

Original researches

Contamination of Frozen Fish with Mesophilic and Psychrotrophic Microorganisms Depending on Biochemical Quality Indices

Received: 12 July 2018
Revised: 25 July 2018
Accepted: 27 July 2018

National Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary-Sanitary Examination, Donetska Str., 30, Kyiv, 03151, Ukraine

Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ruska Str., 56, Ternopil, 46001, Ukraine

Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine, NAAS, Troleibusna Str., 12, Ternopil, 46001, Ukraine

Tel.: +38-099-138-66-10
+38-097-239-20-57
+38-067-290-92-92

E-mail: z_malimon@ukr.net
kuchtynnic@gmail.com
yperkiy@ukr.net

Cite this article: Malimon, Z. V., Kukhtyn, M. D., & Perkiy, Y. B. (2018). Contamination of frozen fish with mesophilic and psychrotrophic microorganisms depending on biochemical quality indices. *Theoretical and Applied Veterinary Medicine*, 6(3), 39–43. doi: 10.32819/2018.63008

Z. V. Malimon¹, M. D. Kukhtyn², Y. B. Perkiy³

¹National Research Institute for Laboratory Diagnostics and Veterinary-Sanitary Examination, Kyiv, Ukraine

²Ternopil Ivan Puluj National Technical University, Ternopil, Ukraine

³Ternopil Research Station of the Institute of Veterinary Medicine, NAAS, Ternopil, Ukraine

Abstract. Because of the high nutritional and biological value, fish is a good nutrient for the development of all groups of microorganisms, making it a perishable kind of food. The conditions of fish storage require appropriate temperature regimes to stop the development of microorganisms. The purpose of the research is to investigate the bioassay of frozen mesophilic and psychrotrophic microflora, depending on the biochemical parameters which characterize its freshness. Mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms in samples were found at a temperature of 30 ± 1 °C within bioassay incubation for 72 hours and psychrotrophic microflora at a temperature of 6.5 ± 0.5 °C within incubation for 10 days. Biochemical parameters include reaction with copper sulfate, peroxidase, total volatile base nitrogen and pH by generally accepted methods. It was discovered that frozen fish in reaction with copper sulfate, that was prior classified as fresh and benign, according to the content of mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms, in of 25% of cases on average did not meet the microbiological standard of DSTU 4868:2007. At the same time, approximately 70% of samples of frozen fish which contained psychrotrophic microflora were found to be higher than established norm for mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms, and $25.9 \pm 1.4\%$ of samples exceeded the number of 100.000 CFU/g. It was determined that for a positive reaction to peroxidase, the number of frozen fish samples complying with the microbiological standard according to the content of mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms was $64.9 \pm 2.7\%$, which is 1.6 times higher than in samples with such quantity of psychrotrophic microorganisms. The benign fish in response to peroxidase was contaminated with mesophilic microflora from 50.000 to 1 million CFU/g in $32.5 \pm 1.3\%$ of cases, and with psychrotrophic microflora 1.7 times more. This indicates a significant insemination of the fish microflora, which, based on the results of studies on peroxidase, is fresh. For a negative reaction to volatile base nitrogen, 30% of frozen fish samples, which were contaminated with mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms, were found to have more than 50.000 CFU/g and $46.2\% \pm 1.8\%$ of psychrotrophs. It was established that 48% of fish samples according to the content of mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms and 57.6% by content of psychrotrophs did not meet the microbiological standard of DSTU 4868:2007 for the pH quality indicator in fresh fish. Consequently, the results of the research indicate that with satisfactory biochemical parameters of frozen fish in reaction with copper sulfate, peroxidase, the content of total volatile base nitrogen and pH, 25–50% of fish samples with over-normative (more than 50.000 CFU/g) content of mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms. It was discovered that the psychrotrophic microflora is quantitatively predominant in the content of mesophilic aerobic and elective anaerobic organisms of frozen fish. In fish samples, which according to biochemical parameters are related to benign fresh, psychrotrophs exceeded the number of 50.000 CFU/g in 60–70% of cases.

Keywords: fish, psychrotrophic microflora, mesophilic microflora, biochemical indices.

Контамінація мезофільними та психротрофними мікроорганізмами замороженої риби залежно від біохімічних показників якості

З. В. Малімон¹, М. Д. Кухтин², Ю. Б. Перкій³

¹Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, м. Київ, Україна

²Тернопільський національний технічний університет імені І. Пулюя, м. Тернопіль, Україна

³Тернопільська дослідна станція Інституту ветеринарної медицини, м. Тернопіль, Україна

Анотація. Встановлено рівень обсіменіння замороженої риби мезофільною та психротрофною мікрофлорою, залежно від біохімічних показників, що ха-рактеризують її свіжість. Заморожену рибу, яка за результатами досліджень у реакції з сірчанокис-

лою міддю, відносили до свіжої – доброякісної за вмістом МАФАНМ, у середньому в 25% випадків не відповідали допустимим рівням, зазначеним у ДСТУ 4868:2007. Виявлено близько 70% проб замороженої риби з умістом психротрофної мікрофлори більше визначеного нормативу для МАФАНМ, та $25,9 \pm 1,4\%$ проб, у яких рівень обсіменіння переважав кількість 100 тис. КУО/г. З'ясовано, що за позитивної реакції на пероксидазу (показник для свіжої риби) кількість проб замороженої риби, які відповідали за вмістом МАФАНМ, становила $64,9 \pm 2,7\%$, що в 1,6 раза більше, ніж проб із такою кількістю психротрофних мікроорганізмів. Доброякісна риба за реакцією на пероксидазу контамінована мезофільною мікрофлорою від 50 тис. до 1 млн КУО/г у $32,5 \pm 1,3\%$ випадків, а психротрофною мікрофлорою – в 1,7 раза більше. Це вказує на значне обсіменіння мікрофлорою риби, яка за результатами досліджень на пероксидазу свіжа. За негативної реакції на леткі основи азоту виявлено 30% проб замороженої риби, які контаміновані МАФАНМ понад 50 тис. КУО/г та $46,2 \pm 1,8\%$ проб – психротрофами, 48% проб риби – за вмістом МАФАНМ і 57,6% за вмістом психротрофів не відповідали нормативу, згідно з ДСТУ 4868:2007, показника рН, властивого для свіжої риби. За задовільних біохімічних показників замороженої риби реакція зі сірчаною кислотою міддю, реакція на пероксидазу, вміст загальних летких основ азоту та рН виявляються від 25% до 50% проб риби з перевищеним умістом МАФАНМ (більше 50 тис. КУО/г). Психротрофна мікрофлора кількісно переважає вміст МАФАНМ замороженої риби. У пробах риби, які за біохімічними показниками відносили до доброякісної свіжої, психротрофи в 60–70% випадків переважали кількість у 50 тис. КУО/г.

Ключові слова: свіжість риби, психротрофна мікрофлора, мезофільна мікрофлора, біохімічні показники, якість.

Вступ

Головне завдання ветеринарно-санітарного контролю харчових продуктів полягає в забезпеченні надходження доброякісної продукції шляхом здійснення постійного нагляду за дотриманням санітарно-гігієнічних вимог і системного санітарно-мікробіологічного контролю (AbdElNady et al., 2017).

Вважають, що основним кількісним мікробіологічним тестом є МАФАНМ продукту – кількість мезофільних аеробних і факультативно-анаеробних мікроорганізмів, що утворили колонії на щільному живильному середовищі під час посіву 1 г чи 1 см³ продукту при культивуванні посівів за температури +30–37 °С протягом 48–72 год (Daczowska-Kozon & Morales-Huaman, 1987; Kapreliants et al., 2006). Дані МАФАНМ вказують на розвиток переважно мезофільних сапрофітних мікроорганізмів, зокрема гнильних спорових і неспорових бактерій груп кишкових паличок, кокової мікрофлори (стафілококів, мікрококів, сарцин) та деяких патогенних бактерій, наприклад, сальмонел (Kareliants et al., 2006; Ercolini et al., 2009). Тому чим вище мікробне обсіменіння харчового продукту, тим більша ймовірність присутності в ньому патогенних мікроорганізмів (Sanjee & Karim, 2016; Tolstorebrov et al., 2016).

Згідно з результатами досліджень, кількісний уміст МАФАНМ не має значення для харчових продуктів, які зберігаються за низьких температур холодильника, оскільки значна частина мезофільної мікрофлори гине під час зберігання за температури –5 °С і нижче (Akinbowale et al., 2006; Usyus et al., 2008; Ercolini et al., 2009; Kobayashi & Park, 2017; Salata et al., 2017a; Roiha et al., 2018). Для мікробіологічної оцінки сировини та харчових продуктів, які зберігають в умовах холодильника (охолоджене, приморожене, заморожене м'ясо і риба), кращим є визначення психротрофних (холодолюбних) мікроорганізмів за інкубації посівів від +5 до +7 °С протягом 10 діб (Zambuchini et al., 2008; Ercolini et al., 2009; Salata et al., 2017a). Однак згідно з ДСТУ 4868:2007 Риба заморожена. Технічні умови (2008) дозволяється в реалізацію заморожена риба з умістом МАФАНМ до 50 тис. КУО/г, бактерії групи кишкових паличок не дозволені в 0,001 г риби, а золотистий стафілокок – у 0,01 г. Дослідження з визначення обсіменіння замороженої риби психротрофною мікрофлорою цим стандартом не передбачені.

Актуальним є проведення комплексних досліджень із визначення контамінації замороженої риби мезофільними та психротрофними мікроорганізмами, яка за біохімічними показниками відповідає свіжій доброякісній (Omoguyi & Abolagba, 2015). Отримані в такий спосіб дані дадуть можливість охарактеризувати рівень санітарно-гігієнічних умов виробництва, холодильного зберігання та транспортування замороженої риби щодо контамінації найчисельнішою групою мікрофлори, яка призводить до мікробного псування.

Мета роботи – виявити обсіменіння замороженої риби мезофільною і психротрофною мікрофлорою залежно від біохімічних показників, які визначають її свіжість.

Матеріал і методи досліджень

Робота виконана в Державному науково-дослідному інституті з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи (ДНДЛДВСЕ, м. Київ) та в Тернопільській дослідній станції Інституту ветеринарної медицини НААН України.

Досліджено 175 проб замороженої риби за мікробіологічними та біохімічними показниками. Проби відбирали та готували для мікробіологічних досліджень згідно з ДСТУ 4868:2007 Риба заморожена. Технічні умови (2008). У пробах визначали МАФАНМ за температури 30 ± 1 °С, інкубацію посівів – протягом 72 год та психротрофну мікрофлору за температури $6,5 \pm 0,5$ °С; інкубація –10 діб (Salata et al., 2017b; 2018).

Біохімічні показники (реакція зі сірчаною кислотою міддю, на пероксидазу, кількість загальних летких основ азоту та рН) – загально визначеними методами. У дослідженнях використано проби риби з невиявленими антибіотиками мікробіологічним методом.

Статистичну обробку результатів дослідження здійснювали за загально визначеними методами варіаційної статистики. Різницю між порівнюваними величинами вважали достовірною за $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення

Наведено дослідження з розподілу проб замороженої риби за вмістом мезофільної та психротрофної мікрофлори, які за показником реакції зі сірчаною кислотою міддю відносили до свіжої та доброякісної риби (рис. 1,а).

Показник реакції зі сірчаною кислотою міддю не може замінити мікробіологічні дослідження замороженої риби. Із проб риби, які в реакції зі сірчаною кислотою міддю відносили до свіжої, за вмістом МАФАНМ вкладалися в стандартний норматив (50 тис. КУО/г) $74,0 \pm 3,2\%$ проб. Близько 20% проб з умістом мезофільних мікроорганізмів до 1 млн КУО/г і більше 1 млн – $3,9 \pm 0,2\%$ проб. Взаємозв'язок між умістом психротрофної мікрофлори та реакцією зі сірчаною кислотою міддю в 2,1 раза ($p < 0,05$) менший порівняно з обсіменінням мезофільними мікроорганізмами до 50 тис. КУО/г. Психротрофна мікрофлора замороженої риби кількісно переважає мезофільну групу, проте тільки $31,7 \pm 1,5\%$ проб доброякісної риби за вмістом психротрофів відповідали рівню, визначеному для мезофільних мікроорганізмів 50 тис. КУО/г. Лише $42,4 \pm 2,1\%$ проб риби за вмістом психротрофної мікрофлори були в межах від 50 тис. КУО/г до 100 тис. КУО/г, $17,2 \pm 0,4\%$ – до 1 млн КУО/г і в 2,0 раза менше проб мали перевищення понад 1 млн КУО/г.

Отже, заморожена риба, яку за реакцією з сірчаною кислотою міддю відносили до свіжої – доброякісної, за вмістом МАФАНМ у середньому в 25% не вкладалися у визначений ДСТУ мікробіологічний норматив.

Одночасно, виявлено близько 70% проб замороженої риби з умістом психротрофної мікрофлори більше для визначеного нормативу для МАФАНМ, а 25,9 ± 1,4% проб містили психротрофні мікроорганізми, кількість яких перевищувала 100 тис. КУО/г. Загалом реакція зі сірчаною кислотою міддю не враховує обміненія психротрофною мікрофлорою.

Наведено результати досліджень із розподілу проб замороженої риби щодо вмісту МАФАНМ та психротрофної мікрофлори, які проявляли позитивну реакцію на пероксидазу, тобто рибу відносили до свіжої доброякісної (рис. 1, б). За позитивної реакції на пероксидазу кількість проб замороженої риби, що відповідали мікробіологічному нормативу за вмістом МАФАНМ, становила 64,9 ± 2,7, що в 1,6 раза (p < 0,05) більше, ніж проб із такою кількістю психротрофних мікроорганізмів. Доброякісна риба за реакцією на пероксидазу контамінована мезофільною мікрофлорою від 50 тис. до 1 млн КУО/г у 32,5 ± 1,3% випадків, а психротрофною – в 1,7 раза більше (p < 0,05). Це вказує на можливість значного обміненія мікрофлорою риби, яку за цією реакцією відносили до свіжої. Крім того, виявлено 5,3 ± 0,2% проб риби, рівень обміненія яких перевищував 1 млн КУО/г психротрофною

мікрофлорою, що в середньому удвічі (p < 0,05) більше, ніж проб, які контаміновані мезофільними мікроорганізмами. У цілому позитивна реакція на пероксидазу замороженої риби в меншій мірі співпадає з визначеним мікробіологічним нормативом для МАФАНМ відносно реакції зі сірчаною кислотою міддю. Наведено результати досліджень із розподілу проб замороженої риби щодо вмісту МАФАНМ та психротрофної мікрофлори, які за показником загальних летких основ азоту відносили до доброякісної свіжої риби (рис. 2, а).

Проби замороженої риби, у яких загальна кількість летких основ азоту не перевищувала МДР у 30 мг/100 г, контаміновані МАФАНМ до 50 тис. КУО/г у 71,4 ± 4,3% випадків, а психротрофною мікрофлорою в 1,3 раза (p < 0,05) менше. Виявлено у 2,2 раза (p < 0,05) більше проб замороженої риби з умістом психротрофів від 50 до 100 тис. КУО/г порівняно з кількістю МАФАНМ. Проби доброякісної риби за вмістом летких основ азоту контаміновані МАФАНМ і психротрофами в 10,4% і 9,1% випадків, відповідно, в кількості від 100 тис. до 1 млн КУО/г.

Отже, отримані дані свідчать про те, що за негативної реакції на леткі основи азоту, припадає в середньому 30% проб замороженої риби, які контаміновані МАФАНМ більше 50 тис. КУО/г; і 46,2 ± 1,8% психротрофами.

Наведено дослідження щодо обміненія мікрофлорою замороженої риби, яку за показником рН відносили до доброякісної свіжої риби (рН 6,6–6,8 од.). За величини рН,

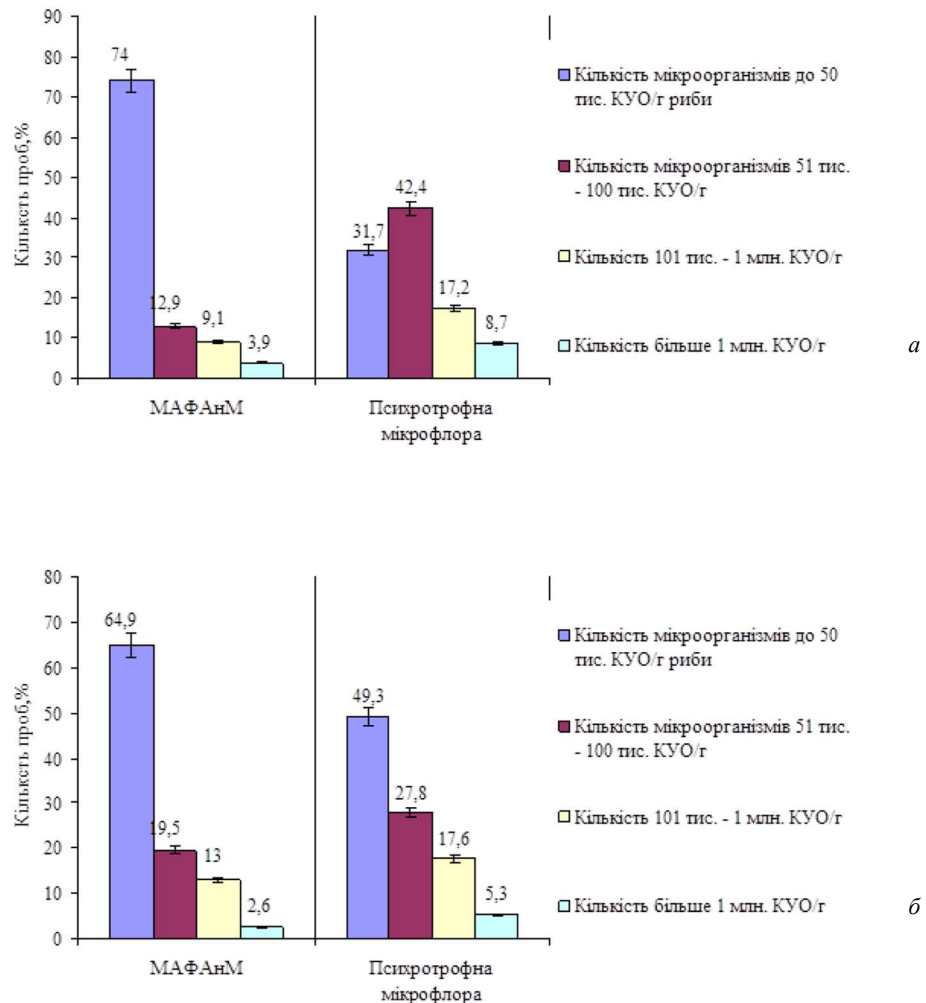


Рис. 1. Розподіл проб замороженої риби, які відносили до доброякісної свіжої риби за показником реакції: а – зі сірчаною кислотою міддю; б – на пероксидазу

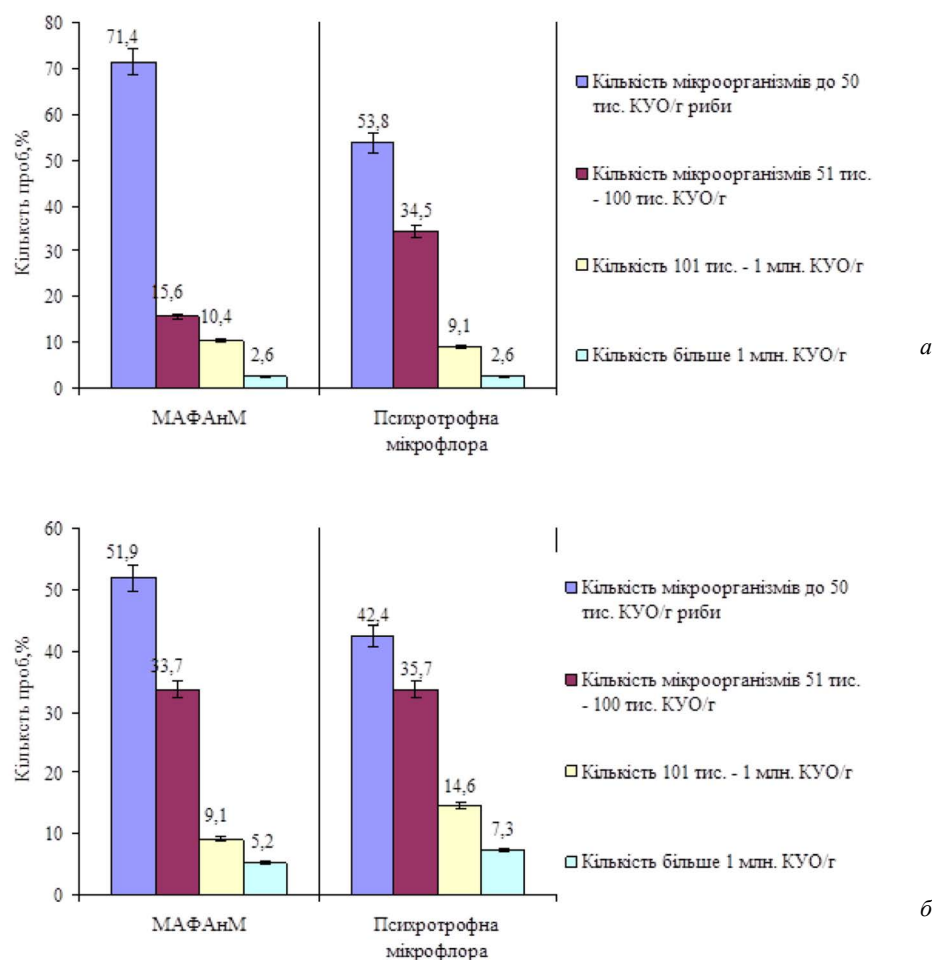


Рис. 2. Розподіл проб замороженої риби, які відносили до доброякісної свіжої риби: а – за показником загальних летких основ азоту; б – за показником рН.

яке характерне для свіжої риби (6,6–6,8 од.), кількість проб за вмістом МАФАНМ до 50 тис. КУО/г становила $51,9 \pm 2,7\%$, а за вмістом психротрофів у 1,2 раза ($p < 0,05$) менше (рис. 2,б). Тобто в середньому 48% проб риби за вмістом МАФАНМ не відповідали нормативу ДСТУ за показника рН, властивого для свіжої риби. У середньому $34,2 \pm 1,9\%$ проб доброякісної замороженої риби за показником рН контаміновані мезофільними і психротрофними мікроорганізмами від 50 до 100 тис. КУО/г. Виявлено збільшення в 1,6 раза ($p < 0,05$) кількості проб риби за вмістом психротрофної мікрофлори від 100 тис. до 1 млн КУО/г відносно кількості проб за вмістом МАФАНМ. В 1,4 раза ($p < 0,05$) більше виявлено проб із кількістю психротрофів понад 1 млн КУО/г, ніж проб із вмістом мезофільних мікроорганізмів.

Висновки

За задовільних біохімічних показників замороженої риби в реакції зі сірчаною кислотою міддю, на пероксидазу, вміст загальних летких основ азоту та величини рН виявляється від 25% до 50% проб риби з понаднормативним (більше 50 тис. КУО/г) вмістом МАФАНМ. Психротрофна мікрофлора кількісно переважає вміст МАФАНМ замороженої риби. У пробах риби, які за біохімічними показниками відносили до доброякісної

свіжої, психротрофи в 60–70% випадків переважали кількість у 50 тис. КУО/г.

Перспективи подальших розробок полягають у всебічному дослідженні обміненні замороженої риби психротрофною мікрофлорою та обґрунтування мікробіологічних критеріїв за вмістом цих мікроорганізмів. Удосконалення нормативно-правової документації щодо контролю замороженої риби імпортованого виробництва.

References

- AbdElHady, H., Ali, G., & Yassin, S. (2017). Assessment of the Bacterial Quality and Toxic Heavy Metal Residues of Frozen Fish Fillet In Kaferelsheikh Markets. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences*, 54(1), 108.
- Akinbowale, O. L., Peng, H., & Barton, M. D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology*, 100(5), 1103–1113.
- Daczowska-Kozon, E., & Morales-Huaman, M. (1987). Effect of frozen storage at -30°C on the survival of chosen indicator microorganisms in minced fish. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 17(1), 97–103.
- Ercolini, D., Russo, F., Nasi, A., Ferranti, P., & Villani, F. (2009). Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their

- Spoilage Potential In Vitro and in Beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(7), 1990–2001.
- Kapreliants, L. V., Pylypenko, L. M., Yehorova, A. V., Kananykhina, O. M., Kobielieva, S. M., & Velychko, T. O. (2006). *Tekhnichna mikrobiolohiia* [Technical microbiology]. Druk, Odesa (in Ukrainian).
- Roiha, I. S., Tveit, G. M., Backi, C. J., Jónsson, Á., Karlsdóttir, M., & Lunestad, B. T. (2018). Effects of controlled thawing media temperatures on quality and safety of prerigor frozen Atlantic cod (*Gadus morhua*). *LWT – Food Science and Technology*, 90, 138–144.
- Kobayashi, Y., & Park, J. W. (2017). Biochemical and physical characterizations of fish protein isolate and surimi prepared from fresh and frozen whole fish. *LWT*, 77, 200–207.
- Omoruyi, K., & Abolagba, O. (2015). Biochemical and organoleptic changes in some frozen commercially important freshwater fish species in Benin metropolis, Edo state, Nigeria. *Tropical Freshwater Biology*, 23(1), 65.
- Tolstorebrov, I., Eikevik, T. M., & Bantle, M. (2016). Effect of low and ultra-low temperature applications during freezing and frozen storage on quality parameters for fish. *International Journal of Refrigeration*, 63, 37–47.
- Sanjee, S. A., & Karim, M. E. (2016). Microbiological Quality Assessment of Frozen Fish and Fish Processing Materials from Bangladesh. *International Journal of Food Science*, 2016, 1–6.
- Salata, V. Z. & Kuchtin, M. D. (2017a). Mikroflora okholodzhenoï i prymorozhenoi yalovychyny za kholodylnoho zberihannia [Microflora of cooled and frozen beef for cooling storage]. *Problems of Zoengineering and Veterinary Medicine*, 34(2), 332–336 (in Ukrainian).
- Salata, V., Kuhtyn, M., Semanjuk, V., & Perkiy, Y. (2017b). Dynamics of microflora of chilled and frosted beef during storage. *Scientific Messenger of LNU of Veterinary Medicine and Biotechnologies*, 19(73), 178–182.
- Salata, V., Kukhtyn, M., & Perkiy, Y. (2018). The development of a method for psychotropic microflora segregation from frozen and iced meat and from the equipment of meat processing enterprises. *Science and Technology Bulletin of SRC for Biosafety and Environmental Control of AIC*, 6(1), 30–34.
- Usydus, Z., Szlinder-Richert, J., Polak-Juszczak, L., Kanderska, J., Adamczyk, M., Malesa-Ciecwierz, M., & Ruczynska, W. (2008). Food of marine origin: Between benefits and potential risks. Part I. Canned fish on the Polish market. *Food Chemistry*, 111(3), 556–563.
- Zambuchini, B., Fiorini, D., Verdenelli, M. C., Orpianesi, C., & Balini, R. (2008). Inhibition of microbiological activity during sole (*Solea solea* L.) chilled storage by applying ellagic and ascorbic acids. *LWT–Food Science and Technology*, 41(9), 1733–1738.