster van ten minste ongeveer 1 kg of 1 liter wordt verkregen. Als hiervan wordt afgeweken, wordt dit in het in punt B.1.8 van deze bijlage bedoelde verslag vermeld.

Tabel 1

Onderverdeling van partijen in subpartijen bij in bulkzendingen verhandelde producten

Gewicht van de partij (in ton)	Gewicht van de subpartijen of aantal subpartijen
$\geq 1\ 500$	500 t
$> 300$ en $< 1\ 500$	3 subpartijen
$\geq 100$ en $\leq 300$	100 t
$< 100$	—

Tabel 2

Onderverdeling van partijen in subpartijen bij overige producten

Gewicht van de partij (in ton)	Gewicht van de subpartijen of aantal subpartijen
$\geq 15$	15-30 t
$< 15$	—

Tabel 3

Minimumaantal van de partij of subpartij te nemen basismonsters

Gewicht of volume van de partij/subpartij (in kg of liter)	Minimumaantal basismonsters
$< 50$	3
$\geq 50$ en $\leq 500$	5
$> 500$	10

Indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat, wordt voor het verzamelmonster een aantal verpakkingen of eenheden genomen overeenkomstig Tabel 4.

Tabel 4

Aantal verpakkingen of eenheden (basismonsters) waaruit het verzamelmonster wordt samengesteld indien de partij of subpartij uit afzonderlijke verpakkingen of eenheden bestaat

Aantal verpakkingen of eenheden in de partij/subpartij	Aantal te nemen verpakkingen of eenheden
$\leq 25$	Minimaal 1 verpakking of eenheid
26-100	Circa 5 %, minimaal 2 verpakkingen of eenheden
$> 100$	Circa 5 %, maximaal 10 verpakkingen of eenheden

---

De maximumgehalten voor anorganisch tin gelden voor de inhoud van elk blik, maar om praktische redenen moet de methode van het verzamelmonster worden gebruikt. Als het testresultaat voor een verzamelmonster blikken onder, maar dichtbij het maximumgehalte aan anorganisch tin ligt en als vermoed wordt dat voor afzonderlijke blikken het maximumgehalte kan worden overschreden, kan het nodig zijn nader onderzoek te verrichten.

Indien de in dit hoofdstuk beschreven bemonsteringswijze onaanvaardbare economische schade aan de partij zou toebrengen (wegens de vorm van de verpakking, de vervoermiddelen enz.) of indien bovengenoemde bemonsteringswijze in de praktijk onwerkbaar is, mag een andere bemonsteringswijze worden toegepast, mits deze voldoende representatief is voor de bemonsterde partij of subpartij en grondig wordt gedocumenteerd.

### **B.2.3. Bijzondere bepalingen voor de bemonstering van partijen grote vissen die in grote partijen aankomen**

Als de te bemonsteren partij of subpartij grote vissen (met een gewicht van meer dan circa 1 kg per vis) bevat en de partij of subpartij weegt meer dan 500 kg, bestaat het basisonster uit het middendeel van de vis. Elk basisonster weegt minstens 100 gram.

### **B.3. BEMONSTERING IN DE DETAILHANDEL**

De bemonstering in de detailhandel wordt zo mogelijk verricht overeenkomstig de bemonsteringsvoorschriften in punt B.2.2 van deze bijlage.

Indien de in punt B.2.2 beschreven bemonsteringswijze onaanvaardbare economische schade aan de partij zou toebrengen (wegens de vorm van de verpakking, schade aan de partij enz.) of indien bovengenoemde bemonsteringswijze in de praktijk onuitvoerbaar is, mag een alternatieve bemonsteringswijze worden toegepast, mits deze voldoende representatief is voor de bemonsterde partij of subpartij en grondig wordt gedocumenteerd. ▼B



---

# Bijlage 3

Uit: Verordening (EG) nr. 2074/2005

Controle op parasieten in vis:

## *HOOFDSTUK II*

### ***VISUELE CONTROLE***

1. De visuele controle wordt steekproefsgewijze verricht op een representatief aantal monsters. De personen die verantwoordelijk zijn voor inrichtingen aan wal en gekwalificeerd personeel aan boord van fabrieksschepen stellen de schaal en de frequentie van de controles vast naar gelang van de soort visserijproducten, de geografische oorsprong ervan en het gebruik dat ervan wordt gemaakt. Tijdens de productie verrichten gekwalificeerde personen op de gestripte vis een visuele controle van de buikholte en de voor menselijke consumptie bestemde levers, kuit en hom. Naar gelang van de wijze van strippen wordt de visuele controle als volgt verricht:

---

# Bijlage 4

Uit: Richtlijn 96/23/EG

## **Aquacultuurproducten**

### **1. Gekweekte vis**

Een monster omvat een of meer vissen, naar gelang van de grootte van de betrokken vis en de eisen van de analysemethode.

De Lid-Staten moeten de onderstaande minimale niveaus en frequentie van bemonstering in acht nemen, afhankelijk van de jaarproductie van de gekweekte vis (uitgedrukt in ton).

Per 100 ton jaarproductie moet jaarlijks minimaal één monsterneming plaatsvinden. De stoffen waarnaar bij de analyse wordt gezocht en de monsters die daarvoor genomen zijn, moeten gekozen zijn op grond van het beoogde gebruik van die stoffen.

De verdeling is als volgt:

*Groep A:*

een derde van alle monsters: alle monsters moeten op de kwekerij genomen worden, op vissen in alle stadia van het productieproces<sup>3</sup>, waaronder vissen die klaar zijn om voor consumptie op de markt gebracht te worden.

*Groep B:*

twee derde van alle monsters: de monsterneming moet plaatsvinden: a) bij voorkeur op de kwekerij, op vissen die klaar zijn om voor consumptie op de markt gebracht te worden; b) op het verwerkingsbedrijf of bij de groothandel, op verse vis, mits de viskwekerij van oorsprong bij positief resultaat kan worden opgespoord („tracing back”).

### **2. Overige aquacultuurproducten**

Wanneer Lid-Staten redenen hebben om te geloven dat er voor andere aquacultuurproducten veterinaire of chemische producten gebruikt zijn of wanneer er een aantasting van het milieu vermoed wordt, moeten die soorten naar rato van de productie daarvan als extra monsters naast de monsters voor gekweekte vis, in het bemonsteringsplan opgenomen worden.

Note: Groep A en Groep B verwijst naar groepen van stoffen waarop aquacultuur producten moeten worden gecontroleerd.

Wat betreft referentie naar traceerbaarheid is dit opgenomen in Verordening (EG) Nr. 178/2002. In Verordening (EG) Nr. 2074/2005, die uitvoeringsmaatregelen voor bepaalde producten bevat, zoals bijvoorbeeld gezondheidscertificaten, is in appendix IV een model voor import van visserijproducten bedoeld voor menselijke consumptie opgenomen. In deze appendix wordt in box I.28 (identificatie van de goederen) de soort vis (wetenschappelijke benaming) gevraagd.

Verder is in een update (01-07-2013) van Richtlijn 96/23/EG (inzake maximale hoeveelheden residu van bestrijdingsmiddelen in en op groenten en fruit) een hoofdstuk opgenomen over bemonstering en frequentie van producten afkomstig van viskwekerijen. Hierin staat vermeld dat een monster kan bestaan uit één of meerdere vissen. Qua frequentie gaat men uit van een minimum aantal monsters per jaar van 1 per 100 ton jaarlijkse productie. Daarnaast is er nog sprake van een onderverdeling van de herkomst van de monsters (1/3 van viskwekerij, 2/3 van viskwekerij of verwerkingsbedrijf). Tenslotte moeten de monsters van de viskwekerijen, tenminste afkomstig zijn van 10% van alle geregistreerde bedrijven

---

<sup>3</sup> Bij zeekekerijen, waar monsterneming bijzonder moeilijk kan zijn, mogen er monsters van voeders in plaats van vissen worden genomen.

In ieder geval moeten de monsters die in de kwekerij genomen worden, op ten minste 10% van de geregistreerde productieplaatsen genomen worden.

Voor specifieke methode van bemonstering en daaropvolgende laboratorium analyse van dierlijke producten waaronder vis geeft Verordening (EG) Nr. 252/2012 een basis toelichting. Weliswaar is de vaststelling van deze bemonsteringsmethoden bedoeld voor de officiële controle op gehalten van dioxine in bepaalde levensmiddelen, maar kan gelden als goed uitgangspunt voor bemonsteringsmethoden voor bepaling van authenticiteit.

Definities in Verordening (EG) Nr. 252/2012 met betrekking tot bemonsteringsmethoden:

- partij: identificeerbare hoeveelheid levensmiddel die in één zending is geleverd en waarbij de verantwoordelijke functionaris gemeenschappelijke kenmerken heeft geconstateerd, zoals herkomst, soort, type verpakking, verpakker, verzender of aangebrachte vermeldingen of stempels. In geval van vissen en visserijproducten dienen ook de afmetingen van de vissen vergelijkbaar te zijn. Indien de omvang en/of het gewicht van de vis binnen een zending niet vergelijkbaar is, kan de zending nog steeds als een partij worden beschouwd, maar moet er een specifieke bemonsteringsprocedure worden uitgevoerd;

- subpartij: deel van een grote partij dat voor bemonsteringsdoeleinden van die partij is afgescheiden. Elke subpartij moet fysiek gescheiden zijn en identificeerbaar zijn;
- basismonster: hoeveelheid materiaal die op één plaats uit de partij of de subpartij is genomen;
- verzamelmonster: het totaal van alle uit de partij of de subpartij genomen basismonsters;
- laboratoriummonster: een representatief deel of een representatieve hoeveelheid van het verzamelmonster, bestemd voor het laboratorium.

In deze verordening staan tevens bijzondere bepalingen voor bemonstering van partijen vis.

1. Bijzondere bepalingen voor de bemonstering van partijen die gehele vissen van vergelijkbaar gewicht en vergelijkbare grootte bevatten

Vissen worden geacht een vergelijkbare grootte en een vergelijkbaar gewicht te bezitten, indien het verschil in grootte en gewicht niet meer dan 50% bedraagt.

In Tabel 1 wordt aangegeven hoeveel basismonsters van de partij moeten worden genomen. Het verzamelmonster (totaal van alle basismonsters) moet een gewicht van minstens 1 kg hebben.

Als de te bemonsteren partij kleine vissen (met een gewicht tot circa 1 kg per vis) bevat, wordt de hele vis als basismonster genomen om het verzamelmonster te vormen. Als het resulterende verzamelmonster meer dan 3 kg weegt, mogen de basismonsters bestaan uit het middendeel (met een minimumgewicht van 100 gram per stuk) van de vissen van het verzamelmonster. Het deel waarop het maximumgehalte van toepassing is, wordt in zijn geheel gebruikt voor de homogenisering van het monster.

Het middendeel van de vis is waar het zwaartepunt ligt. Dit is meestal gelegen bij de rugvin (als de vis een rugvin bezit) of halverwege tussen de kieuwopening en de aars.

Tabel 1

*Minimum aantal van de partij te nemen basismonsters*

Gewicht of volume van de partij (kg)	Minimum aantal basismonsters
< 50	3
50 t/m 500	5
> 500	10

2. Bemonstering van partijen vis die gehele vissen van verschillende grootte en/of gewicht bevatten.

Als een bepaalde grootte- of gewichtsklasse overheerst (80% of meer van de partij) dan wordt het monster genomen van die categorie en is daarmee representatief voor de gehele partij.

Als er geen bepaalde grootte- of gewichtsklasse overheerst, dan moeten de vissen in het monster representatief zijn voor de partij. Er is trouwens een apart document dat specifieke richtsnoeren bevat voor dergelijke gevallen: 'Guidance on sampling of whole fishes of different size and or weight' (punt 4.4 in Verordening (EG) 1883/2006).

Dit document geeft enkele werkbare aanknopingspunten en twee voorbeelden in voorkomende gevallen van het bemonsteren van gehele vissen van verschillende grootte en of gewichten.

---

1) in het geval dat het verschil in grootte en/of gewicht van de aanwezige vissen in de partij > 50% maar < 100% is: neem dan twee separate representatieve monsters van elke grootte- of gewichtsklasse binnen de partij.

Voorbeeld: partij vis van 5 ton met gewichtsklassen van 2 kg tot 3,5 kg.

Eén verzamelmonster wordt genomen van de kleinere vissen (2 – 2,75 kg): 10 basismonsters (= vissen) worden genomen, waarbij het monster bestaat uit spiervlees van de middenmoot van de vis, die elk ongeveer 100 gram weegt, resulterend in een monster van 1 kg dat dan apart kan worden gehomogeniseerd en geanalyseerd.

Dezelfde procedure kan worden gevolgd voor het andere verzamelmonster van grotere vissen (2,75 – 3,75 kg).

2) in het geval dat het verschil in grootte en/of gewicht van de aanwezige vissen > 100% is: neem dan drie separate representatieve van elke grootte- of gewichtsklasse binnen de partij.

Voorbeeld: partij vis van 10 ton met gewichtsklassen van 2 kg tot 8 kg.

Eén verzamelmonster wordt genomen van de kleinere vissen (2 – 4 kg): 10 basismonsters (= vissen) worden genomen, waarbij het monster bestaat uit spiervlees van de middenmoot van de vis, die elk ongeveer 100 gram weegt, resulterend in een monster van 1 kg dat dan apart kan worden gehomogeniseerd en geanalyseerd.

Dezelfde procedure kan worden gevolgd voor het tweede verzamelmonster van de middelmatige vissen (4 – 6 kg).

Voor het derde verzamelmonster van de grotere vissen (6 – 8 kg): 3 basismonsters (= vissen) worden genomen, waarbij het monster bestaat uit de rechterkant van het 'dorso lateraal' van het midden van de vis, die elk 350 gram weegt, hetgeen resulteert in een in een monster van 1 kg dat dan apart kan worden gehomogeniseerd en geanalyseerd.

---

# Bijlage 5

Uit: Verordening (EG) nr. 1224/2009

Binnen één maand te rekenen vanaf de datum van inwerkingtreding van een verordening tot vaststelling van een meerjarenplan voeren de lidstaten hun inspectieschema's uit, rekening houdend met de onderstaande streefniveaus.

De lidstaten stellen de toe te passen steekproefstrategie vast en geven daarvan een beschrijving. Als de Commissie daarom verzoekt, wordt haar inzage verleend van het door de lidstaat toegepaste steekproefplan.

## a) Omvang van de inspectie in de havens

In de regel moet een nauwkeurigheid worden bereikt die ten minste gelijkwaardig is aan die welke zou worden verkregen met een eenvoudige aselecte steekproefmethode waarbij inspecties worden verricht bij 20 gewichtsprocent van alle onder een meerjarenplan vallende soorten die in een lidstaat worden aangeland.

## b) Omvang van de inspectie bij de afzet

Inspectie van 5% van de op de visafslagen te koop aangeboden hoeveelheden van onder een meerjarenplan vallende soorten.

## c) Omvang van de inspectie op zee

Flexibel ijkpunt: vast te stellen na een gedetailleerde analyse van de visserijactiviteit in elk gebied. IJkpunten voor de inspectie op zee hebben betrekking op het aantal patrouilledagen op zee in de beheersgebieden, eventueel met een afzonderlijk ijkpunt voor de dagen waarop in specifieke gebieden wordt gepatrouilleerd.

## d) Omvang van de inspectie vanuit de lucht

Flexibel ijkpunt: vast te stellen na een gedetailleerde analyse van de visserijactiviteit in elk gebied en rekening houdend met de middelen waarover de lidstaat beschikt.

---

RIKILT Wageningen UR  
Postbus 230  
6700 AE Wageningen  
T 0317 48 02 56  
[www.wageningenUR.nl/rikilt](http://www.wageningenUR.nl/rikilt)

RIKILT-rapport 2015.015



---

RIKILT Wageningen UR is onderdeel van de internationale kennisorganisatie Wageningen University & Research centre. RIKILT doet onafhankelijk onderzoek naar de veiligheid en betrouwbaarheid van voedsel. Het instituut is gespecialiseerd in de detectie, identificatie, functionaliteit en (mogelijk schadelijke) effectiviteit van stoffen in voedingsmiddelen en diervoeders.

De missie van Wageningen UR (University & Research centre) is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort Wageningen UR wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

---





To explore  
the potential  
of nature to  
improve the  
quality of life



---

RIKILT Wageningen UR  
Postbus 230  
6700 AE Wageningen  
T 0317 48 02 56  
[www.wageningenUR.nl/rikilt](http://www.wageningenUR.nl/rikilt)

RIKILT-rapport 2015.015

---

RIKILT Wageningen UR is onderdeel van de internationale kennisorganisatie Wageningen University & Research centre. RIKILT doet onafhankelijk onderzoek naar de veiligheid en betrouwbaarheid van voedsel. Het instituut is gespecialiseerd in de detectie, identificatie, functionaliteit en (mogelijk schadelijke) effectiviteit van stoffen in voedingsmiddelen en diervoeders.

De missie van Wageningen UR (University & Research centre) is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen UR bundelen 9 gespecialiseerde onderzoeksinstituten van stichting DLO en Wageningen University hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 6.000 medewerkers en 9.000 studenten behoort Wageningen UR wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.

