

Project 505.0030

Ontwikkeling van microbiologische onderzoeksmethoden voor diverse
landbouw- en visserijprodukten

Rapport 88.56 november 1988

ONDERZOEK NAAR DE TOEPASBAARHEID
VAN DE IMPEDANTIEMETING ALS SNELLE
SCREENINGSMETHODE VOOR DE BACTERIO-
LOGISCHE GESTELDHEID VAN EIPRODUKTEN

Ing. A.E.M. Vermunt

Afdeling Microbiologie

Medewerkers: R. Bakker, H. Dusselaar, A.E.M. Vermunt

Goedgekeurd door: Ir. H. Stegeman

Rijks-kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen
Postbus 230, 6700 AE Wageningen
Telefoon: 08370-19110
Telex: 75180 RIKIL
Telefax: 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN

Ir. G.S. Roosje

Dr. F.A. Huf

Dr. H. Herstel

Drs. J.M.P. den Hartog

R. Bakker

H. Dusselaar

Ir. H. Stegeman

N.J.G. Broex

A.E.M. Vermunt

EXTERN

Dr. Ir. R.W.A.W. Mulder, COVP Spelderholt

Directie Landbouwkundig Onderzoek

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

ABSTRACT

Onderzoek naar de toepasbaarheid van de impedantiemeting als snelle screeningsmethode voor de bacteriologische gesteldheid van eiproducten.

The application of impedance-measurement in the screening of the bacteriological quality of eggproducts

Report no. 88.56 November 1988

A.E.M. Vermunt

State Institute for Quality Control of Agricultural products (RIKILT)
P.O.Box 230, 6700 AE Wageningen, the Netherlands.

28 tables, 17 figures, 11 references

Investigation has been done whether impedance-measurement is applicable in screening the total aerobic count in different kind of eggproducts. In the case of unpasteurised products impedance-measurement is a useful technique. In the case of pasteurised products impedance-measurement is not an efficient technique; this is due to the presence of the bacterium Bacillus cereus.

INHOUD	blz.
--------	------

ABSTRACT	I
----------	---

SAMENVATTING	II
--------------	----

1 INLEIDING

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstermateriaal

2.2 Werkwijze impedantiemeting

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Effect van pre-incubatie op de detectietijd

3.2 Relatie tussen het mesofiel aeroob kiemgetal en de detectietijd

3.2.1 Diverse soorten eiprodukt

3.2.2 Diverse behandelingen eiprodukt

3.2.3 Invloed van Bacillus cereus op de impedantiemeting

3.2.4 Rendement screeningsonderzoek

4 CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

4.1 Gepasteuriseerde produkten

4.2 Ongepasteuriseerde produkten

LITERATUUR

BIJLAGEN

A Resultaten diverse produktsoorten (tabel 5 t/m 17)

B Resultaten diverse behandelingen (tabel 18 t/m 23)

C Grafische weergave alle monsters (fig 2)

D Grafische weergave resultaten diverse produktsoorten (fig 3 t/m 8)

E Grafische weergave resultaten diverse behandelingen (fig 9 t/m 13)

F Grafische weergave resultaten ongepasteuriseerde monsters (fig 14)

G Grafische weergave resultaten monsters met kiemgetal < 50.000 kve/g
(fig 15)

SAMENVATTING

Dit onderzoek is uitgevoerd om na te gaan of de impedantiemeting gebruikt kan worden als snelle screeningsmethode voor het mesofiel aeroob kiemgetal van eiprodukten. De experimenten werden uitgevoerd met een Malthus Growth Analyser. Gebleken is dat de aard van de behandeling die het monstermateriaal heeft ondergaan duidelijk van invloed is op de relatie tussen het kiemgetal en de detectietijd. Dit hangt samen met de microflora die in de monsters aanwezig is.

Voor de categorie "ongepasteuriseerde produkten" blijkt de gehanteerde impedantiemethode goed bruikbaar te zijn om het kiemgetal te screenen; deze methode leent zich niet om een betrouwbare schatting van het kiemgetal te geven. Voor de categorie "gepasteuriseerde produkten" is de methode niet erg efficient, daar het overgrote deel van de monsters niet met de impedantiemethode kan worden goedgekeurd cq. afgekeurd. De aanwezigheid van het relatief snel groeiende micro-organisme Bacillus cereus was hiervan de oorzaak.

1 INLEIDING

In het kader van exportcertificering worden aan gepasteuriseerde eiprodukten microbiologische eisen gesteld. Onverminderd de per land geldende microbiologische eisen zijn dit:

- Salmonella: afwezig in 25 gram
- Enterobacteriaceae: afwezig in 1 gram
- Aeroob kiemgetal: < 50.000 kve/gram

Daarnaast kunnen er door een land specifieke microbiologische eisen worden gesteld. Ook in de Verordening Kwaliteitseisen eiprodukten 1976 worden microbiologische eisen gesteld aan eiprodukten.

Met de gebruikelijke onderzoeksmethode duurt de bepaling van het aeroob kiemgetal tenminste 3 dagen. Het is uitermate belangrijk om sneller over dit resultaat te kunnen beschikken. Bovendien is het gebruikelijke microbiologische onderzoek arbeids- en materiaalintensief. Daarom is er grote interesse voor analysemethoden, waarbij de analyseduur verkort is en/of die minder arbeids- en materiaalintensief zijn.

Veelbelovend is in dit opzicht sinds enkele jaren verkrijgbare apparatuur, die gebaseerd is op de impedantiemeting. Een van de instrumenten is de Malhtus Growth Analyser. Bij deze techniek wordt een monster, tezamen met een voedingsmedium, in een meetcel gebracht. De eventueel aanwezige micro-organismen kunnen zich onder geschikte omstandigheden vermeerderen in de meetcel. Als gevolg van de hiermee samenhangende microbiele stofwisseling verandert de elektrische geleidbaarheid van het groei-medium in de meetcel (Richards et al, 1978). De tijdsduur die nodig is om een meetbare geleidbaarheidsverandering te bereiken is afhankelijk van diverse factoren, waaronder het aantal micro-organismen. Recent is een onderzoek op het RIKILT afgesloten betreffende de toepasbaarheid van de impedantiemeting als snelle screeningsmethode voor de bacteriologische gesteldheid van caseïnes en caseïnaten (RIKILT rapport 88.45)

Dit onderzoek is uitgevoerd om na te gaan of impedantiemeting gebruikt kan worden voor de screening van het aeroob kiemgetal van eiprodukten.

2 MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Monstermateriaal

Door het COVP Spelderholt zijn diverse monsters eiprodukten ter beschikking gesteld. De monsters zijn ingedeeld naar soort en behandeling welke zij hebben ondergaan. Zie hiervoor tabel 1 en 2.

Tabel 1 Soorten eiprodukten

- 1 Heelei vloeibaar van struif
- 2 Heelei vloeibaar
- 3 Eigeel vloeibaar
- 4 Eiwit vloeibaar voor fermentatie
- 5 Eiwit vloeibaar na fermentatie
- 6 Heeleipoeder
- 7 Eigeelpoeder
- 8 Eiwitpoeder gefermenteerd
- 9 Heelei, gemengd met struif
- 10 Heelei, gemengd met tweede soort gecentrifugeerd heelei
- 11 Gedroogd heelei, gemengd met struif *
- 12 Gedroogd heelei, gemengd met tweede soort gecentrifugeerd heelei
- 13 Gefermenteerde eiwitkristallen
- 14 Slingerheelei

* Géén van de aangeboden monsters is in deze categorie ondergebracht

Tabel 2 Behandeling eiprodukten

- 1 Eindprodukten vóór het pasteurisatieproces
 - 2 Eindprodukten na het pasteurisatieproces
 - 3 Heelei na de breekmachine
 - 4 Heelei na de centrifuge (eischalen gescheiden dmv centrifuge)
 - 5 Produkten verkregen na fermentatie
 - 6 Diversen
-

Bij de waardering van bovenstaande indelingen moet voorzichtigheid worden betracht.

Alvorens de monsters microbiologisch zijn onderzocht, zijn ze 7 - 11 maanden bewaard bij -18°C .

In totaal zijn 92 monsters onderzocht.

2.2 WERKWIJZE IMPEDANTIEMETING

De impedantiemetingen zijn uitgevoerd met Malthus Model 128 H Microbiological Growth Analyser System in meetcellen met platina-elektroden voor 2 à 3 ml medium. Lege meetcellen zijn gevuld met 2 ml Malthus Columbia Broth medium (MCB-medium), waarvan de samenstelling is weergegeven in tabel 3.

Tabel 3 Samenstelling Malthus Columbia Broth in gram/liter

Speciaal pepton mengsel	23.0
L-cysteine HCl	0.1
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.0
FeSO ₄ .7H ₂ O	0.02
Na ₂ CO ₃	0.6
Chloriden van Na, NH ₄ , Ca	2.12 (Cl)
Tris(hydroxymethyl)aminomethaan	0.083
BTris(hydroxymethyl)aminomethaan HCl	0.286
Dextrose	3.5
Gedemineraliseerd water	1000 ml

Na het vullen van de meetcellen zijn de cellen geautoclaveerd gedurende 15 minuten bij $121 \pm 1^\circ\text{C}$. Na afkoeling van het medium is hieraan 1 ml monsterhomogenaat toegevoegd. Het homogenaat bestond uit 10 gram monster, wat toegevoegd was aan 90 ml steriel MCB-medium en vervolgens gedurende 1 minuut gestomacherd was.

Ieder homogenaat (dus ieder monster) werd in 3 of 4 voud in Malthus meetcellen gebracht. Van hetzelfde homogenaat is het mesofiel aeroob kiemgetal bepaald met de traditionele gietplaatmethode conform NEN-voorschrift 1507 (voedingsbodem: PCA; incubatie: 3dg 30°C). De meetcellen zijn direct na toevoeging van het homogenaat in de incubator geplaatst en aangesloten op het meetsysteem. De tijdsduur tussen homogeniseren en plaatsen in de incubator was maximaal 0.5 uur. Deze procedure werd zoveel mogelijk gestandaardiseerd om een zo hoog mogelijke herhaalbaarheid van de meting te verkrijgen.

Bij een aantal monsters is bovendien het homogenaat gepre-incubeerd in een waterbad van 30°C , gedurende 3 uur. Vervolgens werd hiervan 1 ml toegevoegd aan de meetcellen met 2 ml MCB-medium.

De temperatuur van de incubator bedroeg 30.0°C , met uitzondering van een aantal proeven waarbij door de hoge omgevingstemperatuur de minimaal haalbare temperatuur van de incubator 31.4°C bleek (het systeem was toen nog niet uitgerust met een koelunit).

De detectietijd is gedefinieerd als de tijd die verloopt totdat een versnelde verandering van de elektrische geleidbaarheid optreedt als gevolg van microbiele stofwisseling. Op grond van de waarde van 4 verschillende detectieparameters wordt de detectietijd berekend door het apparaat (Anonymus, 1986). Bij dit experiment waren deze detectieparameters:

- startscan: 12
- baseline threshold: 0.8
- first difference: 1.0
- second difference: 0.3

Na ca. 25 uur incubatie in de Malthus is de test beëindigd. Door visuele beoordeling van de geleidbaarheidscurves is nagegaan of de geregistreerde detectietijden correct waren. Indien de detectietijd niet correct bleek, zijn de waarden hiervan gecorrigeerd.

Van een aantal monsters is periodiek tijdens de Malthustest vanuit duplocellen het mesofiel aeroob kiemgetal bepaald. Bovendien is van deze monsters bestudeerd welke micro-organismen in het monster aanwezig waren en welke van deze micro-organismen vervolgens in de meetcel aanwezig waren op het moment dat detectie plaats vond.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

3.1 Effect van pre-incubatie op de detectietijd

Uit de literatuur is bekend dat de relatie tussen detectietijd en kiemgetal bij kiemgetallen beneden 100 kolonievormende eenheden (kve) per gram niet meer lineair is (Firstenberg-Eden et al., 1984). Dit wordt veroorzaakt door de ongelijke verdeling van de micro-organismen in de meetcel en door de onnauwkeurigheid van de bepaling van het kiemgetal. Wanneer dergelijke monsters wel van belang zijn voor de bepaling van een regressievergelijking kan pre-incubatie van een bepaalde hoeveelheid monster worden uitgevoerd, alvorens de meetcellen aangesloten worden op het meetsysteem. De tijdsduur van pre-incubatie, die bij dezelfde temperatuur plaats vindt als de impedantiemeting, wordt dan opgeteld bij de detectietijd die de Malthus geeft om de uiteindelijke detectietijd te verkrijgen (Firstenberg-Eden et al., 1983). Van totaal 33 monsters is de impedantiemeting uitgevoerd zowel mét als zónder pre-incubatie. Voor de resultaten hiervan zie tabel 4.

Tabel 4 Detectietijd (gemiddelde van 4 waarnemingen) en variatiecoefficient in monsters eiprodukten mét en zónder pre-incubatie

Monsternr	log N	Zonder preincubatie		Met pre-incubatie	
		Td (uren)	var.coeff. (%)	Td (uren)	var.coeff. (%)
6011	<1.0	-	-	>24.3	-
5930	1.0	-	-	12.2	2.5
6118	1.0	-	-	>25.7	-
5894	1.5	-	-	16.9	4.7
6014	1.3	-	-	-	-
6009	2.0	-	-	11.5	3.5
6065	2.0	12.6	4.0	14.1	7.8
6111	2.0	18.5	9.7	19.3	8.8
6110	2.1	10.8	4.6	8.7	1.1
6122	2.1	10.1	5.0	10.3	3.9
6126	2.1	8.9	4.5	8.6	1.2
6121	2.2	>26.1	-	>26.8	-
6077	2.4	>25.6	-	-	-
6070	2.7	14.3	1.4	13.7	6.6
6078	2.7	17.5	1.7	19.5	11.3
6073	2.9	8.3	3.6	8.1	1.2
6103	2.8	11.8	19.5	10.2	2.0
6000	2.9	8.5	3.5	8.4	3.6
6100	3.0	9.9	10.1	10.2	5.9
6117	3.0	-	-	>25.5	-
6067	3.1	9.7	5.2	9.2	1.1
6115	3.2	11.6	0.9	11.8	3.4
6101	3.4	11.9	2.5	11.7	4.3
6106	3.5	9.3	4.3	9.5	2.1
6107	3.6	8.3	4.8	8.1	2.5
5996	3.7	8.5	4.7	8.4	1.2
6098	3.7	7.1	2.8	7.1	1.4
6010	4.0	9.5	1.1	9.4	2.1
6012	4.0	9.1	3.3	9.3	6.5
5934	4.2	12.3	6.5	12.3	8.9
6006	4.8	8.5	4.7	8.3	3.6
6108	6.8	5.4	7.4	5.4	1.9
6109	7.1	4.4	2.3	4.7	2.1

- : geen opgave van Td mogelijk, daar in tenminste 1 meetcel géén detectietijd binnen de testduur optrad.

N : mesofiel aeroob kiemgetal

Td : detectietijd

var.coeff: variatiecoefficient = standaardafwijking/ gemiddelde * 100%

Uit statistische toetsing (χ^2 toets, $\alpha=0.01$) is gebleken dat er bij de monsters met een kiemgetal > 100 kve/g geen significant verschil bestaat in de gemeten detectietijd en de bijbehorende variatiecoëfficiënt tussen de analyse waarbij wél pre-incubatie is uitgevoerd en de analyse waarbij géén pre-incubatie is uitgevoerd.

Uit dit experiment is gebleken dat van monsters met lage kiemgetallen (kiemgetal < 100 kve/g) vaak geen testresultaat kan worden opgegeven daar niet van alle analyses in de Malthus binnen de testduur een detectietijd geregistreerd is. Indien dergelijke monsters met een lage besmetting worden gepreincubeerd is de kans dat wél binnen de Malthustestduur (24 uur) een testresultaat kan worden opgegeven, significant groter dan wanneer ze niet gepre-incubeerd zijn ($\alpha=0.01$). Het bleek niet mogelijk om na te gaan of de spreiding in gemeten detectietijd van de triplo-quadro analyses van monsters met kiemgetal < 100 kve/g significant lager was, indien wél gepre-incubeerd was, daar er van deze monsters geen detectie binnen de testduur van 24 uur plaats had gevonden. Indien de testduur uitgebreid zou kunnen worden tot het tweevoudige, zou dit wel mogelijk zijn.

3.2 Relatie tussen het mesofiel aeroob kiemgetal en de detectietijd

3.2.1 Diverse soorten eiprodukt

In figuur 1 is een impedantiecurve van een monster weergegeven. In bijlage A (tabellen 5 t/m 17) zijn de resultaten weergegeven van de onderzochte soorten eiprodukten. Tenzij anders vermeld is, is de detectietijd het gemiddelde van 3 of 4 waarnemingen (al deze waarnemingen liggen binnen het 99.9% betrouwbaarheidsgebied). De weergegeven resultaten betreffen analyses waarbij geen pre-incubatie is uitgevoerd. Voor grafische weergave van de resultaten van alle monsters zie bijlage C (figuur 2). De grafische weergave van de resultaten van de diverse produktsoorten is te vinden in bijlage D (figuur 3 t/m 8). De resultaten van produktsoort 4 zijn niet in een grafiek opgenomen daar er te weinig monsters waren met een hoog kiemgetal. Van produktsoorten 5, 6, 7, 8, 12 en 13 zijn de resultaten ook niet in een grafiek weergegeven, daar er van elke categorie te weinig monsters waren. In par. 2.2 is vermeld dat de temperatuur van de incubator niet hetzelfde is geweest tijdens de diverse proeven; deze varieerde van

DATE:

SAMPLE: Eiproduct 6096

DETECTION TIME:

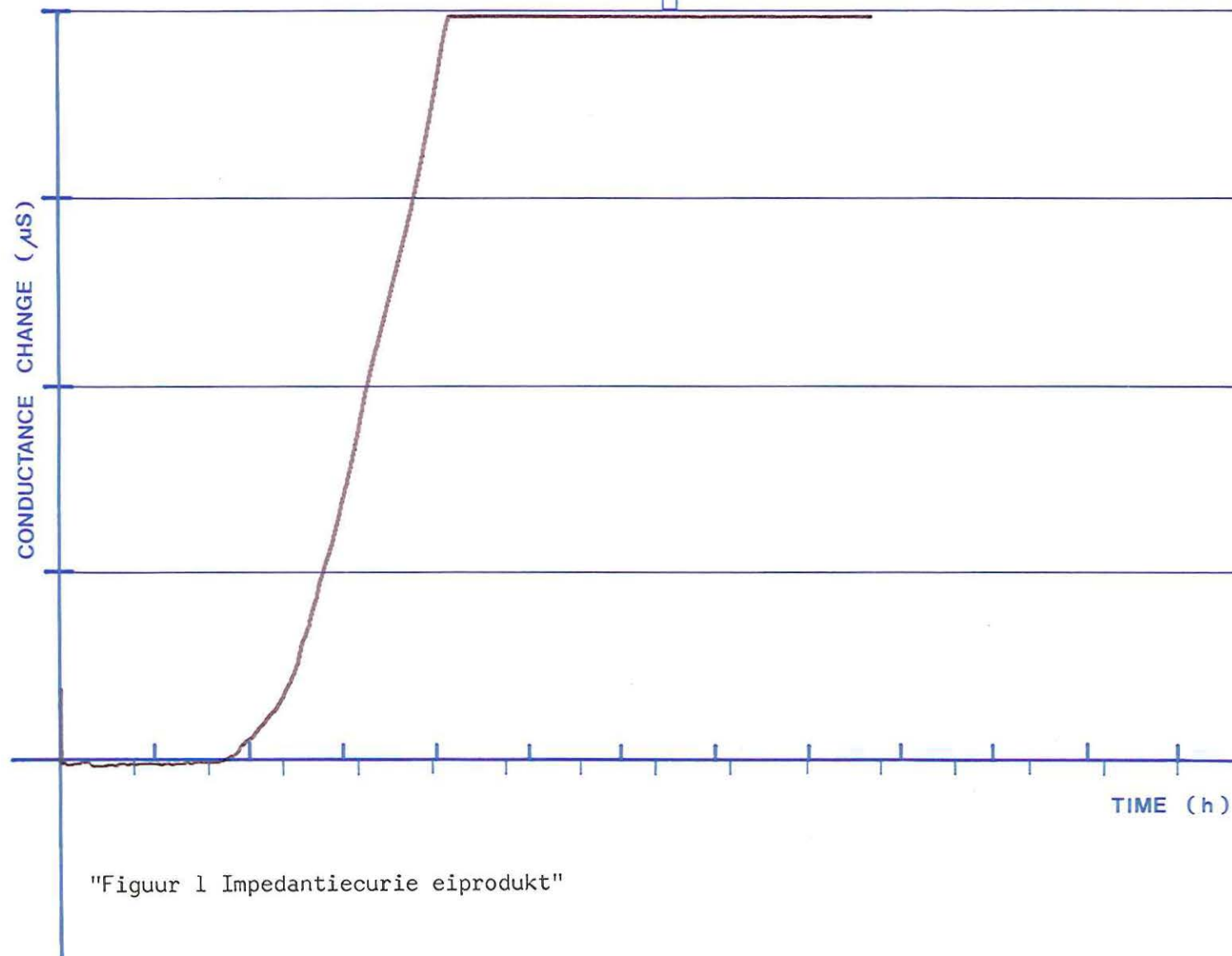
plotter sheet

FULL Y SCALE USED	
200 μ S	X
400 μ S	
600 μ S	
800 μ S	

START.....1.....

ZERO.....1.....

X SCALE USED (h)			
4		72	
6		144	
12		288	
24	X		



30.0 °C tot 31.4 °C (afhankelijk van de omgevingstemperatuur). Om na te gaan of dit invloed heeft op de te berekenen regressievergelijking zijn 15 monsters zowel bij 30.0 als bij 31.4 °C geanalyseerd. Uit statistische toetsing bleek dat er geen significant verschil bestond tussen de berekende regressievergelijkingen bij de incubatietemperatuur 30 °C en 31.4 gr°C (alfa = 0.01).

In tabel 24 zijn de gegevens samengevat van de berekende regressievergelijkingen volgens de kleinste kwadratenmethode voor iedere produktsoort.

Tabel 24 Relatie tussen het kiemgetal (logaritmisch) en de detectietijd van de diverse produktsoorten

Produktsoort	n*	Regressievergelijking	r**	(sy)x***
1	9	$\log N = -0.36T_d + 8.6$	-0.97	0.35
2	23	$\log N = -0.53T_d + 9.3$	-0.87	0.75
3	8	$\log N = -0.26T_d + 6.9$	-0.82	1.20
4	8	$\log N = -0.09T_d + 4.7$	-0.40	0.57
9	9	$\log N = -0.86T_d + 10.9$	-0.92	0.72
10	13	$\log N = -0.65T_d + 9.6$	-0.85	1.17
14	8	$\log N = -0.38T_d + 8.9$	-0.90	0.33

* n = aantal monsters

** r = correlatiecoëfficiënt

*** (sy)x = residuele standaardafwijking

N = mesofiel aeroob kiemgetal

Td = detectietijd

Het verband tussen het logaritmisch kiemgetal en de detectietijd kan het best worden beoordeeld met de zgn. (sy)x, de standaarddeviatie van de schatting van het logaritmisch kiemgetal via de regressielijn uit de gemeten detectietijd (Westgard, 1973). De toepassing van de regressie-analyse (kleinste kwadraten methode) bij het vergelijken van data

van 2 analysemethoden, waarbij de meting van de x-variabele ook een zekere onnauwkeurigheid kent, is niet zonder meer correct. De methode van Deming is in dit geval het meest bruikbaar bevonden (Cornbleet, 1979). Er blijkt een significante fout op te treden in de kleinste kwadratenmethode, indien de verhouding tussen de standaarddeviatie van de meting van één enkele x-waarde en de standaarddeviatie van alle x-waarden groter is dan 0.2. Aangezien bij deze experimenten deze verhouding steeds lager bleek te zijn dan 0.2, levert de kleinste kwadratenmethode geen significante fout op.

3.2.2 Diverse behandelingen eiproducten

In bijlage B (tabellen 18 t/m 23) zijn de resultaten weergegeven van de onderzochte eiproducten, waarbij de monsters zijn ingedeeld naar behandeling. De grafische weergave van deze monsters is weergegeven in bijlage E (figuur 9 t/m 13).

Van de monsters met behandeling 6 zijn de resultaten niet weergegeven in een grafiek, daar er van elke categorie te weinig monsters waren. In tabel 25 zijn de gegevens samengevat van de berekende regressievergelijkingen volgens de kleinste kwadratenmethode voor iedere behandeling.

Tabel 25: Relatie tussen het kiemgetal (logaritmische) en de detectietijd van de diverse behandelde eiproducten

Behandeling	n*	Regressievergelijking	r**	(sy)x***
1	26	$\log N = -0.36Td + 8.4$	-0.91	0.71
2	17	$\log N = -0.15Td + 4.7$	-0.50	0.9
3	13	$\log N = -0.29Td + 8.0$	-0.91	0.64
4	19	$\log N = -0.37Td + 8.7$	-0.96	0.32
5	9	$\log N = -0.49Td + 9.3$	-0.86	0.32
6	8	$\log N = -0.37Td + 6.7$	-0.75	0.94

* n = aantal monsters

** r = correlatiecoëfficiënt

*** (sy)x = residuele standaardafwijking

N = mesofiel aeroob kiemgetal

Td = detectietijd

Bij de gepasteuriseerde monsters (behandeling 2, figuur 10) blijkt er een slecht verband te bestaan tussen kiemgetal en detectietijd. Met uitzondering van één monster met een detectietijd van ca. 22 uur, varieert de detectietijd slechts tussen 7 en 12 uur, terwijl het kiemgetal varieert van 80 tot 50.000 kve/g.

De monsters met behandeling 1,3,4 of 5 vormen tesamen de ongepasteuriseerde monsters. Bij deze monsters is er wel een goed verband tussen kiemgetal en detectietijd (zie bijlage F figuur 14). Dit verband is beter dan bij alle monsters tesamen. In tabel 26 zijn de statistische gegevens weergegeven van de berekende regressielijnen van de ongepasteuriseerde monsters en alle monsters tesamen.

Tabel 26: Verband tussen kiemgetal ($\log N$) en de detectietijd (T_d)

Monstercategorie	Regressielijn	n*	r**	(sy) _x ***
alle monsters	$\log N = -0.38T_d + 8.2$	92	-0.80	1.13
ongepasteuriseerde monsters	$\log N = -0.37T_d + 8.5$	67	-0.90	0.73

*n = aantal monsters

**r = correlatiecoëfficiënt

***(_{sy})_x = standaarddeviatie van de schatting van het logaritmisch kiemgetal via de regressielijn uit de gemeten detectietijd.

N = mesofiel aeroob kiemgetal

T_d = detectietijd

Om de resultaten van de gepasteuriseerde en de ongepasteuriseerde monsters goed met elkaar te kunnen vergelijken, zijn in figuur 15 (bijlage G) alle gepasteuriseerde en ongepasteuriseerde monsters met $\log N < 4.7$ weergegeven.

Uit statistische toetsing bleek dat van de groep monsters eiprodukt met $\log N < 4.7$ (kiemgetal < 50.000 kve/gr) de gepasteuriseerde monsters een significant kortere detectietijd vertoonden dan de ongepasteuriseerde monsters ($P(W > 174.5) < 0.01$).

3.2.3 Invloed van Bacillus cereus op de impedantiemeting

Uit par. 3.2.2 is gebleken dat er bij de gepasteuriseerde monsters een slecht verband bestaat tussen kiemgetal en detectietijd en dat de detectietijd bij gepasteuriseerde monsters significant korter is dan bij die van ongepasteuriseerde monsters bij een nagenoeg identiek kiemgetal.

Om verder te onderzoeken wat hiervan de oorzaak is, is van 10 monsters naast het kiemgetal en de detectietijd in de Malthus ook de microflora in de Malthusmeetcel op het moment van detectie geanalyseerd. Zie hiervoor tabel 27. De meetwaarden van deze monsters zijn tezamen met de bekende regressielijn van alle onderzochte 92 monsters weergegeven in figuur 16.

Tabel 27: Invloed van de aanwezigheid van Bacillus cereus in monsters ei producten op de detectietijd (Td)

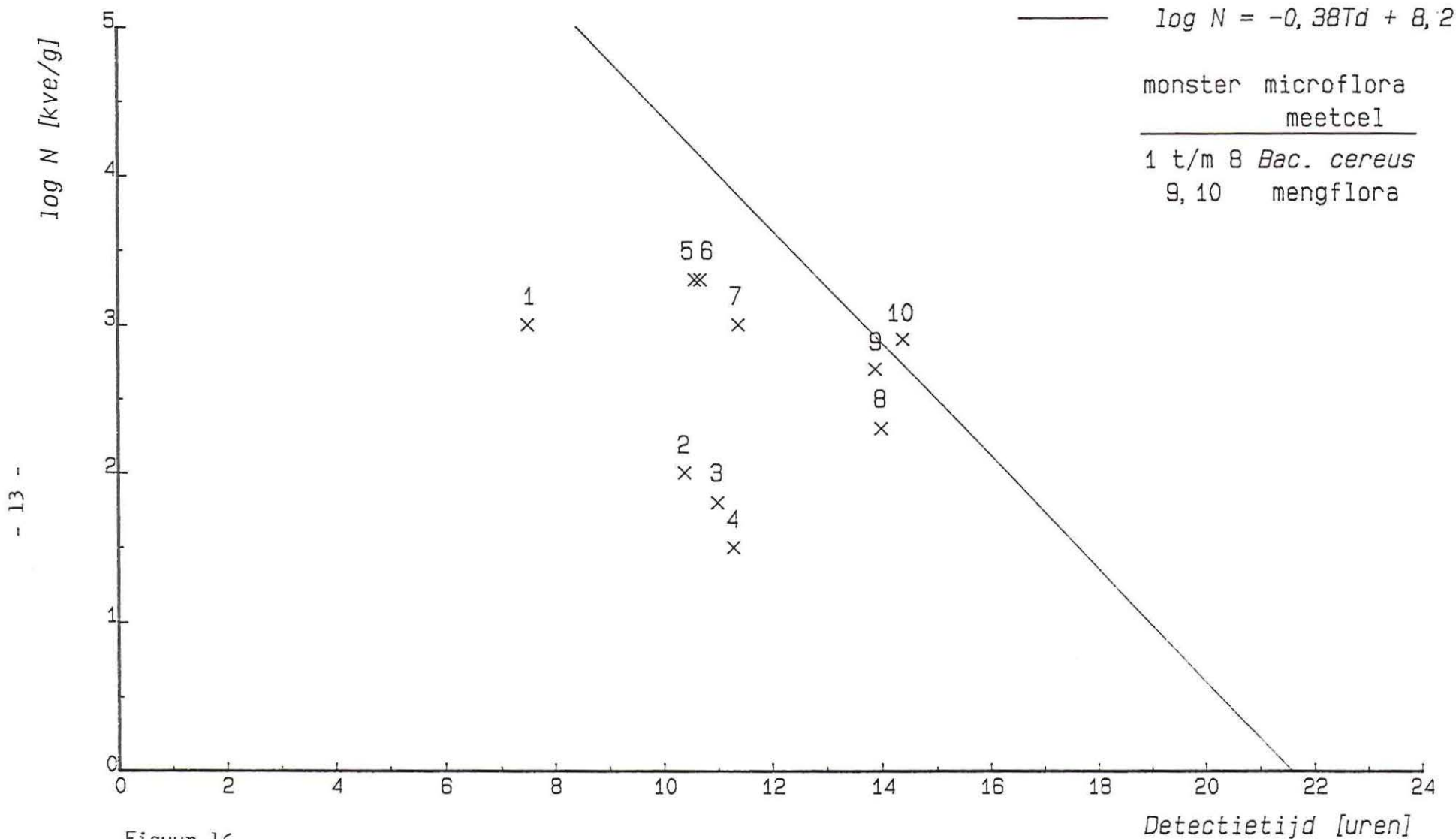
Monster	Microflora monster op t=0		Microflora meetcel op t=Td
	log N	log B. cereus	
1	3.0	3.0	<u>Bacillus cereus</u>
2	2.0	1.3	<u>Bacillus cereus</u>
3	1.8	1.7	<u>Bacillus cereus</u>
4	1.5	1.2	<u>Bacillus cereus</u>
5	3.3	1.4	<u>Bacillus cereus</u>
6*	3.3	1.3	<u>Bacillus cereus</u>
7	3.0	<1.0	<u>Bacillus cereus</u>
8	2.3	<1.0	<u>Bacillus cereus</u>
9*	2.7	<1.0	Mengflora**
10*	2.9	<1.0	Mengflora**

* = ongepasteuriseerd

** = geen Bacillus cereus aanwezig

N = mesofiel aeroob kiemgetal

Td = detectietijd



Figuur 16

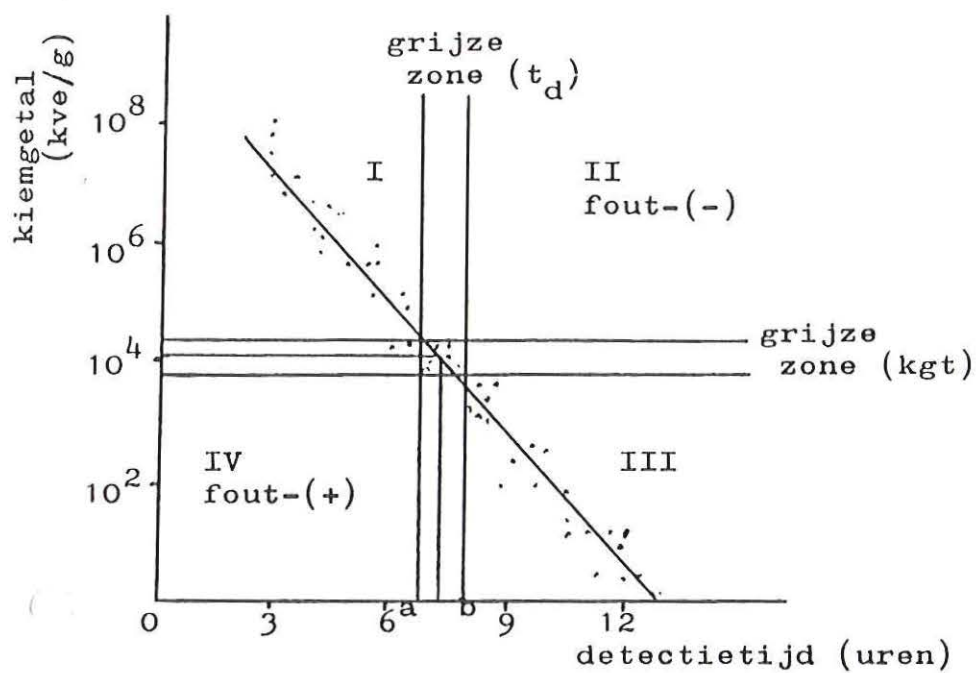
Positie van de meetpunten van een aantal monsters eiprodukten t.o.v.
de regressielijn (n=92).

Uit analyse van de microflora in de meetcel bleek dat het detectiesignaal in de monsters 1 t/m 8 veroorzaakt was door Bacillus cereus en in de monsters 9 en 10 was op het moment van detectie een mengflora aanwezig, waarin geen Bacillus cereus voorkwam. Bovendien is opvallend dat monster nr. 1 van alle monsters de snelste detectietijd heeft, terwijl het kiemgetal van dit monster vergelijkbaar is met dat van de monsters 5,6 en 7. De monsters 2,3 en 4 hebben nagenoeg dezelfde detectietijd als de monsters 5,6 en 7 terwijl het kiemgetal van deze monsters beduidend lager is. Een verklaring hiervoor is te vinden in tabel 27.

Monsternr 1 wat de snelste detectietijd had, heeft het grootste aantal Bacillus cereus. Monsternrs 2 t/m 6 hebben nagenoeg hetzelfde aantal Bacillus cereus nl. tussen 10 en 50 kolonievormende eenheden per gram en de detectietijden van deze monsters vertonen dus weinig verschil. De monsternrs 9 en 10 bevatten geen Bacillus cereus en het detectiesignaal is veroorzaakt door andere micro-organismen dan Bacillus cereus. Aan de hand van het aantal Bacillus cereus kiemen in de monsters is dus de ligging van de meetpunten t.o.v. de regressielijn te verklaren. Uit kiemtellingen in de Malthus meetcel is gebleken dat de generatietijd van Bacillus cereus ca 0.3 uur bedraagt, terwijl die van de overige micro-organismen ca. 0.6 uur bedraagt. Deze relatief korte generatietijd van Bacillus cereus is ook door andere onderzoekers gevonden (Suhren en Heeschen, 1987).

3.2.4 Rendement screeningsonderzoek

Het is interessant om na te gaan wat de resultaten van het screeningsonderzoek met de Malthus zijn, als wordt uitgegaan van de verkregen regressielijnen. Op basis van de eis waaraan het produkt moet worden getoetst en het in acht nemen van een zekere onnauwkeurigheid in de detectietijd worden monsters op basis van de meting van de detectietijd of goedgekeurd (detectietijd > caution-time), OF afgekeurd (detectietijd < cutoff-time), OF ze komen in de grijze zone terecht (cutoff-time < detectietijd < caution-time) (zie hiervoor figuur 17). Van monsters die in de grijze zone terecht komen moet alsnog het kiemgetal bepaald worden met de traditionele plaatmethode om een uitspraak te kunnen doen over de bacteriologische gesteldheid.



Figuur 17. Callibratiecurve voor een produkt

I= terecht afgekeurd

II= fout negatief

III= terecht goedgekeurd

IV= fout-positief

a= cut-off time

b= caution time

In tabel 28 is het rendement van voorscreening van het mesofiel aeroob kiemgetal m.b.v. Malthus weergegeven.

Tabel 28: Resultaten rendement voorscreenen van het mesofiel aeroob kiemgetal m.b.v. Malthus

Monster cat.	aantal getoetst	%log $N \geq 4,7$	Beslissing op basis van detectietijd					
			Afkeuren		Goedkeuren		Grijze zone	
			$\log N \geq 4,7$	$\log N < 4,7$	$\log N \geq 4,7$	$\log N < 4,7$	$\log N \geq 4,7$	$\log N < 4,7$
Alle ¹⁾	45	60,0	26,7	0	0	11,1	33,3	28,9
Ongepast ²⁾ teuriseerd	33	72,7	63,6	0	0	15,2	9,1	12,1
Gepas ³⁾ teuriseerd	17	17,6	0	0	0	5,9	17,6	76,5

Gebruikte regressielijnen:

- 1) $\log N = -0,37 T_d + 0,0$ (n=47); T_d , kritisch = 0,9 uur; cut-aftine = 5,8 uur; cauteonteme = 12,0 hr
- 2) $\log N = -0,38 T_d + 8,5$ (n=34); T_d , kritisch = 10,0 uur; cut-aftine = 5,8 uur; cauteonteme = 12,0 hr
- 3) $\log N = -0,38 T_d + 8,2$ (n=92) T_d , kritisch = 9,2 uur; cut-aftine = 6,2 uur; cauteonteme = 12,2 hr.

Van de ongepasteuriseerde en gepasteuriseerde monsters tesamen voldoet $26,7 + 33,3 = 60\%$ niet aan de eis van het kiemgetal. Al deze monsters worden op basis van de meting van de detectietijd OF afgekeurd OF komen in de grijze zone terecht. Geen enkel monster met een kiemgetal boven 50.000 kve/g wordt op basis van de gemeten detectietijd goedgekeurd. Alle monsters die aan de eis van het kiemgetal voldoen, komen OF in de grijze zone terecht OF ze worden goedgekeurd. Geen enkel monster wordt ten onrechte afgekeurd.

Van de ongepasteuriseerde monsters voldoet $63.6 + 9.1 = 72.7\%$ van de monsters niet aan de eis van het kiemgetal en het overgrote deel hiervan wordt op basis van de detectietijd afgekeurd; slechts een klein gedeelte komt in de grijze zone terecht. Ook hier wordt geen enkel monster met een kiemgetal boven 50.000 kve/g op basis van de detectietijd goedgekeurd. Alle monsters die aan de eis van het kiemgetal voldoen, komen of in de grijze zone terecht, OF ze worden goedgekeurd. Ook hier wordt geen enkel monster ten onrechte afgekeurd.

Alle gepasteuriseerde monsters die een afwijkend kiemgetal hebben komen in de grijze zone terecht en van de monsters waarvan het kiemgetal wel aan de eis voldoet, komt ook het merendeel in de grijze zone terecht.

Conclusie hieruit is dat het screeningsrendement (bepaald door het percentage vals positieve, resp. vals negatieve uitslagen en het percentage wat in de grijze zone terecht komt) voor alle monsters tezamen lager is dan van alleen de ongepasteuriseerde monsters. De screening van gepasteuriseerde monsters is met de hier gebruikte methode weinig efficient, daar 94% van de monsters noch kan worden goedgekeurd, noch kan worden afgekeurd met de Malthus. De oorzaak hiervan is de aanwezigheid van Bacillus cereus gebleken.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Gepasteuriseerde produkten

Gebleken is dat bij gepasteuriseerde monsters duidelijk geen goed verband bestaat tussen kiemgetal en detectietijd. Gebruik van de regressielijn die verkregen is uit de meetwaarden van alle monsters voor screeningsonderzoek is niet zinvol daar er een groot percentage van het totale aantal monsters moet worden heronderzocht met de traditionele plaatmethode.

Uit het flora-onderzoek is gebleken dat in deze experimenten Bacillus cereus een relatief korte generatietijd heeft, waardoor er bij monsters waarin dit micro-organisme voorkomt een slechte correlatie bestaat tussen het kiemgetal en de detectietijd. Dit probleem zou mogelijk kunnen worden opgelost door:

- verlaging van de incubatietemperatuur van 30°C naar 20°C ;
- toevoegen van bepaalde remstoffen aan het impedantiemedium.

4.2 Ongepasteuriseerde produkten

Voor ongepasteuriseerde produkten is een regressielijn verkregen die goed bruikbaar is om ongepasteuriseerde monsters te screenen op hun mesofiel aeroob kiemgetal. Aanbevolen wordt om (uitgaande van de eis van het mesofiel aeroob kiemgetal < 50.000 kve/g) hierbij de volgende werkwijze te kiezen: Afkeuren : $T_d < 8.3$

Goedkeuren : $T_d > 12.3$

Grijze zone : $8.3 \leq T_d \leq 12.3$

Gezien de grootte van de residuele standaardafwijking in de ij-richting van de diverse regressielijnen (steeds > 0.2 log-eenheden) is de beschreven methode niet geschikt om een betrouwbare indicatie te geven van het mesofiel aeroob kiemgetal (Nieuwenhof, 1985).

De kans dat bij lage kiemgetallen (kiemgetal < 100 kve/gr) wel een testresultaat kan worden opgegeven is, indien de monsters worden gepreincubeerd significant hoger dan wanneer ze niet worden gepreincubeerd ($\alpha = 0.01$). Indien het technisch gezien mogelijk is de testduur te verlengen dan kan worden nagegaan of de spreiding in grootte van de detectietijd bij deze lage kiemgetallen minder wordt indien de monsters worden gepre-incubeerd.

LITERATUUR

Anonymous, Malthus-AT training manual. Malthus Instruments, 1986. 96 blz.

Cornbleet, P. Joanne and N. Gochman. Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis. Clinical Chemistry vol 25 (1979) nr. 3, blz. 432-438.

Firstenberg-Eden R. and M.K. Tricarico. Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk. Journal of Food Science vol 48 (1983) blz. 1750 - 1754.

Firstenberg-Eden R. and G. Eden. Impedance Microbiology. Eerste druk. Research studies press Ltd., Great-Brittan, 1984. 170 blz.

Kooy J.A. van en J.T. Jansen. Screening van monsters op bacteriologische gesteldheid met impedantie-apparatuur. De Ware(n) chemicus. (1986) no 16, blz. 31-47.

NEN 1507 - 1985. Melk en melkprodukten. Bepaling van het kiemgetal. Nederlands Normalisatie-instituut, Delft.

Nieuwenhof F.F.J. et al. Moderne methoden voor het vaststellen van de bacteriologische gesteldheid van melk (1).

Voedingsmiddelentechnologie. vol 18 (1985) no 14, blz. 22-25.

Rikilt rapport 88.45. Onderzoek naar de toepasbaarheid van de impedantiemeting als snelle screeningsmethode voor de bacteriologische gesteldheid van caseïnes en caseïnatën.

Richards J.C.S. et al. Electronic measurement of bacterial growth. Journal Physical Environmental Scientific Instruments. vol 11 (1978) blz. 560-568.

Suhren G. and W. Heeschen. Impedance assays and the bacteriological testing of milk and milkproducts. Milchwissenschaft vol. 42 no. 10 (1987) blz. 619-627.

Westgard J.O. and M.R. Hunt. Use and Interpretation of common statistical tests in method-comparison studies. Clinical Chemistry vol 25 (1979) no 3, blz 49-57.

Bijlage A

Tabel 5: Resultaten heelei vloeibaar van struif (soort1)

RIIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5693	4	9.0	5.1
5835	4	5.9	6.7
5884	4	3.8	7.0
5901	4	2.4	7.9
5900	4	3.1	7.5
5934	4	12.3	4.2
6071	4	8.7	4.9
6004	4	3.0	7.7
6127	4	11.0	5.2

Tabel 6: Resultaten heelei vloeibaar (soort 2)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5694	3	8.1	6.4
5833	1	7.6	5.4
5838	3	5.1	6.4
5839	2	10.2	4.0
5904	4	5.1	6.5
5902	3	7.5	5.1
5892	2	11.0	3.1
5891	3	4.4	7.3
5893	1	7.2	6.4
5895	6	3.9	6.3
5897	3	6.3	5.8
5899	4	5.2	6.9
6001	13	7.7	6.0
5997	2	11.7	3.8
6115	1	11.6	3.2
6119	1	5.2	7.2
6072	1	3.4	7.2
6073	2	8.3	2.9
6007	3	6.6	5.8
6010	3	9.5	4.0
6012	6	9.1	4.0
6108	3	5.4	6.8
6107	2	8.3	3.6

Tabel 7: Resultaten eigeel vloeibaar (soort 3)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5881	1	7.0	5.9
5882	2	21.8	1.7
5933	1	6.8	5.9
6111	3	18.5	2.0
6076	1	7.9	6.1
6098	1	8.0	3.6
6102	1	18.5	2.4
6110	2	10.8	2.1

Tabel 8: Resultaten eiwit vloeibaar voor fermentatie (soort 4)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5879	6	13.6	2.8
5878	1	10.1	3.9
5883	1	16.7	2.9
5931	3	14.4	4.1
6112	3	13.7	4.0
6078	1	17.5	2.7
6101	1	11.9	3.4
6104	3	17.3	3.8

Tabel 9: Resultaten eiwit vloeibaar na fermentatie (soort 5)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5875	5	5.4	7.5
5999	5	5.4	7.0

Tabel 10: Resultaten heelel poeder (soort 6)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5876	6	9.4	3.6

Vervolg bijlage A

Tabel 11: Resultaten eigeel poeder (soort 7)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5880	6	9.0	3.1
6000	6	8.5	2.9
6114	6	9.7	2.4
6103	2	11.8	2.8

Tabel 12: Resultaten eiwitpoeder gefermenteerd (soort 8)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
6113	5	6.0	7.0
6100	5	9.9	3.0
6106	5	9.3	3.5

Tabel 13: Resultaten heelei, gemengd met struif (soort 9)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5692	1	2.9	8.1
5695	1	6.6	6.5
5696	2	6.9	4.7
5905	1	4.3	7.3
5903	2	7.1	4.8
5896	2	7.4	3.2
5898	1	5.2	6.4
5996	1	8.5	3.7
6096	1	4.9	6.5

Tabel 14: Resultaten heelei, gemengd met 2⁰ soort gecentrifugeerd heelei (soort 10)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5936	1	4.2	7.1
5935	2	9.2	1.9
5994	1	4.8	6.4
6008	1	7.9	5.6
6003	1	5.3	6.6
6006	2	8.5	4.8
6068	4	6.2	6.6
6122	2	10.1	2.1
6067	2	9.7	3.1
6123	5	14.1	2.4
6125	1	4.5	7.1
6126	2	8.9	2.1
6152	2	8.8	2.9

Tabel 15: Resultaten gedroogd heelei met 2⁰ soort gecentrifugeerd heelei (soort 12)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
6066	6	9.0	2.2
6065	5	12.6	2.0
6070	5	14.3	2.7

Tabel 16: Resultaten gefermenteerde eiwitkristallen (soort 13)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5877	5	14.4	4.1

Tabel 17: Resultaten slinger heelei (soort 14)

RIKILTnr	Behandeling	Td	logN
5937	4	6.2	7.0
5993	1	5.3	6.8
5995	4	8.5	5.2
6120	4	5.8	6.9
6074	4	3.3	7.2
6005	4	5.0	7.0
6109	4	4.4	7.1
6124	4	3.8	7.5

Bijlage B

Tabel 18: Resultaten eindprodukten voor pasteuriseren (behandeling 1)

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5692	9	2.9	8.1
5695	9	6.6	6.5
5833	2	7.6	5.4
5878	4	10.1	3.9
5883	4	16.7	2.9
5881	3	7.0	5.9
5905	9	4.3	7.3
5893	2	7.2	6.4
5898	9	5.2	6.4
5936	10	4.2	7.1
5933	3	6.8	5.9
5993	14	5.3	6.8
5994	10	4.8	6.4
5996	9	8.5	3.7
6115	2	11.6	3.2
6119	2	5.2	7.2
6008	10	7.9	5.6
6076	3	7.9	6.1
6078	4	17.5	2.7
6072	2	3.4	7.2
6003	10	5.3	6.6
6096	9	4.9	6.5
6098	3	8.0	3.6
6101	4	11.9	3.4
6102	3	18.5	2.4
6125	10	4.5	7.1

Tabel 19: Resultaten eindprodukten na pasteuriseren (behandeling 2)

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5696	9	6.9	4.7
5839	2	10.2	4.0
5882	3	21.8	1.7
5903	9	7.1	4.8
5892	2	11.0	3.1
5896	9	7.4	3.2
5935	10	9.2	1.9
5997	2	11.7	3.8
6073	2	8.3	2.9
6006	10	8.5	4.8

Vervolg bijlage B

Vervolg tabel 19

RIKILTnr	Soort	Td	logN
6122	10	10.1	2.1
6067	10	9.7	3.1
6103	7	11.8	2.8
6110	3	10.8	2.1
6107	2	8.3	3.6
6126	10	8.9	2.1
6152	10	8.8	2.9

Tabel 20: Resultaten heelei na de breekmachine (behandeling 3)

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5694	2	8.1	6.4
5838	2	5.1	6.4
5902	2	7.5	5.1
5891	2	4.4	7.3
5897	2	6.3	5.8
5931	4	14.4	4.1
6112	4	13.7	4.0
6111	3	18.5	2.0
6007	2	6.6	5.8
6010	2	9.5	4.0
6104	4	17.3	3.8
6108	2	5.4	6.8
6001	2	7.7	6.0

Tabel 21: Resultaten heelei na de centrifuge (behandeling 4)

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5693	1	9.0	5.1
5835	1	5.9	6.7
5884	1	3.8	7.0
5904	2	5.1	6.5
5901	1	2.4	7.9
5899	2	5.2	6.9
5900	1	3.1	7.5
5937	14	6.2	7.0

Vervolg bijlage B

Vervolg tabel 21

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5934	1	12.3	4.2
5995	14	8.5	5.2
6120	14	5.8	6.9
6074	14	3.3	7.2
6071	1	8.7	4.9
6004	1	3.0	7.7
6005	14	5.0	7.0
6068	10	6.2	6.6
6109	14	4.4	7.1
6127	1	11.0	5.2
6124	14	3.8	7.5

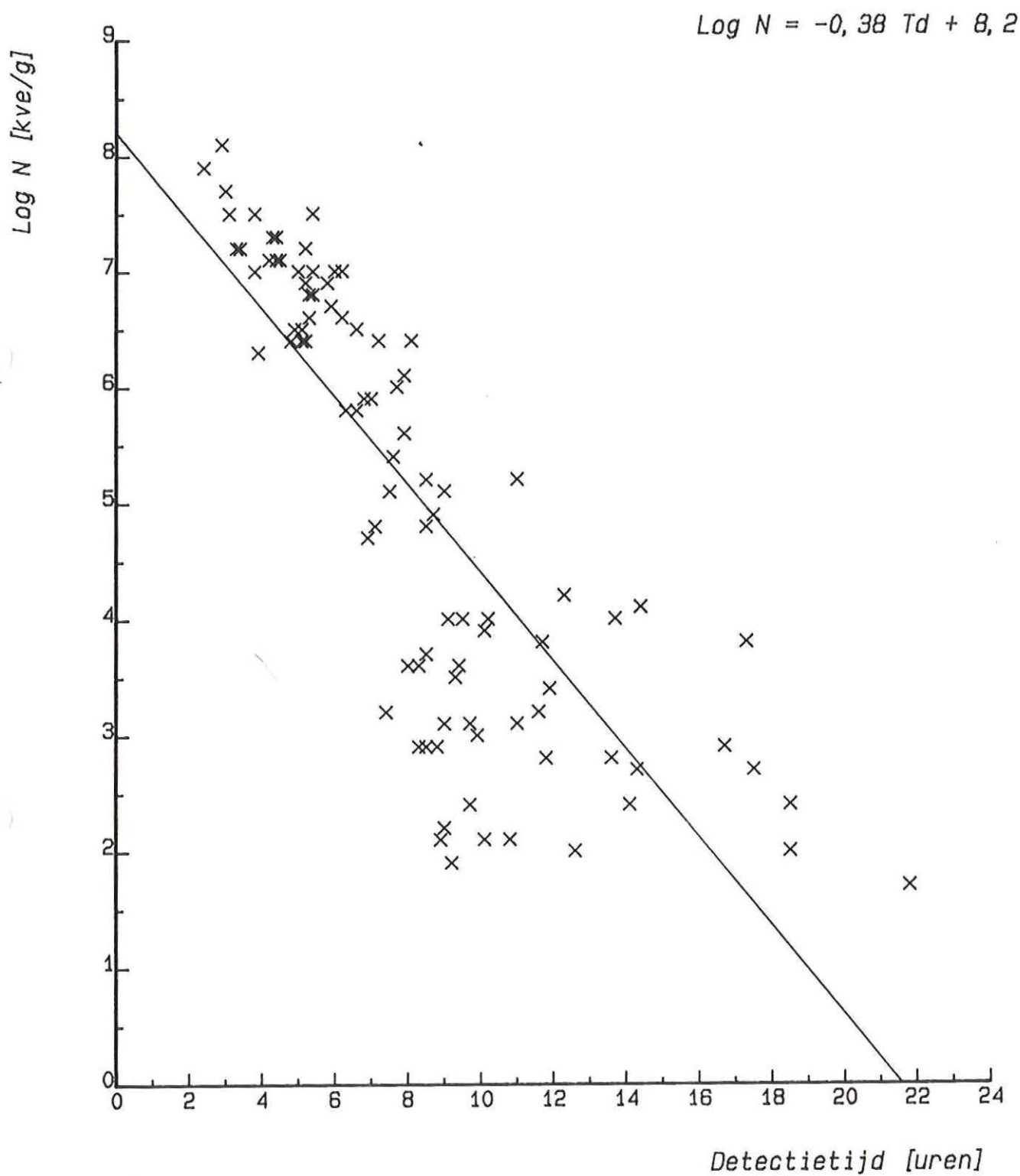
Tabel 22: Resultaten produkten na fermentatie (behandeling 5)

RIKILTnr	Soort	Td	logN
5875	5	5.4	7.5
5877	13	14.4	4.1
5999	5	5.4	7.0
6113	8	6.0	7.0
6065	12	12.6	2.0
6070	12	14.3	2.7
6123	10	14.1	2.4
6100	8	9.9	3.0
6106	8	9.3	3.5

Tabel 23: Resultaten diversen

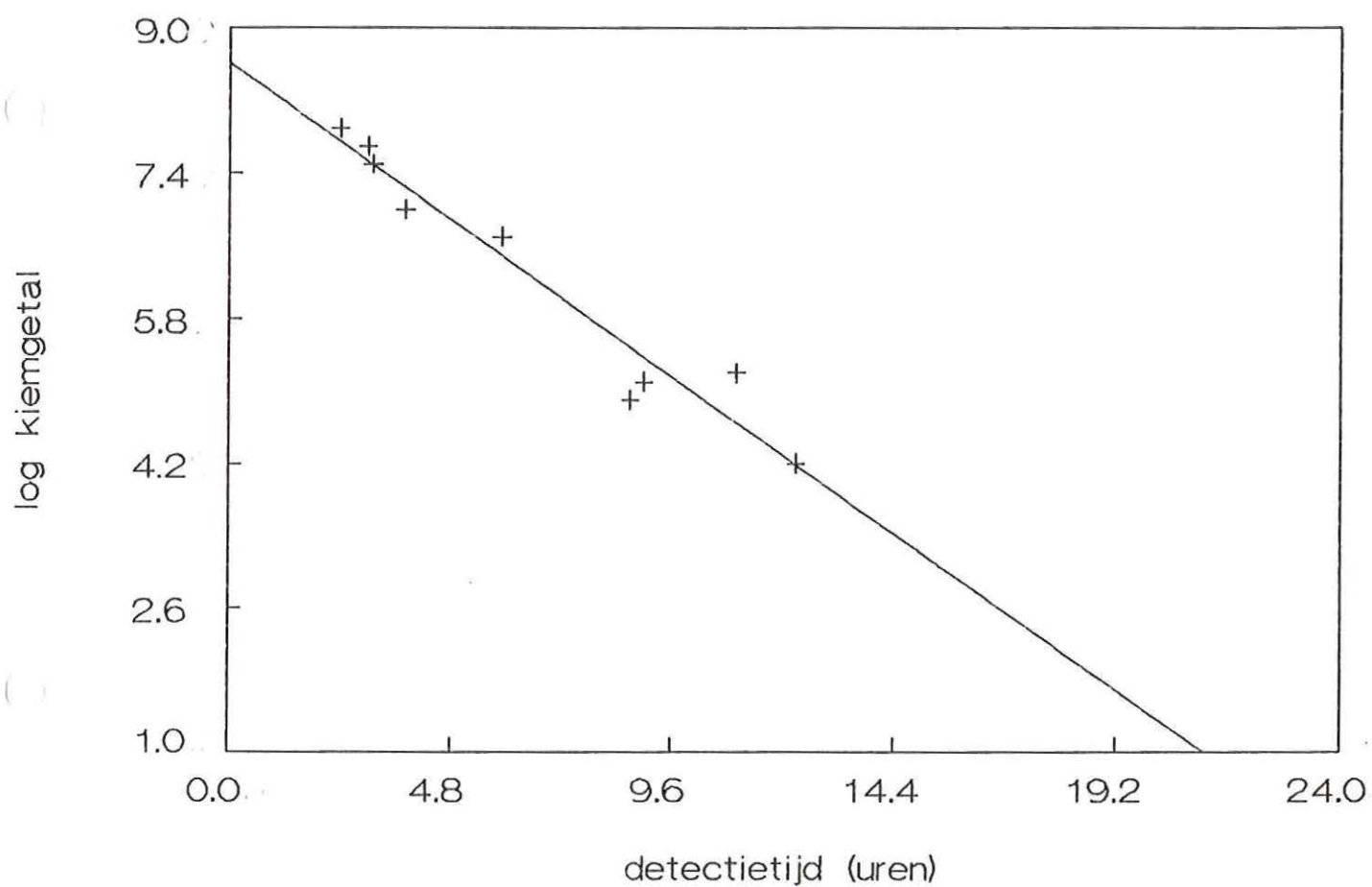
RIKILTnr	Soort	Td	logN
5879	4	13.6	2.8
5880	7	9.0	3.1
5876	6	9.4	3.6
5895	2	3.9	6.3
6000	7	8.5	2.9
6114	7	9.7	2.4
6012	2	9.1	4.0
6066	12	9.0	2.2

r8856



Figuur 2.
Verband tussen kiemgetal en detectietijd van 92
monsters eiprodukten.

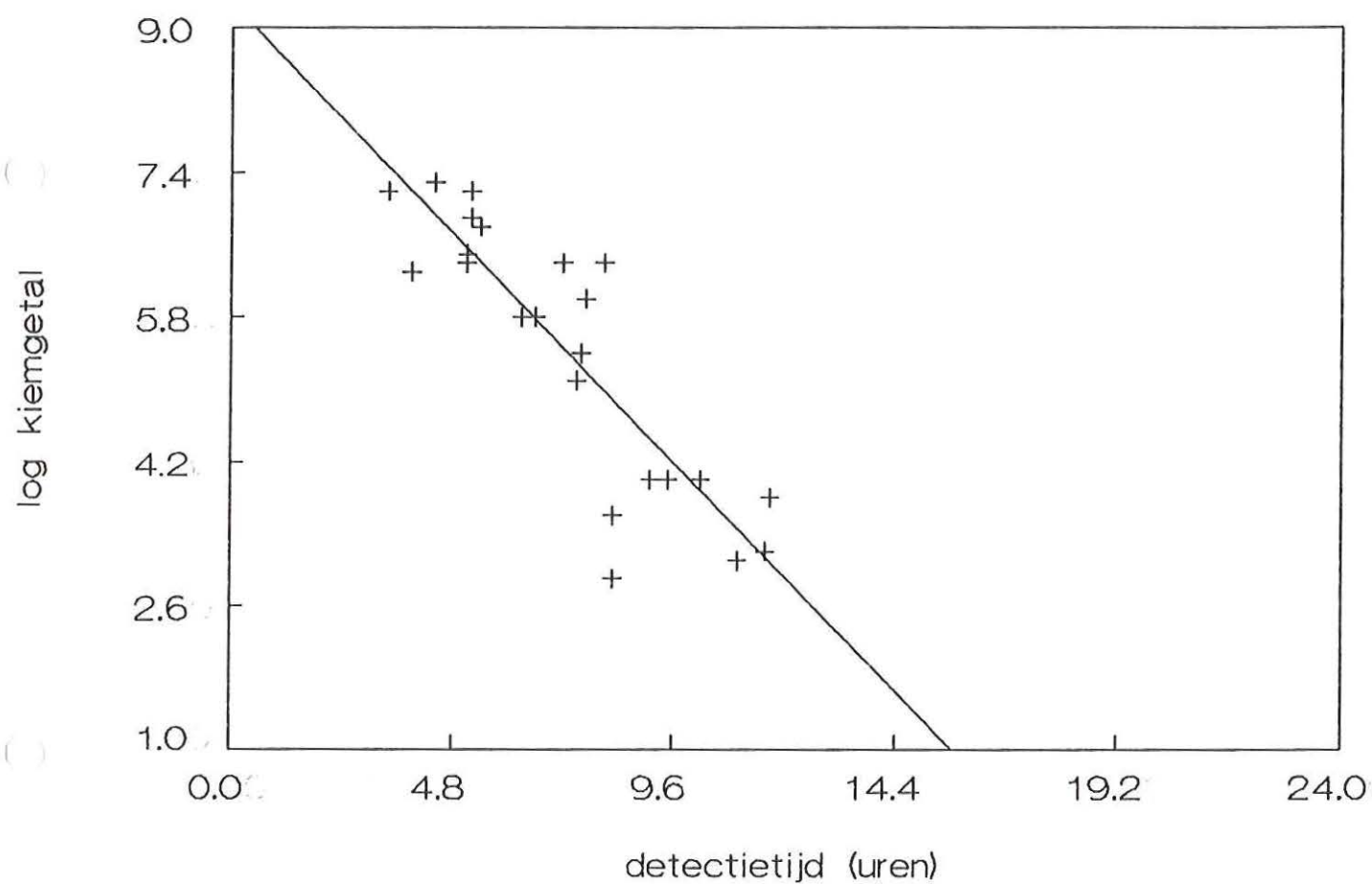
Figuur 3
Produktsoort 1
Heelei vloeibaar van struif



Figuur 4

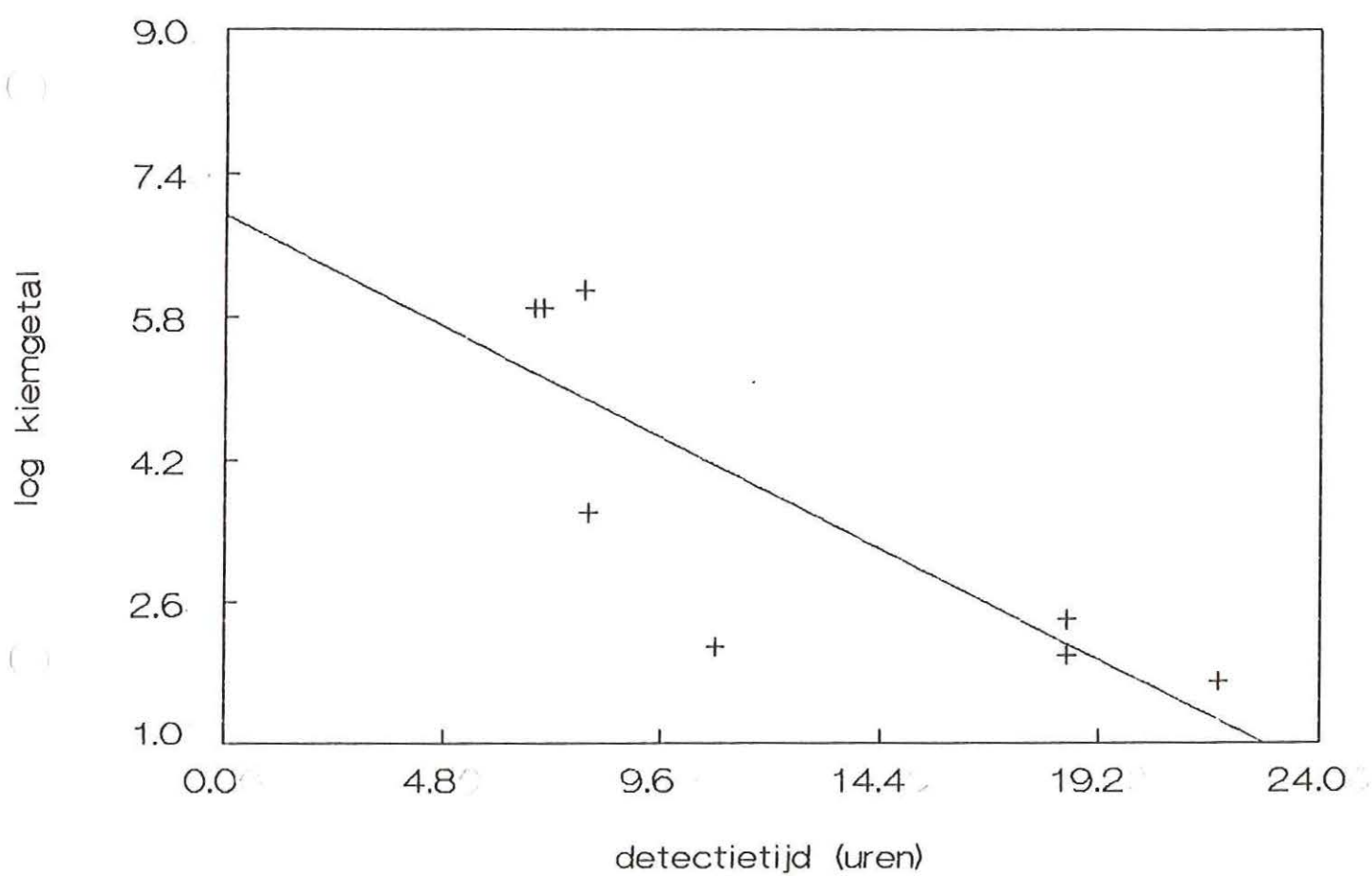
Produktsoort 2

Heelei vloeibaar



Vervolg bijlage D

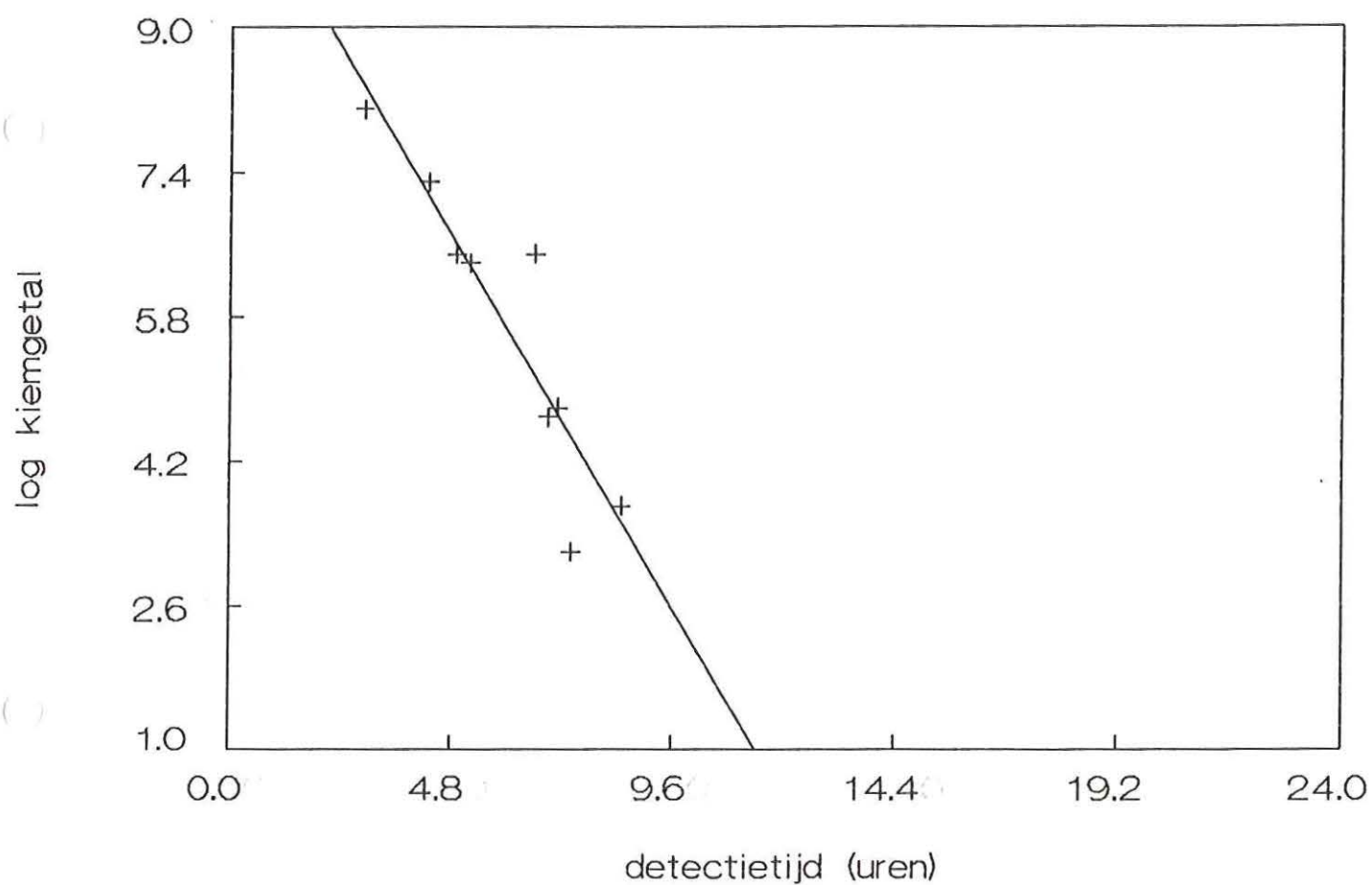
Figuur 5
Produktsoort 3
Eigeeel vloeibaar



Vervolg bijlage D

Figuur 6

Produktsoort 9
Heelei gemengd met struif

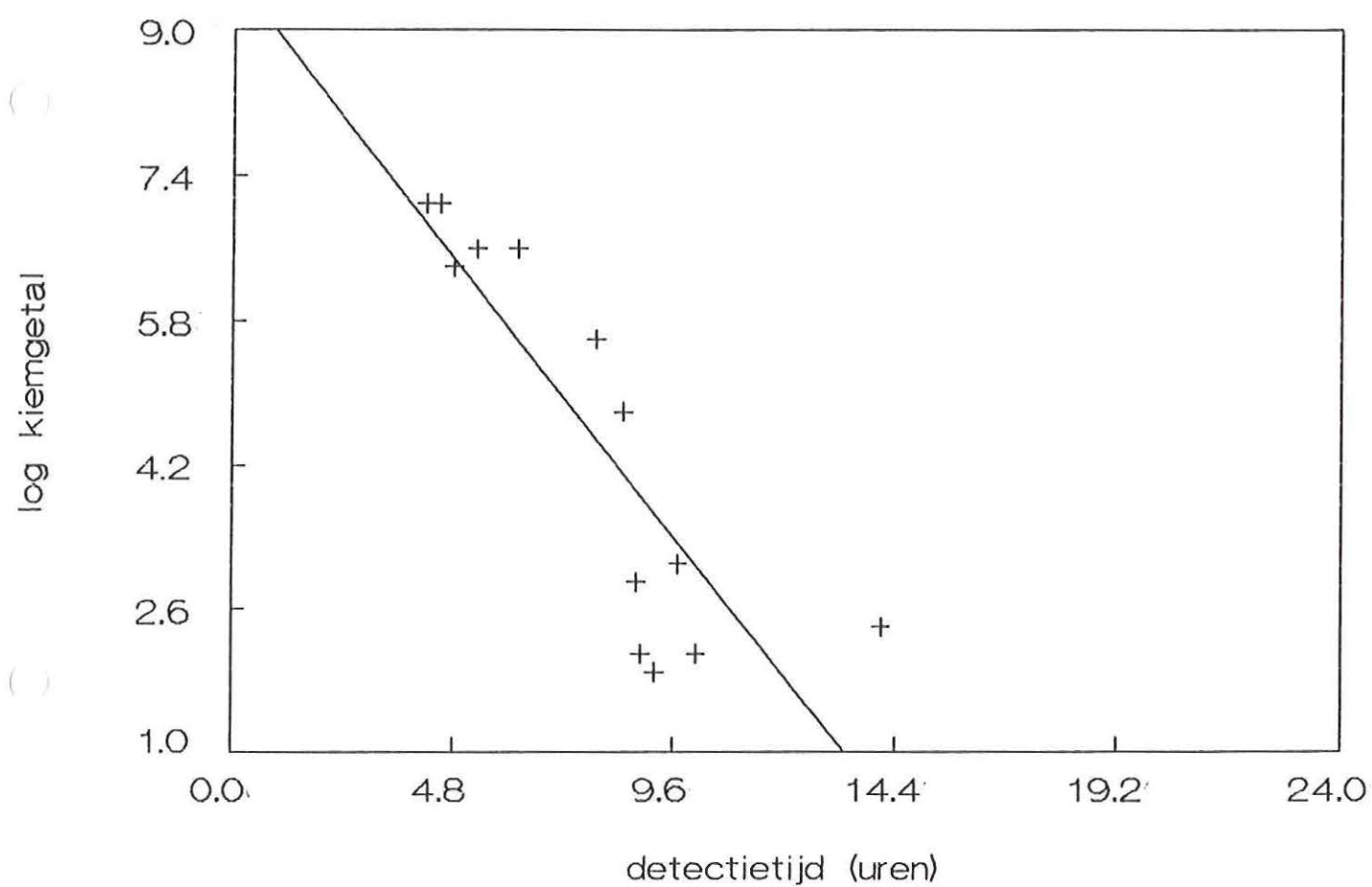


Vervolg bijlage D

Figuur 7

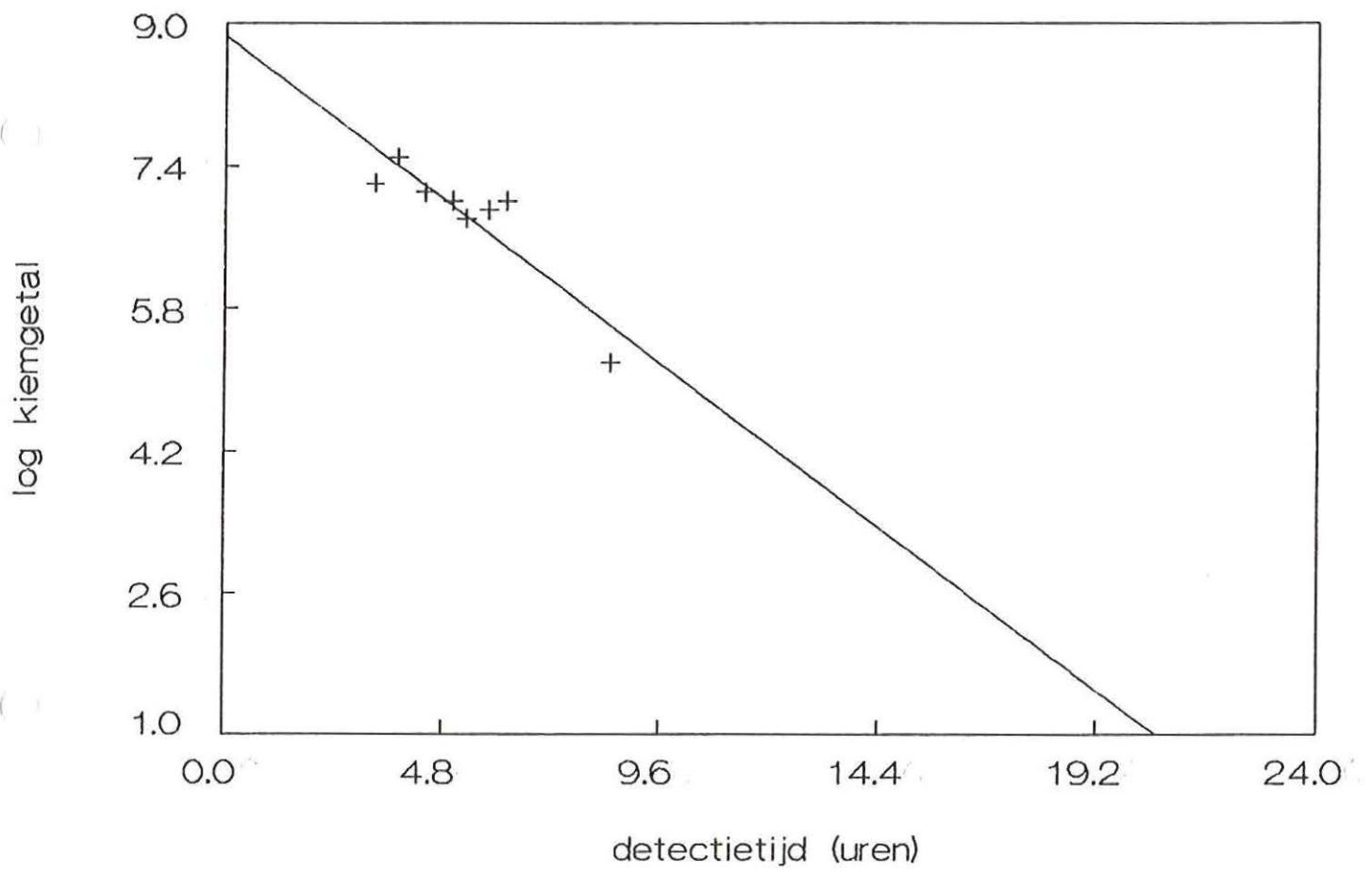
Produktsoort 10

Heelei+gecentrifugeerd heelei(2de soort)



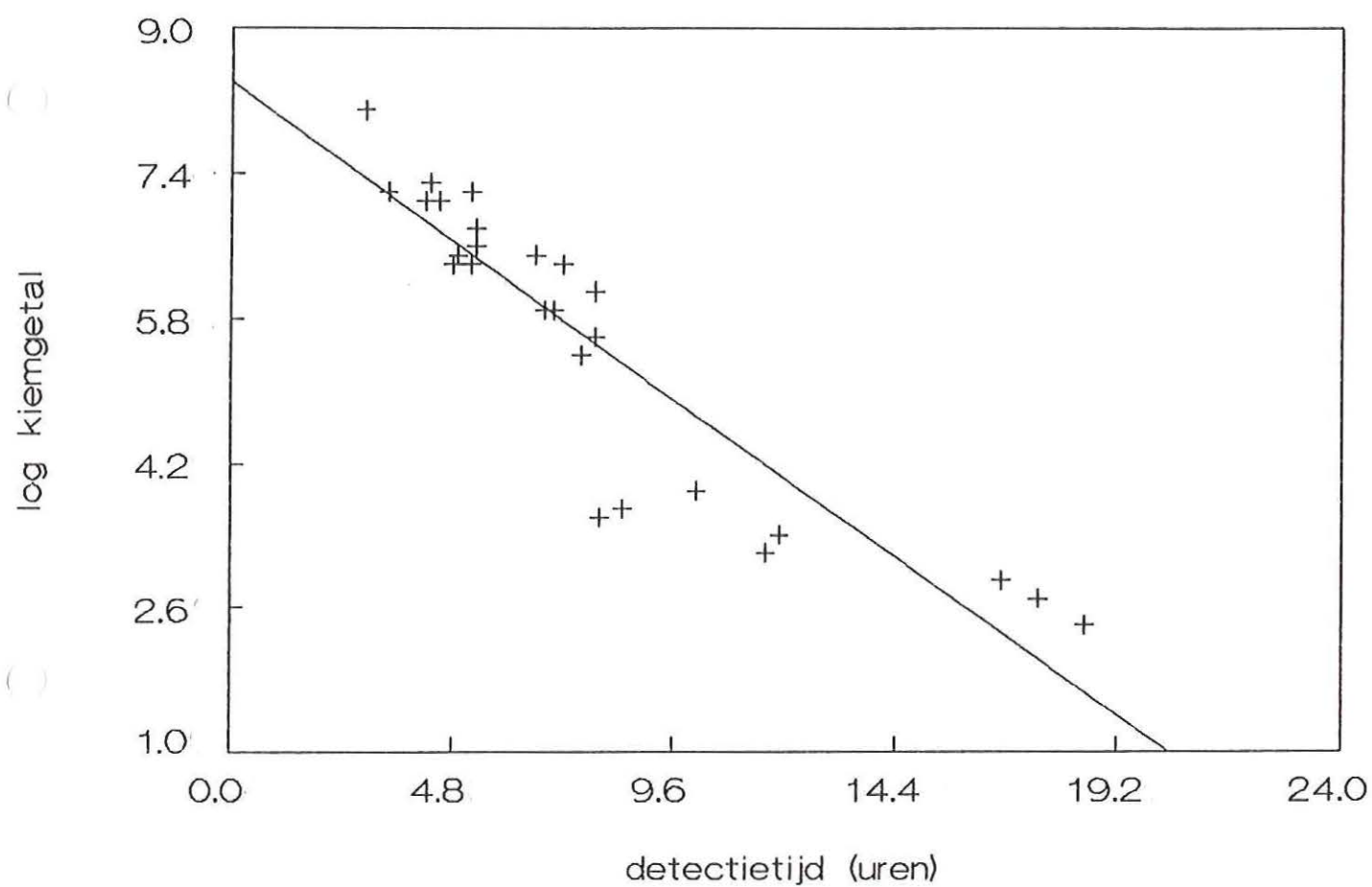
Figuur 8

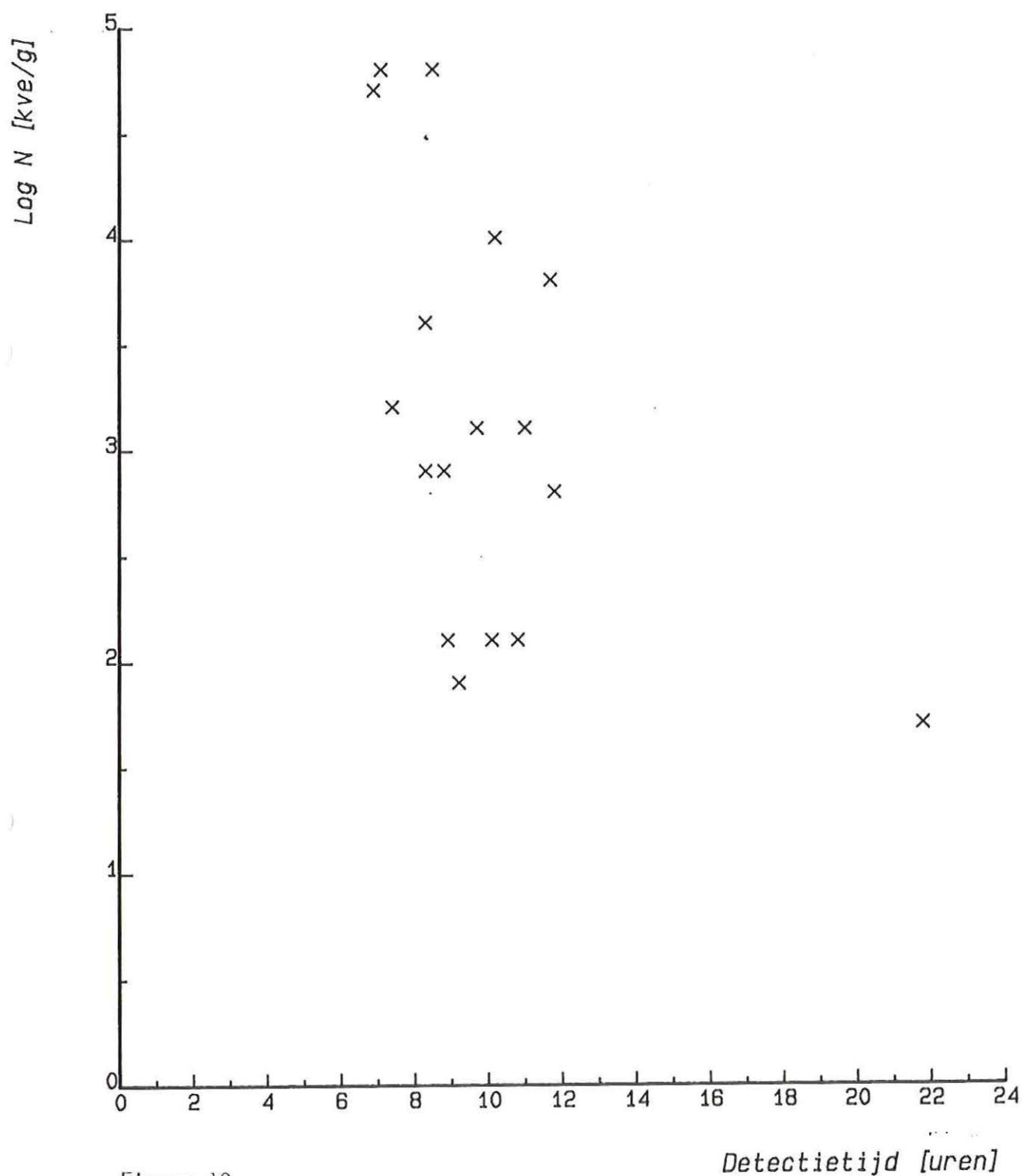
Produktsoort 14
Slingerheeleei



Figuur 9

Behandeling 1
eindprodukten voor pasteurisatie



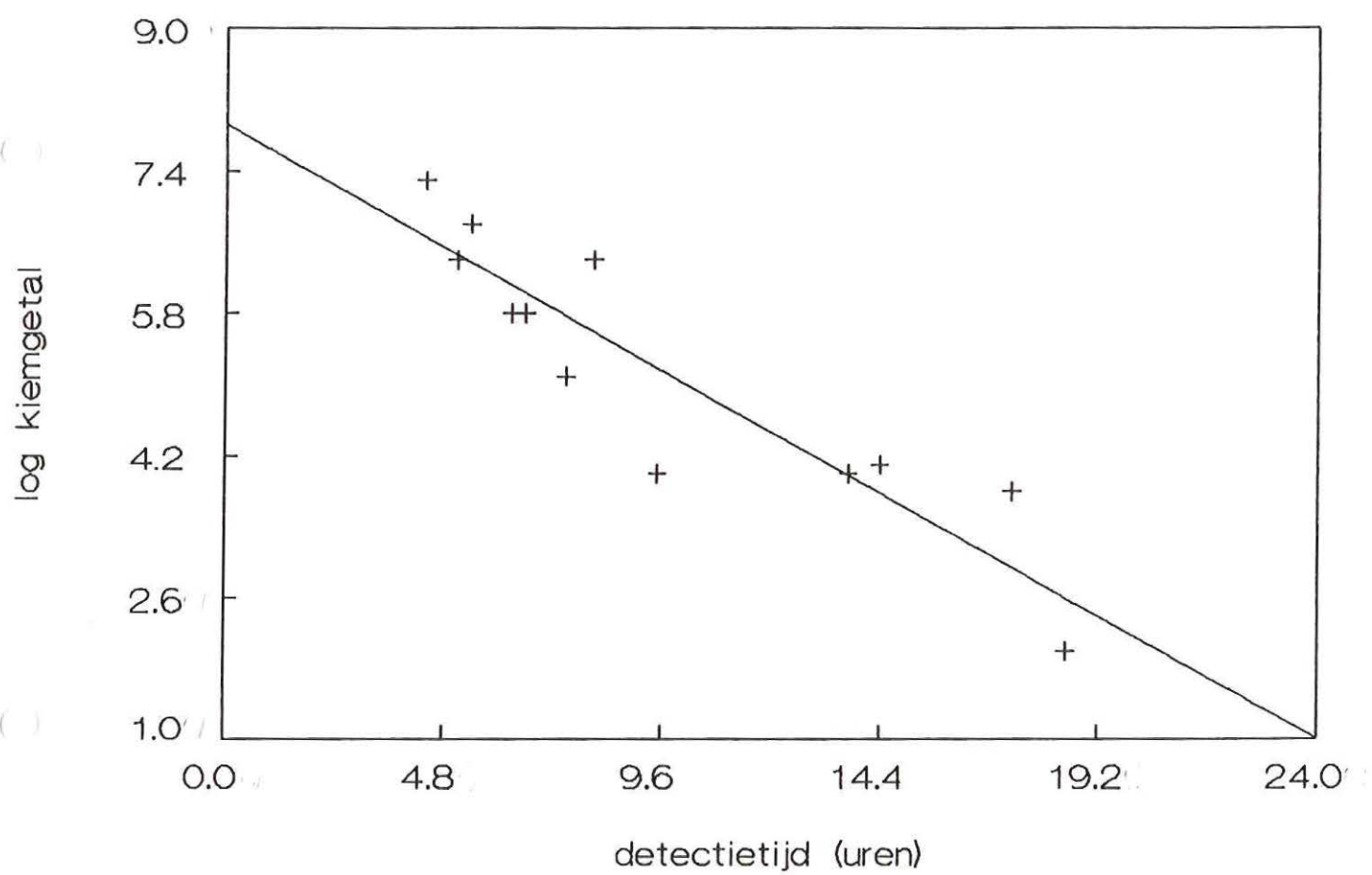


Figuur 10

Verband tussen kiemgetal en detectietijd van 17 gepasteuriseerde monsters eiprodukten.

Figuur 11

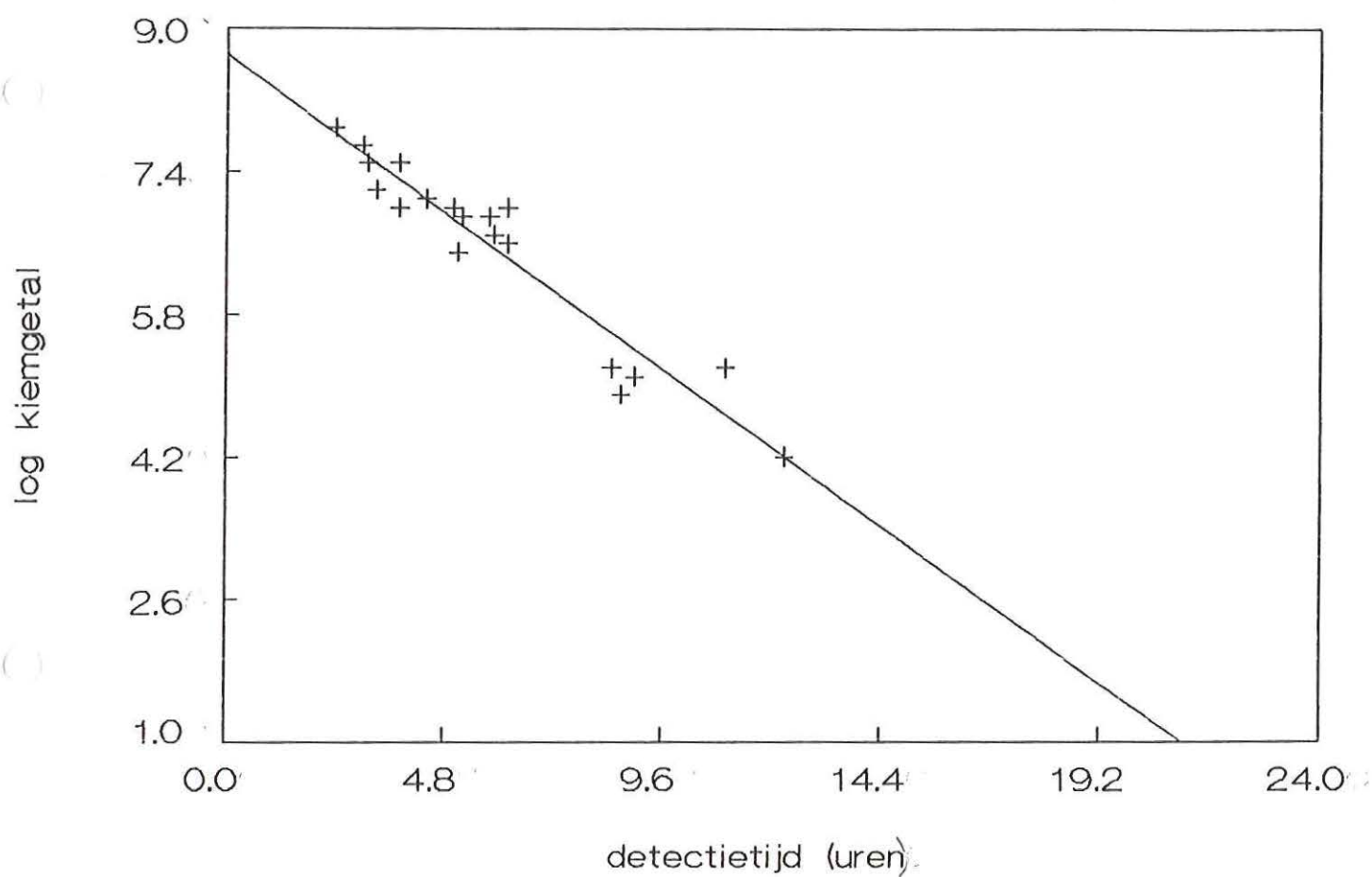
Behandeling 3
heelei na breekmachine



Vervolg bijlage E

Figuur 12

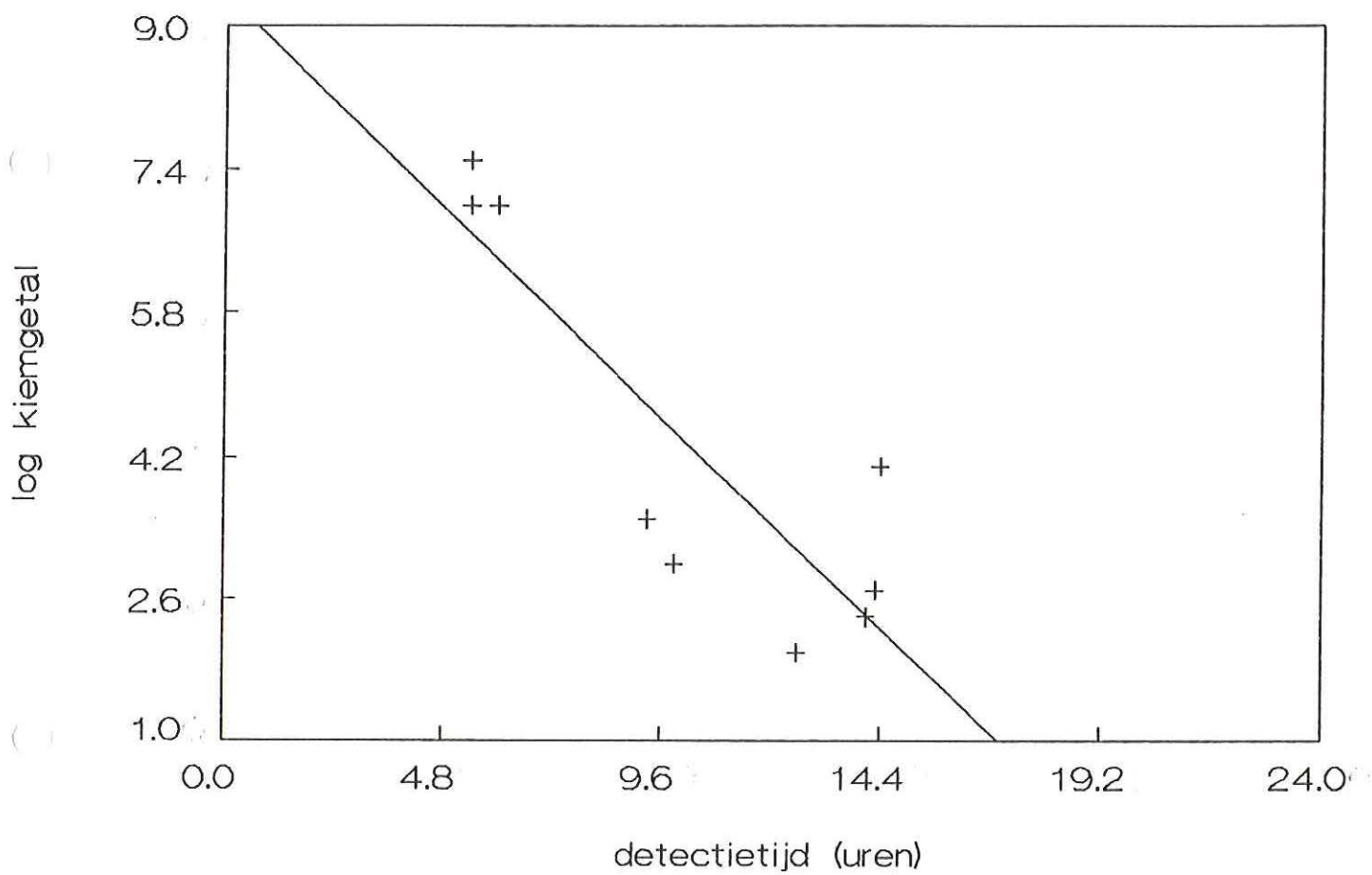
Behandeling 4
Heelei na centrifuge

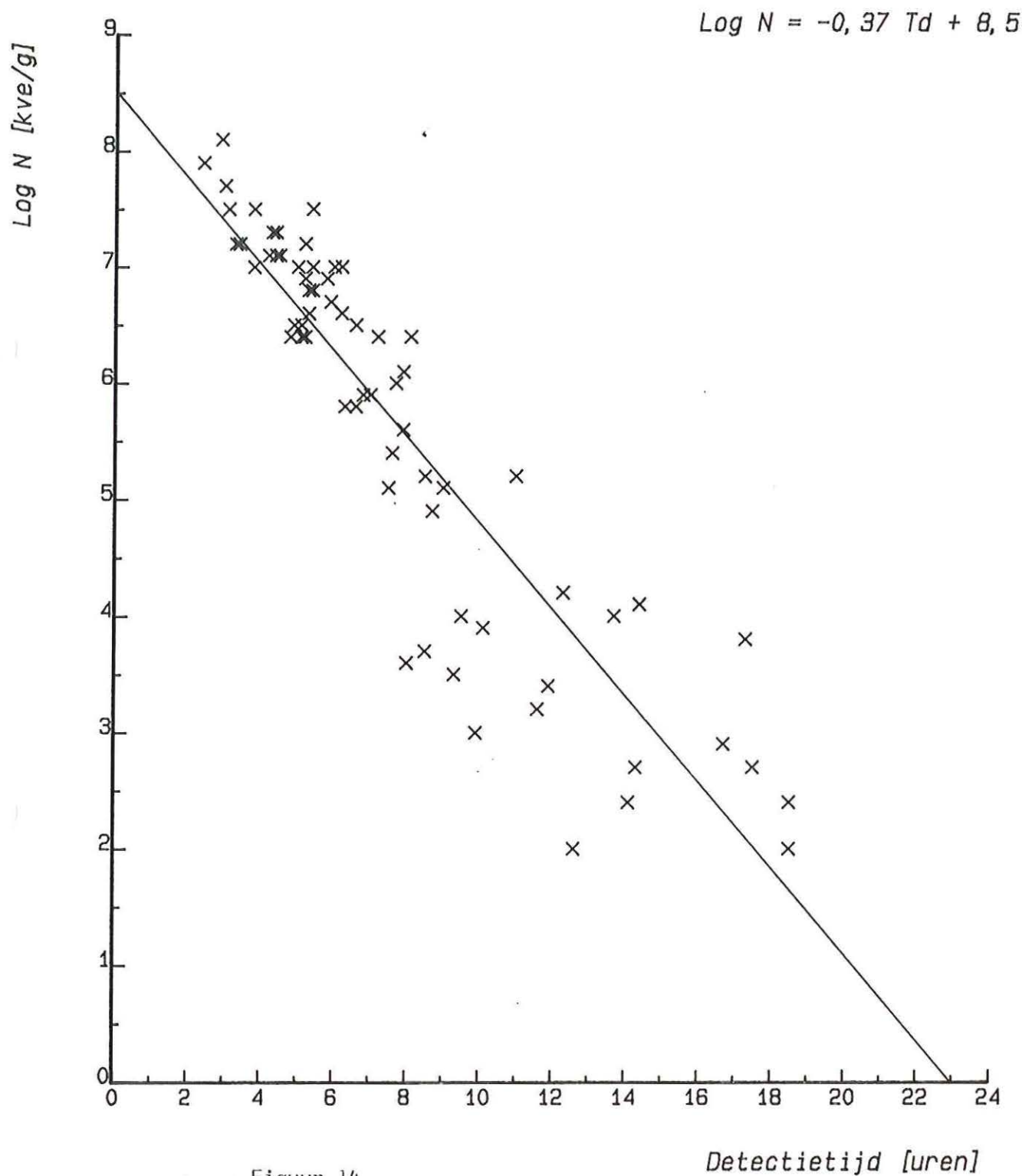


Vervolg bijlage E

Figuur 13

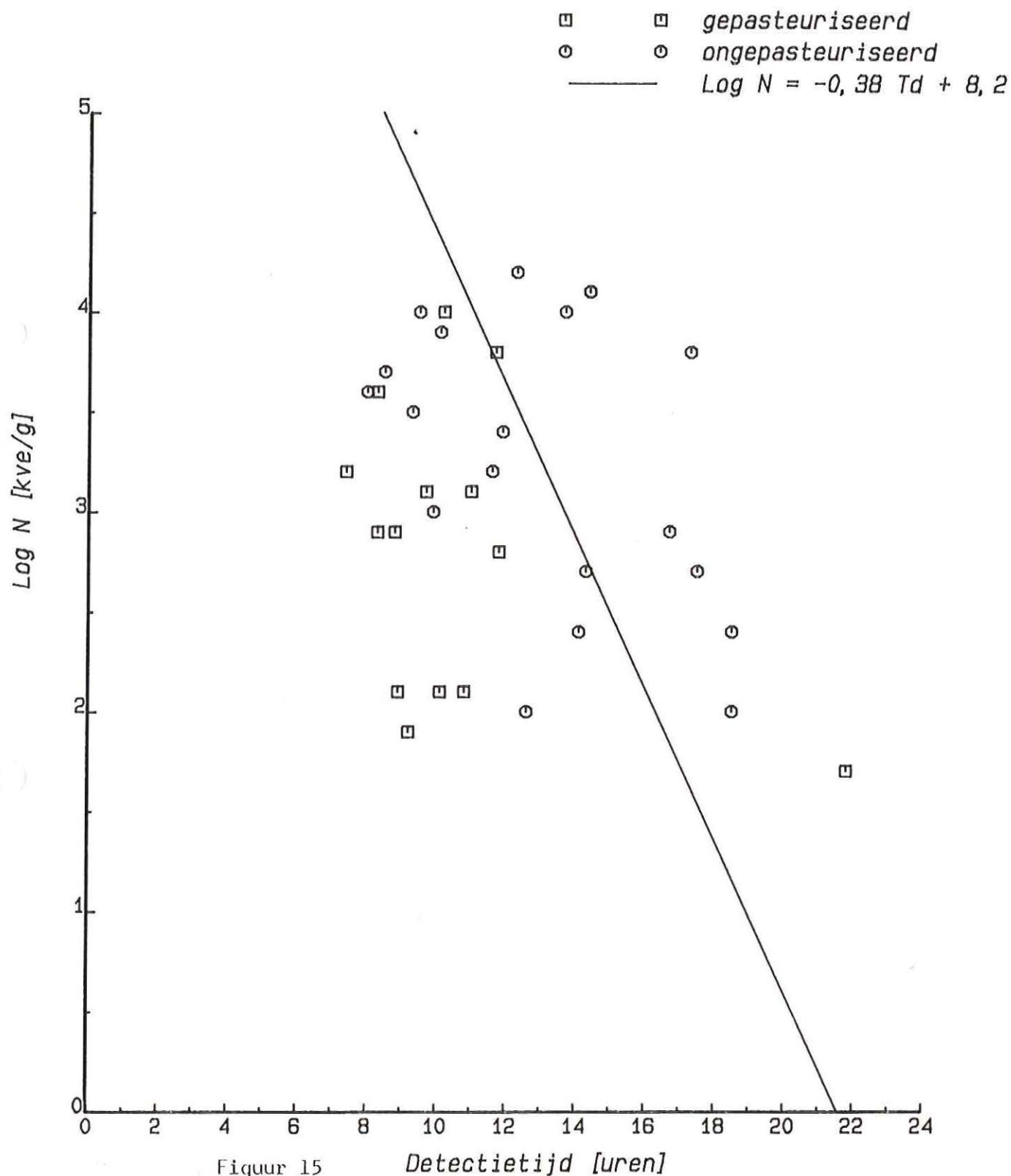
Behandeling 5
Produkten na fermentatie





. Figuur 14

Verband tussen kiemgetal en detectietijd van 67
ongepasteuriseerde monsters eiprodukten.



Figuur 15

Verband tussen kiemgetal en detectietijd van 34 (on)gepasteuriseerde monsters eiprodukten met $\log N < 4,7$ (Regressielijn uit alle 92 monsters).