

JANINA PĘCONEK

ROLA NIEKTÓRYCH GRUP BAKTERII PSYCHROFILNYCH W PROCESIE PSUCIA SIĘ RYB

THE ROLE OF SOME GROUPS OF PSYCHROPHILIC BACTERIA IN THE FISH SPOIL AGE PROCESS

Z Katedry Higieny Żywności Wydziału Weterynaryjnego SGGW-AR
Kierownik: prof. dr hab. M. Szulc

Na podstawie danych piśmiennictwa przedstawiono nowsze poglądy na rolę bakterii psychrofilnych w procesie psucia się ryb. Omówiono także znaczenie bakterii psychrofilnych w produkcji histaminy.

Powszechnie wiadomo, że proces psucia się ryb spowodowany jest z jednej strony działalnością endogennych enzymów tkankowych, a z drugiej strony aktywnością drobnoustrojów. Trudne jest ustalenie granicy między obu tymi procesami.

Wyniki dotychczasowych badań wydają się wskazywać, że psucie się związane jest przede wszystkim z aktywnością obecnej flory bakteryjnej. *Shewan* podaje [12], że jałowe mięśnie ryby po 6 tygodniowym przechowywaniu w 0°C nie różniły się prawie od mięśni świeżo złowionych ryb. Zdaniem autora [12] i innych badaczy [cyt. za 12] w psuciu się wyjałowionej tkanki mięśniowej świeżo złowionych ryb, przechowywanej w niskiej temperaturze (0–7°C) enzymy odgrywają nieznaczną rolę, chociaż na pewno powodują zmiany w nukleotydach typu ATP i ADP i niższych peptydach jak np. anseryna, nie wywołując jednak zmian organoleptycznych produktu.

Szczególnie interesujące wydają się prace *Shewan'a*, w których autor, w oparciu o kompleksowe badania dotyczące zarówno analizy chemicznej wybranych mięśni, jak i roli wyselekcjonowanych bakterii, prześledził proces psucia się różnych chłodzonych artykułów spożywczych. Autorowi wydawało się mało prawdopodobne, że w tak różnych produktach jak np. mleko, kurczęta, ryby, skorupiaki, z ich różnymi składnikami i ich różną początkową florą bakteryjną, psucie miałyby następować według tego samego wzoru.

Analiza ekstraktów z różnych mięśni (między innymi dorsza, śledzia, rekina, skorupiaków i kurcząt) wykazała duże różnice w składzie niskomolekularnych komponentów, które podlegają działaniu mikroorganizmów (tab. I). Pomimo jednak tych różnic, podczas 14-dniowego przechowywania w chłodni badanych produktów następował niezmiennie znaczny wzrost liczby pałeczek z rodzaju *Pseudomonas*, przy jednoczesnym wyraźnym zahamowaniu wzrostu bakterii mezofilnych, w tym mikrokoków i laseczek *Gram*-dodatnich (tab. II).

Tabela I. Skład ekstraktów z tkanki mięśniowej, pochodzącej z różnych surowców spożywczych [wg 12]

The composition of extracts of the muscular tissue derived from various food raw materials

Skład komponentów w mg na 100 g tkanki	Ryby			Skorupiaki	Kurczęta
	Dorsz	Śledź	Rekin		
Ogólna ilość ekstraktu	1200	1200	3000	5500	1200
Ogólna ilość aminokwasów	75	300	100	3000	440
– argininy	<10	<10	<10	750	<20
– glicyny	20	20	20	100–1000	<20
– kwasu glutaminowego	<10	<10	<10	270	55
– histydyny	< 1.0	86	< 1.0	–	<10
– proliny	< 1.0	< 1.0	< 1.0	750	<10
Kreatynina	400	400	300	nieobecna	–
Betaina	nieobecna	nieobecna	150	100	–
TMAO	360	250	500–1000	100	0
Anseryna	150	nieobecna	nieobecna	nieobecna	280
Karnozyna	nieobecna	nieobecna	nieobecna	nieobecna	180
Mocznik	nieobecny	nieobecny	2000	–	–

Interesujące było porównanie rodzaju zmian organoleptycznych występujących w czasie przechowywania pod wpływem działania poszczególnych rodzajów bakterii. *Shewan*, przez zaszczepienie 100 różnych gatunków bakterii, wyizolowanych ze świeżych i z przechowywanych w chłodni ryb oraz produktów rybnych, do sterylnych bloków z ryby, badał możliwości powodowania psucia przez poszczególne bakterie. Na podstawie obserwacji innych autorów (cyt. za *Shewan*) oraz własnych, *Shewan* podaje, że wykrywalne zmiany organoleptyczne, występujące w zaszczepionych rybach, od bezwzględnej świeżości do zepsucia w czasie przechowywania w niskiej temperaturze, występują w czterech fazach (tab. III). W temperaturze wyższej, fazy te są przyspieszone i nieco skrócone. Najważniejszą cechą, zdaniem autora, będącą efektem działalności *Pseudomonas putrefaciens* jest rozmiękanie mięsa, połączone z widoczną oślizgłością, zależną od stopnia protolizy.

Wyniki przytoczonych badań oraz obserwacje *Van Spreekens* [15] wydają się wskazywać, że w biologicznym psuciu się produktów spożywczych, takich jak mięso zwierząt rzeźnych, kurcząt, ryb i skorupiaków, przechowywanych w niskiej temperaturze (0–7°C) główną rolę odgrywa rodzaj *Pseudomonas*. Mniejsze znaczenie natomiast ma rodzaj *Achromobacter* (obecnie nazwany *Moraxella*). *Shewan* [12] oraz *Van Spreekens* [15] stwierdzili bardzo nikłe zmiany w wyglądzie i zapachu podczas przechowywania i uważają, że bakterie z rodzaju *Moraxella* nie odgrywają większej roli w psuciu się produktów przechowywanych w warunkach chłodniczych.

Tabela II. Zmiany składu % flory bakteryjnej w różnych rodzajach żywności podczas chłodniczego przechowywania [wg 12]
Changes in the percentile composition of the bacterial flora in different kinds of foods during cold storage

Grupa mikrobiol.	Produkt spożywczy									
	Mleko i produkty mleczne		Kurczęta		Ryby		Mięso		Mielona wołowina	
	7dni	Mikroflora wyjściowa	10-11 dni w 1°C	Mikroflora wyjściowa	10 dni w lodzie	Mikroflora wyjściowa	4 dni w 7°C	Mikroflora wyjściowa	14 dni w 7°C	
<i>Pseudomonas</i>										
a) pigment.	45	2	51	0	8	9				
b) nie pigment.	25	–	20	16	} 53	11	85			
c) <i>P. putref.</i>	–	–	10						11	84
<i>Achromobacter</i>	9	7	7	42	25	27		–	–	
<i>Alkaligenes</i>	8	–	–	–	–	–	–	–	–	
<i>Flavobacterium</i>	1	14		2	1			0	0	
<i>Micrococcus</i>	11	50		10	2	53		50	5	
Pałeczki z grupy <i>E. coli</i>		8								
Laseczki G+		14		28	10					
Inne	1	5	12	2	1		15	14	11	
Drożdże								25	0	

Zdaniem *Shewan* [12], rozwój wszystkich szczepów *Pseudomonas fragi*, niezależnie od źródła pochodzenia, wywołuje powstawanie zapachu owocowego. Obserwacje tego badacza wskazują, że *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas fragi* i *Pseudomonas putrefaciens* mogą dobrze rosnać w temperaturze -2 do -5°C . Bakterie z rodzaju *Pseudomonas*, zdaniem autora, powodują co najmniej dwa typy zmian zapachowych:

- 1) dominująca produkcja estrów owocowych, podobnych do zapachu jaki daje grupa *Pseudomonas fragi*,
- 2) zdolność wytwarzania zapachu siarkowego, np. przez *Pseudomonas fluorescens*, często z dodatkiem zapachu owocowego, zapachu zepsutej wody kapuścianej lub też zapachu warzywnego, amoniakalnego.

Zapach siarczków, zdaniem autora, jest zależny od powstawania pojedynczych lub złożonych komponentów siarki, w produktach takich jak: siarczki, dwusiarczki, merkaptan metylu itp.

Tabela III. Zmiany organoleptyczne mięsa białej ryby w czasie przechowywania w temp. 0°C [wg 12]
Organoleptic changes in white fish meat during storage at 0°C

Stadia rozkładu	Temperatura przechowywania (°C)	Okres przechowywania (dni)	Zmiany organoleptyczne
Faza I	0	0–6	Brak wyraźnego psucia, mięso konsystencji jędrnej
	4	0–3	
Faza II	0	7–10	Zapach nieco wzmocniony, stęchły, mysi, mięso konsystencji nieco miękkiej
	4	3–5	
Faza III	0	11–14	Zapach nieco kwaśny, nieznacznie słodki do owocowego. Widoczna nieświeżość. Mięso konsystencji miękkiej
	4	6–7	
Faza IV	0	≥ 15 lub więcej	Zapach H ₂ S i siarczków, stęchłej wody kapuścianej, ostry amoniakalny, zapach kałowy lub podobny do trójmetyloaminy. Mięso konsystencji miękkiej, oślizgłe.
	4	> 7	

Murray [dane niepublikowane – cyt. za *Shewan* – 12] wykazał, że niektóre czyste kultury, rosnąc w obecności cystyny i metioniny, produkują także komponenty siarkowe. Tlenowa dezaminacja metioniny prowadzi do tworzenia kwasu ketomasłowego i merkaptanu metylu lub dwusiarczku dwumetylu. Schemat ten podał *Starkey* oraz inni badacze [cyt. za 12]. Pałeczki *Pseudomonas putrefaciens* powodują natomiast powstawanie zapachu rybnego, który jest następstwem rozkładu tlenku trójmetyloaminy do trójmetyloaminy. W procesie rozkładu tkanki rybnej przez *Pseudomonas putrefaciens* w pierwszym etapie pojawiają się lotne związki siarkowe i NH₃, a w późniejszym okresie występuje zapach rybi.

Gatunek *Pseudomonas putrefaciens* był po raz pierwszy wyizolowany z zepsutego masła przez *Derby* i *Hammer*, a następnie, między innymi, z surowego mleka, ryb, kurcząt, mięsa, wołowego, wody jezior, naturalnego gazu, benzyny [cyt. za 12]. *Lewin* próbował opracować zasady klasyfikacji tego gatunku na podstawie składu guaniny i cytozyny (G+C) w DNA. Zdaniem *Shewan* [12] grupa *Pseudomonas putrefaciens* obejmuje co najmniej dwa oddzielne gatunki. Jakkolwiek są one fenotypowo prawie identyczne, to jednak różnią się ilością G+C w swoich DNA. Jak podaje *Shewan* [12], w grupie *Pseudomonas putrefaciens* zawartość G+C w DNA wynosi 65% i dlatego, zdaniem autora, gatunek ten powinien być zaliczony do rodzaju *Pseudomonas*. *Lee* i inni [cyt. za *Van Spreekens* – 15] proponują zaliczenie pałeczek *Pseudomonas*, u których stosunek ten waha się w granicach 40–55% do rodzaju *Alteromonas*. Z ostatniego wydania systematyki bakteriologicznej *Bergey'a* [2] wynika, że *Pseudomonas putrefaciens*, na podstawie zawartości G+C w DNA, sięgającym 43–45% został obecnie wyłączony z rodzaju *Pseudomonas* i jest aktualnie zaliczony do rodzaju *Alteromonas*. Według *Bergey'a* gatunek ten obejmuje co najmniej dwie różne fenotypowo grupy.

W Polsce, *Grawiński* [6, 7] izolował *Pseudomonas putrefaciens* z ryb morskich, wody i osadów dennych południowego Bałtyku. Gatunek ten, chorobotwórczy w określonych warunkach dla ryb, może być również patogenny dla człowieka [6, 7, 10, 11].

Van Spreekens, na podstawie własnych prac eksperymentalnych, dokonała klasyfikacji bakterii, powodujących psucie się ryb i krewetek, uszeregowując je, w zależności od ich roli i znaczenia w tym procesie:

1. Grupa *Pseudomonas putrefaciens*, obejmująca dwa oddzielne gatunki,
2. Grupa bakterii A, nieokreślonych, o cechach wspólnych z gat. *Pseudomonas putrefaciens* (A „non – defined” group of spoilers),
3. Grupa bakterii podobnych do *Pseudomonas* („*Pseudomonad – like*”), powodująca psucie się krewetek,
4. Rodzaj *Pseudomonas* (grupy I i II),
5. Rodzaj *Photobacterium*,
6. Grupa bakterii o cechach zbliżonych do *Moraxella*, uprzednio klasyfikowanych jako („*Moraxella – like*”).

Ważnym problemem z punktu widzenia oceny sanitarnej jest zagadnienie obecności histaminy w tkance mięśniowej ryb, co często nawet nie jest związane z wyraźnymi zmianami organoleptycznymi produktu. Większość autorów jest jednak zdania, że toksycznemu poziomowi wytworzonej histaminy towarzyszą zmiany organoleptyczne produktu [5, 9]. Jednak nie wszyscy są zgodni co do tego poglądu (cyt. za 13, 15).

Doniesienia z ostatnich lat wskazują na coraz częściej występujące zatrucia pokarmowe po spożyciu ryb, u których w tkance mięśniowej występowała histamina w wysokich stężeniach [1, 3, 4, 7, 13, 14]. Zatrucia takie stwierdzono również w Polsce [17].

Dane, dotyczące udziału poszczególnych gatunków bakterii w procesie dekarboksylacji histydyny są kontrowersyjne. Zdaniem *Grawińskiego* zdolność tę posiadają drobnoustroje znajdujące się na powierzchni ryb, a przede wszystkim *Proteus morgani*, *Escherichia coli*, *Salmonella* i *Schigella* [6]. Podobne stanowisko reprezentuje *Zaleski* [18]. *Stănescu* i inni [13] szczególne znaczenie w tym procesie przypisują *E. coli*. Badania przeprowadzone w Rumunii wykazały, że histamina może być produkowana zarówno przez chorobotwórcze jak i niechorobotwórcze szczepy *E. coli*.

W Polsce dotąd nie były prowadzone badania doświadczalne związane z udziałem różnych grup bakterii w tym procesie.

Ganowiak uważa, że stężenie soli w rybach solonych hamuje rozwój większości bakterii zdolnych do produkcji dekarboksylaz [5]. Obserwacje *Karnopa* [9], oparte na badaniach solonych sardeli, wskazały na możliwości tworzenia histaminy przez szczepy *Pediococcus halophilus* w warunkach ponad 20% zawartości NaCl, zarówno podczas przechowywania w temperaturze 20°C jak i w 5°C. Zdaniem badacza, wysoka zawartość histaminy nie zależała od stopnia dojrzałości produktu, lecz od zawartości NaCl, przy zawartości soli ponad 20% była najniższa.

Zdaniem *Windygi* i wsp. [17] bakterie, w zależności od poziomu wytwarzanej histaminy, można podzielić na dwie grupy: zdolne do wytwarzania podczas krótkiej inkubacji ≤ 24 h w temperaturze 15°C powyżej 100 mg histaminy/100 g produktu – *Proteus morgani*, *Enterobacter aerogenes*, *Clostridium perfringens*, *Klebsiella pneumoniae* oraz zdolne do wytworzenia, nawet przy dłuższej inkubacji ≥ 48 h w temp. 30°C mniejszej ilości histaminy (poniżej 25 mg/100 g) – *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*.

Jędra [8] ponadto podaje, że z produktów, których spożycie spowodowało zatrucie ludzi na skutek zwiększonej w nich zawartości histaminy, wyizolowano m.in. *Clostridium perfringens* i *Lactobacillus buchneri* [8]. Nieco odmienny punkt widzenia reprezentuje *Van Spreekens* [16], z której badań wynika, że *Enterobacteriaceae* stanowią zazwyczaj mniej niż 0.01% ogólnej liczby bakterii wyizolowanych z filetów i produktów rybnych. W badaniu 100 próbek systemem API/20 E *Van Spreekens* nie stwierdziła obecności *Proteus morgani*. Podważa to rolę tych bakterii w procesie dekarboksylacji histydyny.

Z ostatnich badań *Van Spreekens* wynika, że bakterie psychrofilne mogą mieć istotne znaczenie w produkcji histaminy, a za szczególnie aktywną w tym procesie autorka uważa *Photobacterium* [16]. Bakterie te mają specjalne wymagania wzrostowe i dlatego nie są wykrywalne klasycznymi metodami. Z wcześniejszych obserwacji *Van Spreekens* [15] wynika ponadto, że grupa *Photobacterium*, podobnie jak grupa *Moraxella*, nie daje lub powoduje powstawanie mało intensywnego zapachu w trakcie procesu psucia.

Naukowcy japońscy uważają [cyt. za 16], że tworzenie się histaminy w makreli zachodzi przy udziale bakterii określonych przez autorów jako grupa „N” (bliżej nie oznaczona). *Van Spreekens* [16] sugeruje, że, być może, bakterie grupy „N” są w istocie identyczne z *Photobacterium*. Wyjaśnienie tego zagadnienia wymaga jednak dodatkowych badań.

Pani dr *Van Spreekens* z Institute for Fishery Products TNO, Ijmuiden, the Netherlands oraz Panu dr *Karnopowi* z Institut für Biochemie und Technologie der Bundesforschungsanstalt für Fischerei in Hamburg składam serdeczne podziękowanie za przysłane odciski prac, które wykorzystałam przy przygotowaniu niniejszej pracy.

J. Pęconek

THE ROLE OF SOME GROUPS OF PSYCHROPHILIC BACTERIA IN THE FISH SPOIL AGE PROCESS

Summary

On the basis of the literature survey, the present state of knowledge of the part played by psychrophilic bacteria in the fish spoilage process was described. Furthermore, the role of psychrophilic bacteria in the formation of histamine was discussed.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bakasun V., Cuculic M., Maretic Z.*: Scombrototoxic fish poisoning in the Rijeka region. Proc. 2nd Congress Foodborne Infections and Intoxications Berlin (West), 1986, 249. – 2. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Williams and Wilkins Company, Baltimore, USA, 1984. – 3. *Fonberg-Broczek M., Windyga B., Kozłowski D., Sawilska-Rautenstrauch D., Kahl S.*: Spektrofluorometryczna metoda oznaczania histaminy w konserwach rybnych. Roczn. PZH, 1988, 39, 223. – 4. *Ganowiak Z.*,

Gajewska R., Lebedzińska A.: Zawartość histaminy w importowanych konserwach rybnych oraz w serach produkcji krajowej. Roczn. PZH, 1987, 38, 44. – 5. Ganowiak Z., Gajewska R., Lipska E.: Zawartość histaminy w wybranych środkach spożywczych. Roczn. PZH, 1988, 39, 282. – 6. Grawiński E.: Wskaźniki spożywczej przydatności ryb morskich wobec wzrastającego zanieczyszczenia wód. Medycyna Wet. 1986, 7, 422. – 7. Grawiński E.: Charakterystyka mikrobiologiczna węgorza ze zmianami patologicznymi poławianego w 1981 r. w Zatoce Puckiej i Zatoce Gdańskiej. Biuletyn MIR, 1982, 1–6, 14. – 8. Jędra M.: Histamina i inne aminy występujące w żywności. Roczn. PZH, 1988, 39, 417. – 9. Karnop G.: Histamin in Salzsardellen. Archiv für Lebensmittelhygiene. 1988, 39, 67. – 10. Marne C., Pallar es R., Sitges Serra A.: Isolation of *Pseudomonas putrefaciens* in intra – abdominal sepsis. J. Clin. Microbiol. 1983, 17, 1173.

11. Richard C., Kiredjian M., Guilvout I.: Characteristics of phenotypes of *Alteromonas putrefaciens*. Study of 123 strains. Ann. Biol. Clin., Paris 43, 732, 1985. – 12. Shewan J.M.: The biterioration of certain proteinaceous foodstuffs at chill temperatures. Industrial Aspects of Biochemistry, ed. B. Spencer, Federation of European Biochemical Societies, 1974. – 13. Stănescu V., Laslo., Sociaciu C., Stănescu U., Gus C., Jurcă I., Lates M.: Hygienische Beurteilung von Ozeanischen in Bezug auf den Gehalt an Histamin und anderen Proteinabbauprodukten. Proc. 2nd Congress Foodborne Infections and Intoxications Berlin (West) 1986, 245. – 14. Untermann F., Dickertmann D., Yamani M.: Scombroidevergiftung in pizzeria – restaurants – betrieben. 1st World Congress Infections and Intoxications Berlin (West) 1980, 152. – 15. Van Spreekens K.J.A.: Characterization of some fish and shrimp spoiling bacteria. Antonie v. Leeuwenhoek 43, 283, 1977. – 16. Van Spreekens K.J.A.: Histamine production by the psychrophilic flora. Proc. of an International Symposium Coordinated by the University of Alaska, Alaska, 1986. 17. Windyga B., Ścieżyńska H., Górecka K., Balcerzak G., Grochowska A.: Występowanie histaminy w konserwach rybnych. Roczn. PZH, 1988, 39, 424. – 18. Zaleski S.: Mikrobiologia Żywności Pochodzenia morskiego. Wyd. Nauk. – Tech. Warszawa, 1985.

Dnia 1990.01.30

02-766 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166