

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 83 (1992)

**Heft:** 2

**Artikel:** Mikrobielle Bildung von Blausäure beim Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch = Microbial formation of cyanic acid during spoilage of refrigerated stored beef

**Autor:** Meyns, Silke / Lott Fischer, Johanna / Schmidt-Lorenz, W.

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-982253>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

**Download PDF:** 08.02.2025

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Mikrobielle Bildung von Blausäure beim Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch

Microbial Formation of Cyanic Acid during Spoilage  
of Refrigerated Stored Beef

Silke Meyns, Johanna Lott Fischer und W. Schmidt-Lorenz  
Institut für Lebensmittelwissenschaften, Eidg. Technische Hochschule, Zürich

### Einleitung

Bei der Kühlung von unverpackten Rindfleischstücken in Exsikkatoren zwecks Erfassung der dabei gebildeten flüchtigen Stoffe trat nach einigen Lagertagen beim Öffnen der Exsikkatoren immer wieder ein Geruch nach bitteren Mandeln auf. Der Blausäurenachweis mit Gasprüfröhrchen war oft positiv.

Die Bildung von Blausäure durch Mikroorganismen in Kulturmedien ist ausser von einigen Pilzen vor allem von verschiedenen Pseudomonaden sowie von *Chromobacterium violaceum* bekannt (1). Bei Lebensmitteln ist die Blausäurebildung durch Bakterien bisher nur bei längerer Kühlung von mit Pseudomonaden beimpftem Schlachtgeflügel, nicht aber bei anderen Fleischarten bekannt (2). Da aerob kühlgelagertes Rindfleisch hauptsächlich durch Bakterien der Gattung *Pseudomonas* verdirbt, war anzunehmen, dass auch die bei Rindfleisch nachgewiesene Blausäure durch Pseudomonaden gebildet wurde. Dies ist insofern interessant, da am Verderb von aerob gelagertem Rindfleisch nach bisheriger Kenntnis (3) hauptsächlich nicht fluoreszierende Pseudomonaden des Typs *Pseudomonas fragi* beteiligt sind. Als Blausäurebildner sind bis jetzt aber ausschliesslich fluoreszierende bzw. andere pigmentbildende *Pseudomonas*-Arten beschrieben (4).

Ziel dieser Arbeit war es, die Blausäurebildung in Rindfleisch während der Kühlung zu verfolgen und die für die Blausäurebildung verantwortlichen Bakterienarten zu bestimmen.

### Material und Methoden

#### *Untersuchtes Rindfleisch*

Es wurde immer das gleiche Teilstück, die Unterspälte (*M. glutaebiceps*), verwendet, das am Tage des Zerlegens (3 Tage nach der Schlachtung) im Labor in

6 bis 8 ca. 500 g schwere Stücke zerteilt wurde. Diese wurden entweder aerob im Exsikkator oder anaerob in einer Vakuumpackung bei 4 °C eingelagert. Im Laufe der Lagerung wurden Oberflächenschichten von 0,5 cm Dicke und 10 cm<sup>2</sup> Fläche entnommen und für die Koloniezahlbestimmungen mit Verdünnungslösung im Stomacher homogenisiert (5).

## *Mikrobiologische Untersuchungen*

### *Koloniezahlbestimmungen*

Die Bestimmung der Koloniezahlen erfolgte mit Hilfe des Selektivplattenverfahrens. Die Gesamtkoloniezahlen wurden mit Hilfe von PC-Agar (BBL 11638) bestimmt, die der Pseudomonaden mit GSP-Agar (Merck 10230), die Enterobacteriaceen-Zahlen mit VRBG-Agar (Oxoid CM485). Die Koloniezahlen der Milchsäurebakterien sowie von *Brochothrix thermosphacta* wurden mit MRS-Medium (Merck 10660) bzw. mit SNaPP-Medium (5) ermittelt.

### *Nachweis der Blausäurebildung bei Pseudomonaden*

Bei einer Lagerreihe wurden am 7. und am 10. Lagertag von geeigneten Koloniezählplatten des *Pseudomonas*-Selektivmediums (GSP-Agar) Isolate von jeweils 50 Kolonien gewonnen und auf folgende Merkmale geprüft: Morphologie, Beweglichkeit, Aminopeptidase (6), Oxidase (7), Katalase und Glucoseverwertung (O/F-Test) nach *Hugh* und *Leifson* (8).

Zur Prüfung der Fähigkeit zur Blausäurebildung wurden von Vorkulturen in PC-Bouillon jeweils 0,1 ml in Fleischextraktbouillon und Hackfleischbouillon überimpft (Tabelle 1).

*Tabelle 1.* Zusammensetzung der verwendeten Nährmedien zum Nachweis der Blausäurebildung bei Pseudomonaden

Fleischextraktbouillon:
– 5 g Fleischextrakt (Merck 3979)
– 1 g Glucose
– 8 g NaCl
mit aq. dest. ad 1000 ml
jeweils 5 ml in Röhrchen mit Schraubdeckel abfüllen und bei 121°C 15 min sterilisieren
Hackfleischbouillon:
– 8 g NaCl
mit aq. dest. ad 1000 ml
– 5 ml der Lösung in ein Röhrchen mit Schraubdeckel geben und jedes Röhrchen mit 1 g Rinderhackfleisch versehen
– anschliessend bei 121°C 15 min sterilisieren



Nach der Beimpfung wurde in jedes Röhrchen 1 cm eines Cyanidteststreifens gegeben (Cyantesmo, Macherey-Nagel Nr. 90604). Es handelte sich dabei um hydrophobes Testpapier, welches von der Bouillon nicht benetzt wurde und deshalb mit einer Kante auf der Oberfläche der Lösung auflag oder 1 bis 2 mm eintauchte. Beim Vorhandensein von Blausäure verfärbte sich das Testpapier blau (Berliner Blau-Reaktion), wobei die Reaktion besonders gut an der Grenzfläche Lösung/Gasraum erkennbar war. Laut Angaben des Herstellers sind Konzentrationen bis  $0,2 \text{ mg l}^{-1}$  HCN und noch darunter nachweisbar. Bei Konzentrationen  $<0,2 \text{ mg l}^{-1}$  HCN ist eine längere Einwirkungszeit erforderlich, z. B. über Nacht.

Die mit dem Testpapier versehenen Kulturen wurden bei  $20^\circ\text{C}$  maximal 12 Tage bebrütet. Kulturen, bei denen sich das Testpapier nach 12 Tagen noch nicht verfärbt hatte, wurden als blausäurenegativ gewertet.

### *Identifizierung der blausäurebildenden Pseudomonaden*

Alle blausäurepositiven Isolate wurden auf insgesamt 17 Merkmale (3, 9) geprüft. Diese Tests wurden mit 24 bis 48 h in PC-Bouillon bzw. auf PC-Agar (BBL 11638) bei  $20^\circ\text{C}$  vermehrten Kulturen durchgeführt.

- Arginin-Dihydrolase (10)
- Gelatinase (11)
- Intrazelluläre Speicherung von Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure (PHB, nach 12; modifiziert nach 13)
- Bildung von fluoreszierenden Pigmenten (14)
- Hydrolyse von Tween 80 (11)
- Stärke-Hydrolyse (11)
- Wachstum bei  $41^\circ\text{C}$  in PC-Bouillon
- Verwertung verschiedener Substanzen als einzige C-Quelle (15):  
Dem Grundmedium wurden nach der Sterilisation jeweils 0,2% der folgenden Stoffe zugesetzt: D(+)-Glucose, D(+)-Fructose, D(-)-Ribose, Maltose, Trehalose, myo-Inosit, bzw. 0,1% D(-)Weinsäure, meso-Weinsäure, Mesaconsäure und Itaconsäure. Bei Säurezusatz wurde, sofern notwendig, der pH-Wert der fertigen Medien mit NaOH auf ca. 6,5 eingestellt.

### *Methoden zur Bestimmung der Blausäure*

#### *Nachweis mit Gasprüfröhrchen*

Blausäure liess sich im Gasraum der Exsikkatoren, in denen das Rindfleisch gelagert wurde, mit Hilfe von Gasprüfröhrchen der Firma Dräger AG (Lübeck) nachweisen. Die Versuchsanordnung entsprach im wesentlichen der von *Gantenbein-Demarchi* (16) beschriebenen. Der Exsikkator war am Deckel und an der Seite mit Hähnen versehen. Am Deckel wurde das Röhrchen Blausäure 2/a (CH 25701) über ein Schlauchverbindungsstück an den Hahn angeschlossen. Gemäss den Vorschriften der Firma Dräger wurde mit Hilfe einer automatischen Balgpumpe (Quantimeter, Dräger AG), die 100 ml Gas pro Hub fördert, die Luft aus dem



Exsikkator durch das Dräger-Röhrchen gesaugt. Am seitlichen Eingang wurde Raumluft über eine mit Aktivkohle gefüllte Pasteurpipette nachgeführt. Bei der Reaktion bildete sich aus Blausäure und Quecksilber(II)-chlorid Salzsäure, die wiederum mit dem pH-Indikator Methylrot eine Rotfärbung ergab. Eventuell störender Schwefelwasserstoff konnte während der Lagerung von Rindfleisch nicht nachgewiesen werden, so dass falsch positive Ergebnisse nicht zu erwarten waren. Der Messbereich des Röhrchens betrug 2 bis 30 ppm Blausäure.

### *Destillation der Blausäure*

Die Blausäure musste aus dem Fleisch destillativ abgetrennt werden. Die verwendete Methode folgte im wesentlichen der Bestimmung von Cyaniden nach den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (17).

Jeweils zwei 0,5 cm dicke Oberflächenschichten von zusammen 10 bis 12 g Gewicht und 20 cm<sup>2</sup> Fläche wurden mit einer Küchenschere vorzerkleinert und mit 30 ml 0,1 M NaOH auf höchster Stufe mit einem Ultra-Turrax (Janke & Kunkel) bis zur vollständigen Zerkleinerung homogenisiert (ca. 15 bis 30 s). Die Masse wurde sodann in einen 500-ml-Dreihalskolben überführt, Stab und Becherglas mit insgesamt 20 ml 0,1 M NaOH abgespült und diese mit der Fleischmasse vereinigt. Nach Zugabe von 10 ml 0,1 M EDTA-Lösung in 0,1 M NaOH, Glasperlen und eines Tropfens Silicon-Antischaummittel (Fluka 85390) wurde der Kolben an einen Rückflusskühler angeschlossen, an deren Kopf sich das in (17) beschriebene Absorptionsgefäß, gefüllt mit 10 ml 0,1 M NaOH, befand. Ein Tropftrichter, gefüllt mit 60 ml 1 M HCl, wurde auf einen Seitenhals des Kolbens gesetzt, in den anderen kam ein Einleitungsrohr, das bis in die Lösung eintauchte und welches mit einer Stickstoff-Flasche verbunden war. Anschliessend wurde in die Fleischlösung ein Stickstoffstrom von 200 ml min<sup>-1</sup> eingeleitet und die Salzsäure zugetropft. Die Lösung wurde mit dem Stickstoffstrom 1 h unter Rückfluss destilliert. Danach wurde die Natronlauge aus dem Absorptionsgefäß in einen 25-ml-Messkolben überspült und zur Photometrie eingesetzt.

Die Wiederfindungsraten nach Zusatz von Kaliumcyanid zu Fleischhomogenisaten betragen 95 bis 100%.

### *Photometrische Bestimmung der Blausäure*

Die Blausäure in der durch Destillation erhaltenen Absorptionslösung wurde mit Hilfe von verschiedenen photometrischen Methoden quantitativ bestimmt. Eine Methode zur photometrischen Bestimmung von Cyaniden ist in den Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (17) beschrieben. Es handelt sich um die Umsetzung von Blausäure mit aktivem Chlor zu Chlorcyan. Dieses reagiert weiter mit Pyridin in Gegenwart von Wasser unter Bildung von Glutacondialdehyd. Der Aldehyd wird durch Kondensation mit Barbitursäure zu einem violetten Polymethinfarbstoff umgesetzt, dessen Absorption bei  $\lambda = 578$  nm ein Mass für die ursprüngliche Blausäurekonzentration ist.

Mit Hilfe dieser Methode wurde eine Eichkurve in einem Konzentrationsbereich von 80 bis 1000  $\mu\text{g Cyanid l}^{-1}$  aufgestellt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 100  $\mu\text{g Cyanid l}^{-1}$  Messlösung, darunter verlief die Eichkurve nicht mehr linear. Das bedeutet beim Einsatz von 10 g Fleisch eine Bestimmungsgrenze von 250 ng  $\text{HCN g}^{-1}$ .

Zusätzlich zum konventionellen Verfahren nach DEV (17) wurde die Schnellmethode «Spectroquant» der Firma Merck (Nr. 14800) erprobt. Diese Methode beruhte auf dem gleichen Prinzip wie die Vorschrift nach DEV, nur wurden die Reagenzien in fester Form dosiert (ausgenommen Pyridin). Statt Barbitursäure wurde 1,3-Dimethylbarbitursäure verwendet. Die Durchführung der Bestimmung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers.

Es wurde eine Eichkurve im Konzentrationsbereich von 20 bis 300  $\mu\text{g Cyanid l}^{-1}$  Messlösung bestimmt. Die Bestimmungsgrenze lag bei 20  $\mu\text{g Cyanid l}^{-1}$  Messlösung. Das entsprach bei einem Probeneinsatz von 10 g Fleisch einer Bestimmungsgrenze von 50 ng  $\text{g}^{-1}$ .

## Ergebnisse

### *Mikrobiologische Untersuchungen*

#### *Zusammensetzung der Verderbsflora*

Während der offenen Lagerung des Rindfleisches im Exsikkator erfolgte eine starke Vermehrung der Bakterien, vor allem der Pseudomonaden. Sie machten weitaus den grössten Anteil der Verderbsflora aus. Daneben war eine Vermehrung von Milchsäurebakterien, *Brochothrix thermosphacta* und Enterobacteriaceen nachweisbar. Der Verderbsbeginn war sensorisch durch das Auftreten von säuerlich muffigen Gerüchen nach 7 Tagen erkennbar.

Bei Lagerung in der Vakuumpackung trat der Verderb erst nach etwa 14 Tagen ein. Die Verderbsflora wurde hier von Milchsäurebakterien dominiert.

#### *Blausäurebildende Pseudomonaden*

In einer Lagerreihe wurden am 7. und am 10. Lagertag von den Koloniezählplatten des *Pseudomonas*-Selektivmediums (GSP-Agar) je 50 Isolate gewonnen und auf Blausäurebildung geprüft. Von den am 7. Lagertag isolierten Pseudomonaden bildeten 12% ( $n = 6$ ) Blausäure in jeweils beiden Fleischbouillons (Tabelle 2). Bei zwei Isolaten erfolgte eine sehr intensive Färbung des Testpapiers und damit eine besonders starke Blausäurebildung. Von den am 10. Lagertag isolierten Pseudomonaden waren 20% ( $n = 10$ ) Blausäurebildner. Bei sechs der zehn Stämme wurde nicht immer in beiden Fleischbouillons gleichzeitig Blausäure gebildet.

Die blausäurepositiven Isolate wurden auf 17 Merkmale geprüft (Tabelle 2). Alle 16 blausäurebildenden Isolate konnten Glucose und Fructose als alleinige C-Quelle

Tabelle 2. Testergebnisse von 16 während der offenen Lagerung von Rindfleisch bei 4 °C isolierten blausäurebildenden Pseudomonaden sowie Gruppierung in die *P. fragi*-Cluster-Typen nach *Shaw* und *Latty* (3)

Stamm- Nummer	Blausäurebildung in										<i>P. fragi</i> - Cluster- Typ	
	Hack- fleisch- Bouillon	Fleisch- extrakt- Bouillon	Arginin- dihydro- lase	Gelatine- hydrolyse	D-Ribose	Trehalose	myo- Inosit	meso- Weinsäure	Itacon- säure	Mesaconsäu- re		
7. Lagertag												
137	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	1
111, 116	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	2
140	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	2
135, 143	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	3
10. Lagertag												
203, 214	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1
228	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	1
240	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	1
224	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1
229	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	1
230	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	1
205	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1
220	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1
232	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	2
<i>P. fragi</i> ATCC 4973	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	2

Alle Isolate positiv: Verwertung von Glucose und Fructose als alleinige C-Quelle.

Alle Isolate negativ: Bildung von fluoreszierenden Farbstoffen, intrazelluläre Anreicherung von Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure, Wachstum bei 41°C, Hydrolyse von Stärke und Tween 80, Verwertung von Maltose und D-Tartrat als alleinige C-Quelle.



verwerten. Bei allen Isolaten waren folgende Merkmale negativ: die Bildung von fluoreszierenden Farbstoffen, die intrazelluläre Anreicherung von Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure, das Wachstum bei 41 °C, die Hydrolyse von Stärke und Tween 80 sowie die Verwertung von Maltose und D-Tartrat als alleinige C-Quelle.

Am 7. Lagertag konnte ein blausäurebildendes Isolat Cluster 1 zugeordnet werden. Die Eigenschaften von 3 Isolaten trafen auf Cluster 2 zu. Zwei Isolate, die besonders stark Blausäure bildeten, konnten in Cluster 3 gruppiert werden.

Bei den am 10. Lagertag isolierten blausäurebildenden Pseudomonaden konnten 9 von 10 Isolaten in Cluster 1 gruppiert werden und nur ein Isolat in Cluster 2.

### *Chemische Bestimmung von Blausäure in Rindfleisch*

#### *Blausäuregehalte in Rindfleisch während der Lagerung*

Blausäure wurde nur bei aerob gelagertem Rindfleisch gebildet. Bei vakuumverpackt gelagertem Rindfleisch war in sechs verschiedenen Lagerreihen weder sensorisch noch chemisch-analytisch Blausäurebildung auch in sehr späten Lagerstadien nachweisbar.

Bei aerob gelagertem Rindfleisch konnte Blausäurebildung sensorisch nur bei fünf der insgesamt 11 verschiedenen Lagerreihen beobachtet werden. Wenn Blausäure sensorisch nicht erkennbar war, fiel auch ein chemischer Blausäurenachweis sowohl mit Gasprüfröhrchen als auch nach Destillation und photometrischer Bestimmung negativ aus.

Abbildung 1 zeigt die Blausäuregehalte von aerob gelagertem Rindfleisch. Angegeben ist der Mittelwert aus zwei Lagerreihen. Am 7. Lagertag war sensorisch ein

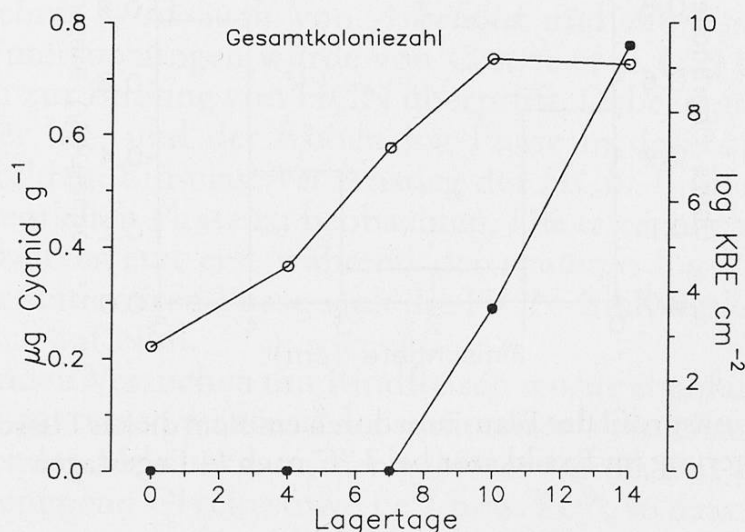


Abb. 1. Blausäuregehalte und Gesamtkoloniezahlen von 0,5 cm dicken Oberflächenschichten von offen im Exsikkator bei 4 °C gelagertem Rindfleisch (Mittelwert aus zwei Lagerreihen)

erster leichter Verderbsgeruch erkennbar, der mit säuerlich muffig umschrieben wurde. Die Gesamtkoloniezahl sowie die Zahl der Pseudomonaden betrug etwa  $2 \times 10^7$  KBE  $\text{cm}^{-2}$ . Zu diesem Zeitpunkt war Blausäure weder sensorisch noch chemisch nachweisbar.

Am 10. Lagertag war Blausäure sensorisch deutlich erkennbar. Ausserdem war ein leicht muffiger Geruch sowie ein starker Buttergeruch zu bemerken. Auf der Fleischoberfläche waren Kolonien und Schleim sichtbar. Das Fleisch war zu diesem Zeitpunkt eindeutig verdorben. Die Gesamtkoloniezahlen und die der Pseudomonaden lagen deutlich über  $10^9$  KBE  $\text{cm}^{-2}$ . Chemisch konnte Blausäure mit einem Gehalt von  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  in 0,5 cm dicken Oberflächenschichten bestimmt werden.

Am 14. Lagertag war Blausäure sensorisch nur noch schwach erkennbar. Daneben traten relativ starke Gerüche nach Butter und Käse auf. Der Blausäuregehalt hatte sich mit  $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$  gegenüber dem 10. Lagertag mehr als verdoppelt. Die Gesamtkoloniezahlen und die Zahl der Pseudomonaden waren hingegen etwa bei  $10^9$  KBE  $\text{cm}^{-2}$  verblieben.

### *Blausäuregehalte im Fleischquerschnitt*

Abbildung 2 zeigt den Verlauf der Blausäurekonzentration im Querschnitt durch ein Stück Rindfleisch. Dieses Profil wurde am 14. Lagertag von aerob

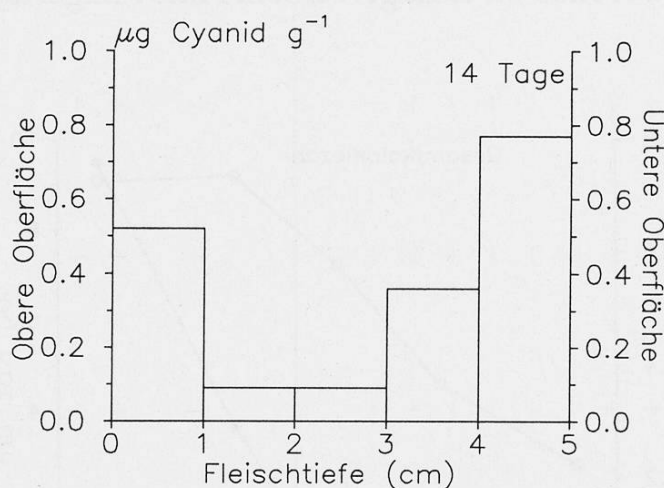


Abb. 2. Konzentrationsprofil der Blausäure durch ein 5 cm dickes Fleischstück während der offenen Lagerung im Exsikkator bei  $4^\circ\text{C}$  nach 14 Lagertagen

gelagertem Fleisch aufgenommen. Es wurde deutlich, dass Blausäure, ebenso wie Ammoniak, an der Fleischoberfläche entstand. Es bildete sich ein Konzentrationsgefälle in Richtung Fleischzentrum aus. Auch im Zentrum selbst war noch Blausäure, wenn auch in geringen Mengen, nachweisbar.

## Diskussion

### *Blausäurebildende Pseudomonaden*

Blausäure ist ein starkes Zellatmungsgift. Sie blockiert das Enzym Cytochromoxidase und damit die Schlussreaktion der mitochondrialen Atmungskette. Ausser der Cytochromoxidase werden noch eine ganze Reihe weiterer Enzyme durch Blausäure gehemmt (18). Blausäure selbst sowie ihre Vorläufersubstanzen kommen in Pflanzen häufig vor.

Die Bildung von Blausäure ist bei Mikroorganismen sowohl von Pilzen als auch von Bakterien seit Beginn des Jahrhunderts bekannt (1). Bei Bakterien wurde die Bildung von HCN durch verschiedene pigmentbildende Pseudomonaden wie *Pseudomonas fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. aureofaciens* und *P. chlororaphis* beobachtet (4). Andere fluoreszierende Pseudomonaden wie *P. putida* und *P. cichorii* bildeten keine Blausäure. Ausser bei diesen Pseudomonaden wurde die Fähigkeit zur Bildung von Blausäure nur noch von *Chromobacterium violaceum* beschrieben (4).

### *Bedingungen und Mechanismus der Blausäurebildung*

Lorck (19) war der erste Autor, der zeigen konnte, dass die optimale HCN-Produktion durch *Pseudomonas aeruginosa* vom Zusatz von Glycin zum Kulturmedium abhängig ist. Michaels und Corpe (20) beobachteten, dass *Chromobacterium violaceum* die grössten Blausäuremengen während der exponentiellen Vermehrungsphase bildeten und Glycin und Methionin im Kulturmedium die Bildung von HCN verstärkten. Nach Castric (21) stimuliert ein Zusatz von  $\text{Fe}^{3+}$  die Bildung von HCN. Castric et al. (22) beobachteten, dass HCN von *Pseudomonas aeruginosa* erstmals während des Übergangs von der exponentiellen zur stationären Phase gebildet wurde. Die Bildung von HCN blieb konstant während der stationären Phase. Dieses Ergebnis wird auch von Askeland und Morrison (23) bestätigt. Parallel zu ihren Untersuchungen wurde von Castric et al. (22) die Fähigkeit von zellfreien Extrakten zur Bildung von HCN überprüft. Dabei ergab sich, dass diese bereits während der lag- und der frühen log-Phase in der Lage waren, kleine Mengen HCN zu bilden. Ein massiver Anstieg der HCN-Bildungskapazität war inmitten der exponentiellen Phase zu beobachten. Die tatsächliche HCN-Bildung der Zellen wurde zeitversetzt erst während der späteren log-Phase beobachtet. Nach Erreichen der stationären Phase sank die HCN-Bildungskapazität des zellfreien Extraktes rasch auf Null.

Bei den vorliegenden Versuchen mit Rindfleisch wurde ebenfalls gefunden, dass HCN erst nach 10 Lagertagen während der stationären Vermehrungsphase der auf dem Fleisch wachsenden Mikroorganismen gebildet wurde. Das «Kulturmedium» Rindfleisch bietet genügend Glycin sowie  $\text{Fe}^{2+}$  bzw.  $\text{Fe}^{3+}$ , so dass für die Mikroorganismen die Voraussetzungen für eine Bildung von Blausäure erfüllt waren.

Die Bildungswege der Blausäure in der Bakterienzelle sind nicht endgültig aufgeklärt. Michaels et al. (24) konnten nachweisen, dass das von *Chromobacterium violaceum* freigesetzte Cyanid aus der Aminomethylgruppe des Glycins stammte.



Bei der bakteriellen Oxidation des Glycins wurden als Endprodukte äquimolare Mengen HCN und CO<sub>2</sub> gebildet. *Michaels* et al. (24) und *Wissing* (25) schlagen für die Bildung der Blausäure aus Glycin verschiedene Wege vor (Abb. 3).

Nach *Wissing* (25) wird für die Cyanogenese Sauerstoff oder ein anderer Elektronenakzeptor benötigt. Unter anaeroben Bedingungen produzierten Zellen von *Pseudomonas* sp. praktisch keine Blausäure. Beim Zusatz von Sauerstoff zur Atmosphäre setzte sofort die HCN-Bildung ein. Im Gegensatz dazu fand *Castric* (4) beim Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* in synthetischen Medien auch noch bei niedrigen O<sub>2</sub>-Konzentrationen (0,015 µMol O<sub>2</sub>) HCN-Produktion.

In der vorliegenden Untersuchung wurde festgestellt, dass unter anaeroben Bedingungen in der Vakuumpackung ebenfalls keine Blausäure gebildet wurde. Dies kann einerseits tatsächlich mit der anaeroben Atmosphäre zusammenhängen. Andererseits machten bei Lagerung des Fleisches in der Vakuumpackung die Pseudomonaden nur einen geringen Teil der Verderbsflora aus, so dass die Anzahl der potentiellen HCN-Bildner um 3 bis 4 Zehnerpotenzen niedriger war als bei der aeroben Lagerung.

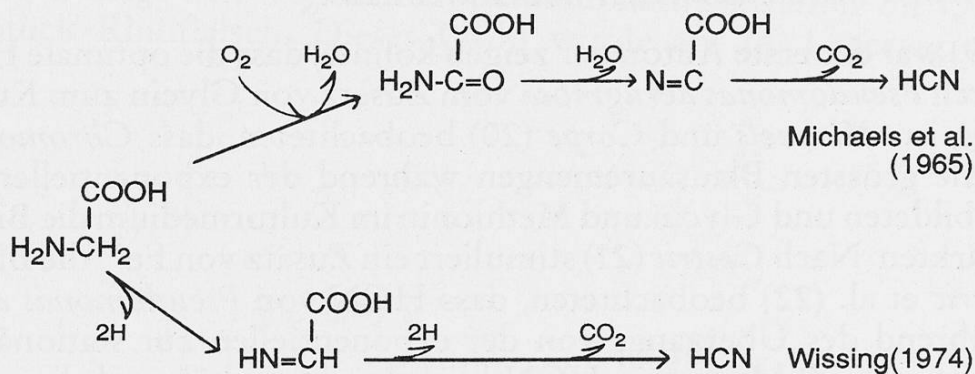


Abb. 3. Blausäure-Bildung in der Bakterienzelle nach *Michaels* et al. (24) und *Wissing* (25)

### Identifizierung der blausäurebildenden *Pseudomonaden*

Der Verderb von aerob kühlgelagertem Rindfleisch wird durch *Pseudomonaden* verursacht. Über die taxonomische Stellung dieser *Pseudomonaden* ist bisher relativ wenig bekannt. *Kleeberger* (26), *Shaw* und *Latty* (3, 9) sowie *Molin* und *Ternström* (27, 28) fanden, dass es sich bei der Mehrheit der von verschiedenen Fleischarten isolierten *Pseudomonaden* um nicht fluoreszierende Arten des Typs *Pseudomonas fragi* handelte. *Shaw* und *Latty* (3) konnten bei den von aerob verdorbenem Rind- und Schweinefleisch isolierten *Pseudomonaden* nach Bestimmung zahlreicher biochemischer Merkmale 4 Cluster unterscheiden. Alle von *Shaw* und *Latty* isolierten Stämme (3) wuchsen bei 4 °C und nicht bei 41 °C, reicherten Poly-β-Hydroxybuttersäure intrazellulär nicht an, konnten Stärke nicht hydrolysieren und konnten u. a. Glucose als einzige C-Quelle verwerten. Diese Eigenschaften waren auch bei den hier untersuchten blausäurebildenden Pseudo-

monaden gegeben. Organismen, die Poly- $\beta$ -Hydroxybuttersäure nicht anreichern, werden von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (13) der Gruppe *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. stutzeri* und *P. mendocina* zugeordnet. Die weiteren Merkmale dieser Arten entsprachen aber nicht den Testergebnissen der blausäurebildenden Pseudomonaden.

Eine gute Übereinstimmung war dagegen mit den von *Shaw* und *Latty* (3) vorgeschlagenen Cluster-Typen gegeben (Tabelle 2). Tabelle 3 zeigt die Kriterien für die Einteilung in die Cluster-Typen.

Bei Cluster 1 und 2 handelte es sich fast ausschliesslich um nicht fluoreszierende Stämme mit ähnlichen Eigenschaften. Cluster 1 und 2 wurden durch das Muster der C-Quellen-Verwertung unterschieden. Die Stämme aus Cluster 2 waren in der Lage, Trehalose, Itaconsäure, Mesaconsäure und meso-Weinsäure zu verwerten. In Cluster 2 war nach *Shaw* und *Latty* (3) auch der Typstamm *P. fragi* (NCIB 8542) enthalten, weshalb sie Cluster 2 mit *P. fragi* bezeichneten. Die Isolate in Cluster 1 verhielten sich sehr ähnlich, hatten aber ein anderes C-Quellen-Verwertungs-muster. *Shaw* und *Latty* (3) bezeichneten deshalb Cluster 1 als Biotyp von *P. fragi*.

*Molin* und *Ternström* (27) kamen zu ähnlichen Ergebnissen wie *Shaw* und *Latty* (3). Die von *Molin* und *Ternström* untersuchten Pseudomonaden stammten von verschiedenen Fleischarten, überwiegend von Rind- und Schweinefleisch. Sie teilten die Isolate nach 174 biochemischen und physiologischen Merkmalen in insgesamt 15 Cluster ein. Die von den Autoren als Cluster 1 definierte Gruppe wurde als *Pseudomonas fragi* bezeichnet, da in diesen Cluster auch der Typstamm *P. fragi* ATCC 4973 fiel. Dieser Cluster 1 entspricht in etwa dem von *Shaw* und *Latty* (3)

Tabelle 3. Merkmale von 4 Clustern der von kühlgelagertem Rindfleisch isolierten Pseudomonaden nach *Shaw* und *Latty* (3)

Merkmal	Cluster			
	1	2	3	4
Fluoreszierendes Pigment	-(3)	-(4)	d(72)	+
Arginindihydrolase	d(53)	+(94)	+	+
Gelatinehydrolyse	d(31)	d(24)	+	-
Tween-80-Hydrolyse	-(3)	-(4)	d(61)	-
Verwertung von:				
D-Ribose	+	+	d(44)	+
Trehalose	d(18)	+	d(66)	+
myo-Inosit	+(90)	d(20)	+	+
Mesaconsäure	-	+	-	-
Itaconsäure	-(9)	+(98)	-(6)	-
meso-Weinsäure	d(13)	+	-	d(20)

+ = 90 bis 100% der Stämme zeigten eine positive Reaktion.

- = 0 bis 10% der Stämme zeigten eine positive Reaktion.

d = variable Reaktion. (Die Zahlen in Klammern geben den prozentualen Anteil der positiven Stämme wieder.)



beschriebenen Cluster 2. Ein zweiter von *Molin* und *Ternström* (27) definierter Cluster 2, wobei 48% dieser Isolate fluoreszierende Pigmente bildeten, unterschied sich sowohl von *P. fragi* als auch von *P. fluorescens*. Dieser Cluster ähnelte sehr dem von *Shaw* und *Latty* (3) beschriebenen Cluster 3. In einer weiteren Arbeit von *Molin* und *Ternström* (28) machten Pseudomonaden des Typs *P. fragi* den Grossteil der wiederum hauptsächlich von Rind- und Schweinefleisch isolierten Stämme aus. Die Autoren bezeichneten diese Isolate als Cluster 1 bzw. *P. fragi*-Komplex. Dieser *P. fragi*-Komplex wurde noch weiter in die Subcluster A und B<sub>1</sub> bis B<sub>3</sub> unterteilt. Sie nennen den Subcluster A, in den die meisten Stämme gruppiert wurden, *P. fragi* in sensu stricto. Dieser Subcluster stimmt sehr gut mit dem *P. fragi* genannten Cluster 2 von *Shaw* und *Latty* (3) überein. Die Subcluster B<sub>1</sub> und B<sub>2</sub> entsprechen sehr gut dem Cluster 1 von *Shaw* und *Latty* (3). In Subcluster B<sub>3</sub> gruppierten *Molin* und *Ternström* (28) die fluoreszierenden Stämme. Aufgrund der vorgenommenen Tests meinen die Autoren, die Subcluster B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> und B<sub>3</sub> als Biovarietäten von *P. fragi* bezeichnen zu können, was sich aber genetisch nach DNA-DNA-Hybridisierung nicht bestätigen liess.

Von den 16 Stämmen der hier isolierten Blausäurebildner konnten 14 den Clustern 1 und 2 nach *Shaw* und *Latty* (3) zugeordnet werden. Es handelte sich dabei also um *Pseudomonas fragi* bzw. um *P. fragi*-ähnliche Stämme. Damit wird die Eigenschaft der Fähigkeit zur Bildung von Blausäure erstmalig für *P. fragi* bzw. für nicht fluoreszierende Pseudomonaden beschrieben.

Fluoreszierende Pseudomonaden, deren Vorkommen auf Fleisch auch in der Literatur dokumentiert ist (29, 30), machten bei *Shaw* und *Latty* (3) nur 21% der isolierten Stämme aus. Sie bildeten aus diesen Stämmen die Cluster 3 und 4, wobei die Isolate in Cluster 3 nur zu 78% fluoreszierende Pigmente produzierten. Die Isolate dieses Clusters ähnelten *Pseudomonas fluorescens*, konnten aber mit keinem der von *Stanier* et al. (31) beschriebenen Biotypen in Übereinstimmung gebracht werden. Unter den Blausäurebildnern konnten am 10. Lagertag zwei Vertreter des Clusters 3 isoliert werden, die kein fluoreszierendes Pigment, aber besonders stark Blausäure bildeten. Gute Übereinstimmung ihrer Eigenschaften liess sich allerdings mit der von *Molin* und *Ternström* (32) neu beschriebenen Art *Pseudomonas lundensis* feststellen.

Von Cluster 4 isolierten *Shaw* und *Latty* (3) lediglich 5 Stämme von einer Fleischprobe. Auch in einer späteren Arbeit (9) fanden sie keine Vertreter dieses Clusters, so dass es sich offensichtlich um eine selten vorkommende Art handelt. Auch unter den Blausäurebildnern befand sich kein Vertreter dieses Clusters.

### *Methodische Aspekte bei der Bestimmung von Blausäure*

#### *Destillation*

Für die Analyse von Blausäure in Rindfleisch mussten Methoden angewandt werden, die für die Bestimmung von Blausäure in Wasser vorgesehen sind und die deshalb für die Anwendung bei Rindfleisch zu modifizieren waren. Aus Vorversu-



chen hatte sich ergeben, dass die Blausäure in jedem Fall mit Hilfe einer Destillation aus dem Fleisch abgetrennt werden musste. Eine direkte Bestimmung mit Hilfe einer cyanidsensitiven Elektrode (Orion 94-06) war nicht möglich, da Fleischinhaltsstoffe stark störten. Insbesondere die geringen im Fleisch enthaltenen Mengen an Chlorid reagierten mit der Silbermembran der Elektrode. Da nach einer Destillation der Arbeitsaufwand für die Bestimmung des Cyanids mit Hilfe der ionensensitiven Elektrode gleich hoch war wie für die photometrische Bestimmung, fiel die Entscheidung zugunsten der empfindlicheren und einfacher zu handhabenden Photometrie.

Die Destillationsmethode wurde durch Zusätze bekannter Mengen von Kaliumcyanid zu frischen Fleischproben, die keine Blausäure enthielten, überprüft. Dabei ergab sich, dass die Wiederfindungsraten, die nach der Destillation mit Hilfe der photometrischen Methode nach DEV (17) bestimmt wurden, nur um 40% lagen. Offensichtlich wurde die Blausäure im Fleischhomogenisat zurückgehalten und konnte nicht mit Stickstoff ausgetrieben werden.

Da Blausäure z. B. mit Eisen recht stabile Metallkomplexe bildet, wurde versucht, deren Bildung mit EDTA-Lösung zu verhindern, da EDTA Cyanide aus deren Komplexen mit Metallen verdrängt. Nach dem Zusatz von EDTA zur Destillationslösung konnten tatsächlich befriedigende Wiederfindungsraten gefunden werden. Bei einem Zusatz von 4  $\mu\text{g}$  Cyanid zu 10 g Fleisch (entsprechend 20  $\text{cm}^2$ ) wurden 95 bis 100% wiedergefunden. Als Destillationszeit war eine Stunde notwendig, da nach 30 min nur rund 70% des Zusatzes wiedergefunden wurden. Beim Aufbewahren der Standard- und Absorptionslösungen in Glasgefäßen wurden schon nach kurzer Lagerzeit Verluste festgestellt. Nach dem Umfüllen der Lösungen in Polyethylengefäße trat dieser Effekt nicht mehr auf.

### *Photometrische Bestimmung der Blausäure*

Die mit der konventionellen photometrischen Methode nach DEV (17) bestimmte Eichkurve (Abb. 4) zeigte eine gute Korrelation. Die Bestimmungsgrenze lag bei 100  $\mu\text{g}$  Cyanid  $\text{l}^{-1}$  Messlösung, was bei einer Fleischprobe von 10 g eine Bestimmungsgrenze von 250  $\text{ng HCN g}^{-1}$  bedeutet. Bei kleineren Werten verlief die Eichgerade dann nicht mehr linear.

Die Schnellmethode «Spectroquant» zur Bestimmung von Blausäure bot verschiedene Vorteile gegenüber der konventionellen photometrischen Methode nach DEV. Zunächst war die Empfindlichkeit der Schnellmethode um etwa das Fünffache gegenüber der konventionellen Methode erhöht.

Das ergab sich aus der Dosierung der Reagenzien in fester Form (ausser Pyridin), wodurch der Verdünnungseffekt durch Reagenzienlösungen entfiel. Auch im Konzentrationsbereich unter 100  $\mu\text{g}$  Cyanid  $\text{l}^{-1}$  Messlösung verlief die Eichgerade linear (Abb. 5). Ihre Korrelation mit einem Koeffizienten von  $r = 0,9998$  war sehr gut.

Die Bestimmungsgrenze lag bei 20  $\mu\text{g}$  Cyanid  $\text{l}^{-1}$  Messlösung. Bei einem Probeneinsatz von etwa 10 g Fleisch (entsprechend 20  $\text{cm}^2$ ) entsprach das einer Bestimmungsgrenze im Fleisch von 50  $\text{ng g}^{-1}$ .

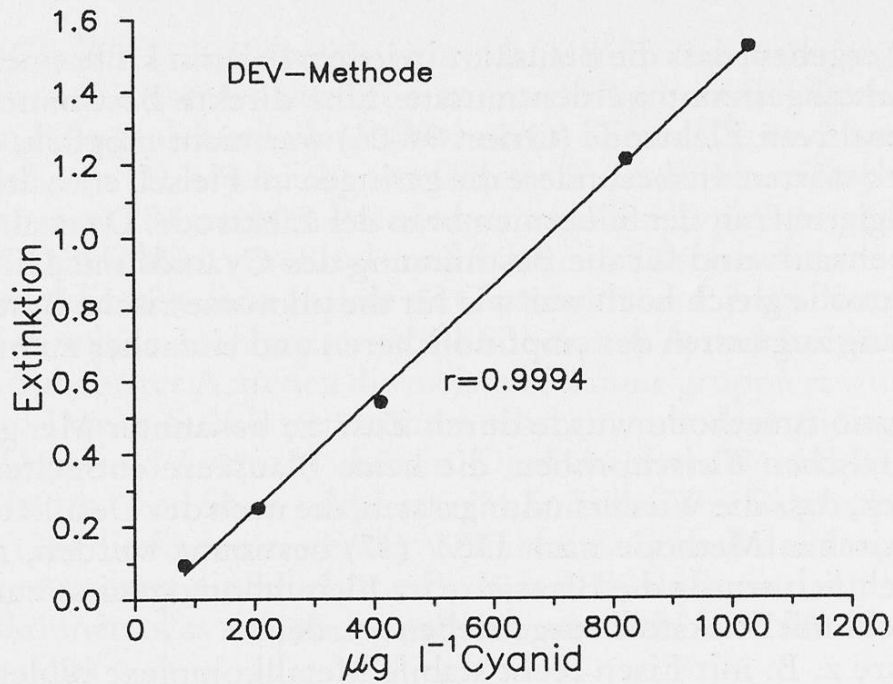


Abb. 4. Eichgerade für die photometrische Bestimmung von Blausäure nach DEV (17) ( $\lambda = 578 \text{ nm}$ )

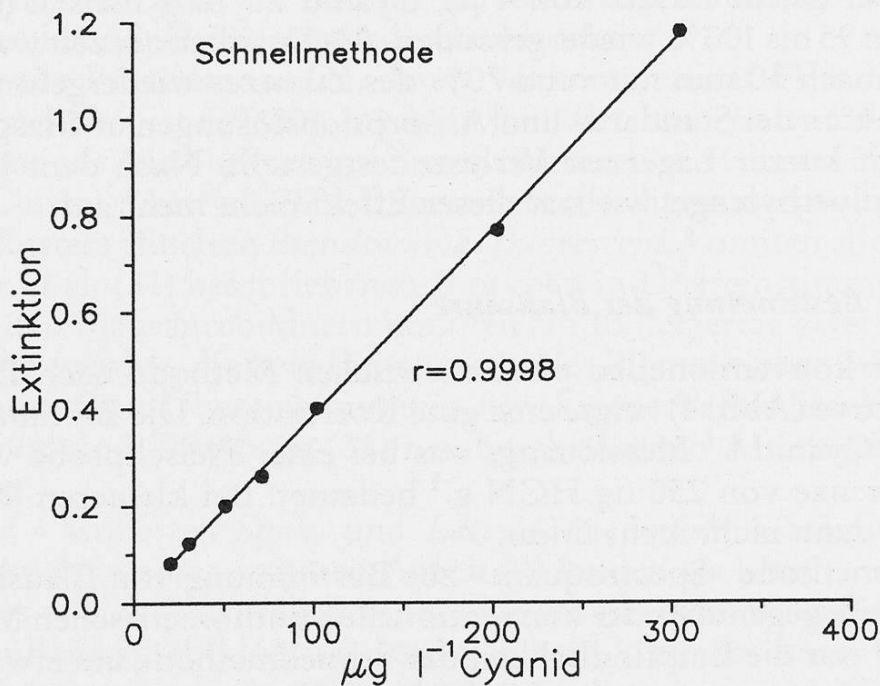


Abb. 5. Eichgerade für die photometrische Bestimmung von Blausäure mit Hilfe der Schnellmethode nach Merck ( $\lambda = 585 \text{ nm}$ )

Ausser der erhöhten Empfindlichkeit bot die Methode «Spectroquant» noch einige Vorteile. Da 1,3-Dimethylbarbitursäure besser löslich ist als die Barbitursäure selbst, konnte die Zugabemenge dieses Stoffes gesteigert werden, was zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit führte. Dadurch lief die Reaktion in insgesamt 10 min vollständig ab, im Gegensatz zu 45 min bei der konventionellen

Methode. Abgesehen von der Zeitersparnis wurde bei der Schnellmethode nur eine sehr geringe Menge Pyridin benötigt, wodurch sich die Geruchsbelästigung auf ein Minimum reduzierte.

Da sehr niedrige Blausäuregehalte im Fleisch zu erwarten waren, fiel die Wahl der Bestimmungsmethode auf die empfindlichere und einfach zu handhabende Schnellmethode «Spectroquant».

### *Blausäuregehalte im Fleisch*

Während dieser Untersuchung wurde die Bildung von Blausäure erstmalig auf Rindfleisch nachgewiesen. Die einzigen Angaben in der Literatur über die Bildung von Blausäure bei Lebensmitteln tierischen Ursprungs stammen von *Freeman et al.* (2). Die Autoren konnten bei der Kultivierung zweier von Schlachtgeflügel isolierter *Pseudomonas fluorescens*-Stämme auf Trypton-Soja-Agar bzw. auf durch Bestrahlung sterilisiertem Schlachtgeflügel nach Bebrütung während 5 Tagen bei 10 °C die Bildung von Blausäure beobachten. Die Blausäure wurde nach einer Hochvakuum-Tiefemperatur-Destillation mit Hilfe von kombinierter Gaschromatographie-Massenspektrometrie nachgewiesen. *Freeman et al.* (33) fanden allerdings keine Blausäure beim normalen Verderb von Schlachtgeflügel.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass Blausäure bereits während des normalen aeroben Verderbs von Rindfleisch auftreten kann. Sie wurde nur bei den ersten fünf von elf Lagerreihen nachgewiesen, was wahrscheinlich auf unterschiedliche *Pseudomonas*-Initialfloren zurückzuführen ist.

Blausäure wurde von den Bakterien an der Fleischoberfläche gebildet, und damit fanden sich auch dort die höchsten Konzentrationen. Sie konnte sowohl sensorisch als auch chemisch erst nach Beginn des Verderbs von Rindfleisch nachgewiesen werden, d. h. am 10. Lagertag. Die Bildung von geringen Blausäuremengen beim mikrobiellen Verderb von Rindfleisch hat keinerlei Bedeutung für die Praxis, ist aber von Interesse, da Blausäure bisher in Lebensmitteln tierischer Herkunft unter normalen Bedingungen nicht nachgewiesen wurde.

### *Zusammenfassung*

Beim Verderb von offen kühlgelagertem Rindfleisch konnte erstmalig qualitativ und quantitativ die Bildung von Blausäure nachgewiesen werden. Für die quantitative Bestimmung wurde die Blausäure destillativ abgetrennt und nach einer Farbreaktion photometrisch bestimmt.

Im Fleisch war Blausäure erst nach 10 Lagertagen bei 4 °C nachweisbar. Dabei war das Rindfleisch mit einer Gesamtkoloniezahl von  $10^9$  KBE  $\text{cm}^{-2}$  sensorisch eindeutig verdorben. Die Blausäuregehalte nahmen von  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  am 10. Lagertag auf  $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$  am 14. Lagertag zu.

Im Konzentrationsprofil der Blausäure von oben nach unten durch ein Fleischstück waren die Blausäurekonzentrationen in den Fleischoberflächen am höchsten. Die Blausäure war also ein Stoffwechselprodukt von Pseudomonaden in den Fleischoberflächen. Von 100



am 7. und am 10. Lagertag aus der Oberflächenschicht isolierten Pseudomonaden zeigten 16 Isolate die Fähigkeit zur Blausäurebildung in zwei verschiedenen Fleischbouillons. 14 Isolate wurden als *Pseudomonas fragi* identifiziert. Zwei Isolate ähnelten *P. lundensis*. Damit wurde erstmals die Fähigkeit zur Bildung von Blausäure bei nicht fluoreszierenden Pseudomonaden beobachtet.

### Résumé

Lors de l'altération de viande de boeuf, non emballée et entreposée au réfrigérateur, une formation d'acide cyanhydrique a pu être mise en évidence pour la première fois. La détermination quantitative de l'acide cyanhydrique par photométrie a été effectuée après distillation et réaction colorée.

Dans la viande, l'acide cyanhydrique n'était décelable qu'après une durée de stockage de 10 jours à 4 °C. Cette viande, avec un nombre de germes totaux de  $10^9$  par  $\text{cm}^2$ , était clairement détériorée à l'examen organoleptique. Les teneurs en acide cyanhydrique ont augmenté de  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  au 10<sup>e</sup> jour de stockage à  $0,8 \mu\text{g g}^{-1}$  au 14<sup>e</sup> jour de stockage.

Selon les profils de concentration d'acide cyanhydrique à travers un morceau de viande, les teneurs en acide cyanhydrique étaient les plus élevées à la surface de la viande. L'acide cyanhydrique était donc un produit du métabolisme de pseudomonades à la surface de la viande. 100 pseudomonades ont été isolées de la couche supérieure les 7<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours de stockage, dont 16 étaient capables de former de l'acide cyanhydrique dans deux différents bouillons de viande. 14 bactéries isolées ont été identifiées comme *Pseudomonas fragi*, 2 ressemblaient à *P. lundensis*. C'est pour la première fois que la formation d'acide cyanhydrique par des pseudomonades non fluorescentes a été observée.

### Summary

During microbial spoilage of aerobically refrigerated stored beef the formation of cyanic acid could be observed for the first time. The quantitative determination of cyanic acid was performed photometrically after distillation and colour reaction.

Cyanic acid could not be detected until the 10<sup>th</sup> day of storage at 4 °C in sensorically already spoiled meat with  $10^9$  cfu  $\text{cm}^{-2}$ . The contents of cyanic acid increased from  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  to  $0.8 \mu\text{g g}^{-1}$  after 14 days of storage.

Concentration profiles showed the highest amounts of cyanic acid at the surface of the meat. Cyanic acid was therefore a metabolism product of pseudomonads growing at the meat surface. Out of a 100 isolated pseudomonads taken from the surface of the beef on the 7<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day of storage, 16 isolates proved to be capable of forming cyanic acid in two different meat media. 14 isolates could be identified as *Pseudomonas fragi* while two isolates resembled *Pseudomonas lundensis*. Therewith the capability for the formation of cyanic acid could be observed for the first time for non-fluorescent pseudomonads.

### Literatur

1. Knowles, C.J.: Microorganisms and cyanide. Bacteriol. Rev. **40**, 656–680 (1976).
2. Freeman, L.R., Angelini, P., Silverman and G.J., Merritt jr., C.: Production of hydrogen cyanide by *Pseudomonas fluorescens*. Appl. Microbiol. **29**, 560–561 (1975).

3. *Shaw, B.G. and Latty, J.B.*: A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *J. Appl. Bacteriol.* **52**, 219–228 (1982).
4. *Castric, P.A.*: The metabolism of hydrogen cyanide by bacteria. In: Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J. and Wissing, F. (eds.), *Cyanide in biology*, pp. 233–261. Academic Press, London 1981.
5. *Meyns, S. und Schmidt-Lorenz, W.*: Mikrobieller Verderb von kühlgelagertem Rindfleisch und Ammoniakbildung. *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **83**, 71–95 (1992).
6. *Cerny, G.*: Method for distinction of gramnegative from grampositive bacteria. *European J. Appl. Microbiol.* **3**, 223–225 (1976).
7. *Daubner, I. und Mayer, J.*: Die Anwendung des Oxidase-Testes bei der hygienisch-bakteriologischen Wasseranalyse. *Arch. Hyg. Bakteriolog.* **152**, 302–305 (1968).
8. *Hugh, R. and Leifson, E.*: The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various gramnegative bacteria. *J. Bacteriol.* **66**, 24–26 (1953).
9. *Shaw, B. G. and Latty, J.B.*: A study of the relative incidence of different *Pseudomonas* groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source tests. *J. Appl. Bacteriol.* **57**, 59–67 (1984).
10. *Thornley, M.J.*: The differentiation of *Pseudomonas* from other Gram-negative bacteria on the basis of arginine metabolism. *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 37–52 (1960).
11. *Gerhardt, P.*: Manual of methods for general bacteriology, p. 409. American Society for Microbiology, Washington DC (1981).
12. *Palleroni, N.J. and Doudoroff, M.*: Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas*. *Ann. Rev. Phytopatholog.* **10**, 73–100 (1972).
13. *Palleroni, N.J.*: Pseudomonadaceae. In: Krieg, N.R. and Holt, J.G. (eds.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 1, pp. 141–219. Williams & Wilkins, Baltimore, London 1984.
14. *King, E.O., Ward, M.K. and Raney, D.E.*: Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. *J. Lab. Clin. Med.* **44**, 301–305 (1954).
15. *Thurner, K. und Busse, M.*: Numerische taxonomische Untersuchungen an Enterobakterien aus Oberflächenwasser. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B.* **167**, 262–271 (1978).
16. *Gantenbein-Demarchi, C.*: Flüchtige Stoffwechselprodukte als Frische-Indikatoren von kühlgelagertem Schlachtgeflügel. Diss. Nr. 8549, ETH Zürich 1988.
17. Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV). Herausgeber: Fachgruppe Wasserchemie der GDCh in Gemeinschaft mit dem Normenausschuss Wasserwesen (NAW) im DIN (Deutsches Institut für Normung e.V.). VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Bestimmung von Cyaniden D 13 (DIN 38405 Teil 13) (1981).
18. *Solomonson, L.P.*: Cyanide as a metabolic inhibitor. In: Vennesland, B., Conn, E.E., Knowles, C.J., Westley, J. and Wissing, F. (eds.), *Cyanide in biology*. Academic Press, London (1981).
19. *Lorck, H.*: Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plant.* **1**, 142–146 (1948).
20. *Michaels, R. and Corpe, W.A.*: Cyanide formation by *Chromobacterium violaceum*. *J. Bacteriol.* **89**, 106–112 (1965).
21. *Castric, P.A.*: Hydrogen cyanide, a secondary metabolite of *Pseudomonas aeruginosa*. *Can. J. Microbiol.* **21**, 613–618 (1975).
22. *Castric, P.A., Ebert, R.F. and Castric, K.F.*: The relationship between growth phase and cyanogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Microbiol.* **2**, 287–292 (1979).

23. *Askeland, R.A. and Morrison, S.M.*: Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1802–1807 (1983).
24. *Michaels, R., Hankes, L. V. and Corpe, W.A.*: Cyanide formation from glycine by nonproliferating cells of *Chromobacterium violaceum*. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**, 121–125 (1965).
25. *Wissing, F.*: Cyanide formation from oxidation of glycine by a *Pseudomonas* species. *J. Bacteriol.* **117**, 1289–1294 (1974).
26. *Kleeberger, A.*: Untersuchungen zur Taxonomie von Enterobakterien und Pseudomonaden aus Hackfleisch. *Arch. Lebensmittelhyg.* **30**, 130–137 (1979).
27. *Molin, G. and Ternström, A.*: Numerical taxonomy of psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1249–1264 (1982).
28. *Molin, G. and Ternström, A.*: Phenotypically based taxonomy of psychrotrophic *Pseudomonas* isolated from spoiled meat, water, and soil. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 257–274 (1986).
29. *Gardner, G.A.*: The aerobic flora of stored meat with particular reference to the use of selective media. *J. Appl. Bacteriol.* **28**, 252–264 (1965).
30. *Davidson, C.M., Dowdell, M.J. and Board, R.G.*: Properties of gram negative aerobes isolated from meats. *J. Food Sci.* **38**, 303–305 (1973).
31. *Stanier, R.Y., Palleroni, N.J. and Doudoroff, M.*: The aerobic pseudomonads: a taxonomic study. *J. Gen. Microbiol.* **43**, 159–271 (1966).
32. *Molin, G. and Ternström, A.*: *Pseudomonas lundensis*, a new bacterial species isolated from meat. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **36**, 339–342 (1986).
33. *Freeman, L.R., Silverman, G.J., Angelini, P., Merritt, jr., C. and Esselen, W.B.*: Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.* **32**, 222–231 (1976).

Dr. Silke Meyns  
 Eidg. Anstalt für Wasserversorgung,  
 Abwasserreinigung und Gewässerschutz  
 Abteilung Limnologie  
 Überlandstrasse 133  
 CH-8600 Dübendorf