

Zur Frage der histologischen Veränderungen in der Muskulatur von Süßwasserfischen während der Lagerung.

Von

W. PARTMANN und N. MALTSCHESKY.

Mitteilung aus der Bundesforschungsanstalt für Lebensmittelfrischhaltung,
Karlsruhe.

Mit 7 Textabbildungen.

(Eingegangen am 2. Januar 1951.)

Die raschere Zersetzung von Fischfleisch gegenüber Warmblüterfleisch ist eine bekannte Tatsache. Für die damit verbundenen auffallenden Veränderungen sind nach der allgemeinen Auffassung mikrobielle Vorgänge von ausschlaggebender Bedeutung. Da sich viele histologische Elemente der Muskulatur nicht nur mikroskopisch gut unterscheiden lassen, sondern meistens auch chemisch gegenüber anderen markante Differenzen aufweisen, müßten Zersetzungsprozesse, die die einzelnen Komponenten unterschiedlich angreifen, im histologischen Bilde sichtbar werden. Ziel unserer Untersuchungen ist daher, Vordringen und Zerstörungswerk der Bakterien im Fischmuskel zu verfolgen, um aus der Kenntnis struktureller Eigenarten dieses Bewegungsorgans einerseits und dem Verhalten der Bakterien darin andererseits Ursachen für den raschen Verderb dieses wichtigen Nahrungsmittels zu erkennen. Ferner soll geprüft werden, ob die histologische Untersuchung einen brauchbaren Test für die Feststellung des Frischezustandes von Fischfleisch darstellt.

1. Unterschiede von Fisch- und Warmblütermuskulatur.

Um die durch die Bakterientätigkeit hervorgerufenen Veränderungen des Fischfleisches zu erkennen, ist es zunächst notwendig, sich über seinen histologischen und chemischen Aufbau klar zu werden. Auch erscheint es zweckmäßig, die bisher bekannten Unterschiede gegenüber dem weniger rasch verderblichen Warmblüterfleisch herauszustellen.

a) Der histologische Aufbau der Fischmuskulatur.

Die Hauptmasse der Fischmuskulatur besteht aus den mächtigen Seitenrumpfmuskeln, die jederseits durch ein horizontales Septum in einen Rücken- und einen dünnen Bauchmuskel geschieden werden. Sie läßt im Gegensatz zur Warmblütermuskulatur eine auffallend regelmäßige Metamerie¹ erkennen, die uns vom gekochten Fisch bekannt ist. Bei ihm beobachten wir ja eine Trennung der einzelnen Metamere¹ oder Myomere¹. Die Myomere sind durch bindegewebige Quersepten miteinander

¹ Metamerie: Während der Embryonalentwicklung entstehende Gliederung des Körpers längs der Hauptachse. Die Fische lassen diese auch im erwachsenen Zustand besonders gut in der Seitenrumpfmuskulatur erkennen. Die gleichartigen, hintereinander liegenden Abschnitte derselben bezeichnet man als „Metamere“ oder „Myomere“.

verbunden und besitzen hohlkegelförmige Ausbuchtungen, die tütenartig ineinanderstecken. In den Myomeren finden wir die quergestreiften Muskelfasern, die durch spärliches Bindegewebe miteinander verbunden und im allgemeinen dicker sind als beim Säugetier. Die neben den Kernen im Sarkoplasma der Muskelfasern liegenden Fibrillen zeigen nach neueren Untersuchungen einen einheitlichen strukturellen Aufbau¹. Zwischen den Fibrillen liegen Körner, die Glykogen und Lipide (Phosphatide und Cholesterin) enthalten.

b) Die Eiweißkörper und Fette der Fischmuskeln.

Als wesentlichste Komponenten der Muskelfibrillen wurden bisher die Eiweißkörper Myosin und Actin beschrieben². Zusammen bilden sie die eigentliche kontraktile Substanz, das Actomyosin, das in zwei Modifikationen als schweres Myosin (identisch mit dem B-Myosin von SZENT-GYÖRGYI) und als leichtes Myosin (identisch mit dem A-Myosin von SZENT-GYÖRGYI), die ineinander überführbar sind, auftreten kann. Ferner wurden aus Muskelpreßsaft, sehr wahrscheinlich als Bestandteile des Sarkoplasmas, Globulin X und das Albumin Myogen isoliert.

Schon H. H. WEBER³ stellte fest, daß der Aufbau verschiedener Myosine vom Säugetier bis zum Hummer kaum nennenswerte Unterschiede aufweist. E. ROTH⁴ konnte das A-Myosin in der Fischmuskulatur nicht nachweisen; sie vermutet, daß sein Fehlen auf einen anderen Adenosin-triphosphat-Haushalt des Fisches zurückzuführen ist. Eine grundsätzliche Verschiedenheit der Myosine von Fisch und Säugetier stellte sie ebenfalls nicht fest. Beim Myogen zeigten sich Unterschiede im isoelektrischen Punkt. Außerdem zeichnet sich Fischmyogen gegenüber Säugermyogen durch einen raschen Anstieg der Flockungstemperatur auf alkalischer Seite aus. Sehr schön konnte die nahe Übereinstimmung der Fibrillensubstanz innerhalb der Wirbeltierreihe durch neuere experimentelle Untersuchungen von M. CIGADA und Mitarbeitern⁵ nachgewiesen werden. Die Verfasser stellten u. a. fest, daß sich Fäden, die man jeweils durch Kombination von Knochenfischmyosin mit dem Actin von Kaninchen, Taube oder Frosch erhielt, bei Adenosin-triphosphatzugabe verkürzten. Allerdings erfolgte die künstliche Kontraktion nicht in dem Maße wie bei Fäden, deren Eiweißkomponenten von einem Tier stammten.

Insgesamt scheinen also recht geringe Unterschiede zwischen den Proteinen von Fisch- und Warmblütermuskulatur zu bestehen. Es ist daher überraschend, daß H. WINTER⁶ bei der Untersuchung der Muskeleiweiße von Süßwasserfischen beträchtliche Differenzen im Anteil der Hexonbasen und des Histidinstickstoffs feststellte. Die von ihm zitierte Literatur zeigt ferner, daß die Aminosäurezusammensetzung bei den beiden Tierklassen dementsprechend bedeutende Unterschiede aufweist, was sicher zum Teil auf verschiedenartige Zusammensetzung des Bindegewebes zurückzuführen ist.

Wesentlichere Differenzen zwischen dem Fleisch von Fisch und Warmblüter bestehen im Wassergehalt, in den Fetten und Lipoiden, die in der Muskulatur der beiden Tiergruppen vorwiegend im Sarkoplasma lokalisiert sein dürften.

Im allgemeinen gilt, daß der Schmelzpunkt der tierischen Fette von der Außen- bzw. von der Umgebungstemperatur abhängig ist, bei der sie gebildet werden⁷. Die Fette wasserbewohnender Tiere, die ja bei relativ niedrigen Temperaturen leben, sind in Übereinstimmung damit niedriger schmelzend und reicher an ungesättigten Gruppen als diejenigen der Landtiere. Außerdem soll sich das Protoplasmafett vom Reservefett durch einen relativ niedrigeren Schmelzpunkt unterscheiden⁷.

¹ LIANG, TSE-YEN: Chin. J. Physiol. 10, 327 (1936). — A. FENN: Kontraktibilität. Physik, Chemie der Zellen u. Gewebe. Hrsg. R. HÖBER. S. 477. Bern: Stämpfli & Cie. 1947. — G. RÓZSA, u. M. STAUDINGER: Makromol. Chem. 2, 66 (1948).

² WEBER, H. H.: Naturwiss. 27, 33 (1939). — A. V. SZENT-GYÖRGYI: C. r. Ann. et Arch. Soc. Turque des Sci. Phys. et Nat. 1943, S. 62.

³ ROTH, E.: Biochem. Z. 318, 74 (1947).

⁴ CIGADA, M., P. CIFTERIO, S. RANZI u. L. TOSI: Experientia 4, 480 (1948).

⁵ WINTER, H.: Ernähr. u. Verpfl. 1, 141 (1949).

⁶ HENRIQUES, V., u. C. HANSEN: Skand. Arch. Physiol. 11, 151 (1901).

⁷ ANDRÉ, E.: Bull. Soc. Chem. Biol. 7, 974 (1925). — M. N. TSCHECHENKIN: J. Chim. gén. 16, 1741 (1946).

Es wäre denkbar, daß eine Wechselwirkung zwischen den Fetten und den Fermenten des Fleisches besteht, die einen raschen Abbau der Fischproteine begünstigt. Wichtiger scheinen jedoch Unterschiede des Temperaturoptimums voneinander entsprechenden Bakteriengruppen¹ und Enzymen² in beiden Tiergruppen zu sein.

Aber auch schon die letzte Lebensphase der Tiere ist für die postmortalen Veränderungen ihrer Muskulatur von Bedeutung. Bekanntlich haben die bisher üblichen Fangmethoden im allgemeinen einen langen Todeskampf der Fische und damit einen viel stärkeren Verbrauch des Muskelglykogens zur Folge, als dies normalerweise bei den geschlachteten Warmblütern der Fall ist. Infolgedessen erreicht die Milchsäurebildung bei Fischen auf dem Höhepunkt der Totenstarre einen niedrigeren Wert als bei Warmblütern. Im Fleisch normal gefangener Schellfische wurde zu diesem Zeitpunkt ein p_H -Wert von 6,2—6,6 gemessen, während er bei Warmblüterfleisch von hohem Glykogenanfangsgehalt 5,5 betrug³. Da die meisten Fischbakterien sich schon bei $p_H \geq 6,5$ vermehren³, kann die geringe Acidität des Rundfischfleisches während der Starreperiode eine weitere Ursache für seine relativ schlechte Haltbarkeit liefern³.

2. Histologische Veränderungen in der Seitenrumpfmuskulatur von Süßwasserfischen in Abhängigkeit von Bakterieninfektion und Lagerzeit.

a) Methodik zur histologischen Untersuchung.

Aus frischen oder unter bestimmten Lager- und Infektionsbedingungen gehaltenen Muskelstücken wurden bis zu 5 mm dicke und 1 cm lange Proben entnommen, die eine Seite mit der Oberfläche des Fisches gemeinsam hatten und wenigstens eine Bindegewebssepte und Teile der zwei anschließenden Myomeren enthielten. Verschieden alte Proben einer Versuchsreihe wurden stets vom gleichen Fisch genommen. Folgende Arbeitsgänge wurden ausgeführt: Die Fixierung erfolgte mit Sublimat-Alkohol nach SCHAUDINN bei 60° C 24 Std. lang, mit Sublimat-Eisessig 6 Std. lang oder mit Sublimat-Formol nach HEIDENHAIN. Zur Beseitigung von Sublimatniederschlägen wurde 12 Std. mit 70%igem Alkohol behandelt, dem bis zur Braunfärbung alkoholische Jodjodkalium-Lösung zugesetzt war. Anschließend führten wir die Proben in der Alkoholreihe bis zum Wasser herab, übertrugen sie für 24 Std. in 10%ige Gelatine von 37° C und darauf bei gleicher Temperatur ebenfalls einen Tag lang in 20%ige Gelatine; hinterher betteten wir in 20%ige Gelatine ein. Die getrockneten Gelatineblöcke wurden nach Erreichung der Konsistenz eines mittelharten Radiergummis auf dem Gefriermikrotom geschnitten. Die Schnittdicke betrug 7 und 10 μ . Die Schnitte wurden mit Eiweiß-Glycerin aufgeklebt, mit 0,5% Natriumthiosulfat-Lösung entjodet und in verdünnter GIEMSA-Lösung (10 Tropfen auf 70 cm³ Wasser) zwölf Stunden lang gefärbt, in Wasser abgespült und durch Lösungen von 95% Aceton + 5% Xylol, 70% Aceton + 30% Xylol, 30% Aceton + 70% Xylol, 5% Aceton + 95% Xylol und reines Xylol in Zedernöl überführt.

b) Histologische Veränderungen in der Seitenrumpfmuskulatur von Kürbiskernbarsch (*Eupomotis gibbosus* L.) während der Lagerung.

Die Beurteilung histologischer Veränderungen der Fischmuskulatur wird dadurch erschwert, daß die gesamte Muskulatur unmittelbar nach dem Tode die Querstreifung infolge der verschiedenen Kontraktionszustände nicht in allen Fasern gleich deutlich erkennen läßt. Gelegentlich zeigen auch einzelne Fasern einen wellenförmigen Verlauf. In diesen Fällen liegt passive Kontraktion durch benachbarte Fasern vor. Ferner fällt auf, daß der Abstand von isotropen und anisotropen Schichten nicht in der gesamten Muskulatur gleich ist. Unmittelbar nach dem Tode findet man darüber hinaus in den entnommenen Gewebelöcken — wenn auch relativ selten — Teile von Muskelfasern, die eigenartige Zerfallerscheinungen aufweisen. Diese

¹ SCHÖNBERG, F.: Z. Fleisch- u. Milchhyg. 1931/32, S. 211.

² PLANK, R.: Dtsch. Fischerei-Rdsch. 1935, H. 24.

³ REAY, G. A.: The Refrig. J. [Australien] 3, 160 (1949).

Faserabschnitte zeigen einen körnigen Inhalt und lassen die Querstreifung oder Längsfibrillierung nicht mehr erkennen. Der Befund war zunächst sehr überraschend für uns; wir fanden ihn aber bei E. KALLERT¹ für die Muskulatur von Fischen und bei B. LOWE² für die von Geflügel bestätigt.

Trotz dieser Abweichungen von der normalen Querstreifung in der lebendfrischen Muskelfaser konnten wir insgesamt doch feststellen, daß die Deutlichkeit der Querstreifung im Verlaufe der Lagerung nachläßt; diese Veränderung der Struktur ist zeit- und temperaturabhängig. Der Zustand, der nach 44stündiger Lagerzeit bei 19° C erreicht wurde, konnte bei 0° C in etwa 35 Tagen festgestellt werden.

Bevor ein vollständiger Schwund der Querstreifung auftrat, beobachteten wir häufig, daß die Querbänder der einzelnen Schichten innerhalb einer Faser nicht mehr zusammenhängend über den ganzen Schnitt verliefen. Es schien zu einer Parallelverschiebung gekommen zu sein, bei der sich innerhalb der Faser einzelne Fibrillenbündel in der Längsrichtung ganz wenig gegeneinander verschoben hatten. B. LOWE² schreibt entsprechend über die Lagerveränderungen der Geflügelmuskulatur, daß sich manchmal während des Schwundes der Streifung die Fibrillen in größerem oder kleinerem Umfange voneinander trennen. Diese Erscheinung ist wohl so zu deuten, daß das Sarkoplasma während der Lagerung Veränderungen erfahren hat, die ein Auseinanderweichen und Verschieben der Fibrillen ermöglichen.

Unsere Färbemethode erlaubte es, neben den histologischen Veränderungen auch den Bakterienbefall zu verfolgen. In Übereinstimmung mit den Untersuchungen von FR. LÜCKE und E. FRERCKS³ über die Keimverteilung in der Muskulatur des Kabeljaus konnte erkannt werden, daß die Keimmenge mit wachsendem Abstand von der Oberfläche abnimmt.

Eine genaue Auszählung der Bakterien, die wegen der unterschiedlichen Verteilung statistisch erfolgen müßte, konnte wegen der im Vergleich zur Dicke der Bakterien großen Schnittdicke nicht durchgeführt werden. Eine Herabsetzung der Schnittdicke war deshalb nicht möglich, weil die Herstellung dünnerer Schnitte mit zunehmender Lagerzeit bzw. zunehmendem Bakterienbefall schlechter gelingt.

An der Oberfläche des 2 Tage lang bei 19° C gelagerten Fisches wurden sehr große Mengen von Stäbchen und Kokken verschiedener Größe festgestellt. In den obersten Faserschichten und besonders an mechanisch beschädigten Stellen derselben traten starke Auflösungserscheinungen ohne Rücksicht auf strukturelle und chemische Unterschiede der Gewebekomponenten auf. Mit zunehmender Entfernung von der Oberfläche zeigte die Gewebestruktur im allgemeinen eine bessere Verfassung und eine damit Hand in Hand gehende Abnahme des Bakterienbefalls. Das Bindegewebe wurde von den Mikroorganismen stärker bevorzugt, als die Muskelfasern. Nun darf man sich aber nicht vorstellen, daß die Gewebestruktur innerhalb eines relativ kleinen Bereiches eine unbedingte Homogenität aufweisen müßte, wie sie etwa eine chemische Analyse dieses Bezirkes vortäuschen könnte. Gelegentlich ist sogar in einem stark mitgenommenen Bereich der Randzone folgendes Bild zu sehen (Abb. 1): In Teilen einer kaum von Bakterien befallenen Muskelfaser ist die Querstreifung noch relativ gut erhalten, während bei einer stark befallenen benachbarten Faser nur noch Reste davon vorhanden sind. Die sarkoplasmatische Struktur ist weitgehend zerstört, der Fibrillenverlauf aber noch deutlich zu erkennen. Die Fibrillen zeigen eine granuläre Struktur und haben das Aussehen von Perlschnüren.

¹ KALLERT, E.: Berl. tierärztl. Wschr. **47**, 475 (1931).

² LOWE, B.: Factors affecting the palatability of poultry with emphasis on histological post-mortem changes. *Advances in Food Research*. Hrsg. von E. M. MRAK u. G. F. STEWART. Bd. I, S. 204. New York: Academic Press Inc. Publishers 1948.

³ LÜCKE, FR., u. E. FRERCKS: *Vorratspfl. u. Lebensmittelforsch.* **3**, 130 (1940).

Auffallend ist die regelmäßige Aufeinanderfolge dieser „Granula“, deren Abstände etwa mit den Entfernungen von isotroper und anisotroper Schicht in benachbarten, besser erhaltenen Fasern übereinstimmen. Der mikroskopische Befund läßt darauf schließen,



Abb. 1. Teil eines Längsschnittes durch die Seitenrumpfmuskulatur eines 70 Std. bei 19° C gelagerten Sonnenbarsches. In der linken Faser — im Gegensatz zur rechten — noch deutliche Erhaltung der Querstreifung. Fibrillen der rechten zeigen körnige Struktur. (Panphot, Vergrößerung 635fach, GIEMSA-Färbung.)

Abb. 2. Längsschnitt durch einen Teil der 70 Std. bei 19° C gelagerten Seitenrumpfmuskulatur von Sonnenbarsch. Starke Infektion der Bindegewebssepten und des spärlichen Bindegewebes zwischen den Muskelfasern durch einen Bacillenstamm. (Panphot, Vergrößerung 90fach, GIEMSA-Färbung.)

daß die Myosin-Actin-Fäden und insbesondere die Überkreuzungsstellen von anisotroper Schicht der Querstreifung und Fibrillen besonders widerstandsfähig sind.

Bei allen während des Sommers über 18° C gelagerten Sonnenbarschen wurden schon am 2. Tage 1—2 mm unter der Oberfläche auffallend große Stäbchen von einer Durchschnittslänge von 5—6 μ gefunden, bevor andere Formen vorhanden waren. Sie lagen in großen Mengen in den Bindegewebssepten und in dem spärlichen Bindegewebe zwischen den Fasern. Wie Abb. 2 zeigt, waren besonders die Bindegewebssepten dermaßen mit den sich mit GIEMSA-Lösung dunkelblau anfärbenden Mikroben besetzt, daß man geradezu von überfüllten „Bakterienstraßen“ sprechen könnte. Im allgemeinen liegen die Stäbchen so, daß sich ihre Fortpflanzungsrichtung im Bindegewebe selber befindet.

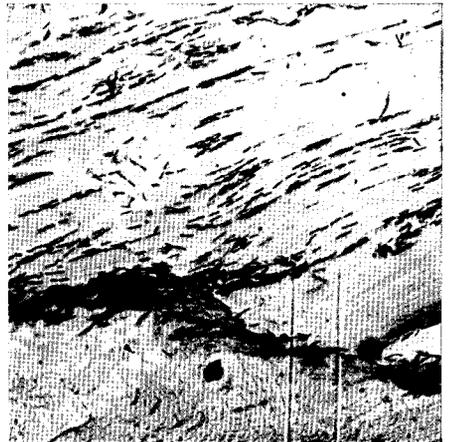


Abb. 3. Teil eines Längsschnittes durch die 2 Tage bei 19° C gelagerte Seitenrumpfmuskulatur vom Rotauge. Starker Befall des Bindegewebes und der Fasern durch einen Bacillenstamm. Fortpflanzungsrichtung der Stäbchen vorwiegend parallel zur Fibrillenrichtung. (Panphot, Vergrößerung 160fach, GIEMSA-Färbung.)

Bei noch stärkerem Befall fanden wir diese Stäbchen schließlich auch in den Muskelfasern. Hier lagen sie bemerkenswert häufig mit der Längsachse parallel zur Fibrillenrichtung, vielfach in langen Ketten hintereinander (Abb. 3). Auf die wirklichen räumlichen Verhältnisse übertragen bedeutet das, daß sich die im Vergleich zur Fibrillendicke und zur Dicke der

sarkoplasmatischen Zwischensubstanz unverhältnismäßig langen Bacillen nur annähernd parallel zur Fibrillenrichtung fortpflanzen.

Diese Anordnung zwischen den Fibrillen könnte entweder darauf zurückzuführen sein, daß die Fibrillensubstanz den enzymatischen Angriffen dieser Mikroorganismen gegenüber widerstandsfähiger ist oder daß diese den durch Form, Größe und Eigenbewegung bedingten Weg des geringsten Widerstandes in dem weniger viscosen Sarkoplasma gehen. Wir halten es für ausgeschlossen, daß die im mikroskopischen Bilde häufig sichtbar werdende Ausrichtung der Stäbchenhauptachse parallel zur Hauptachse der Fibrillen einen durch das Schneiden bedingten Effekt darstellt. Es ist lediglich möglich, daß das Messer beim Vorübergleiten die aus der Schnittebene herausragenden Mikroben in diese hineingedrückt hat. Gegen eine Ortsverlagerung der Stäbchen spricht auch der Befund, daß man in verschiedenen verlaufenden Fasern eines Schnittes Stäbchenreihen in Fibrillenrichtung antrifft.

Wir haben dann die zuvor beschriebenen natürlichen Infektionen und histologischen Veränderungen, wie wir sie beim Sonnenbarsch erhielten, auch beim Rotauge und beim Brachsen beobachtet. Nach einer Lagerzeit von 2 bis 3 Tagen bei 18—20° C war diese interessante Stäbchenform immer im Innern der Fischmuskulatur nachzuweisen, bevor Infektion durch andere Arten erfolgt war. Bei Süßwasserfischen, die bei 0° C gelagert wurden, konnte sie aber nicht festgestellt werden.

Interessant ist, daß auch H. E. GIBBONS und G. B. REED¹, die sich bemühten, für Autolyseversuche sterile Fischproben zu bekommen, während des Sommers häufig Infektionen mit großen Bacillen in den mit größter Sorgfalt entnommenen Proben erhielten.

c) Einwirkung von *Bacillus subtilis* und *Bacillus mesentericus* auf die Fischmuskulatur.

Das oben beschriebene Verhalten der großen Stäbchen läßt die Frage offen, ob andere Bakterien gleicher oder ähnlicher Abmessungen bei ihrem Vordringen in der Fischmuskulatur Wege gehen, die durch vorhandene Strukturen vorgezeichnet sind. Wir untersuchten daher *Bacillus subtilis* COHN und *Bacillus mesentericus* TREVISAN auf ihr Verhalten in der Fischmuskulatur.

Im einzelnen kam folgende Arbeitsweise zur Anwendung: 1 Std. nach dem Tode wurden aus der Seitenrumpfmuskulatur von Schleien jederseits 3 etwa $4 \times 6 \times 1$ bis 1,5 cm große Stücke möglichst steril herausgeschnitten und in sterile Petrischalen gebracht. Jede Probe wurde beiderseitig mit je 0,5 cm³ der Suspension einer Reinkultur der beiden Bakterienarten in 0,08%iger K₂HPO₄-Lösung beimpft. Die Keimzahlen pro cm³ Bakterienaufschwemmung stimmten größenordnungsmäßig gut überein. Die Muskelstücke wurden zwei Tage bei 22° C bebrütet. Nach dem ersten und zweiten Tage wurden Proben für die histologische Untersuchung entnommen.

Nach einem Tage waren schon alle Proben ihrem Geruch und ihrer Konsistenz nach verdorben. Der starke Zersetzungsgrad drückte sich auch bei der histologischen Untersuchung darin aus, daß die Proben schon im Innern mit Bakterien durchsetzt waren. Auffallend war, daß in der Muskulatur niemals eine Fremdinfection festzustellen war, was nicht nur auf steriles Arbeiten bei der Entnahme der sehr großen Muskelproben, sondern auch aus den antibiotischen Fähigkeiten dieser Organismen zu erklären sein dürfte².

In Übereinstimmung mit unseren oben beschriebenen Lagerungsversuchen ohne künstliche Infektion fanden wir auch hier für beide *Bacillus*-Arten bestätigt, daß das Bindegewebe, insbesondere die Bindegewebssepten, die Einfallstore für die Bakterien darstellen. Sie waren stets, selbst in den gezeigten fortgeschrittenen Zersetzungsstadien, ungleich stärker befallen als die Muskelfasern (Abb. 4. u. 5). Innerhalb der

¹ GIBBONS, H. E., u. G. B. REED: J. Bacter. **19**, 73 (1930).

² JANSEN, E. F., u. D. J. HIRSCHMANN: Arch. Biochemistry **4**, 297 (1944). — J. MILLER, u. D. ROWLEY: Brit. J. exper. Path. **29**, 452 (1948).

Myosepten ließen unsere Schnitte ein Maximum der Bakterien-Zusammenballungen an den Grenzschichten zwischen Bindegewebe und Muskelfaser erkennen. Ob hier ein durch Fixierung und Nachbehandlung bedingter Sekundäreffekt vorlag oder ob

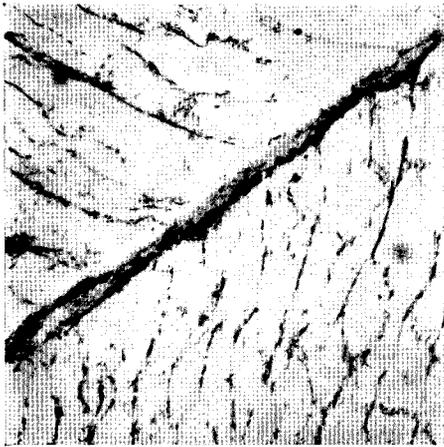


Abb. 4. Teil eines Längsschnittes durch die auf den Oberflächen mit einer Suspension von *Bacillus subtilis* beimpfte und dann 2 Tage bei Zimmertemperatur gelagerte Seitenrumpfmuskulatur einer Schleie. (HENSOLDT-Diami, Vergrößerung 68fach, GIEMSA-Färbung.)

Abb. 5. Teil eines Längsschnittes durch die auf den Oberflächen mit einer Suspension von *Bacillus mesentericus* beimpfte und dann 2 Tage bei Zimmertemperatur gelagerte Seitenrumpfmuskulatur einer Schleie. (HENSOLDT-Diami, Vergrößerung 68fach, GIEMSA-Färbung.)

dieses Bild den ursprünglichen Verhältnissen im unbehandelten Gewebestück entsprach, konnten wir nicht mit Sicherheit klären. Es wäre ja durchaus denkbar, daß gerade die Grenzzone bessere Bedingungen für diese Mikroorganismen enthält als das zentrale Gebiet der Myosepten.

Der Verdorbenheitsgrad war neben dem hohen Bakteriengehalt auch daran zu erkennen, daß in den Fasern selbst nur noch selten eine Eigenstruktur zu sehen war. Eingedrungene Bakterien wiesen im allgemeinen keine bestimmte Orientierung mehr auf (Abb. 5). Es muß aber auch hier wieder darauf hingewiesen werden, daß keine absolute Homogenität innerhalb des Gewebes vorlag.

Ganz anders war der Befund in früheren Zersetzungsstadien. Auch hier beobachteten wir in den Fasern selber das oben geschilderte orientierte Vordringen der Stäbchen. In Abb. 6, in der die Fibrillenstruktur besonders gut zu sehen ist, wird die wechselnde Fibrillenrichtung von den *Mesentericus*-Stäbchen gut „mitgemacht“. Außerdem zeigt die gleiche Mikroaufnahme, daß es gelegentlich nach Behandlung mit formolhaltiger Sublimatlösung

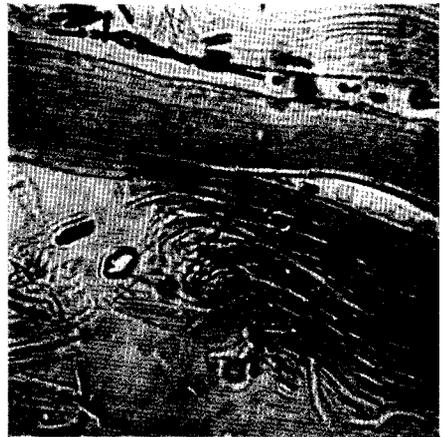


Abb. 6. Teil eines Längsschnittes durch die auf den Oberflächen mit *Bacillus mesentericus* beimpfte und dann 1 Tag bei Zimmertemperatur gelagerte Seitenrumpfmuskulatur einer Schleie (eine Faser bei Sublimat-Formol-Fixierung zerrissen). Innerhalb der Fasern werden die Bacillen in diesem Stadium selbst bei wechselnder Fibrillenrichtung auffallend häufig annähernd parallel zu dieser angetroffen. (HENSOLDT-Diami, Vergrößerung 320 fach, GIEMSA-Färbung.)

zu Zerreißen von Muskelfasern kommt. Auffallend häufig waren solche geschädigten Stellen an Orten stärkerer Bakterienansammlungen. Histomechanische Gründe spielen für das Vordringen von Bakterien in der Fischmuskulatur und für das Verhalten des Gewebes selber während der mikrobiellen Zersetzungsprozesse eine große Rolle.

d) *Einwirkung anderer Bakterienarten auf die Fischmuskulatur.*

Es war für uns nunmehr interessant zu erfahren, ob die bei einigen Bacillensstämmen erhaltenen Befunde auch allgemein für die üblichen Fischbakterien gelten. Muskelproben von Brachsen, die mit einer stark eiweißzersetzenden Varianten von *Pseudomonas urea* und mit *Flavobacterium sulfureum* beimpft waren, zeigten ebenfalls

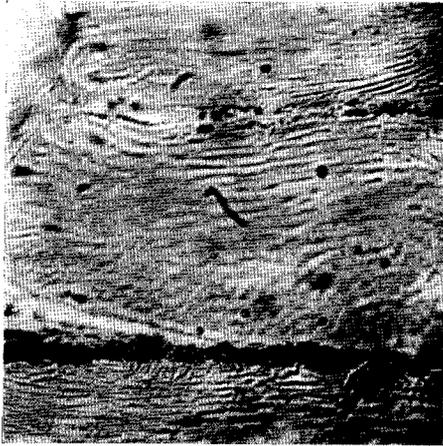


Abb. 7. Teil eines Längsschnittes durch die sterilisierte und dann auf den Oberflächen mit *Erwinia caratovora* beimpfte und 7 Tage bei 20° C gelagerte Seitenrumpfmuskulatur eines Brachsen. Bakterienbefall vorwiegend im Bindegewebe und an den Faserrändern. (Panphot, Vergrößerung 400 fach, GIEMSA-Färbung.)

ein bevorzugtes Vordringen der Bakterien im Bindegewebe. Diese Mikroorganismen griffen aber rascher auf die Muskelfasern über als die oben beschriebenen Bacillensstämmen. In den Fasern selber konnte kein Unterschied in der Widerstandsfähigkeit der einzelnen Strukturelemente oder kein Einfluß derselben auf das Vordringen der Mikroorganismen erkannt werden. *Flavobacterium sulfureum* hatte in den mit ihm beimpften Fischmuskelstücken, die bei 19° C aufgehoben wurden, schon nach zwei Tagen eine derart zerstörende Tätigkeit entfaltet, daß der Faserverlauf nur noch schwer festzustellen war. Nicht nur Bindegewebe, sondern auch Muskelfasern bildeten eine strukturlose, wolkige Masse. Aber auch hier fanden wir noch kleine Faserbruchstücke, die die Querstreifung erkennen ließen.

Im Autoklaven sterilisierte Seitenrumpfmuskulatur eines Brachsen war von

uns mit einem Stamm von *Erwinia caratovora* JONES beimpft worden. Es fiel uns auf, daß die bei 20° C gehaltenen Proben relativ langsam verderben. Die histologische Nachprüfung nach einer Woche ergab auch hier, daß die Faserränder und die Überreste des Bindegewebes im Gegensatz zum Faserinneren eine stärkere Infektion durch diese mikrokokkenähnliche Form aufwiesen (Abb. 7).

3. Diskussion der Ergebnisse.

Unsere Untersuchungen zeigen, daß dem Bindegewebe der Fische — neben der bakterienreichen und außerhalb des Wassers lange feucht bleibenden Haut — eine besondere Bedeutung für den Verderb dieses Kaltblüterfleisches zukommt, worauf u. a. auch W. SCHWARTZ¹ hinwies. Die besondere Rolle, die dieser Gewebetyp für die schlechtere Haltbarkeit von Fischfleisch gegenüber dem Fleisch von landbewohnenden Säugern spielt, kann einmal aus dem unterschiedlichen Aufbau der Muskulatur und zum anderen aus der geringen Resistenz des Fischbindegewebes

¹ SCHWARTZ, W.: Vortrag geh. auf der Hauptvers. d. dtsh. Kälte-Vereins im VDI Bremen und Wesermünde 23.—26. 6. 1937, unveröffentlicht.

gegen mikrobielle Zersetzungsprozesse erklärt werden; die starke Widerstandsfähigkeit des Warmblüterbindegewebes gegen bakterielle Angriffe wird schon von F. FALK¹ betont. Es ist anzunehmen, daß es sehr viel reicher an schwerer verdaulichen² Skleroproteinen ist als das Bindegewebe der Fische. Daß der intercelluläre Proteingehalt für Säugetiermuskeln wesentlich größer ist als bei Fischen (16—27% bei Kaninchenmuskel gegenüber 3% bei Schellfischmuskel³), dürfte damit zum Teil seine Erklärung finden.

Veranlaßt durch die Ergebnisse der Untersuchungen von E. C. BATE-SMITH über die Bedeutung der Milchsäurebildung und des pH-Wertes während der Totenstarre für die postmortalen Veränderungen des Warmblüterfleisches⁴ hat G. A. REAY die im allgemeinen geringere Acidität der Fischmuskulatur als Ursache für seine relativ rasche Zersetzung diskutiert⁵.

Die bei unseren Infektionsversuchen, welche vorwiegend im Temperaturbereich von + 18 bis + 25° C angestellt wurden, erzielten Ergebnisse sind im einzelnen nicht auf die für die Lagerung erwünschte Temperatur von 0° C übertragbar. Zunächst scheiden die Stämme aus, deren Wachstumsgrenze über 0° C liegt; dann nehmen die Veränderungen durch die im allgemeinen psychrophilen Wasserbakterien bei dieser Temperatur im Gegensatz zu gleichen bei 20° C eine um das Vielfache verlängerte Zeit in Anspruch. Wie orientierende Versuche an Kabeljau zeigten, die auf Eis gelagert waren, ändert das aber nichts an der Tatsache, daß auch bei Temperaturen um 0° C die Bakterien zunächst über das Bindegewebe in das Fischinnere gelangen.

Wir hoffen Gelegenheit zu haben, die bei der Lagerung um den Gefrierpunkt auftretenden Verhältnisse noch im einzelnen zu verfolgen, wobei unsere histologische Methode als Ergänzung von chemischen Testmethoden zur Bestimmung des Frischezustandes von Fischmuskulatur dienen soll. Sie erfordert leider einen verhältnismäßig großen Zeitaufwand und kann uns nicht wie eine chemische Untersuchungsmethode einen für den betreffenden Gewebeteil gültigen zahlenmäßigen Absolutwert liefern. Wie wir sahen, ist das Muskelgewebe der Fische im Verlaufe der bakteriellen Zersetzung nicht von homogener Beschaffenheit. Unmittelbar neben stark zerstörten Faserteilen können solche liegen, die nur geringe Zerstörungen ihrer Struktur aufweisen. Der im Mikroskopieren Geschulte wird sich aber an Hand des Gewebeschnittes, der zugleich den Bakterienbefall erkennen läßt, ein Bild über den Zustand des Gewebes machen können.

Frau E. RENNER danken wir für ihre Mitarbeit bei der Durchführung der Untersuchungen.

Zusammenfassung.

Durch histologische Untersuchungen von gelagerten oder mit verschiedenen Bakterienstämmen beimpften Muskelproben von Süßwasserfischen konnten die Zerstörungen der Gewebestrukturen verfolgt werden. — Innerhalb von Muskelproben verdorbener Fische waren die Unterschiede der Zerstörung der histologischen Struktur, die sich vor allem im Schwund der Querstreifung äußert, groß. Die Myosepten und das spärliche Bindegewebe zwischen den Muskelfasern wurden von allen verwendeten Bakterienstämmen zunächst bevorzugt befallen. Eine unbekannte Stäbchenform, *Bacillus mesentericus* und *Bacillus subtilis*, die in ihren vegetativen Zuständen annähernd gleiche Abmessungen besitzen, wurden nach ihrem späteren Eindringen in die Muskelfasern zunächst auffallend häufig in Richtung der Hauptachse der Faser liegend angetroffen, was auf ein bevorzugtes Vordringen in der weniger

¹ FALK, F.: Zbl. med. Wiss. 1867, 881.

² SMORODINTSEV, J. A., Z., u. A. ADOVA: Bull. Acad. Med. 114, 203 (1935); ref. in Chem. Abstr. 30, 8258.

³ BAILEY, K.: Advances in Protein Chem. 1, 289 (1944).

⁴ BATE SMITH, E. C.: The physiology and chemistry of rigor mortis with special reference to the aging of beef. Advances in Food Research. Hrsg. von E. M. MRAK u. G. F. STEWART. Bd. I, S. 204. New York: Academic Press Inc. Publishers 1948.

⁵ REAY, G. A.: Zit. S. 123, Anm. 3.

viscosen interfibrillären sarkoplasmatischen Substanz schließen läßt. *Flavobacterium sulfureum* und eine Variante von *Pseudomonas urea* griffen vom Bindegewebe aus wesentlich rascher auf die Muskelfasern über als die anderen Bacillenstämmen. Die beiden starken Proteolyten zeigten kein selektives Verhalten beim Angriff auf die einzelnen Strukturelemente der Fasern.

Die angewandte Untersuchungsmethode ist geeignet, in wichtigen Fällen eine wesentliche Ergänzung chemischer Testmethoden zur Bestimmung des Frischzustandes von Fischfleisch zu liefern.
