

- 38) Luckey, T. D.; B. Venugopal; D. Hutcheson: Heavy Metal Toxicity, Safety and Hormonology. Georg Thieme Publishers, Stuttgart/Academic Press, New York, (1975).
- 39) Lüthi, H.: Toleranzen für Schwermetalle in Fruchtsäften. Flüssiges Obst, 29, 11—14, (1962).
- 40) Oelschläger, W.: Composition of particulate motor vehicle emissions and their effect on agriculturally useful animals. Staub-Reinhalt. Luft, 32, 243—247, (1972).
- 41) Oelschläger, W.; E. Frenkel: Bestimmung von Blei in pflanzlichen und tierischen Materialien, sowie in Mineralfuttermitteln mit Hilfe der AAS. Landwirtsch. Forsch., 26, 281—292, (1973).
- 42) Page, A. L.; T. J. Ganje; M. S. Joshi: Lead quantities in plants, soil, and air near some major highways in Southern California. Hilgardia, 41, 1—31, (1971).
- 43) Quinche, J.-P.; J. Curzydlo: La pollution des prairies riveraines de l'autoroute Lausanne-Genève par le plomb de gaz d'échappement des véhicules automobiles. Revue Suisse d'Agriculture, 4, 196—202, (1972).
- 44) Somers, E.: The toxic potential of trace metals in foods. J. of Food Science, 39, 215—217, (1974).
- 45) Sommer, G.; A. Rosopulo; J. Klee: Die Bleikontamination von Pflanzen und Böden verursacht durch Kraftfahrzeugabgase. Z. Pflanzenernähr. Bodenk., 130, 193—205, (1971).
- 46) Teworte, W.: Blei, Zink, Cadmium. Gewinnung, Einsatz und Emissionen. Staub-Reinhalt. Luft, 33, 422—431 (1973).
- 47) Thomas, B.; J. A. Roughan: Lead and cadmium content of some vegetable foodstuffs. J. of the Science of Food Agriculture, 23, 1493—1498, (1972).
- 48) Thomas, B.; J. A. Roughan; E. D. Watters: Lead and cadmium content of some canned fruit and vegetables. J. of the Science of Food Agriculture, 24, 447—449, (1973).
- 49) Vetter, H.: R. Mählhop: Untersuchungen über Blei-, Zink- und Fluor-Immissionen und dadurch verursachte Schäden an Pflanzen und Tieren. Landw. Forsch., 24, 294—315, (1971).
- 50) Wallrauch, S.: Blei- und Cadmiumgehalte von Fruchtsäften und Traubenmosten. Flüssiges Obst, 41, 134—135, (1974).
- 51) Zuber, R.; E. Bovay; W. Tschannen: Das Blei aus Motorfahrzeugabgasen. Seine Akkumulation auf Pflanzen und die damit verbundenen Gefahren. Schweiz. Landwirtsch. Monatshefte, 49, 249—261, (1971).

Aus dem Institut für Biochemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei, Hamburg

## Die Bakteriologie des Verderbens von Frischfisch — ihre Probleme und deren Lösungsmöglichkeiten

Von G. Karnop

### 1. Einleitung

Die lebensmittel-mikrobiologischen Untersuchungen der letzten Jahrzehnte sind — auch was den Fisch betrifft — fast ausschließlich im Interesse möglicher toxischer Effekte beim Verzehr von Lebensmitteln angetrieben worden. Damit stand also die Wirkung von Bakterien auf den Menschen stark im Vordergrund. Die Kategorie der saprophytären Keime gehört dagegen auch heute noch zu der am schlechtesten studierten. Da Untersuchungen über den Mechanismus des Verderbens, d. h. die Auswirkung der Bakterien gegenüber dem Lebensmittel, selten sind, ergibt sich auf diesem Gebiet insgesamt eine sehr unbefriedigende Situation bezüglich der Bewertung bakteriologischer Befunde. So sind denn auch die bei den bekannten Standardmethoden und -werten im Bereich der mikrobiologischen Qualitätsuntersuchung auftretenden Schwierigkeiten bisher meist dadurch umgangen worden, daß man sich so weit wie möglich auf andere als mikrobiologische Verfahren verlegt hat.

Im Zusammenhang mit der Bewertung von Ergebnissen auf dem Sektor des Verderbens von Frischfisch durch saprophytische Mikroorganismen werden vor allem fünf große Fragenkomplexe angesprochen:

1. Welche Aussagekraft haben Gesamt-Aerobenkeimzahlen?
2. Auf welche Bakterientätigkeiten lassen sich Verderberscheinungen zurückführen?
3. Gibt es Bakterienarten, die für bestimmte Stadien des Qualitätsabfalls bzw. Verderbens charakteristisch sind?
4. Ändert sich die biologische Aktivität der während der Eislagerung der Fische auftretenden Keime derart, daß hieraus Rückschlüsse auf Lager- oder Qualitätszustände gezogen werden können?
5. Ist es möglich, speziell für den Ganzfisch ein relevantes Durchschnittsmuster für die mikrobiologische Qualitätserhebung festzulegen?

Von der Lösung der Fragen 1 und 2 hängt die Erklärung der sensorischen und chemischen Qualitätsveränderungen während der Eislagerung ab.

Angesichts dieser Themen erhebt sich die Frage, vor welcher Situation die Verderbsbakteriologie heute

und speziell beim Ganzfisch steht. Welche Erkenntnislücken gibt es, und wie wäre eine Lösung der wichtigsten offenen Fragen möglich?

### 2. Die Beeinflussung des diagnostischen Werts von Gesamtkeimgehalten (Gesamt-Aerobenkeimzahlen) durch räumliche Verteilung und Einwirkungsdauer der Bakterien.

Die Bestimmung von Gesamtkeimgehalten an sich ist unkritisch, denn sie stellt einen methodisch genau definierten Teil der bakteriologischen Aussage dar, obwohl auch der quantitative Test mit einer gewissen Fehlerbreite behaftet ist. Kritisch ist dagegen die Bewertung der Ergebnisse, denn es müssen Faktoren wie z. B. die Lokalisation der Keime oder die Einwirkungsdauer berücksichtigt werden. Hierdurch ergibt sich ein fundamentaler Unterschied gegenüber dem Arbeiten mit gesundheitsgefährdenden Keimen, bei denen die Lokalisation im Substrat meist ebenso unwichtig ist wie die Besiedlungsdauer; hier interessieren nur Bedeutung und Menge ganz bestimmter Keime, wobei anstelle der Bedeutung ein systematischer Begriff gesetzt werden kann.

Im allgemeinen wird der sensorisch wirkungsfreie Grenzkeimgehalt unter der Voraussetzung einer am Ort entstandenen Flora von homogener Verteilung im Produkt mit max.  $10^6$  bis  $10^7/g$  angegeben<sup>1, 2)</sup>. Es ist jedoch schon beim Fischfilet nicht ohne weiteres zu entscheiden, ob eine Flora autochthon entstanden ist oder ob nur beim Filetieren ursprünglich keimarmes Gewebe durch die stärker belastete Haut heftig kontaminiert wurde, wodurch eine fortgeschrittene Entwicklung vorgetäuscht wird. Beim Ganzfisch bestehen noch kompliziertere Zusammenhänge, weil hier die Geschwindigkeit des Verderbens in starkem Maße von der Lokalisation der Bakterien beeinflußt wird. Verderbsbakterien kommen beim Ganzfisch anfangs nur auf

der Schleimschicht der Haut vor. Die Hautpassage durch die Epidermis- und Cutisschicht ist zunächst nicht den Bakterien, sondern nur deren niedermolekularen Abbauprodukten vorbehalten. Erst später dringen auch Bakterien percutan in uneröffnete Muskelpartien ein. Aus den verschieden langen percutanen Infektionszeiten — langsames Eindringen durch Hautporen oder Sofortinfektion des Gewebes nach Verletzungen — ergibt sich daher in Verbindung mit dem vermutlich unterschiedlichen Penetrationsvermögen der einzelnen Mikroorganismen ein von Fall zu Fall sehr verschieden starkes Wirkungsfeld der Keime, je nachdem, wann und wieviele Bakterien einerseits von der Haut her, andererseits im Gewebe selbst Umsetzungsreaktionen am Substrat vollziehen. Die Projektion saprophytischer Keimgehalte von derart unterschiedlicher Bedeutung auf den ganzen Fischkörper ist ein sehr wesentliches Problem für die Beurteilung. Sie bringt eine große Unsicherheit in die Bewertung von Gesamtkeimgehalten.

Die Wirkungsfelder sind nach Stärke und Ausmaß noch ungeklärt. Sie hängen nicht nur von evtl. Verletzungen der Haut ab (lokale Herdbildung), sondern auch von dem jeweiligen Penetrationswiderstand, den verschiedene Häute bilden (Hering gegenüber Rotbarsch), dem verschieden langen Schutz des Gewebes durch die Totenstarre, der Einwirkungsdauer successiver Bakterienpopulationen und weiteren Einflußgrößen.

Der sensorische Befund, den es letztlich zu untermauern gilt, ist die Summe von bakteriellen Umsetzungsreaktionen aus allen vorher durchlaufenen Stadien. Er leitet sich daher nicht direkt aus einem momentanen Gesamtkeimgehalt ab. Schon aus diesem Grunde ist es kaum möglich, aus dem bakteriologischen status praesens ein Qualitätsbild zu entwerfen. Gesamtkeimgehalte haben entsprechend dem Zeitraum, in dem die Bakterien einwirken konnten, ein sehr unterschiedliches Gewicht. Keimgehalte von z. B. einigen  $10^4/g$  subcutanem Gewebe sagen in den ersten Eislagertagen beim Ganzfisch nichts über das Verderbstadium aus, denn es handelt sich dann meist um eine lokale Herdbildung als Folge von Hautverletzungen. Ein gleich hoher Keimgehalt, der am 10. Tag in tiefen Muskelpartien gefunden wird, bedeutet dagegen eine Migration der Bakterien von der nunmehr stark belasteten Schleimschicht der Haut aus. Er muß aufgrund der längeren Vorgeschichte anders bewertet werden und wirkt sich meist schon sensorisch und chemisch aus.

Gewebekeimgehalte sind allen Erkenntnissen nach beim Ganzfisch nur sehr bedingt verwertbare mikrobiologische Verderbsindikatoren. Der bekannte Mangel einer ausreichenden Korrelation mit der Lagerzeit und der Qualität, der immer wieder gefunden wurde, ist eine Anzeige dafür, daß beim Ganzfisch noch viele unbekannte Zusammenhänge zwischen der lokalen Keimverteilung im und auf dem Fisch und der chemisch-sensorischen Qualität aufgedeckt werden müssen.

### 3. Der Verderb als Folge verschiedener Verderbspotentiale der Bakterien.

Noch weitgehend unbekannt sind heute die biologischen Aktivitäten der jeweiligen Belastungsfloren, die den Charakter des Verderbs bestimmen. Der Grund

für den Mangel an Wissen auf diesem Gebiet bzw. des Desinteresses ist wohl der, daß Mikrobiologen zu sehr den Metabolismus der Bakterien übersehen, Chemiker andererseits oft nicht das Prozeßhafte in den Bakterien berücksichtigen, sondern nur an das Substrat denken. Es ist bekannt, daß in einem Ganzfisch ein Keimgehalt von z. B.  $10^4/g$  mit sehr verschiedenen Sensoriknoten und chemischen Werten verbunden sein kann. Dies hängt nicht nur vom Ort der Bakterienentwicklung und der Einwirkungsdauer ab, sondern auch vom Charakter der Verderbserreger. Stoffwechselaktiven Keimen kommt ein anderes Gewicht zu als weitgehend inaktiven<sup>3)</sup>. Das wiederum beeinflusst eine Prognose über die Haltbarkeit. Gelegentlich sieht man sehr deutlich, daß eine hohe Zahl inaktiver Keime einer niedrigeren Zahl aktiver Keime äquivalent ist<sup>4)</sup>. Fast in allen Saprophytengruppen gibt es neben aktiven auch inaktive Keime. Die Aktivität wiederum wird u. a. vom Grad der Aerobiose beeinflusst, weshalb z. B. beim vakuumverpackten Frischfisch andere Endprodukte des Bakterienstoffwechsels entstehen können als beim unverpackten.

Der sensorische Befund hängt auch von ganz spezifischen Substratveränderungen ab. So ist die Entwicklung eines  $H_2S$ -artigen Geruchs oder Geschmacks nicht dem Auftreten von Keimen eines nach klassischen Gesichtspunkten definierten Genus zuzuschreiben, das nach dem Angriff auf Kohlenstoffquellen definiert wurde, sondern Bakterien eines speziellen, bisher nicht beschriebenen Typs mit dem Merkmal der Spaltungsfähigkeit von Schwefel-Aminosäuren. Die Entstehung ammoniakalischer Abbauprodukte geht ganz allgemein auf die Desaminierung von Aminosäuren zurück, woran Keime aus den verschiedensten Saprophytengruppen beteiligt sind, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß. Die Veränderung der pH-Werte ist zum großen Teil eine Widerspiegelung bakterieller Desaminierungsprozesse. Verschiedene Keime sind zum Abbau des  $\beta$ -Alanins befähigt, wodurch sich bei Leng und Seelachs im Laufe des Verderbs die ursprünglich graublauere Farbe in charakteristischer Weise nach rosa umwandelt<sup>5)</sup>. Für die Ansammlung bestimmter Amine in Konzentrationen, die für den Menschen physiologisch wirksam sind, kommen keineswegs nur die bekannten gesundheitsgefährdenden Keime in Betracht, sondern z. B. im Fall des Histamins das Verhältnis zwischen Histidin- und Histamin-spaltenden Keimen aller Art und nicht die Gesamtkeimzahl schlechthin.

So sind die Hauptcharakteristiken des Verderbs und die Entstehung spezifischer Schadbilder nicht ein Ergebnis von Keimzahlen oder Bakterien-Taxa an sich, sondern die Folge des Auftretens bestimmter Keimtypen und ihres Verhältnisses zueinander. Die vergebliche Suche nach Indikatorkeimen auf der Basis der bestehenden Saprophyten-Taxonomie hat bereits gezeigt, daß sich der Verderb nicht nach der Bakterien-Systematik richtet.

Über die spezifische Aktivität, die Verderbskeime am Fischsubstrat entwickeln können, ist nur sehr wenig bekannt. Relativ häufig wird noch die proteolytische Aktivität der Keime erwähnt. Wenn jedoch behauptet wird, daß z. B. Pseudomonaden starke Proteolytenseien, so ist dies eine Pauschalaussage, die eine starre Anknüpfung an die Systematik verrät, aber beim Fischverderb in sehr vielen Fällen unrichtig ist. Es stehen nur wenige Ergebnisse aus Beimpfungsver-

suchen steriler Muskelblöcke mit Reinkulturen zur Verfügung, und es gibt nur eine Bewertung gewisser Pseudomonaden an Fischprodukten<sup>6-12</sup>). Was jedoch ganz fehlt, ist die Abschätzung der Aktivität kompletter Floren, die sich aus Synergismen, Protagonismen und Antagonismen der verschiedenen Glieder der Populationen ergibt. Da es nicht möglich ist, die von einer Vielzahl komplizierter Mechanismen abhängige in-vivo-Aktivität einzelner Saprophyten oder ganzer Floren komplett zu bestimmen, müssen für die Aktivitätsbestimmung notgedrungen gewisse Hilfsdefinitionen gesucht werden, wenn auch deren prädiktiver Wert in vielen Fällen mit einem Unsicherheitsfaktor unbekannter Größe verbunden sein wird. Es gibt im wesentlichen nur zaghafte Versuche zur Charakterisierung fischverderbender Keime nach dem proteolytischen und lipolytischen Verhalten, wobei erstmals die Grenzen bestehender systematischer Einheiten übersprungen werden. Der Wert von Proteolyten- und Lipolytenzahlen ist jedoch ganz ungewiß.

Wie bei den gesundheitsgefährdenden Keimen muß auch bei den Saprophyten des Fischverderbs erst das Schadbild am Substrat bekannt sein; danach kann ein Bestimmungsverfahren für den entsprechenden Keim ausgearbeitet werden, und sei es mit Hilfe des Abbaus von Holzzuckern. Kennt man die Bedeutung der Keime nicht, wird auch jede Systematik fischverderbender Bakterien sinnlos; es genügt dann die reine Mengenangabe, womit man wieder auf die Gesamtkeimzahl zurückfällt, die in der Literatur häufig als sogenannter „unspezifischer Keimgehalt“ diskriminiert wird.

#### 4. Der Wert von Arten- oder Genus-Spektren der Verderbfloren für die mikrobiologische Qualitätserhebung

Aus der Bakteriensystematik sind Keimarten, die Indikatoren des Verderbs darstellen, bisher nicht bekannt geworden. Allerdings ist nur versucht worden, die wenigen, überhaupt eine reelle Chance bietenden und im Zusammenhang mit dem Fischverderb beschriebenen Keime des als besonders wichtig erkannten Genus *Pseudomonas* hierfür zu verwenden. Aber hier gibt es keine Möglichkeit, die tatsächliche Fülle verschiedener saprophytischer Arten und Biotypen taxonomisch anzusprechen. Lediglich bei den klinisch interessanten Pseudomonaden besteht kein derartiges Differenzierungsdilemma. Ferner gibt es für bestimmte Bereiche der Lebensmittel-Mikrobiologie, etwa der Milch-Hygiene, eine Heraushebung weniger Arten, wobei diese Taxonomie eigene Wege geht und sich stark auf zweckmäßige, milchhygienische Gesichtspunkte stützt<sup>13</sup>), was nicht ohne weiteres für Pseudomonaden des Frischfisches sinnvoll sein muß.

In Verbindung mit dem Frischfisch sind bisher nur *Pseudomonas fluorescens*, *P. putida*, *P. perolens* und *P. fragi* bekannt geworden<sup>6, 9-11</sup>). Aber schon die nicht-fluoreszierenden Biotypen des *P. fluorescens* sind von anderen saprophytären Pseudomonaden artenmäßig praktisch nicht abzutrennen. Häufig wurde *Alteromonas putrefaciens* (früher *Pseudomonas putrefaciens*) gefunden<sup>14</sup>). Er unterscheidet sich nur aufgrund des geringeren Mol-% GC von den Pseudomonaden. Aus der Gattung *Pseudomonas* hat sich keine Art als Indikator herausgestellt.

In der Literatur sind verschiedene Keime als nur gelegentlich typisch für einen aeroben Verderb beschrieben worden: *Alteromonas putrefaciens*<sup>15</sup>), *Photobacterium* (Synonyme: *Vibrio fischeri*, *Achromobacter fischeri*, *Vibrio noctiluca*, *Bacterium phosphorescens*, *Spirillum marinum*, *Bacillus fischeri*, *Microspira fischeri*) und Pseudomonaden der *Shewan*-Gruppen I und II. Die von *Shewan* empfohlene Aufteilung der Pseudomonaden in 4 Einzelgruppen<sup>16</sup>) führte in der Praxis kaum zu strafferen mikrobiologischen Aussagen; besitzen doch die Gruppen I und II nach *Okuzumi et al.* große Ähnlichkeiten in grundsätzlichen biologischen Eigenschaften<sup>17</sup>).

Ungeeignet sind Keime aus den Genera *Flavobacterium*, *Corynebacterium*, *Brevibacterium*, *Microbacterium*, *Micrococcus* und *Staphylococcus*, weil deren saprophytäre Arten weitgehend unbearbeitet sind. Auch für die Genera *Moraxella* und *Acinetobacter*, die längere Zeit während der Eislagerung an den Fischen anzutreffen sind, gibt es nur einen Bestimmungsschlüssel der klinisch interessanten mesophilen Vertreter<sup>18</sup>).

In anderen Fällen stört auch die in der Literatur nicht selten zu findende unterschiedliche Bezeichnung von gleichen Keimen die Sammlung von verwertbarem Vergleichsmaterial (*Pseudomonas* — *Comamonas* — *Alteromonas*). Vermutlich ist auch ein Teil der achromogenen Pseudomonaden in früheren Arbeiten als *Achromobacter* beschrieben worden<sup>8</sup>).

Da Indikatororganismen des Verderbs auf der Basis von Artenbestimmungen trotz zahlreicher Untersuchungen bisher nicht zu finden gewesen sind, erscheint es nicht zweckmäßig, ohne weiteres die dünnen Ergebnisse aufzupolieren, die sich aus der Registrierung klassisch definierter Bakterien ergeben. Die nomenklatorische Verwirrung im Bereich der saprophytären Kaltlagerbakterien ist nur ein Grund für die vergebliche Suche nach Indikatorarten.

Vielleicht wird die Situation etwas besser, wenn man nicht nach einzelnen Arten fahndet, deren Diagnostik und Taxonomie ohnehin nicht hinreichend geklärt sind, sondern größere systematische Einheiten betrachtet, bei deren Bearbeitung man ohne größere Schwierigkeiten auskommt. Bekanntlich weist der in nördlichen Gewässern gefangene fangfrische Fisch auf der Haut eine sehr heterogene Mikroflora auf, die vor allem das Ergebnis der Außenkontamination ist. Sie besteht überwiegend aus *Moraxella*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* und *Brevibacterium/Corynebacterium* der primären Infektionsquelle und Bakterien des Darmtrakts der Fische. Dieser Primärflora, die am lebenden Fisch im latenten Zustand verharrt, kann jedoch nicht die eigentliche Entwicklung des Verderbs angelastet werden, denn am Ende der Lagerung dominieren meist psychrotrophe Fäulniskeime, die in sehr geringer Startmenge vorlagen, aber eine größere Affinität zum Eislagerfisch haben und sich durchsetzten. Dazwischen liegen verschiedene, sich gegenseitig überschneidende und ablösende Bakterien-Assoziationen. In einem beschränkten Umfang dürfte also aus der Succession der Genera in bestimmten Fällen ein Rückschluß auf zurückgelegte Lagerzeiten und damit in gewissem Sinne auch auf die jeweilige Qualität möglich sein. Aber hier gibt es wieder Differenzierungsprobleme, weil die systematische Abgrenzung einiger Genera heute noch nicht sicher ist (*Brevibacterium*, *Micro-*

bacterium). Es müßten daher zunächst nach einheitlichen Methoden in ausreichender Menge Florenspektra analysiert werden, damit die verschiedenen Formen der Bakterien-Metabiose am eislagernden Frischfisch aufgedeckt werden. Derartige Erhebungen gibt es bisher jedoch praktisch nicht, und es ist auch z. B. nicht auszuschließen, daß ein Teil der gramlabilen „Diplokokken“ (*Achromobacter*) mit anderen Keimen verwechselt wurde (*Micrococcus*), was nachträgliche Auswertungen verunsichert.

Eine solche Florenanalyse würde, sofern sie unter bestimmten Bedingungen lagerzeitabhängige Entwicklungstendenzen aufzeigen könnte, den sehr großen Vorteil bringen, daß eine bakteriologische Aussage unabhängig von der absoluten Höhe des Keimgehaltes möglich wäre. Auch wären Manipulationen am Keimgehalt (mechanische Säuberung) zwecklos, sofern eine Florenanalyse an weniger als 100 verbleibenden Keimen ausgeführt werden könnte.

Zu dieser Frage existieren bisher nur recht allgemeine Erkenntnisse, zu denen insbesondere gehört, daß die Gruppe der Pseudomonaden während der Eislagerung meist prozentual zu anderen Genera an den Verderbsfloren zunimmt und verschiedene grampositive Keime abnehmen. Systematische Aufzeichnungen solcher Entwicklungsreihen ganzer Saprophytenfloren an Frischfischen gibt es nicht.

#### 5. Der Mengenwechsel von Bakterien mit unterschiedlichem Verderbspotential als möglicher Indikator für Lager- und Qualitätsstadien

Diese Frage entspricht Frage 3, nur bezieht sie sich auf die biologische Aktivität der Mikroorganismen gegenüber Komponenten des Substrats, d. h. auf Merkmale, die bisher nicht für eine Einteilung verwendet wurden. Wenn auf der Basis der bekannten taxonomischen Einheiten keine Indikatororganismen zu finden sind, muß als letzte Möglichkeit daran gedacht werden, daß sich nicht nur Merkmale, wie Zellform, Begeißelung, Pigmentierung, Gramverhalten oder Xylospaltung in den Bakteriogrammen verschiedener Lagerstadien als Folge einer Selektion ändern (Veränderung des Genus- oder Artenspektrums). Daneben kann sich auch das Verhalten gegenüber dem Guanin der Fischschuppen, den Schwefel-Aminosäuren, dem Trimethylaminoxid, dem wasserlöslichen oder strukturbildenden Fischeiweiß etc. als Folge von Adaptationszwängen ändern. Adaptationserscheinungen liegen nahe, da Bakterien aus der Anfangs- und Endphase der Lagerung meist sehr verschiedene biochemische Aktivitäten haben. Da der Artenbegriff bei vielen Saprophyten nicht festliegt, kann nur in Einzelfällen entschieden werden, welche Veränderungen auf Adaptationen beruhen, bzw. in welchen Fällen aus einem sehr geringen Anfangs-keimgehalt selbständige, bisher nicht erfaßbare Arten zum Durchbruch gekommen sind.

Bei derhäutigen Fischen führen Gewebekeimgehalte oft zu keinen brauchbaren Aussagen, weil sie lange Zeit niedrig bleiben. Hier muß sich die Aufmerksamkeit auf den Keimbestand der Haut richten. Da dieser jedoch sehr schnell ansteigt und dann recht konstant um  $10^8$  bis  $10^9/\text{cm}^2$  liegt, kann die Einwirkungsdauer der Bakterien nicht mehr an der Höhe der Keimgehalte abgelesen werden. Dann kann vielleicht nur noch die Zusammensetzung der Flora aus Typen mit

verschiedener substratbezogener Aktivität Auskunft über den Reifegrad der Gesamtpopulation und damit über das Lagerstadium geben.

Es ist also wichtig, eine qualitative Erfassung aller putregenen Keime von Haut und Gewebe vorzunehmen, auch wenn diese nicht zu systematisieren sind. Die rein stoffwechselphysiologische Betrachtung muß natürlich zu einer ganz anderen Einteilung der Bakterien führen. Sie basiert auf Aktivitätsprofilen, die auf ihren Indikatorwert untersucht werden können. Hierüber liegen noch keine Erkenntnisse vor.

#### 6. Das Problem des relevanten Durchschnittsmusters

Die Frage nach einem geeigneten Durchschnittsmuster ist von großer Wichtigkeit für die mikrobiologische Kontrolle des Ganzfisches. Um den eßbaren Hauptanteil des Fisches zu überprüfen, erfolgt die Probenahme nicht etwa aus dem Bauchlappen oder dem Gewebe in unmittelbarer Nähe der Kiemen, d. h. nicht an kritischen Körperstellen, an denen eine besonders schnelle Invasion der Bakterien erfolgt. Üblich ist, nach Entfernen der Haut eine ausreichend große Menge subcutanen und zentralen Gewebes zu untersuchen. Daher werden relativ günstige bakteriologische Werte erhalten, die nicht mit der sensorischen Qualität einherzugehen brauchen, wenn Abbauprodukte aus stark kontaminierten Körperregionen in diese Gewebe hineindiffundieren. Da die Migration und die weitere Ausbreitung der Bakterien im Muskel oft lokal begrenzt bleiben, gehört die Gewinnung eines relevanten Durchschnittsmusters wohl zu den schwierigsten Aufgaben mikrobiologischer Untersuchungsverfahren. Die Situation wird noch dadurch erschwert, daß die Cutis als Barriere gegen das Eindringen von Bakterien wirkt und Veränderungen im Fischkörper durch Diffusion der Abbauprodukte von der Hautoberfläche her ausgelöst werden, ohne daß Bakterien im Muskel aufzutreten brauchen. Man findet diese Verhältnisse häufig beim derbhäutigen Rotbarsch. Hier wirft sich die Frage auf, in welchem Umfang der bakteriologische Status der Haut bei der Probenahme zu berücksichtigen ist.

Es ist noch unbekannt, welche Zusammenhänge zwischen der Keimbelastung der Haut und der Qualität des Gewebes im einzelnen bestehen, doch kann es keinen Zweifel daran geben, daß bei dickhäutigen Fischen die Bakterien auf der Hautoberfläche oft von wesentlich größerer Bedeutung sind als die Gewebekeime. Bei der Eislagerung von Rotbarsch z. B. kommt es häufig vor, daß die Genußtauglichkeitsgrenze unterschritten ist und hohe chemische Werte vorliegen, obwohl das Gewebe in den Diffusionsbereichen noch sehr keimarm oder mitunter sogar steril ist; die Hautkeimgehalte bewegen sich dann jedoch schon um  $10^9/\text{cm}^2$ . —

Diese Ausführungen veranschaulichen im großen Rahmen die Schwierigkeiten, die bei der Interpretation saprophytärer Keimgehalte bestehen. Dabei ist das Fehlen leistungsfähiger Methoden nur einer der Gründe für die unbefriedigende Situation. Die z. Z. bekannten Methoden beschränken sich nur auf die Bestimmung von Gesamtkeimgehalten, von Gattungen oder Arten und von Proteolyten und Lipolyten. Gelegentlich wird auch der Unterscheidung von psychrotrophen und mesophilen Keimen einer Gesamtpopulation eine

gewisse Bedeutung bei verschiedenen Verderbsabläufen zugemessen, was jedoch in diesem Fall wenig spezifisch ist, da unter Eislagerbedingungen mesophile Keime fast immer gänzlich ausfallen.

Auf einer derartig schmalen Basis sind bakteriologische Aussagen beim Ganzfisch nur dann eindeutig und decken sich insbesondere mit sensorischen und chemischen Befunden, wenn im gesamten Gewebe ein gleichmäßiger und sehr hoher Keimgehalt von mehr als  $10^6/g$  vorliegt, d. h. der Fisch verdorben ist. Die einzelnen Stadien des Verderbens sind jedoch mikrobiologisch nicht zu differenzieren.

Es müssen also brauchbare Kriterien gefunden werden, die sich vor allem aus weitgehend anders orientierten Untersuchungen ergeben. Der Stillstand auf dem Gebiet der Saprophytenbakteriologie im Bereich des Fisches als Lebensmittel zeigt, daß völlig neue Denkansätze nötig sind. Damit geht auch die Ausarbeitung neuer Testmethoden Hand in Hand. In einigen Fällen wird es sich nur um eine Methodenverbesserung handeln, so etwa bei der Frage, welche Gewebeschicht des Fischkörpers als Untersuchungsprobe heranzuziehen ist. In anderen Fällen müssen neue Kriterien entwickelt werden, um zu einer Objektivierung des Begriffs der Gesamtkeimzahl zu kommen, aus der sich bei richtiger Wahl auf der einen Seite wesentliche diagnostische Informationen über Verderbsprozesse an Frischfischen ergeben, auf der anderen Seite eventuelle Indikatorkeime.

Was müßte im einzelnen zur Lösung der vielen offenen Fragen getan werden? Zunächst soll das theoretische Vorgehen zu diesem Themenkomplex erörtert werden, wie wir es sehen.

Unsere Arbeiten auf diesem Gebiet, die wir bereits seit einiger Zeit durchführen, gingen von folgenden beiden Gesichtspunkten aus: Einmal mußten wir darauf achten, daß die praktischen Verfahren in einem Kompromiß zu den theoretischen Prinzipien standen. Theorien, die sich experimentell mit unseren bakteriologischen und biochemischen Mitteln nicht überprüfen ließen, sollten nicht verfolgt werden. Was an neuen Kriterien gefunden werden sollte, sollte auch praktisch verwertbar sein. Zum anderen stand am Ausgangspunkt aller Überlegungen, daß die verschiedenen Parameter, die den Ablauf des Verderbens bestimmen, nicht isoliert voneinander wirken und eine Rangfolge der Einflußgröße der Faktoren nicht im voraus festzulegen ist. Vor allem ist es experimentell nicht möglich, die einzelnen Parameter für sich zu untersuchen, ohne z. B. beim Ganzfisch einen natürlichen Verderbsablauf grundlegend zu stören. Da das Verderben eine komplexe mikrobiologische Erscheinung ist, sollte außerdem immer die gesamte Palette aller auftretenden Keime untersucht werden.

Wir mußten aus diesen Gründen auf breiter Front an das Thema herangehen, um zunächst die größten Zusammenhänge und Gesetzmäßigkeiten herauszufinden. Die Untersuchung isolierter Parameter hat ja bisher nichts Greifbares für die mikrobiologische Ansprache des Verderbens gebracht.

Entsprechend der oben geschilderten Situation haben wir daher folgende Hauptparameter in unsere Untersuchungen einbezogen:

Menge -1-, Lokalisation (Art der Probe) -2-, biologische Aktivität -3- und systematische Stellung -4- aller während des Verderbens von frischem Ganzfisch auftretenden

Bakterien sowie als chemisches Kriterium die bei Frischfischuntersuchungen bewährten TVB-N-Werte -5-. Soweit möglich wurde eine sensorische Beurteilung -6- vorgenommen.

Aus der Vielzahl aller denkbaren Parameter ergibt sich auch eine Vielzahl von Arbeitsansätzen, die in verschiedene Richtungen führen und bis zu rein taxonomischen Grundlagenstudien in Form eines Vergleichs der bestehenden Taxa mit bestimmten substratbezogenen Aktivitätsmustern der fischverderbenden Keime reichen. Wir konnten daher unsere anwendungsorientierten Untersuchungen zunächst nur im Ansatz planen und gingen davon aus, daß es vor allem wichtig ist, durch eine sinnvolle Konstellation von Tests zwei Fragen zu klären:

1. Gibt es Indikatorkeime für Verderbensabläufe?
2. Welche Beziehungen bestehen zwischen dem Auftreten verschieden aktiver Bakterien und den sensorisch-chemisch erfaßbaren Verderberscheinungen?

Die letzte Frage ist so formuliert, daß sie noch weitgehend mit den Mitteln der Bakteriologie zu beantworten wäre. Darüber hinaus kann die Bakteriologie nur in beschränktem Umfang zur Aufklärung der Bildungsmechanismen von Geschmacks- und Geruchsstoffen durch Mikroorganismen beitragen, weil dies die Domäne der Biochemie ist, ohne deren Hilfe die Interpretationsschwierigkeiten meist zu groß werden.

Durch ein arbeitstechnisches Vorgehen, das soweit wie möglich alle sechs erwähnten Parameter berücksichtigt, sollte versucht werden, beide Fragen gleichzeitig zu klären. Es wäre falsch, zu früh festlegen zu wollen, ob einer der beiden Arbeitsrichtungen mehr Aufmerksamkeit geschenkt werden sollte, denn es handelt sich um Simultanuntersuchungen auf einem bisher weitgehend unerforschten Gebiet, auf dem in sehr verschiedener Hinsicht die Aufdeckung von Zusammenhängen zu erwarten ist. Tendenziöse, mit Steitigkeit wiederkehrende Ergebnisse an Verderbsfloren dienen der Suche nach Indikatorkeimen für Lager- und Qualitätsstadien, während sich andererseits aus dem abweichenden Verhalten von Keimen oder ganzen Floren eine Aufklärung sensorischer und chemischer Befunde ergeben kann.

Nachdem in dieser Arbeit die Prinzipien unseres Vorgehens vorgestellt wurden, sollen in weiteren Veröffentlichungen Versuchsergebnisse über die verschiedenen Zusammenhänge der angeführten Parameter mitgeteilt werden.

### Zusammenfassung

Die Problematik der Bakteriologie des Frischfischverderbens wird behandelt und die Aussagekraft, die die bekannten Kriterien Gesamt-Aerobenkeimzahl und Keimart haben, diskutiert. Verderbsprozesse hängen jedoch auch in hohem Maße von der Lokalisation, der Einwirkungsdauer und der Aktivität der Bakterien gegenüber dem Fischsubstrat ab. Es wird ein Ausblick auf begonnene Arbeiten gegeben, die zur Klärung der Fragen führen können, welche Beziehungen zwischen der Bakterienaktivität und den sensorisch-chemisch erfaßbaren Verderberscheinungen bestehen und ob es Indikatorkeime für den Ablauf des Verderbens gibt.

### Summary

The paper deals with the problems involved in the bacteriology of decaying new fish and discusses the informative value of such well-known criteria like total aerobic germ figure and germ type. Decay processes, however, also depend to a large extent of the localisation, the reaction

time and the activity of the bacteria vis-a-vis the fish substrate. An outlook is given on work begun that may help to clarify the question of what the relations are between bacteria activity and sensorially and chemically ascertainable symptoms of decay, and of whether there are indicator germs for the lapse of the decaying process.

### Résumé

On traite des problèmes de la bactériologie de la décomposition du poisson frais et on discute de la valeur d'affirmation que possèdent les critères connus d'indice global de germination aérobie et de mode de germination. Mais les processus de décomposition dépendent en grande partie de la localisation, de la durée d'action et de l'activité des bactéries par rapport au substrat poisson. On donne un aperçu de travaux en cours qui peuvent apporter des réponses aux questions de savoir quels rapports existent entre l'activité bactériologique et les phénomènes de décomposition perceptibles de façon chimico-sensorielle et s'il existe des germes indicateurs du processus de décomposition.

### LITERATUR

- 1) Meyer, V.: In: Handbuch der Lebensmittelchemie, Bd. III, Teil 2, Seite 1538. V. Mikrobiologische Methoden zur Untersuchung von Fischen und Fischerzeugnissen. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1968.
- 2) Liston, J., A. M. Dollar, J. Matches: Effects of multiple dose of irradiation on the bacterial flora of Seafoods. In: Kreuzer: Freezing and Irradiation of Fish, p. 463-466, Fishing News (Books) London, 1969.
- 3) Adams, R., L. Farber, P. Lerke: Bacteriology of spoilage of fish muscle. II. Incidence of spoilers during spoilage. Appl. Microbiol. 12, 277-279, 1964.
- 4) Karnop, G., N. Antonacopoulos: Einfluß von Röntgenbestrahlungen auf das bakteriologische und chemische Qualitätsverhalten von verpacktem Frischfisch in Eis. Dtsch. Lebensmittel-Rdsch. 73 (7) 217-222, 1977.
- 5) Ranke, E.: Der Einfluß der Lagerung auf die freien Aminosäuren und Peptide beim Lengfisch *Molva vulgaris* und Seelachs *Gadus virens*. Arch. Fisch. Wiss. 11, 18-47, 1960.

- 6) Herbert, R. A., M. S. Hendrie, D. M. Gibson, J. M. Shewan: Bacteria Active in the Spoilage of Certain Sea Foods. J. Appl. Bact. 34 (1), 41-50, 1971.
- 7) Miller, A., R. A. Scanlan, J. S. Lee, L. M. Libbey: Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species. Appl. Microbiol. 26 (1) 18-21, 1973.
- 8) Castell, C. H., M. F. Greenough: The Action of *Pseudomonas* on Fish Muscle: 1. Organisms Responsible for Odours Produced During Incipient Spoilage of Chilled Fish Muscle. J. Fish. Res. Bd. Can. 14 (4) 617-625, 1957.
- 9) Castell, C. H., M. F. Greenough, N. L. Jenkin: The Action of *Pseudomonas* on Fish Muscle. 2. Musty and Potato-like Odours. J. Fish. Res. Bd. Can. 14 (5) 775-782, 1957.
- 10) Castell, C. H., M. F. Greenough, J. Dale: The Action of *Pseudomonas* on Fish Muscle. 3. Identification of Organisms Producing Fruity and Oniony Odours. J. Fish. Res. Bd. Can. 16 (1) 13-19, 1959.
- 11) Castell, C. H., M. F. Greenough: The Action of *Pseudomonas* on Fish Muscle. 4. Relation between Substrate Composition and the Development of Odours by *Pseudomonas fragi*. J. Fish. Res. Bd. Can. 16 (1) 21-31, 1959.
- 12) Lobben, J. C., J. S. Lee: Roles of Microorganisms in the Deterioration of Rockfish. Appl. Microbiol. 16 (9) 1320-1325, 1968.
- 13) Kielwein, G.: Problemkeim *Pseudomonas* in der Milchwirtschaft. Goldschmidt informiert 1/74, Nr. 28.
- 14) Shewan, J. M.: The Biochemistry and Microbiology of low temperature spoilage. Fd. Techn. in Australia 28 (11) 409-410, 1976.
- 15) Chai, T., C. Chen, A. Rosen, R. E. Levin: Detection and Incidence of Specific Species of Spoilage Bacteria on Fish. II. Relative Incidence of *Pseudomonas putrefaciens* and Fluorescent *Pseudomonads* on Haddock Fillets. Appl. Microbiol. 16 (11) 1738-1741, 1968.
- 16) Shewan, J. M., G. Hobbs, W. Hodgkiss: A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria with special reference to the *Pseudomonadaceae*. J. Appl. Bact. 23, 379-390, 1960.
- 17) Okuzumi, M., S. Horie, M. Kimura, M. Akahori, M. Kawamae: Studies on Psychrophilic Bacteria of Chilled Sea Fish (III). Differentiating Properties of the Five Groups, *Pseudomonas* I/II, III/IV-NH, III/IV-H, *Vibrio* and *Moraxella*. J. Fd. Hyg. Soc. Jap. 14 (1) 81-89, 1973.
- 18) Breed, R. S., E. G. D. Murray, R. R. Smith: „Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th Ed.“. The Williams and Wilkins Co., Baltimore 1975.

Forschungsanstalt für Weinbau, Gartenbau, Getränketechnologie und Landespflege Geisenheim/Rhg.  
Fachhochschule Wiesbaden

## Verlust des fruchteigenen Wohlgeschmacks bei verarbeiteten Lebensmitteln pflanzlicher Herkunft, der im Zusammenhang mit der Spaltung von Hydroxizimtsäureestern (Depsiden) steht

Von R. Burkhardt  
III. Mitteilung

In einer Wein-Fachzeitschrift<sup>1)</sup> erschien der erste Bericht über geschmackswirksame Veränderungen, die auf Depsidspaltung zurückzuführen waren.

Die Weine entstammten 1976er Rieslingtrauben, die als Most kellertechnisch mit pektolytischen Enzympräparaten unterschiedlicher Herkunft bearbeitet worden waren. Als Richtschnur für ihren gezielten Einsatz diente die vorherige Überprüfung der Präparate auf Vorhandensein und Ausmaß, oder auf Abwesenheit einer Depsidase-Nebenaktivität, nach der Arbeitsvorschrift der I. Mitteilung<sup>2)</sup> in dieser Zeitschrift.

Dabei wurden die Untersuchungen der dort in Tabelle 2 aufgeführten Enzympräparate inzwischen auf mehr als das Doppelte der Anzahl ausgedehnt.

Die ebenfalls in der I. Mitteilung geäußerte Vermutung, daß Depsidase-Nebenaktivität in der Regel dann auftritt, wenn Aspergillusarten das Ausgangsmaterial für die Enzymgewinnung lieferten, konnte bekräftigt werden, gleichgültig ob die hydrolysierende Hauptaktivität dabei Amylase, Protease, Pektinase, Naringinase, Cellulase usw. darstellte.

Bei Enzymen von Mikroorganismen, die nicht zu den Aspergillen gehören, konnte bisher keine Depsidase-Nebenaktivität gefunden werden. Die Anzahl dieser geprüften Präparate war jedoch geringer.

Bei oft wiederholten Kostproben mit geübten Zungensachverständigen fiel auf, daß bei denjenigen Weinen das typische Sortenbukett verschwunden war, bei denen pektolytische Präparate mit Hydroxizimtsäureester spaltender Nebenaktivität ihren Mosten zugesetzt worden waren.