

FERMENTE ET ÜRÜNLERİNDE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* GELİŞİMİ ÜZERİNE STARTER KÜLTÜRLERİN ETKİLERİ

EFFECTS OF STARTER CULTURES ON GROWTH OF *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN FERMENTED MEAT PRODUCTS

Halil VURAL, Aydin ÖZTAN

Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Beytepe-Ankara

ÖZET: *Staphylococcus aureus*'dan kaynaklanan gıda zehirlenmelerinde fermente et ürünlerinin payı oldukça fazladır. Burada, fermente et ürünlerinde *S.aureus* üremesi ve enterotoksin oluşumu üzerine starter kültürlerin etkileri incelenmiş ve inhibisyon mekanizmaları tartışılmıştır.

SUMMARY: The proportion of fermented meat products are rather high in Staphylococcal food poisoning. In this review, effects of starter cultures on growth and enterotoxin production by *S.aureus* in fermented meat products were examined, also inhibition mechanisms were discussed.

GİRİŞ

Staphylococcus aureus, doğal olarak insan ve hayvan deri, el ve burun florasında bulunmakla birlikte, doğada da yaygın olarak bulunan ve etlerin mikrobiyal florasında sık rastlanılan bir bakteridir (BANWART, 1989).

Cig et ve özellikle kıymış ette her zaman bulunabilir (STENGEL, 1990).

S.aureus'un besin istekleri fazla değildir. 6,7-45,6°C gibi geniş bir sıcaklık aralığında ve çoğu bakterilerin üreyemediği 0,90-0,95 su aktivitesinde ve %5-10 tuz konsantrasyonlarında kolaylıkla ürer. Hem aerobik, hem anaerobik koşullarda üreyebilen aside toleranslı bir mikroorganizmadır. Aerob koşullarda pH 4,0 ve 0,83-0,86 su aktivitesi değerine kadar üremesini sürdürmektedir (GENIGEORGIS, 1976; NOTERMANS ve HEUVELMAN, 1983; BANWART, 1989; STENGEL, 1990).

S.aureus'un önemi, insan ve hayvanlarda enfeksiyonlara neden olması yanında, gıda zehirlenmelerinde rol almasından kaynaklanmaktadır. Zehirlenmenin oluşumu için enterotoksijenik *S.aureus* varyetelerinin gıdalarda gelişerek 10^6 Cfу/g ve üzerinde olmaları gereklidir (BANWART, 1989; STENGEL, 1990).

S.aureus'un tüm varyeteleri enterotoksijenik değildir. PAYNE ve WOOD (1974), et, süt ve diğer gıdalarda belirlenen *S.aureus* varyetelerinin %6,25'inin enterotoksin oluşturduğunu saptamışlardır.

Bugüne kadar enterotoksijenik *S.aureus* varyetelerinin A,B,C,D,E,F enterotoksinleri olmak üzere 6 farklı enterotoksin oluşturduğu saptanmıştır. Genelde zehirlenmelerden A enterotoksinini sorumlu olmakla birlikte, diğer enterotoksinlerde zehirlenme belirtileri gösterebilmektedir (STENGEL, 1990).

S.aureus gerek aerobik, gerekse anaerobik koşullarda toksin üretebilir, fakat anaerobik koşullarda toksin üretimi oldukça azdır (GENIGEORGIS, 1976). LEE ve Ark. (1981), *S.aureus*'un aerobik olarak 37°C'da 0,84 su aktivitesinde veya 20°C'da 0,89 su aktivitesinde enterotoksin üretirken anaerobik olarak 37°C'da 0,90 su aktivitesine ve 20°C'da 0,94 su aktivitesine gerek duyduğunu belirtmişlerdir.

FERMENTE ET ÜRÜNLERİNDE *S.aureus* GELİŞİMİ

Amerika'da yapılan çalışmalar, *S.aureus*'dan kaynaklanan gıda zehirlenmelerinde fermente et ürünlerinin payının oldukça fazla olduğunu göstermiştir (BRYAN, 1980; BACUS ve BROWN, 1981; METAXOPOULOS, 1981a; SMITH ve PALUMBO, 1983).

GENIGEORGIS (1976), İtalyan tipi kurutulmuş salamilerde, $<1,0 \times 10^2$ - $5,6 \times 10^4$ Cfу/g *S.aureus* saptandığını belirtmiştir. Bir başka çalışmada, 13 fermente sucukta kaogülaz pozitif *Staphylococcus* düzeyi $1,0 \times 10^6$ - $1,0 \times 10^7$ cfу/g olarak saptanmıştır (ANONYMOUS, 1978).

BARBER ve DEIBEL (1972), ticari fermento sucukların oksijen oranının en yüksek olduğu dış kısımlarında önemli düzeyde *S.aureus* saptamlardır. 4×10^7 CfU/g *S.aureus*'un 24 saat içinde sucuklarda belirlenebilir enterotoksin A oluşumu için gerekli olduğu, %10, %15 ve %20 oksijen içeren ortamlarda 2+ saat içinde, %5 oksijen içeren ortamda 48 saat sonra belirlenebilir düzeyde enterotoksin A saptandığı, buna karşın anaerob koşullarda 120 saatin sonunda bile toksin bulunmadığı da aynı araştırmacılarca belirlenmiştir. Araştırmacılar ayrıca, çoğu *S.aureus* varyetesi, aerob koşullarda pH 5,1'de enterotoksin üretirken, anaerob olarak pH 5,7'nin altında bile belirlenebilir düzeyde entereotoksin oluşturmadığını da saptamışlardır.

S.aureus'dan kaynaklanan gıda zehirlenmeleri, fermento et ürünlerinde önemli bir sorundur. *S.aureus* işletmede; personelden, çevreden ve kullanılan alet-ekipmanlardan gelebilir. Et ürünleri fermentasyonu dinamik bir dengedir. Fermente et ürünleri üretimi süresince *S.aureus* inhibisyonunda etkin olan parametreler;

1. Başlangıç et formülasyonu, pH, su aktivitesi, redoks potansiyeli,
2. Kullanılan kürleme maddeleri, katkılar ve bunların kullanım miktarları,
3. Uygulanan sıcaklık ve bağlı nem, dumanlama,
4. *S.aureus*'un başlangıç düzeyi,
5. Starter kültür kullanılıp kullanılmadığı ve başlangıç düzeyi şeklinde sıralanabilir (GENIGEORGIS, 1976; BACUS ve BROWN, 1981; METAXOPOULOS ve Ark., 1981a).

Araştırmacılar fermento et ürünlerinin hazırlanması sırasında; hammadde, katkılar, ekipmanlar ve çalışanların hijyenindeki aksamaların, *S.aureus* kontaminasyonuna neden olduğunu ve kontaminasyonun büyük kısmının çalışanlardan (burun, tırnak, saç, el, dışkı) geldiği konusunda birleşmektedirler (SMITH ve PALUMBO, 1981).

***S.aureus*'UN GELİŞİMİ VE ENTEROTOKSİN OLUŞTURMASI ÜZERİNE STARTER KÜLTÜRLERİN ETKİLERİ**

Fermente sucuklarda, laktik asit bakterileri doğal olarak mevcuttur, ayrıca starter kültür olarak dışardan da katıtlar ve karbonhidratları laktik aside çevirirler. İyi bir fermentasyon, sadece fermentasyon ürünlerinin oluşumu değil, ortamda bulunabilecek istenmeyen mikroorganizmaların, özellikle gıda patojenlerinin üremelerinin önlenmesi demektir.

Fermente et ürünlerinde *S.aureus* üremesi ve toksin oluşturma üzerine starter kültürlerin rolü konusunda, son 20 yıl içinde et endüstrisinde starter kullanımının artmasına paralel olarak araştırmalar da arṭmıştır.

Hızlı starter kültür üremesi ve hızlı pH düşüşü *S.aureus* riskini oldukça azaltır. Ayrıca sucuk formülasyonunda kullanılan bileşenlerin *S.aureus* taşımadıklarına dikkat edilmesi de bu riski minimuma indirecektir (METAXOPOULOS ve Ark., 1981b).

BARBER ve DEIBEL (1972), ticari fermento sucuklarda *Pediococcus cerevisiae* ile *S.aureus* üremesinin sucuk yüzeyinde limit düzeye indiğini, iç kısımlarda ise saptanmadığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu inhibasyonun, kullanılan starter kültürün laktik asit üremesiyle gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

S.aureus'un başlangıç inokülasyon düzeyi yüksek ve fermentasyon sıcaklığı düşük olduğunda starter kültürlerin inhibitör etkisi azalmaktadır (SMITH ve PALUMBO, 1983). DALY ve Ark., (1973), sucuk karışımında *S.aureus* üremesi üzerine *P.cerevisiae*, *Lactobacillus plantarum* ve *P.cerevisiae* - *L.plantarum* kombinasyonu halinde üç farklı starter kültürün etkilerini incelemiştir. *S.aureus*'un başlangıç inokülasyon düzeyi 10^4 CfU/g, starterlerin 10^7 CfU/g sucuktur. Araştırmacılar, üç farklı starter kültürün *S.aureus* üremesini 37°C 'da başarılı bir şekilde önlediklerini, fakat 30°C ve 21°C 'da inhibisyon etkilerinin azaldığını saptamışlardır. *S.aureus*'un başlangıç inokülasyon düzeyi $1,9 \times 10^5$ CfU/g'a yükseltildiginde starter kültürlerin inhibisyon derecesinin azaldığını da belirtmişlerdir.

LABOTS (1976), fermento sucuklarda, *S.aureus*'un inhibisyonunda en önemli faktörün kürlemede kullanılan nitrit olduğunu, starter kültürlerin rolünün ise nitrit yanında daha düşük kaldığını belirtmiş ve 120 ppm nitrit kullanımının yeterli olduğunu saptamıştır.

RACCACH (1981), enterotoksin A üreten *S.aureus* 265-1 varyetesiinde $1,0 \times 10^4$ CfU/g düzeyinde eklediği Genoa sucuk ve pepperonide starter kültür olarak *Pediococcus spp.* içeren Lactacel 75 kullanmıştır. Lactacel 75, Genoa sucuk ve pepperonide fermentasyon periyodu süresince (pH 5,0 olana kadar) sucukların dış yüzeyinden 0,5-1,0cm içine kadar olan kısımlarda *S.aureus* inhibisyonunu sağlamıştır. *S.aureus*'un üreme zamanı, starter kültürlerde kontrol grubuna göre 15 kez daha uzundur. 21°C'da Genoa sucukta, Lactacel 75 *S.aureus*'un %42'sini yıkma uğratmaktadır. Pepperonide de, 35°C'da > 100 kez azalma sağlanmaktadır.

RACCACH (1986), yaptığı bir diğer çalışmada, *Pediococcus* türlerinin sucuklarda *S.aureus* üremesini, aerobik ve anaerobik koşullarda önlediğini saptamıştır.

Fermente sucuklarda *S.aureus* inhibisyonunda, *S.aureus*'un başlangıç inokülasyon düzeyi kadar önemli bir nokta da, starter kültürlerin katılım oranıdır (METAXOPOULOS ve Ark., 1981a.b).

METAXOPOULOS ve Ark. (1981a), İtalyan tipi kurutulmuş salamilerde *S.aureus* gelişimi ve enterotoksin oluşturmaları üzerine *Lactobacillus spp.* starter kültürünün etkilerini incelemiştir. *S.aureus* $2,2 \times 10^2$ - $1,8 \times 10^7$ CfU/g aralığında 5 farklı düzeyi kullanılırken, starter kültür 5×10^5 CfU/g düzeyinde katılmıştır. Doğal fermentasyona tutulan örneklerde göre, starter kültürlerin *S.aureus* düzeyleri düşük bulunurken, hiç bir örnekte enterotoksin saptanmamıştır.

İki farklı *S.aureus* (10^4 ve 10^5 CfU/g) ve üç farklı starter kültür (*Lactobacillus spp.*) düzeyi (0 , 10^5 , 10^6 CfU/g) ve üç farklı başlangıç pH'sı ($6,1$, $5,5$ ve $4,8$) kullanarak yapılan İtalyan tipi kurutulmuş salamilerde *S.aureus* üremesi üzerine başlangıç pH düzeyinin, başlangıç *S.aureus* ve laktik asit bakteri sayısının önemli düzeyde etkin olduğu belirlenmiştir. Daha düşük başlangıç pH'sı ve daha yüksek laktik asit bakteri sayısının *S.aureus* inhibisyonunda en yüksek aktivite verdiği saptanmıştır (METAXOPOULOS ve Ark., 1981b).

Fermente sucuklarda starter kültür olarak karışık kültürler kullanıldığında laktik asit bakterileri yanında, karışımda yer alan diğer mikrobiyal kültürlerin *S.aureus* inhibisyonundaki etkisi tam açık değildir. Fakat inhibisyon yardımcı olduğu ve laktik asit bakterilerinin etkisini belli ölçülerde artırdığı gözlenmektedir (NISKANEN ve NURMI, 1976; DELENYI ve INCZE, 1985; MEISEL, 1989).

NISKANEN ve NURMI (1976), enterotoksin A,B,C, üretebilen *S.aureus* varyetelerini ekledikleri Avrupa tipi kurutulmuş fermente sucukların starter kültürler (*Micrococcus spp.* ve *Lactobacillus spp.*) ve starter kültürsız olarak iki farklı şekilde üretmişler ve üretimin değişik safhalarında analize almışlardır. Starter kültürsız örneklerde enterotoksin A'nın 3. günde üредiğini ve *S.aureus* düzeyinin bu aşamada 10^6 CfU/g olduğunu saptamışlardır. *S.aureus* düzeyi 10^8 CfU/g'a yükseldiğinde bile enterotoksin B saptanmadığını, enterotoksin C'nin ise 8×10^7 CfU/g *S.aureus* düzeyinde belirlendigini ve starter kültürlerin enterotoksin A oluşumunu önledikleri belirtmişlerdir. Starter kültürlerde enterotoksin B saptanmadığını, enterotoksin C'nin de üretimin başlangıç safhalarında belirlenirken, son ürünlerde bulunmadığını belirtmişlerdir. Son ürün pH'sı 5,0-5,1'dir.

DELENYI ve INCZE (1985), *S.aureus*'un enterotoksin oluşturan varyeteleri üzerine *Pediococcus spp.* (Saga I), *Pediococcus spp.* (Saga 75), *Pediococcus spp.* + *Micrococcus spp.* (Saga III), *Lactobacillus spp.* + *Micrococcus spp.* (Duploferment 66) ve *Leuconostoc mesenteroides* starter kültürlerinin etkilerini incelemiştir ve kontrol grubuna göre *S.aureus*'u belirgin şekilde inhibe ettilerini ve inhibitör etkilerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir.

MEISEL (1989), kurutulmuş sucuklarda *S.aureus* üremesinin inhibisyonunda *L.curvatus*, *M.varians* ve *Dabaryomyces hansenii* starterlerinin tek tek kullanıldığına başarıyla inhibisyonu gerçekleştirdiklerini, fakat ikili ve üçlü starter kültür karışımlarının daha yüksek düzeyde inhibitör etki gösterdiklerini saptamıştır.

S.aureus inhibisyonu, fermentasyon süresince oluşan laktik asit üretimine dayanır ve laktik asit oluşumu için de ortamda starter kültürler ve glukoz bulunmalıdır. Glukoz yoğunlığında, sadece starter kültür mevcutsa inhibitör etki çok az veya yoktur. Benzer sonuçlar glukoz varlığında starter kültür yokluğunda da geçerlidir (SMITH ve PALUMBO, 1978).

Laktik asit oluşumuyla sağlanan inhibisyon derecesi, *P.cerevisiae* ve *L.plantarum* karışık kültürleri kullanıldığında sucuk karışımına eklenen glukoz konsantrasyonuyla da bağlantılıdır. Asid inhibisyonu, %0,5 glukoz katılan sucuklarda, %2 glukozluğa göre daha fazladır (SMITH ve PALUMBO, 1978).

Lebanon bologna gibi, uzun süre (2-4 gün) fermentasyona tutulan ve fermente karbonhidratları yüksek oranda içeren ürünlerde fazla miktarda asit oluşur ve *S.aureus*'u inhibe eder. Buna karşın diğer sucuklarda (summer sausage ve thunringer gibi) düşük düzeyde fermente karbonhidrat mevcuttur, fermentasyon süresi 24 saat gibi kısa ise asit üretimi düşüktür ve sucukta canlı patojen mikroorganizma kalma şansı yüksektir (SMITH ve PALUMBO, 1978).

Starter kültürlerle *S.aureus* inhibisyonunun artırılması ortama glukoz oksidaz ilavesiyle olasıdır. KATO ve Ark. (1986), 10^7 CfU/g *L.plantarum* ve *P.cerevisiae* starter kültürleri ile birlikte, ortama 2,2 unit/g glukoz oksidaz eklenmesinin *S.aureus* inhibisyonunu başarıyla gerçekleştirdiğini saptamışlardır.

PETCHING ve WOODBURN (1990), Tayvan tipi fermente domuz sucuklarında şorun oluşturan *S.aureus* üzerine %0,75 ve %1,5 düzeylerinde starter kültür katılımının etkilerini incelemiştir. Starter kültürsız örneklerde *S.aureus* artışı gözlenirken, %0,75 starter kültürlü örneklerde 48 saat sonunda, %1,5'lük starter kültür katılan sucuklarda 36 saat sonunda *S.aureus* inhibisyonu gerçekleştigiğini belirtmişlerdir.

İNHİBİSYONUN ETKİ MEKANİZMASI

Starter kültürlerin, *S.aureus* inhibisyonundaki en önemli etki şekilleri; kontrollü fermentasyon koşullarında, laktik asit bakterileri tarafından oluşturulan laktik aside dayanır ki, laktik asit oluşumu ile pH düşürülür ve düşük pH derecelerinde *S.aureus* üremesi önlenir (BARBER ve DEIBEL, 1972; HAINES ve HORMON, 1973; SCHILLINGER ve LÜCKE, 1990).

Starter kültürler, laktik asit yanında, çok az oranlarda asetik asit, etanol, porpionik asit ve butirik asit gibi fermentasyon ürünleri de oluşturmaktadırlar (DEKETELAERE ve Ark., 1974).

SCHILLINGER ve LÜCKE (1990), bu tür yan fermentasyon ürünlerinin de *S.aureus* inhibisyonunda etkili olduğunu bildirmiştir.

Starter kültürler, *S.aureus* ile ortamda mevcut besin öğelerinin kullanılmasında yarılmalı davranışarak da inhibisyon'a yardım ederler. Ayrıca inhibisyonda etkin olan hidrojen peroksit, antibiotik ve bakteriosin gibi metabolitler oluşturularak da etki gösterirler (HAINES ve HORMON, 1973; RACCACH ve BAKER, 1978; SCHILLINGER ve LÜCKE, 1990).

KAYNAKLAR

- ANDERSSON, R., 1986. Inhibition of *Staphylococcus aureus* and sphaeroplast of gram-negative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum*. International J.Food Microb. 3:149-160.
- ANONYMOUS, 1978. Fermented sausage dangers. Meat Ind. February 1978: 62-68 (almıştır. M.Raccach., J.Food Prot. 44:665-669.).
- BACUS, J.N., W.L. BROWN, 1981. Use of microbial cultures : Meat products. Food Tech. 35:74-78, 83.
- BANWART, G.J., 1989. Basic Food Microbiology. 2nd ed. Van Nostrand Reinhold, New York, 773p.
- BARBER, L.E., R.H. DEIBEL, 1972. The effect of pH and oxygen tension on Staphylococcal growth and enterotoxin production in fermented sausage. App. Microb. 24:891-898.
- BRYAN, F.L., 1980. Foodborne diseases in the United States associated with meat and poultry. J. Food Prot. 43:140-150.
- DALY, C., N. CHANCE, W.E. SANDINE, P.R. ELLIKER, 1973. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter culture and chemical acidulation. J.Food Sci. 38:426-430.
- DEKETELAERE, A., D. DEMEMEYER, P. VANDEKERCKHOVE, I. VERVAEKE, 1974. Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. J. Food Sci., 39:297-300.
- DELENYI, M., K. INCZE, 1985. Effect of starter cultures on pathogenic microorganisms. Proc. Eur. Meet Meat Res. Work. No:31, 5-6, 388-392.
- GENIGEORGIS, C.A., 1976. Quality control for fermented meats. JAVMA, 169:1220-1228.
- HAINES, W.C., L.G. HARMON, 1973. Effect of selected lactic acid bacteria on growth of *Staphylococcus aureus* and production of enterotoxin. App. Microb. 25:436-441.
- KATO, T., D. MIZUKOSHI, I. SHIGA, Y. SATO, 1986. Preparation of fermented sausage by lactic acid bacteria. II. Control of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. J. Agric. Chem Soc. Japan. 60:199-205 (FSTA, 19, 5, 212).
- LABOTS, H., 1976. Effect of nitrite on the development of *Staphylococcus aureus* in fermented sausages. Proc. 2nd. Int. Symp. Nitrite Meat Prod., Zeist, 1976. Pudoc. Wageningen, Netherlands, 21-27.

- LEE, I.C., L.G. HARMON, J.F. PRICE, 1977. Growth and enterotoxin production by *Staphylococci* in Genoa salami. *J. Food Prot.* 40:325-329.
- LEE, R.Y., G.J. SILVERMAN, D.T. MUNSEY, 1981. Growth and enterotoxin A production by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon in the intermediate moisture range. *J. Food Sci.*, 46:1687-1700.
- MEISEL, C., K.H. GEHLEN, A. FISCHER, W.P. HAMMES, 1989. Inhibition of growth of *Staphylococcus aureus* in dry sausages by *Lactobacillus curvatus*, *Micrococcus varians* and *Debaryomyces hansenii*. *Food Biotech.* 3:145-168.
- METAXOPOULUS, J., C. GENIGEORGIS, M.J. FANELLI, C. FRANTI, E. COSMA, 1981a. Production of Italian dry salami: I- Initiation of Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *J. Food Prot.* 44:347-352.
- METAXOPOULUS, J., C. GENIGEORGIS, M.J. FANELLI, C. FRANTI, E. COSMA, 1981b. Production of Italian dry salami: Effect of starter culture and chemical acidulation on Staphylococcal growth in salami under commercial manufacturing conditions. *App. Env. Mic.* 42:863-871.
- NISKANEN, A., E. NURMI, 1976. Effect of culture on Staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. *App. Env. Mic.* 31:11-20.
- NOTERMANS, S., C.J. HEUVELMAN, 1983. Combined effect of water activity, pH and sub-optimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J. Food. Sci.* 48:1832-1835.
- PAYNE, D.N., J.M. WOOD, 1974. The incidence of enterotoxin production in strain of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. App. Bact.* 37:319-325.
- PETCHISING, U., M.J. WOODBURN, 1990. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* in nham (Thai-style fermented pork sausage). *International J. Food Mic.* 10:183-192.
- RACCACH, M., R.C. BAKER, 1978. Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. *J. Food Prot.* 41:703-705.
- RACCACH, M., 1981. Control of *Staphylococcus aureus* in dry sausage by a newly developed meat starter culture and phenolic-type antioxidants. *J. Food Prot.* 44:665-669.
- RACCACH, M., 1986. Lactic acid fermentation using high levels of culture and the fate of *Staphylococcus aureus* in meat. *J. Food Sci.* 51:520-521,523.
- SCHILLINGER, U., F.K. LÜCKE, 1990. Lactic acid bacteria as protective cultures in meat products. *Fleischw.* 70:1296-1299.
- SMITH, J.L., S.A. PALUMBO, 1978. Injury to *Staphylococcus aureus* during sausage fermentation. *App. Env. Mic.* 36:857-860.
- SMITH, J.L., S.A. PALUMBO, 1981. Microorganisms as food additives. *J. Food Prot.* 44:936-955.
- SMITH, J.L., S.A. PALUMBO, 1983. Use of starter cultures in meats. *J. Food Prot.* 44:997-1006.
- STENGEL, G., 1990. Staphylococci. *Fleischw.* 70:307-310.