

Zeitschrift:	Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène
Herausgeber:	Bundesamt für Gesundheit
Band:	1 (1910)
Heft:	6
Artikel:	Studien über den Keimgehalt von Limonaden
Autor:	Thöni, J.
DOI:	https://doi.org/10.5169/seals-983236

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. 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. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

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. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

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. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

Download PDF: 27.01.2026

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

riechenden Stoff und einen das eigentliche Aroma dieser Rumsorte bedingenden Körper, welcher den Terpenen nahe zu stehen scheint.

Welche Rolle diesen Riechstoffen bei der Farbenreaktion zukommt, werden vielleicht spätere, auf breiterer Basis ruhende Untersuchungen lehren. Es wird sich dann auch herausstellen, welche der vorgenommenen Prüfungen, Silberoxydbehandlung, Bisulfitdestillation oder Bromierung, eventuell brauchbare Zahlen für die Rumbeurteilung liefert. Jedenfalls scheint der beschritene Weg zum Ziele zu führen; denn es ist kaum denkbar, dass sich künstliche, bei der Rumfabrikation verwertbare Substanzen finden lassen, welche in bezug auf diese verschiedenen Proben dem Naturrum ähnliche Zahlen liefern. Welchen Schwankungen diese Zahlen bei echtem Rum unterworfen sind, soll durch weitere Untersuchungen festgestellt werden.

Studien über den Keimgehalt von Limonaden.

Von Dr. J. THÖNI.

(Arbeit aus dem Laboratorium des schweiz. Gesundheitsamtes,
Vorstand: Prof. Dr. Schaffer.)

Unter Limonaden versteht man nach der Definition, wie sie im schweiz. Lebensmittelbuch gegeben wird, «Mischungen von kohlensäurehaltigem Wasser mit natürlichen oder künstlichen Fruchtsirupen oder mit Essensen aus Zitronen, Ingwer, Kola und dgl., welche in Flaschen in den Verkehr gelangen oder unmittelbar vor dem Konsum an den Ausschankstellen hergestellt werden.»

Auf Grund der verschiedenen in den Limonaden vorkommenden, anti-septisch wirkenden Substanzen, wie Säuren, Fruchtester etc. sollte man glauben annehmen zu dürfen, dass derartige Wässer im allgemeinen steril seien. Eine Notiz von *Kuylenstierna*¹⁾, in der gesagt wird, dass die untersuchten Limonaden bakterienarm, zuweilen sogar steril waren, scheint dies auch zu bestätigen.

Gelegentlich von mir und andern gemachte Beobachtungen bei getrübter oder mit Sediment behafteter Limonade, deren fehlerhafte Beschaffenheit nicht auf chemische Umsetzungen zurückzuführen waren, liessen es als wünschenswert erscheinen, weitere Untersuchungen über das Vorkommen von Organismen in Limonaden auszuführen.

Um diese Aufgabe möglichst eingehend zu lösen, suchte ich Aufschluss zu erlangen:

¹⁾ *Kuylenstierna, K. G.*, Bericht über die Wirksamkeit des Laboratoriums des Stockholmer Wasserwerkes im Jahre 1907. Ref. Centralblatt für Bakteriologie, II. Abteilung. 24. Bd. 1909. pag. 236.

1. über die Arten der Organismen bei Limonaden des Handels,
2. über die Herkunft der in diesen Fabrikaten vorhandenen Keime und
3. über das Verhalten der Keimarten bei verschieden langer Dauer der Aufbewahrung der Limonadenproben.

Das gesamte Versuchsmaterial werde ich dementsprechend in 3 Hauptgruppen, A, B und C zerlegen.

Anschliessend daran wird dann noch eine Besprechung der Untersuchungsergebnisse und die daraus sich ergebenden Schlüsse für die Fabrikation und die zukünftige biologische Kontrolle der Limonade folgen.

A. Die Organismen der Limonaden.

I. Untersuchungsmethoden.

Die Grosszahl der Limonaden wurde aus möglichst verschiedenen Fabriken und Verkaufsstellen der Stadt Bern bezogen und sofort nach Einlieferung in das Laboratorium untersucht. Diese Untersuchung erstreckte sich zunächst auf das Aussehen, den Geschmack und eine mikroskopische Prüfung. Bis anhin fehlten eingehendere Studien über den Keimgehalt der Limonaden. Es war daher zur Lösung meiner Aufgabe in erster Linie notwendig, durch einige orientierende Vorversuche Aufschluss zu erhalten über die Arten der in dem fraglichen Substrat auftretenden Organismen. Schon durch die mikroskopische Prüfung konnten zuweilen Hefezellen, auch längere Hyphen von Schimmelpilzen, in seltenen Fällen Bakterien beobachtet werden. Aussaaten in verschiedene Kulturmedien bewiesen dann, dass die in den Limonaden anzutreffenden Organismen vorwiegend aus aërob wachsenden Keimen zusammengesetzt sind und aus Hefen, Schimmelpilzen und Bakterien bestehen. Die beiden erstgenannten Pflanzenklassen ziehen saure Nährböden den gewöhnlichen, alkalischen und neutralen vor und so wählte ich für die weitere Untersuchung neben gewöhnlicher Nährgelatine und Agar als Plattenkulturen noch Zwetschgendekoktgelatine¹⁾. Als flüssiges Substrat wurde Bouillon verwendet und um auch eventuell vorkommenden Anaëroben günstige Wachstumsbedingungen zu bieten, wurden weiter Aussaaten in Milchzuckeragar in hoher Schicht (Schüttelkulturen nach Burri) gemacht. Auch die Eijkmann'sche Probe zum Nachweis von *Bacterium coli*, wie sie bei Wasseruntersuchungen sich eingebürgert hat, kam bei einer grösseren Anzahl von Proben zur Anwendung. Als Aussaatmengen benützte ich hier 3, 2

¹⁾ Die Bereitung der Zwetschgendekoktgelatine geschah in folgender Weise: Gedörnte Zwetschgen wurden von den Kernen befreit und 100 g davon mit 1 Liter Wasser eine halbe Stunde lang auf offener Flamme gekocht. Das durch das Kochen verdampfte Wasser wurde wieder ersetzt und die Flüssigkeit durch ein Tuch filtriert. Nach 24-stündigem Stehen wurde die klare Flüssigkeit vom Bodensatz in Kolben abgefüllt und sterilisiert. Zu 1000 cm³ dieser Zwetschgenabkochung kamen 100 g Gelatine. Diese Mischung wurde gekocht bis zur vollständigen Lösung der Gelatine, dann abgekühlt auf 25° C, ein Weissei hineingebracht und nochmals aufgekocht. Hierauf wurde die Zwetschengelatine bei 37° C während 3—4 Stunden gehalten, wieder vom Bodensatz abgegossen, dann in Reagenzgläser abgefüllt und sterilisiert.

und 1 cm³, um die entwicklungshemmenden Eigenschaften der Limonaden (CO₂ und Essenzen) möglichst auszuschalten. Eine ansehnliche Zahl von Proben wurde ferner geprüft auf das Vorkommen von pathogenen Keimen und namentlich auf die Gruppen der Typhus- und Paratyphusbakterien. Dabei verfuhr ich in der Weise, dass ich nach Beschickung aller Nährmedien den Rest des Flascheninhaltes (ca. 250 cm³) mit ca. 15 cm³ einer 20%o. Peptonlösung versetzte und die Probe dann bei 37° C während 24 Stunden aufbewahrte. Der Zusatz der Peptonlösung zur Limonade und die Aufbewahrung bei 37° C bezweckten eine Anreicherung eventuell vorhandener spärlicher krankheitsverursachender Keime. Nach dieser Zeit wurden dann Ausstriche gemacht auf Endo-Drigalski- und gewöhnlichen Agar.

Die Aufbewahrung der besäten Kulturmedien erfolgte für die Gelatinenährböden bei 20—22°, für die Bouillon- und die Agarnährböden bei 37° C.

Für die Bestimmung der Keimzahlen kamen als Aussaatmengen in Betracht $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ und $\frac{1}{1000}$ cm³. Die Untersuchung der Agarkulturen erfolgte gewöhnlich sobald das Wachstum gut sichtbar war, die der Gelatine- und Bouillonkulturen nach 4—6 Tagen, insofern nicht stark verflüssigende Arten ein früheres Untersuchen notwendig machten.

Für die Bestimmung der Keimzahlen wählte ich, soweit möglich, immer die gleiche Verdünnung.

II. Untersuchungsergebnisse.

In den folgenden Zusammenstellungen (Tab. I) sind zunächst die Resultate über das Aussehen, die Befunde der mikroskopischen Kontrolle, ferner die Geschmacksprüfung und die auf verschiedenen Nährsubstraten ermittelten Keimarten enthalten.

Aus dieser Uebersicht ist zu entnehmen, dass die Limonaden mit einer Ausnahme entweder farblos oder rot waren, eine Probe war goldgelb. Dieses makroskopische Verhalten der gefärbten Limonaden wird bedingt durch die bei der Fabrikation verwendeten Essenzen. Nur 4 Proben wiesen schwache Trübung auf, die übrigen waren klar, wenn auch bei einigen kleinere und grössere verschiedenfarbige (schwarze, braune, weisse) Flöckchen in verschiedener Anzahl zu beobachten waren. Hand in Hand mit dem Auftreten von Trübungen und zahlreichen Flöckchen war gewöhnlich auch ein hoher Keimgehalt festzustellen.

Das Resultat der mikroskopischen Prüfung (Kolonne 3) zeigt, dass von den 35 mikroskopischen Proben 21 Proben bei Absuchen je eines hängenden Tropfens keine Organismen erkennen liessen, bei 5 waren nur Hefen, bei 3 Bakterien, bei 2 Hefen und Bakterien, bei 2 längere Hyphen von Schimmelpilzen und endlich bei einer Limonade alle 3 Organismenklassen nachweisbar. Der Geschmack (Kolonne 4) war bei der Grosszahl der untersuchten Limonaden ein normaler; bei einigen wenigen musste er als fade bezeichnet werden.

Nr.	Makroskopischer Befund	Mikroskopischer Befund	Sinnes- prüfung	Kul-
				Nährgelatineplatten
1	Farblos, klar.	Dickes Stäbchen.	Normal.	<i>Bact. fluorescens liquefaciens</i> , <i>Güntheri</i> -ähnliche Organismen und Hefen. ¹⁾
2	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Bact. fluorescens liquefaciens</i> und Coccen.
3	Farblos, klar.	Hefezellen.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und eine andere <i>Penicillium</i> -art, ferner <i>Bact. fluorescens liq.</i> und Hefen
4	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Bact. fluorescens liq.</i> <i>Coli</i> -ähnliche Organismen und Hefen.
5	Rot, klar, vereinzelte kleine Flöckchen.	Hyphen.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.
6	Rot, klar, vereinzelte kleine Flöckchen.	Längere Fäden.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.
7	Rot, klar, zahlreiche kleine und grössere Flöckchen.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Bact. fluorescens liquefaciens</i> und verschiedene Hefearten.
8	Farblos, schwach getrübt, zahlreiche kleine Flöckchen.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Bact. fluorescens liq.</i> , verschiedene Schimmelpilze und Hefen.
9	Farblos, klar.	—	Normal.	<i>Bact. fluorescens liq.</i> , <i>Penicillium glaucum</i> , verschiedene Hefearten.
10	Rot, klar, zahlreiche Flöckchen.	—	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , verschiedene Hefearten.
11	Farblos, klar, wenige Flöckchen sichtbar.	Zahlreiche Hefezellen.	Ein wenig fade.	<i>Bact. fluorescens liq.</i> , verflüssigende Coccen, <i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.
12	Rot, klar.	Sehr zahlreiche Hefen.	Fade.	Ein die Gelatine verflüssigender Coccus, Stäbchen, Schimmelpilze und Hefen.

¹⁾ Der Ausdruck «Hefen» wird hier im weiteren Sinne des Wortes gebraucht. Neben den darunter verstandenen.

belle I.

tureller Befund

Zweischgendekotgelatineplatten	Nähragarplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen	Nährbouillon	Eijk-mann'sche Probe
—	—	Kleines unregelmässiges <i>Bacterium</i> .	<i>Bact. fluorescens</i> und Hefen.	—
—	—	Steril.	<i>Bact. fluorescens</i> .	—
—	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Mucor</i> art.	Steril.	<i>Bact. fluorescens liq.</i> und Hefen.	—
—	<i>Penicillium glaucum</i> und <i>Mucor</i> , ferner Hefen.	Steril.	<i>Bact. fluorescens liq.</i> und Hefen.	—
—	—	Streptoroccen u. ein <i>Bacterium</i> .	<i>Bac. subtilis</i> .	—
—	—	Verkümmerte Formen eines <i>Bacteriums</i> .	Steril.	—
—	—	<i>Bact. Güntheri</i> und Hefen.	<i>Bacter. Güntheri</i> .	—
—	—	Ein in Form sehr unregelmässiges <i>Bacterium</i> .	Steril.	—
—	Verschied. Schimmelpilze (<i>Penicillium glaucum</i> und <i>Aspergillus niger</i>). <i>Bact. fluorescens liq.</i> . <i>Bact. coli</i> u. Hefen.	<i>Bacterium coli</i> .	<i>Bact. coli</i> .	—
—	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.	<i>Diplococci</i> u. <i>Streptococci</i> .	<i>Diplococci</i> und <i>Streptococci</i> .	—
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.	Ein sporenbildender Bacillus (? <i>Bac. subtilis</i>) und Hefe.	<i>Bact. Güntheri</i> und und kürzere <i>Streptocockenketten</i> .	<i>Bact. Güntheri</i> , <i>Streptococci</i> und Hefen.	—
<i>Penicillium</i> und Hefe.	<i>Bac. mesentericus</i> u. Hefe.	<i>Bact. Güntheri</i> und ein anderes <i>Bacterium</i> .	<i>Streptococci</i> und <i>Bac. mesentericus</i> .	—

Saccharomyceten werden auch die den *Fungi imperfecti* zugeteilten *Torula*- und *Mycoderma*arten

Tabelle I

Nr.	Makroskopischer Befund	Mikroskopischer Befund	Sinnes- prüfung	Kul-
				Nährgelatineplatten
13	Farblos, klar, ver einzelte schwarze Flöckchen.	Zahlreiche längliche Hefezellen.	Ein wenig fade.	<i>Dematium pullulans</i> und 2 Hefearten.
14	Farblos, klar.	Zahlreiche längliche Hefezellen.	Ein wenig fade.	Hefereinkultur.
15	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.
16	Farblos, klar.	Coccen.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.
17	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und ver schiedene Hefen.
18	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Bact. fluorescens liquefaciens</i> , <i>Penicillium glaucum</i> und 2 verschiedene Hefearten.
19	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	Ein die Gelatine verflüssigen der Coccus, Schimmelpilze und Hefe.
20	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , eine <i>Dematium</i> art und Hefe.
21	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	3 verschiedene Hefearten.
22	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Streptothrix alba</i> , <i>Penicillium glaucum</i> und 2 Hefearten.
23	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.
24	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Asper gillus glaucus</i> und 2 Hefearten.
25	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , ein <i>Dematium</i> -ähnlicher Pilz, Hefen.
26	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und 3 ver schiedene Hefearten.

(Fortsetzung).

tureller Befund

Zwetschgendekoktgelatineplatten	Nähragarplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen	Nährbouillon	Eijk-mann'sche Probe
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.	2 verschiedene Kokkenarten.	Coccen.	Hefen.	—
Zwei verschiedene Hefearten.	<i>Streptothrix alba</i> und Hefe.	<i>Bact. Güntheri</i> -ähnliche Organismen.	Steril.	—
<i>Penicillium glaucum</i> und eine andere <i>Penicillium</i> -art, ferner verschiedene Hefearten.	<i>Bacillus mycoides</i> .	Propionsäurebakterien-ähnliche Organismen.	<i>Micrococcus aurens</i> .	—
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.	Kokken.	Ein kleines Bacterium.	<i>Bac. mycoides</i>	—
<i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Aspergillus</i> -art, ferner 3 verschiedene Hefearten.	<i>Aspergillus repens</i> . (?)	Coccen und dünne Stäbchen.	Staphylococcen und kürz. Kettchen.	0
<i>Penicillium glaucum</i> und 2 Hefearten.	Steril.	Streptococcen und Diplococcen.	Streptococcen	0
Schimmelpilze u. 2 Hefearten.	Steril.	Steril.	Hefe.	0
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.	Kokken.	Steril.	Steril.	0
3 verschiedene Hefearten.	Kokken.	Steril.	Steril.	0
Hefen.	Steril.	Steril.	Bewegliche, dicke Stäbchen.	0
Verunglückt.	Steril.	Steril.	Steril.	0
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.	Steril.	Steril.	<i>Bact. fluorescens liquefaciens</i> .	0
<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Dematioides</i> -ähnlicher Pilz und Hefen.	<i>Bac. mesentericus</i> , <i>Bact. Güntheri</i> -ähnliche Organismen und Hefen.	Hefen.	<i>Bact. fluorescens lig.</i>	0
<i>Penicillium glaucum</i> und 3 verschiedene Hefearten.	Kokken.	Kleine Stäbchen.	Kleine Stäbchen.	0

Tabelle I

Nr.	Makroskopischer Befund	Mikroskopischer Befund	Sinnes- prüfung	Kul-
				Nährgelatineplatten
27	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	Schimmelpilze und Hefen.
28	Rot, klar.	Coccen.	Normal.	Ein <i>Dematiumpullulans</i> -ähnlicher Pilz, <i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.
29	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	Hefereinkultur.
30	Farblos, schwache Trübung, zahlreiche Schmutzpartikelchen.	Zahlreiche Hefen, lange Hyphen und Stäbchen.	Fader Geschmack.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , <i>Bac. mesentericus</i> , <i>coli</i> -ähnliche Stäbchen, Schimmelpilze und 2 Hefearten.
31	Rot, klar.	Vereinzelte Hefe- zellen.	Normal.	<i>Cladosporium</i> art, bewegliche Stäbchen und Hefen.
32	Farblos, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Streptothrix</i> , <i>Bact. Güntheri</i> und Hefen.
33	Goldgelb, klar, ver einzelterte kl. Schmutz- partikelchen.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Penicillium glaucum</i> und 2 Hefearten.
34	Farblos, klar, ver einzelterte kleine Flöck- chen.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	Hefen.
35	Rot, klar.	Keine Organismen sichtbar.	Normal.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , ferner ein bewegliches Stäbchen.
36	Rot, schwach getrübt, zahlreiche grössere und kleinere Flöck- chen.	Schmutzpartikelchen, zahlreiche einzelne Hefezellen u. ganze Sprossverbände von Hefen, wenige Bakterienstäbchen.	Normal.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , <i>coli</i> -ähnliche Stäbchen, <i>Penicillium glaucum</i> und 2 Hefearten.
37	Farblos, schwach getrübt, sehr zahlreiche grössere und kleinere Flöckchen	Schmutzpartikelchen, zahlreiche einzelne und in grösseren Sprossverbänden auftretende Hefen, vereinzelte Bakterienstäbchen.	Fader Geschmack.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , <i>Bact. Güntheri</i> , <i>Bact. aërogenes</i> , <i>Penicillium glaucum</i> und 2 Hefearten.

(Fortsetzung).

tureller Befund

Zwetschgendekoktgelatineplatten	Nähragarplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen	Nährbouillon	Eijk.-mann'sche Probe
Reinkultur von Hefen.	Mucor und ein Fadenbakterium.	<i>Bact. subtilis</i> und Hefen.	<i>Bac. subtilis.</i>	0
Ein <i>Dematium pullulans</i> -ähnlicher Pilz, <i>Aspergillus</i> und Hefen.	<i>Bac. mesentericus.</i>	Steril.	<i>Bac. mesentericus</i> und Coccen.	0
<i>Penicillium glaucum</i> und Hefe.	Hefen.	Hefen.	<i>Bac. mesentericus.</i>	0
Schimmelpilze und 2 verschiedene Hefearten.	<i>Mucor Mucedo</i> , Coccen und <i>Bac. mesentericus.</i>	<i>Bact. Güntheri</i> und Coccen.	<i>B. Güntheri.</i>	0
<i>Penicillium glaucum</i> , eine <i>Cladosporium</i> -art, bewegliche Stäbchen und Hefen.	Steril.	Steril.	<i>Bac. mesentericus.</i>	0
Hefen.	Steril.	Steril.	Steril.	+
<i>Penicillium glaucum</i> und 2 verschiedene Hefearten.	<i>Bac. subtilis</i> und Hefen.	Hefen.	<i>Bac. subtilis</i> und Hefen.	0
<i>Aspergillus niger</i> und 2 verschiedene Hefearten.	<i>Bac. subtilis</i> und ein dünnes Stäbchen.	Steril.	<i>Bac. mesentericus.</i>	0
Begliche Stäbchen und Hefen.	Bewegliche Stäbchen.	Bewegliche Stäbchen.	Bewegliche Stäbchen u. Diplococci	0
Hefen.	Hefen.	Streptococci und <i>Bacillus putrificus.</i>	—	0
Hefen und <i>Bact. Güntheri.</i>	<i>Bact. Güntheri</i> und <i>Bact. aërogenes.</i>	<i>Bact. Güntheri</i> und <i>Bact. aërogenes.</i>	—	0

Die folgenden Kolonnen enthalten die auf verschiedenen Nährböden gewachsenen Organismen. Sie entstammen 3 Klassen: den Hefen, den Bakterien und den Schimmelpilzen. Je nach dem gebotenen Nährmedium waren im kulturellen Befunde bei der gleichen Limonade zuweilen nicht unwesentliche Unterschiede zu konstatieren. Die Ursache dieses auf den ersten Blick etwas auffallenden Verhaltens muss in dem prozentualisch sehr starken Ueberwiegen der Hefekeime gesucht werden, wodurch das Bakterienwachstum, selbst auf den sonst für Spaltpilze günstigen Nährgelatineplatten, unterdrückt wurde. Günstigere Wachstumsbedingungen für die Bakterien waren dann, wenigstens für die an höhere Temperaturen angepassten Arten, die Agar- und Bouillonnährböden, da das Hefewachstum hier, infolge der höheren Aufbewahrungstemperatur, bei der diese Kulturen gehalten wurden, vielfach ganz ausblieb. Von den im vorliegenden angeführten Limonaden fanden sich bei Berücksichtigung aller Kulturmedien

- bei 31 Proben: Hefen, Bakterien und Schimmelpilze,
- » 4 Proben: Hefen und Bakterien,
- » 1 Probe: Hefen und Schimmelpilze und
- » 1 Probe: Bakterien allein.

Die Keimarten.

a. **Hefen** (Sprosspilze).

Eine nähere Untersuchung der aus den Limonaden isolierten Hefestämme fand nur insofern statt, als nach deren Isolierung auf Sporen- und Alkoholbildung geprüft und das Verhalten auf den Gelatineplatten und in Bierwürze mitberücksichtigt wurde. Zur Feststellung der Sporenbildung kam einmal das Gipsblockverfahren in Anwendung; ferner wurden stets auch die alten eingetrockneten Kulturen daraufhin verfolgt. Die Prüfung auf Alkohol in älteren Bierwürzefüllungen erfolgte mittelst der Jodoformreaktion, zum Teil unter gleichzeitiger Bestimmung des spezifischen Gewichtes des Destillates. Dabei hat sich ergeben, dass die Mehrzahl der in Limonaden sich vorfindenden Hefearten zu den *Torulaarten* zu zählen ist. Von ca. 40 geprüften Stämmen zeigten 28 keine Sporenbildung, wohl aber meistens ein wenig Alkohol. Weiter waren 6 Hefearten darunter, die das Vermögen der Sporen- und Alkoholbildung besaßen und die somit den eigentlichen *Saccharomyceten* angehören. Eine mässige Anzahl von Hefen zeichneten sich dadurch aus, dass sie in kurzer Zeit an der Oberfläche Häutchen bildeten, aber kein Gärvermögen aufwiesen. Diese beiden Momente und ihr morphologisches Verhalten der Bildung von vorwiegend schlauchförmigen Zellen in Oberflächenkulturen, ferner das Fehlen der Sporenbildung weisen sie in die Gruppe der *Mycodermaarten*. Einige wenige Hefestämme verflüssigten Gelatine. Sie bildeten zudem Sporen. Es dürfte sich, nach diesen Merkmalen zu schliessen, um *Pichiaarten* handeln.

b. Bakterien.

Alle diejenigen Bakterienarten, die nicht sofort durch ihr kulturelles und mikroskopische Verhalten ermittelt werden konnten, wurden, zum Zwecke der später vorzunehmenden Identifizierung, abgeimpft. Schon bei der Untersuchung der Originalkulturen machte ich zuweilen die Beobachtung, dass das Bakterienwachstum ein kümmerliches war. Einige der Kulturen waren in der Folge überhaupt zu einem Weiterwachsen nicht mehr zu bringen, sodass eine Identifizierung nicht immer möglich war. Diese bemerkenswerte Tatsache dürfte sich mit der Annahme erklären, dass die Limonade im allgemeinen kein günstiges Nährmedium für viele Bakterienarten ist, was, wie wir später sehen werden, sich bestätigte.

Die am häufigsten angetroffene Bakterienart war *Bacterium fluorescens liq.* Sie fand sich in 15 Proben vor. Ebenfalls verhältnismässig oft waren die Vertreter der Milchsäurebakterien nachzuweisen und zwar *Bacterium Güntheri, Lehm. et Neum.* (*Bacterium lactis acidi*) und einige Streptokokken. Die hier ermittelten Streptokokken bildeten gewöhnlich nur kurze Ketten von 10—20 Gliedern, ihre Zellen waren öfters oval mit Andeutungen von Spitzchen, zudem waren sie gewöhnlich Säurebildner. Diese Momente machen es sehr wahrscheinlich, dass sie nicht den eigentlichen pathogenen Streptokokken angehören. Ferner wurden ermittelt verschiedene Kokkenarten. Da die gleiche Kokkenart gewöhnlich nur 1—2 Mal vorzukommen pflegte, so unterliess ich eine nähere Identifizierung. In 2 Proben fand sich *Bacterium coli*. Die Anzahl dieser Keime war in beiden Fällen eine kleine. Das eine Mal gelang der Nachweis dieses Gasbildners nur mit Hilfe der *Eijkmann'schen* Probe. Ein dem *Bacterium coli* sehr nahe stehender Organismus, *Bacterium aërogenes*, konnte nur in einer Probe ermittelt werden. Auch Vertreter der Heu- und Kartoffelbazillen wie z. B. *Bacillus subtilis*, *Bacillus Megatherium*, *Bacillus mesentericus* und *Bacillus mycoides* wurden in vereinzelten Proben angetroffen. Sie traten aber prozentualisch stets in äusserst geringen Mengen auf. Von den streng anaeroben Bakterienarten war als einziger Vertreter und auch nur einmal konstatiert worden *Bacillus putrificus*. In nur wenigen Limonaden wurde ferner *Streptothrix alba* gefunden. Die Prüfung auf Typhus- und Paratyphusbakterien mittelst Spezialnährböden fiel stets negativ aus.

c. Schimmelpilze.

Die Anzahl der verschiedenen aus Limonaden isolierten Schimmelpilzarten ist nicht sehr gross. Sehr häufig und mitunter auch in grösserer Anzahl fand sich einzig das sehr verbreite *Penicillium glaucum* vor. Die übrigen Schimmelpilzarten, wie *Mucor Mucedo*, *Aspergillus glaucus* und *Aspergillus niger*, ferner eine *Cladosporum*- und eine *Dematioid*-Art waren nur ganz vereinzelt anzutreffen. Unter ihnen ist als pathogene Art bekannt *Aspergillus niger*.

Die Keimzahlen.

Eine Zusammenstellung der auf verschiedenen Nährmedien ermittelten Keimzahlen findet sich in Tab. II. Von den 37 Limonadenproben erwies sich keine als vollkommen steril. Stellt man die Anzahl Proben den pro cm^3 auf Nährgelatineplatten gefundenen gleichen Keimzahlen gegenüber, so zeigt sich folgendes Bild:

Pro cm^3 fanden sich:	Anzahl Proben:
1—50 Keime	2
51—100 »	2
101—500 »	11
501—1000 »	4
1001—2000 »	3
2001—5000 »	5
5001—10000 »	2
10001—20000 »	1
Ueber 20001 »	7

Nicht ganz die Hälfte der untersuchten Limonaden besass demnach einen Keimgehalt von über 1000, eine Keimzahl, die im Vergleich mit den Keimzahlen von normalem Trinkwasser hoch erscheint.

Aehnliche Keimzahlen bei der gleichen Limonadenprobe wie auf Nährgelatine fanden sich auf Zwetschgendekoktgelatine. Ausnahmen machen hier einzig die Proben 11, 13 und 14, bei denen auf letzterem Nährboden bedeutend höhere Keimmengen ermittelt wurden. Es handelte sich dabei um eine Hefe, die nur auf Zwetschgen-Gelatine sich entwickelte. Ganz andere Keimzahlen als die Gelatinekulturen lieferten die Agarnährböden. Von 31 Limonadeproben, die auf Agarplatten ausgesät worden waren, blieb in 10 Fällen jedes Wachstum aus; bei 13 Proben war die Keimzahl unter 100, bei 2 Limonaden betrug sie 100—1000 und nur 6 Proben zeigten höhere Keimgehalte pro cm^3 als 1000. Ohne Zweifel macht sich hier in sehr ausgesprochener Weise das Moment der Aufbewahrung der Kulturen bei höherer Temperatur (37° C) geltend, die für die überwiegende Anzahl der in den Limonaden vorkommenden Organismen zu hoch ist. In sehr vielen Fällen übereinstimmende Resultate mit den Agarplattenkulturen gaben die Milchzuckeragarschüttelkulturen. Bei einigen Proben waren die Keimgehalte etwas höher bei dem letztern Nährboden, gewöhnlich als Folge des Vorkommens von fakultativ anaëroben Stäbchen, denen die Hohlschichtkultur besser zusagte, als die Plattenkultur.

Vergleicht man die farblosen (meistens Citronenlimonaden) mit den gefärbten Limonaden (gewöhnlich Himbeerlimonaden), so fällt auf den ersten Blick auf, dass die Himbeerlimonaden im allgemeinen ganz beträchtlich geringere Keimgehalte aufweisen als die farblosen Limonaden. Dieses verschiedene Verhalten farbloser und roter Limonade war nicht nur bei Produkten aus verschiedenen Fabriken, sondern auch stets bei Limonaden, die

Tabelle II.

Anzahl Keime pro cm³ auf verschiedenen Nährböden.

Nr.	Bezeichnung	Nährgelatineplatten	Zwetschgen-dekot-gelatineplatten	Nähragar-platten	Milchzucker-agarschüttel-kultur (hohe Schicht)
1	Limonade gazeuse	6440	—	—	38
2	Himbeerlimonade	420	—	—	0
3	Limonade gazeuse	63400	—	15600	0
4	Himbeerlimonade	1200	—	1630	0
5	Limonade	1900	—	—	600
6	Limonade	700	—	—	70
7	Limonade	106000	—	—	20
8	Limonade	1900	—	—	100
9	Limonade mit Citron-Aroma . .	4800	4000	2100	ca. 200
10	Limonade mit Himbeer-Aroma . .	1000	740	900	ca. 400
11	Limonade mit Citron-Aroma . .	3600	265000	1350	4000
12	Limonade mit Himbeer-Aroma . .	unzählbar	214000	90	10
13	Ohne Aufschrift	2400	181000	18	20
14	Ohne Aufschrift	280	70000	6	110
15	Limonade gazeuse Himbeer . .	170	200	4	42
16	Limonade gazeuse au Citron . .	160	370	0	6
17	Limonade gazeuse	2800	1900	4	170
18	Limonade gazeuse	390	300	0	210
19	Ohne Aufschrift	200	210	0	0
20	Ohne Aufschrift	50	70	0	0
21	Ohne Aufschrift	3310	1230	0	0
22	Ohne Aufschrift	20	?	0	0
23	Himbeerlimonade	280	300	0	0
24	Limonade gazeuse	590	300	0	0
25	Limonade gazeuse	280	600	6	24
26	Limonade gazeuse	900	600	4	200
27	Limonade mit Citron-Aroma . .	370	700	60	50
28	Limonade mit Himbeer-Aroma . .	60	250	30	0
29	Limonade mit Himbeer-Aroma . .	290	296	240	86
30	Brause-Limonade	83500	91200	20	20
31	Brause-Limonade, Aroma Himbeer	204	210	0	0
32	Limonade gazeuse au Citron . .	60	10	0	0
33	Si'-Si'	7900	14500	40	1200
34	Feinste Limonaden, Citron . .	10400	11000	80	0
35	Limonade gazeuse	448500	386400	33000	ca. 400
36	Himbeer-Aroma	433000	530000	8	1900
37	Citron-Aroma	831000	790000	27500	?

den gleichen Herstellungsort aufzuweisen hatten, zu konstatieren. Offenbar ist die Ursache der kleineren Keimzahlen der roten Limonadenproben auf eine stärkere aseptische Wirkung der hiebei verwendeten Essenzen und Fruchtestern, gegenüber denjenigen, die bei den farblosen Limonaden in Anwendung kommen, zurückzuführen.

In der folgenden Tabelle III findet sich nun eine Uebersicht der pro cm^3 auf Nährgelatineplatten ermittelten Keimzahlen für Hefen, Bakterien und Schimmelpilze. Die mit + angedeuteten Stellen bezeichnen, dass die betreffende Organismenklasse vertreten war, aber nur auf den Verdünnungen, die nicht zur Zählung verwendet werden konnten. Aus dieser Zusammensetzung ergibt sich, dass die Hefen mit Ausnahme von nur 6 Proben die grössten Keimzahlen aufwiesen, dann folgen mit viel geringeren Zahlen die Schimmelpilze und erst an letzter Stelle stehen im allgemeinen in Bezug auf den Keimgehalt die Bakterien.

B. Ueber die Herkunft der in Limonaden sich vorfindenden Keime.

Als mutmassliche Infektionsquellen kommen bei Limonadefabrikation in Betracht:

1. das Wasser,
2. die Sirupe,
3. die Gefässer, in denen die Mischung der verschiedenen Agenzien vorgenommen wird und
4. die Aufnahmegefässer für die fertige Limonade (Flaschen).

Bei der Limonadebereitung wird gewöhnlich in der Weise verfahren, dass das Wasser und die Kohlensäure in ein gemeinschaftliches Gefäss geleitet und hier unter einem bestimmten Druck gemischt werden. Bei dem hiezu dienenden Apparat ist vielfach ein Aufnahmegefäß für den Sirup angebracht, dessen Ausflussöffnung in das Abfüllrohr für das kohlensäurehaltige Wasser mündet. Zunächst wird das gewünschte Quantum Sirup in die Flasche gebracht und dann die Flasche mit kohlensäurehaltigem Wasser zugefüllt.

Um nun über die Herkunft der in den Limonaden angetroffenen Keimarten Aufschluss zu erhalten, verfuhr ich wie folgt: Während der Bereitung von Limonaden wurde von dem zur Verwendung kommenden Wasser an Ort und Stelle Kulturen angelegt, ebenfalls, wo es möglich war, von dem kohlensäurehaltigen Wasser. Dann wurden Proben entnommen von Sirup und von den unter Beaufsichtigung verfertigten Limonaden. Mit diesen Materialien wurden sofort nach der Ankunft im Laboratorium Aussaaten gemacht. Gewöhnlich erfolgte die Verarbeitung der frisch bereiteten Limonaden schon innerhalb von 10—15 Minuten nach Anlegung der Kulturen von Wasser und von der Mischung Wasser + CO_2 , so dass die erhaltenen Resultate als den tatsächlichen Verhältnisse entsprechend miteinander vergleichbar sind.

Tabelle III.

Anzahl Hefen, Bakterien und Schimmelpilze pro cm³ auf Nährgelatineplatten.

Nr.	Bezeichnung	Hefen	Bakterien	Schimmelpilze	Total Keime
1	Limonade gazeuse	6320	120	0	6440
2	Himbeerlimonade	0	420	0	420
3	Limonade gazeuse	1000	62200	200	63400
4	Himbeerlimonade	1100	+	100	1200
5	Limonade	1500	0	400	1900
6	Limonade	400	0	300	700
7	Limonade	105000	+	1000	106000
8	Limonade	1200	300	400	1900
9	Limonade mit Citron-Aroma .	4500	+	300	4800
10	Limonade mit Himbeer-Aroma .	800	+	200	1000
11	Limonade mit Citron-Aroma .	3400	+	200	3600
12	Limonade mit Himbeer-Aroma .	115000	unzählbar	+	?
13	Ohne Aufschrift	2300	0	100	2400
14	Ohne Aufschrift	280	0	0	280
15	Limonade gazeuse, Himbeer .	80	0	90	170
16	Limonade gazeuse au Citron .	20	+	140	160
17	Limonade gazeuse	2500	0	300	2800
18	Limonade gazeuse	60	330	+	390
19	Ohne Aufschrift	170	10	20	200
20	Ohne Aufschrift	30	0	20	50
21	Ohne Aufschrift	3310	0	0	3310
22	Ohne Aufschrift	20	0	0	20
23	Himbeerlimonade	280	0	+	280
24	Limonade gazeuse	550	0	40	590
25	Limonade gazeuse	270	0	10	280
26	Limonade gazeuse	700	0	200	900
27	Limonade mit Citron-Aroma .	360	0	10	370
28	Limonade mit Himbeer-Aroma .	40	0	20	60
29	Limonade mit Himbeer-Aroma .	290	0	0	290
30	Brause-Limonade	83400	+	100	83500
31	Brause-Limonade, Aroma Himbeer	162	36	6	204
32	Limonade gazeuse au Citron .	20	30	10	60
33	Si'-Si'	7900	0	+	7900
34	Feinste Limonaden, Citron .	10400	0	+	10400
35	Limonade gazeuse	0	448500	0	448500
36	Himbeer-Aroma	433000	+	+	433000
37	Citron-Aroma	803500	27500	+	831000

Untersuchungsergebnisse.

Fall 1. Limonadefabrik A.

Tabelle IV.

Material	Gelatineplatten		Zwetschgendekokt-gelatineplatten, resp. Bouillon		Milchzuckeragar h. Sch.	
	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten
Wasser . . .	12	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i>	—	—	1	<i>Bac. mesentericus</i>
Citronensirup .	0	0			0	0
Himbeersirup .	0	0			0	0
Limonade, -Citr.	5100	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , Hefen <i>Penic. glaucum</i>	47200	Hefen <i>Penic. glaucum</i> <i>Bac. subtilis</i>	30	Hefen
» -Himbeer	640	Hefen <i>Penic. glaucum</i> ein verfl. <i>Bacterium</i> .	610	Hefen <i>Penic. glaucum</i>	170	<i>Bacterium</i>

Im vorliegenden Falle wurde das Wasser durch Berkefeldkerzen filtriert. Es war, wie aus Tabelle IV hervorgeht, sozusagen keimfrei. Die beiden Sirupproben erwiesen sich als vollkommen steril und doch zeigten die Limonadenproben hohe Keimzahlen. Als Ursache dieser hohen Keimzahlen können nur die Gefäße, in der die Limonade bereitet und die Flaschen, in die die fertige Limonade gebracht wurde, in Betracht fallen. Da die Keimzahlen und zum Teil auch die Keimarten der beiden Proben verschiedene sind, so muss angenommen werden, dass besonders die Flaschen als Infektionsquelle anzusehen sind.

Fall 2. Limonadefabrik B.

Tabelle V.

Material	Gelatineplatten		Zwetschgendekokt-gelatineplatten, resp. Bouillon		Milchzuckeragar h. Sch.	
	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten
Wasser . . .	1920	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , <i>Penic. glaucum</i> , colähnl. Bact. u. Hefen	—	—	—	—
Wasser + CO ₂	1510	Gleiche Organismen wie bei Wasser	—	—	—	—
Himbeersirup .	0	0	—	—	0	0
Citronensirup .	0	0	—	—	0	0
Hopfensirup .	0	0	—	—	0	0
Limonade . . .	1400	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , <i>Penic. glaucum</i> u. Hefen	900	<i>Penic. glaucum</i> und Hefen	0	0

Im Fall 2 wird bei der Limonadefabrikation gewöhnliches Leitungswasser verwendet. Da sowohl die Keimzahlen, wie die Keimarten der fertigen Limonade mit denen des Wassers übereinstimmen (Tabelle V), so kann hier nur das Wasser für das Vorkommen von Keimen in der Limonade verantwortlich gemacht werden. Der auffallend hohe Keimgehalt des Wassers selber röhrt daher, weil das Leitungswasser nicht direkt in den eigentlichen «Mischapparat» gelangt, sondern zuerst in ein offenes irdenes Fass und erst von hier aus in den Apparat, wo die Mischung von Wasser und Kohlensäure erfolgt, gepumpt wird.

Fall 3. Limonadefabrik C.

In Fabrik C wird zur Herstellung dieser Getränke gewöhnliches, nicht filtriertes Leitungswasser benutzt. Nach Mischung des Wassers mit der Kohlensäure fanden sich die gleichen Keimzahlen und Keimarten vor (Tabelle VI), dagegen wies die frisch bereitete Limonade einmal einen etwas

Tabelle VI.

Material	Gelatineplatten		Zwetschgendekokt-gelatineplatten, resp. Bouillon		Milchzuckeragar h. Sch.	
	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten
Wasser . . .	100	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq., Penic. glaucum</i> , Coccen	—	—	—	—
Wasser + CO ₂	100	<i>Bact. fluoresc. liq.</i> , Coccen, <i>Penicillium glauc.</i>	—	—	—	—
Himbeersirup .	0	0			0	0
Citronensirup .	0	0			0	0
Limonade . . .	170	Coccen, <i>güntheri</i> - <i>rähnl. Organismen</i> , Hefen und <i>Penic. glaucum</i>	40	Hefen	0	0

höheren Keimgehalt und zudem auch noch andere Keimarten auf. Die Sirupproben wurden steril befunden. Als Infektionsquellen fallen daher in Betracht das Wasser und die Aufnahmegefässe der fertigen Limonade — die Flaschen.

Fall 4. Limonadefabrik D.

Die verwendeten Materialien Wasser, Kohlensäure und Sirupe erwiesen sich hier als beinahe steril (Tabelle VII) und doch zeigte das fertige Produkt einen mässig hohen Keimgehalt. Ohne Zweifel muss daher in diesem Falle die Flasche als die Hauptinfektionsquelle für die in der Limonade angetroffenen Organismen angesehen werden.

Tabelle VII.

Material	Gelatineplatten		Zwetschgendekokt-gelatineplatten, resp. Bonillon		Milchzuckeragar h. Sch.	
	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten	Keimzahl pro cm ³	Keimarten
Wasser . . .	2	Ein kleines Bacterium	0	0	—	—
Wasser + CO ₂	ca. 5	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i>	0	0	—	—
Himbeersirup .	0	0	0	0	—	—
Citronensirup .	0	0	0	0	—	—
Limonade . . .	300	Hefen u. Schimmelpilze, <i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i>	300	Hefen u. Schimmelpilze	0	0

Aus diesen 4 Versuchen ist somit zu entnehmen, dass die in Limonaden nachweisbaren Organismen aus dem Wasser und besonders aus den Flaschen herrühren. Zu ähnlichen Resultaten kam *Haenle*¹⁾ bei Untersuchungen über künstliche Selterswasser. Der Genannte wies nach, dass der Keimgehalt hauptsächlich von der Sauberkeit der Flaschen abhängig ist. So besassen von den untersuchten Flaschenproben stets die Syphonflaschen den niedrigsten Keimgehalt, weil sie vom Publikum nicht geöffnet und durch Verwendung für allerlei häusliche Zwecke verunreinigt werden können.

C. Ueber das Verhalten der Keimarten bei verschiedenen langer Dauer der Aufbewahrung der Limonadeproben.

Nachdem ich im Kapitel A gezeigt habe, dass der Keimgehalt der Limonaden sowohl in bezug auf die Anzahl der verschiedenen Keimarten, wie besonders auch in bezug auf die Keimzahl grossen Schwankungen unterworfen ist, war es von Wichtigkeit, weiter die Frage zu prüfen, ob bei verschiedenen langer Dauer der Aufbewahrung im Keimgehalt Veränderungen zu konstatieren seien. Das Studium dieser Aufgabe schien dazu geeignet, uns neben den näheren mykologischen Verhältnissen dieses Fabrikates überhaupt auch Aufschluss zu erteilen über die Eigenschaften der Limonaden als Nährboden für die ermittelten Keimarten und damit Einblicke über eventuelle Ursachen von abnormalen Eigenschaften derselben, hervorgerufen durch biologische Prozesse.

Eine einwandfreie Lösung dieser Aufgabe stösst, in Anbetracht der bei der Limonadenfabrikation üblichen Technik, auf grosse Schwierigkeiten. Da diese Getränke unter einem bestimmten Drucke in die Flaschen gefüllt werden, so bestehen nach dem Oeffnen einer Flasche bereits andere Ver-

¹⁾ *Haenle* O., Bakteriologische Studien über künstliches Selterswasser. Centralblatt f. Bakteriologie, I. Abt., 1906, pag. 609.

hältnisse als vorher. Es entsprechen daher die Untersuchungsergebnisse, die man erhält, wenn aus der gleichen Limonadeprobe mehrmals Kulturen angelegt werden, wobei es unvermeidlich ist, dass stets Kohlensäure entweicht, nicht genau den tatsächlichen Verhältnissen gelagerter Limonade. Anderseits haften denjenigen Versuchen, wo bei Entnahme einer grösseren Anzahl gleichzeitig bereiteter Limonaden 1—2 Proben sofort untersucht und deren Resultate mit denen nach verschiedener Dauer der Aufbewahrung geprüfter Proben verglichen wurden, ebenfalls Mängel an. Diese Mängel bestehen darin, dass der Keimgehalt der leeren Flaschen in den seltensten Fällen der gleiche ist. Ein dritter Weg, der über Zu- oder Abnahme der Keimarten genau orientieren würde, wäre die Verwendung steriler Flaschen zur Aufnahme der Limonaden. Dies würde aber wiederum den in der Praxis vorkommenden Verhältnissen, wo die aus der Flasche selber stammenden Keimarten oft eine grosse Rolle spielen, nicht entsprechen.

Bei meinen Versuchen habe ich die beiden ersten Wege eingeschlagen, immerhin aber mehr die zweite Versuchsrichtung bevorzugt, weil nur diese den wirklichen Verhältnissen am meisten Rechnung trägt.

I. Versuchsserie.

Wiederholte Prüfung der gleichen Limonadeprobe.

Die in dieser Versuchsserie untersuchten Limonaden wurden nach Entnahme der für die erstmalige Untersuchung notwendigen Mengen sofort wieder verschlossen, um möglichst wenig Kohlensäure entweichen zu lassen. Alle Proben waren zur Zeit der 1. Prüfung, was Aussehen und Geschmack anbetrifft, als normal zu bezeichnen. Sie standen dann bis zur 2. Prüfung in Zimmertemperatur bei zirka 16—20° C. Ihr makroskopisches Verhalten blieb auch während der zirka dreimonatlichen Aufbewahrung nach der 1. Prüfung normal, dagegen war der Geschmack bei Probe Nr. 26 muffig-seifig und bei den übrigen Proben mehr oder weniger fade. Bei der 2. Probeentnahme zeigten fernerhin noch alle Limonaden beim Oeffnen der Flaschen deutliches Schäumen, ein Zeichen, dass die Kohlensäure noch in ziemlicher Menge vorhanden war.

Das Verhalten der Keimarten und Keimzahlen kommt in Tabelle VIII zur Darstellung. Bei 4 von den 5 untersuchten Proben fand, bei Berücksichtigung aller Nährmedien¹⁾, eine starke Keimvermehrung statt. Nur Probe Nr. 26 zeigte eine Abnahme der Keimzahl. Es ist anzunehmen, dass diese Keimverminderung im Zusammenhang steht mit der deutlichen Veränderung des Geschmackes während der Aufbewahrungszeit, als Folge von

¹⁾ Es ist auffallend, dass namentlich bei der 2. Prüfung die Zwetschgendekokt-gelatinekulturen stets höhere Keimzahlen lieferten als die Nährgelatinekulturen. Da die starke Keimzunahme hauptsächlich auf eine Vermehrung der Hefen zurückzuführen war, beide Nährmedien aber gewöhnlich auch die gleichen Hefearten aufwiesen, so dürften die höheren Keimzahlen der Zwetschgendekoktgelatinekulturen, in diesem Falle, wohl nur mit der bedeutenden Ueberlegenheit dieses Nährbodens, gegenüber der Nährgelatine, zu erklären sein.

Tabelle VIII.

Bezeichnung der Probe	Datum der Untersuchung	Gelatineplatten		Zwetschgendekoktgelatineplatten		Milchzuckeragarschüttel- kulturen	
		Keimzahl	Keimarten	Keimzahl	Keimarten	Keimzahl	Keimarten
Nr. 25	7. II. 10	280	<i>Penicillium glaucum</i> , ein <i>Dematiu</i> m-ähnlicher Pilz und Hefen.	600	<i>Penicillium glaucum</i> , <i>Dematiu</i> m-ähnlicher Pilz und Hefen.	24	Hefen.
Nr. 25	11. V. 10	120	<i>Penicillium glaucum</i> und 2 verschiedene Hefearten.	27600	2 verschiedene Hefearten.	0	
Nr. 26	7. II. 10	900	<i>Penicillium glaucum</i> und 3 verschiedene Hefearten.	600	<i>Penicillium glaucum</i> und 3 verschiedene Hefearten.	200	Kleines Bakterium.
Nr. 26	11. V. 10	0		6	Hefen.	0	
Nr. 27	1. III. 10	370	Hefen und Schimmelpilze.	700	Reinkultur von Hefen.	50	Hefen und <i>Bac.</i> <i>subtilis</i> .
Nr. 27	11. V. 10	5,200	Hefen.	41,500	Bewegliches Stäbchen und Hefen.	0	
Nr. 28	1. III. 10	60	Ein <i>Dematiu</i> m <i>pullulans</i> -ähnlicher Pilz, <i>Penicillium glaucum</i> und Hefen.	250	Ein <i>Dematiu</i> m <i>pullulans</i> -ähnlicher Pilz, <i>Aspergillus glaucus</i> und Hefen.	0	
Nr. 28	11. V. 10	3,700	<i>Bact. Güntheri</i> und Hefen.	48,200	2 verschiedene Hefearten.	2,500	<i>Bact. Güntheri</i> u. Hefen.
Nr. 29	1. III. 10	290	Hefereinkultur.	296	Hefe und <i>Penicillium glaucum</i> .	86	Hefen.
Nr. 29	11. V. 10	2,000	Hefen und ein Kurzstäbchen.	2,139,000	3 verschiedene Hefearten und ein Kurzstäbchen.	0	

Umsetzungen, wobei sich Produkte gebildet haben mögen, die nachteilig auf die Organismen einwirkten und sie zum Absterben brachten. Die starke Keimzunahme der übrigen Proben ist hauptsächlich auf eine Vermehrung der Hefearten zurückzuführen, während die weiteren Keimarten stabil blieben oder auch nicht mehr nachweisbar waren. Einzig bei Probe Nr. 28 muss auch eine Bakterienvermehrung stattgefunden haben, da *Bacterium Güntheri* bei der 1. Untersuchung nicht angetroffen wurde, wohl aber bei der späteren und zwar in ziemlich grosser Anzahl.

Aus dieser Versuchsserie ergibt sich somit, dass bei längerer Lagerung von Limonaden unter den einleitend hervorgehobenen Verhältnissen (verändertem Kohlensäuregehalt) in der Grosszahl der Fälle eine Keimvermehrung während der Aufbewahrung der Proben stattfindet. An der Keimvermehrung beteiligen sich hauptsächlich die Hefen und nur in seltenen Fällen auch Bakterien. Die Klasse der Schimmelpilze scheint dagegen bei der Lagerung zurückzugehen.

II. Versuchsserie.

Vergleichende Prüfung von Limonadeproben gleicher Herkunft und gleichen Fabrikationsdatums nach verschiedenen Zeitintervallen.

Um eine sichere Kontrolle zu besitzen über das Alter und die Zeit der Herstellung, wurden die zu diesen Versuchen verwendeten Limonaden stets unter Aufsicht bereitet und dann möglichst rasch nach dem Laboratorium transportiert. Hier angelangt, wurde gewöhnlich eine der Proben sofort untersucht und die übrigen, für die weiteren Prüfungen vorgesehenen Limonaden kamen bis zu ihrer Verarbeitung in den Keller zu stehen (bei ca. 15—16° C.).

Die bei diesen Untersuchungen erhaltenen Resultate sind in den folgenden Tabellen wiedergegeben.

Bei dem ersten Versuche (Limonadeproben aus Fabrik A) erstreckte sich die Untersuchung auf 6 Limonadeproben, wovon aus einer Limonade sofort Aussaaten angelegt und die weiteren 5 Proben in Zeitabständen von 1—2 Tagen geprüft wurden. Das makroskopische Verhalten (Tabelle X) und der Geschmack waren bei allen Proben normal. Auch die Keimarten (Tabelle X) der 6 Proben zeigten grosse Uebereinstimmung. Es waren bei allen vertreten: Hefen, *Penicillium glaucum* und Fluoreszenten, daneben fanden sich vereinzelt Kokken, *Aspergillus glaucus* und ein dünnes Stäbchen. Nur bei der 3 Tage alten Probe war ferner *Bact. coli* nachweisbar. Die gleiche Probe verhielt sich auch wesentlich verschieden gegenüber den 5 übrigen Limonaden in bezug auf den Keimgehalt (Tabelle IX). Er war bedeutend höher. Abgesehen von dieser 3 Tage alten Probe waren die Keimgehalte bei den 5 verschieden alten Limonaden verhältnismässig sehr ähnliche. Es kann weder von einer Zu- noch von einer Abnahme gesprochen werden. Wohl wiesen die 1 Tag und 2 Tage alten Proben etwas höhere Keimzahlen gegenüber der frisch bereiteten Probe auf, jedoch war dieser Mehrgehalt an Keimen klein. Zudem ist zu berücksichtigen, dass die

Tabelle IX.**Limonadeproben aus Fabrik A.**

Keimzahlen.

Alter der Limonaden	Gelatineplatten				Zwetschgendekoktgelatineplatten				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³
Frisch bereitete.	300	200	100	+ ¹⁾	280	200	80	0	0	0	0	0
1 Tag.	330	320	10	+	390	240	+	150	0	0	0	0
2 Tage.	490	440	20	30	620	610	+	10	0	0	0	0
3 Tage.	10,900	10,200	+	700	19,400	19,400	+	+	5	0	0	5
4 Tage.	150	130	20	+	140	120	10	10	1	0	0	1
6 Tage.	150	100	10	40	200	90	20	90	10	0	0	10

¹⁾ + = Vorkommen in denjenigen Verdünnungen, die nicht zur Zählung berücksichtigt werden konnten.

Tabelle X.**Makroskopisches Verhalten und Keimarten.**

Alter der Limonadenproben	Makroskopischer Befund	Kultureller Befund		
		Gelatineplatten	Zwetschgendekoktgelatineplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen
Frisch bereitete.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und <i>Bact. fluorescens</i> liq.	Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	Steril.
1 Tag.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und <i>Bact. fluorescens</i> liq.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Fluorescens</i> -Art.	Steril.
2 Tage.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und <i>Bact. fluorescens</i> liq.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Fluorescens</i> -Art.	Steril.
3 Tage.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und <i>Bact. fluorescens</i> liq. + <i>B. coli</i> .	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Fluorescens</i> -Art.	<i>Bact. coli</i> .
4 Tage.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>Aspergillus glaucus</i> und eine <i>Fluorescens</i> -Art.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und eine <i>Fluorescens</i> -Art.	Dünnes Stäbchen.
6 Tage.	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und ein unbewegliches Stäbchen.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und ein unbewegliches Stäbchen.	Kokken.

4 und 6 Tage alten Limonaden kleinere Keimmengen besaßen als die frisch bereitete Probe. Diese Differenzen im Keimgehalt der verschiedenen alten Proben dürften daher lediglich auf einen ungleichen Anfangskeimgehalt zurückzuführen sein, herührend von den Keimen der Flaschen und der Ausseninfektion bei der Herstellung. Der auffallend hohe Keimgehalt der 3 Tage alten Probe ist zudem ohne Zweifel bedingt durch eine vollständig ungenügende Reinigung der Flasche, was auch aus dem Auftreten von *Bact. coli*, das nur in dieser Probe ermittelt wurde, zu schliessen ist.

Aus diesem Versuche geht demnach hervor, dass bei normalen Limonaden in den ersten Tagen nach ihrer Herstellung im Keimgehalte keine wesentlichen Veränderungen zu konstatieren sind.

Bei der folgenden Serie (Limonadeproben aus Fabrik B) wurden, nach der 1. Prüfung der frisch bereiteten Proben, die weiteren Untersuchungen nach grösseren Zeitabschnitten ausgeführt, um in Erfahrung zu bringen, ob die im vorigen Versuche erhaltenen Resultate auch bei älteren Limonaden sich bestätigen würden. Für jede Untersuchung wurden diesmal 2 Proben verwendet. Probe a repräsentierte jeweilen Zitronenlimonade, Probe b war Himbeerlimonade.

Wie aus Tabelle XII ersichtlich ist, war das Aussehen der frisch bereiteten Proben ein normales. Bei der 8 Tage alten Probe a zeigten sich jedoch schon vereinzelte Flöckchen, während dies bei der gleich alten Probe b nicht beobachtet wurde. Auch die 12 Tage alten Proben verhielten sich in bezug auf Aussehen wie die 8 Tage alten: Probe a mit Flöckchenbildung und Probe b normal. Nach 20 Tagen hatte sich bei beiden Proben Flocken- und Sedimentbildung eingestellt.

Interessant war nun das Verhalten der Keimarten und Keimzahlen. In beiden Proben waren die Hefen stets dominierend. Anfänglich, d. h. in den beiden frisch bereiteten Proben traten auch die Schimmelpilze in mässiger Anzahl auf, in den älteren Limonaden waren sie aber nicht mehr oder nur äusserst spärlich nachweisbar. Aehnlich wie die Schimmelpilze verhielten sich die Bakterien. Eine Ausnahme davon war nur bei Probe a, 20 Tage alt, zu konstatieren, wo sich plötzlich neben diesem *coli*-ähnlichen Organismus *Bact. Güntheri* in ziemlich grosser Zahl eingestellt hatte. Das nähere Verhalten der Keimzahlen ist in Tabelle XI angeführt. Auf den ersten Blick fällt auf, dass die jüngeren Himbeerlimonadeproben bedeutend niedrigere Keimzahlen aufwiesen als die gleich alten Zitronenlimonaden, während bei den älteren Proben (20 Tage) dann die Unterschiede verschwanden. Die Beobachtung, dass die Himbeerlimonadesorten im allgemeinen niedrigere Keimzahlen besitzen als die Zitronenlimonadesorten, wurde schon früher (Kapitel A) gemacht und die Ursache davon in einer verschiedenen aseptischen Wirkung der beiden Limonadesorten gesucht. Diese Erklärung dürfte sich nach dem Verhalten der Keimarten im vorliegenden Versuche als zutreffend erweisen. Vergleicht man nämlich die Keimzahlen der gleichen Limonadesorte miteinander, so ergibt sich bei den offenbar eine geringere

Tabelle XI.**Limonadeproben aus Fabrik B.**

Keimzahlen.

Alter der Limonaden	Gelatineplatten				Zwetschgendekoktgelatineplatten				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³
Frisch bereitete, Probe a	5,100	4,700	200	+	47,200	46,800	300	100	16	16	0	0
	Probe b	640	580	20	40	610	610	+	0	170	0	0
8 Tage	Probe a	300,000	300,000	+	+	488,000	488,000	+	+	550	0	0
	Probe b	21,000	21,000	0	0	21,200	21,100	100	+	510	460	50
12 Tage	Probe a	196,000	196,000	+	+	210,000	210,000	+	+	900	900	0
	Probe b	11,100	11,100	+	0	13,300	13,300	0	0	180	180	0
20 Tage	Probe a	215,000	215,000	+	+	167,000	167,000	+	+	590	+	0
	Probe b	253,000	253,000	0	0	289,000	289,000	0	0	0	0	0

Tabelle XII.

Makroskopisches Verhalten und Keimarten.

Alter der Limonadenproben	Makroskopischer Befund	Kultureller Befund		
		Gelatineplatten	Zwetschgendekoktgelatineplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen
Frisch bereitete, Probe a	Farblos, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>Bact. fluorescens</i> lig.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>Bact. prodigiosum</i> , <i>Bac. subtilis</i> .	Hefen.
	Probe b	Rot, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>Güntheri</i> -ähnliche Bakterien.	Diplococceen.
8 Tage	Probe a	Farblos, klar, vereinzelte kleine Flöckchen.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>coli</i> -ähnlicher Organismus.	<i>Coli</i> -ähnlicher Organismus.
	Probe b	Rot, klar.	Hefen (3 verschiedene Arten).	Hefen und <i>Bact. Güntheri</i> .
12 Tage	Probe a	Farblos, klar, vereinzelte kleine Flöckchen.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>coli</i> -ähnliche Organismen, <i>Bact. fluorescens</i> lig.	Hefen.
	Probe b	Rot, klar.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> .	Hefereinkultur.
20 Tage	Probe a	Farbl., schwache Trübung, sehr zahlreiche Flöckchen.	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> und <i>coli</i> -ähnliche Organismen.	<i>Bact. Güntheri</i> und Hefen.
	Probe b	Farbl., schwache Trübung, sehr zahlreiche Flöckchen.	Hefen.	—

aseptische Wirkung besitzenden Zitronenlimonaden ein rasches Ansteigen der Keimmengen schon innerhalb der ersten 8 Tage, während bei den Himbeerlimonadeproben die Vermehrung der Keime in bedeutend langsamem Tempo erfolgte, infolge einer nur allmählichen Anpassung und Ueberwindung der stärkeren aseptischen Wirkung dieses Nährmediums.

Von Interesse ist nun, dass mit der Erreichung einer bestimmten Keimzahl (ca. 100,000) auch eine makroskopische Veränderung der Limonadeprobe zu konstatieren war, da sich in dem anfänglich vollständig klaren und keine festen Substanzen erkennen lassenden Inhalt Flöckchen bildeten, die mit dem Aelterwerden der Limonaden zahlreicher wurden und sich zum Teil als Sediment zu Boden setzten. Diese Flöckchen erwiesen sich bei der mikroskopischen Prüfung als Hefeklumpen.

Kurz resümierend ergibt sich aus diesem Versuche, dass bei längerer Dauer der Lagerung selbst bei verhältnismässig kühl aufbewahrten Limonaden eine Keimvermehrung stattfindet. Diese Keimvermehrung ist, wie auch schon bei früheren Versuchen festgestellt wurde, hauptsächlich auf eine Vermehrung der Hefen zurückzuführen. Haben die Keimzahlen eine gewisse Höhe erreicht (zirka 100,000), so können auch makroskopische Veränderungen an den Limonaden beobachtet werden, die sich dem Auge als Flocken- und Sedimentbildungen darstellen. Die Flöckchen selber sind nichts anderes als grössere und kleinere Massen aneinander gelagerter Hefezellen.

Eine Bestätigung der soeben angeführten Ergebnisse bilden die folgenden Versuche (Tabelle XIII und XIV), die mit Limonadeproben einer andern Fabrik (Fabrik C) unter genau den gleichen Versuchsbedingungen ausgeführt wurden. Sie bestätigen auch die Resultate der früheren Versuche, wonach im allgemeinen ein Ansteigen der Keimmengen in den Limonaden erst nach einigen Tagen erfolgt und zuweilen neben den Hefearten auch Bakterien an der Keimzunahme der ältern Proben beteiligt sein können.

Bei den letzten Versuchen mit Limonadeproben aus Fabrik D wurde die Versuchsdauer gegenüber früher bedeutend länger gewählt. Sämtliche Proben blieben trotzdem in ihrem Aussehen normal (Tabelle XVI), was mit den Ergebnissen der vorigen Versuche nicht übereinstimmte. Das Ausbleiben der Flöckchenbildung bei den älteren Proben liess darauf schliessen, dass wohl auch im Keimgehalte andere Resultate erhalten würden als früher. Ein Blick auf Tabelle XV zeigt, dass zwar die Keimzahlen, verglichen mit gleichaltrigen Proben der früheren Versuche, ähnliche waren, dass aber in bezug auf das Vorkommen der verschiedenen Keimklassen ganz andere Mengenverhältnisse existieren. Hatten bei den Limonaden der früheren Untersuchungen stets die Hefen den grössten Prozentgehalt der Keime ausgemacht, so waren es diesmal die Bakterien. Die Hefen, wie auch die Schimmelpilze, waren nur in den 3 jüngern Proben in verschwindend kleiner Anzahl zu treffen. Von ganz besonderem Interesse war nun das Verhalten der Keimzahlen der verschiedenaltrigen Proben. Da die Keimarten in alten Proben verhältnismässig sehr gut miteinander übereinstimmten (vorwiegend

Tabelle XIII.**Limonadeproben aus Fabrik C.**

Keimzahlen.

Alter der Limonaden	Gelatineplatten				Zwetschgendekoktgelatineplatten				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³
Frisch bereitete.	1,125	1,115	10	0	1,105	1,085	20	+	0	0	0	0
4 Tage.	900	880	20	0			Verunglückt		280	0	0	280
12 Tage.	23,000	22,990	10	0	22,000	22,000	0	0	30	0	0	30
23 Tage.	149,000	149,000	0	+	190,000	190,000	0	0	1,600	0	0	1,600

Tabelle XIV.

Makroskopisches Verhalten und Keimarten.

Alter der Limonadenproben	Makroskopischer Befund	Kultureller Befund		
		Gelatineplatten	Zwetschgendekoktgelatineplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen
Frisch bereitete.	Braun, klar.	Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	Hefen, <i>Penicillium glaucum</i> , <i>Bact. fluorescens liq.</i>	Steril.
4 Tage.	Rot, klar.	Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	—	Coccen.
12 Tage.	Rot, klar.	Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	Hefen.	<i>Bac. mesentericus</i> .
23 Tage.	Farblos, klar, vereinzelte Flöckchen.	Hefen u. <i>Güntheri</i> -ähnlicher Organismus.	Hefen.	<i>Güntheri</i> -ähnlicher Organismus.

Tabelle XV.**Limonadeproben aus Fabrik D.**

Keimzahlen.

Alter der Limonaden	Gelatineplatten				Zwetschgendekoktgelatineplatten				Milchzuckeragarschüttelkulturen			
	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³	Keimzahl pro cm ³	Hefen pro cm ³	Schimmelpilze pro cm ³	Bakterien pro cm ³
Frisch bereitete.	170	20	20	130	40	40	0	0	0	0	0	0
12 Tage.	127,000	+	0	127,000					1,300	0	0	1,300
16 Tage.	185,000	1,000	+	184,000	132,000	2,000	0	130,000	0	0	0	0
43 Tage.	23,000	0	0	23,000	32,000	0	0	32,000	0	0	0	0
59 Tage.	5,500	0	0	5,500	6,300	+	0	6,300	18	0	0	18

Tabelle XVI.

Makroskopisches Verhalten und Keimarten.

Alter der Limonadenproben	Makroskopischer Befund	Kultureller Befund		
		Gelatineplatten	Zwetschgendekoktgelatineplatten	Milchzuckeragarschüttelkulturen
Frisch bereitete.	Farblos, klar.	Verflüssigende Kokken, <i>Bacter. fluorescens</i> <i>liq.</i> , Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	Hefen.	0
12 Tage.	Farblos, klar.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , eine andere <i>Fluorescens</i> -Art, Kokken, <i>Güntheri</i> -ähnliches Bakterium und Hefen.	—	Streptococcen.
16 Tage.	Farblos, klar.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> , eine weitere <i>Fluorescens</i> -Art, Hefen und <i>Penicillium glaucum</i> .	Eine <i>Fluorescens</i> -Art und Hefen.	0
43 Tage.	Farblos, klar.	<i>Bact. fluorescens</i> <i>liq.</i> und eine weitere <i>Fluorescens</i> -Art.	Eine <i>Fluorescens</i> -Art.	0
59 Tage.	Farblos, klar.	Eine <i>Fluorescens</i> -Art und <i>Bact. Güntheri</i> .	Eine <i>Fluorescens</i> -Art, <i>Bact. Güntheri</i> und Hefen.	<i>Bact. Güntheri</i> .

ein zu den Fluoreszenten gehörendes Bakterium und daneben auch das gewöhnliche *Bacterium fluorescens liquefaciens*), so darf angenommen werden, dass auch die Anfangskeimgehalte der 5 Proben sehr ähnliche waren. Es muss daher in diesen Limonaden eine sehr intensive Keimvermehrung eingesetzt haben, die noch andauerte in der 16 Tage alten Probe und auf die dann eine rasche Keimabnahme erfolgte. Die Ursache des Zurückgehens der Keimzahlen dürfte auf den schädlichen Einfluss der eigenen Stoffwechselprodukte dieser Bakterien zurückzuführen sein, die sich durch die ziemlich lange Lagerzeit allmählich angehäuft hatten, vielleicht zum Teil auch auf antagonistische Wirkungen der beiden Bakterienarten und auf Nahrungs- mangel.

Von Wichtigkeit ist ferner bei diesen Versuchen, dass trotz der hohen Keimzahlen der einzelnen Proben nicht, wie dies bei den vorigen Versuchen der Fall war, makroskopische Veränderungen an den Limonaden zu konstatieren waren.

Zusammenfassend ergibt sich somit aus diesen Versuchen, dass auch bei Limonadeproben, deren Keimgehalt vorwiegend aus Bakterien besteht, bei der Lagerung anfänglich eine sehr erhebliche Keimvermehrung auf Rechnung der Bakterien stattfinden kann. Nach Erreichung einer bestimmten Höhe des Bakteriengehaltes scheint wieder eine Abnahme desselben einzutreten. Sehr hohe Keimzahlen, die auf Bakterien zurückzuführen sind, bedingen, wenn es sich nur um Bakterien der Fluoreszentengruppe handelt, keine Veränderungen im Aussehen der Limonaden.

Besprechung der Untersuchungsergebnisse und die daraus sich ergebenden Schlüsse für die Fabrikation und die zukünftige biologische Kontrolle der Limonaden.

Die vorliegenden Untersuchungen, die sich auf 65 verschiedene Limonaden erstrecken, haben gezeigt, dass in allen Proben Organismen nachweisbar, ja, dass diese mitunter ausserordentlich zahlreich waren. Ver gegenwärtige man sich die Bedingungen, die die Limonaden in bezug auf Nährstoffe und sonstiges Verhalten den in ihr vorkommenden Keimen unter normalen Verhältnissen bieten, so muss dieses Ergebnis auf den ersten Blick auffallend erscheinen.

Als Nährmaterialien für die Lebewesen der Limonaden können nur Zuckerarten und organische Säuren in Betracht fallen, während verschiedene andere Stoffe, wie Kohlensäure und Essenzen, direkt entwicklungs- hemmend wirken. Es ist demnach einleuchtend, dass unter derart ungünstigen Lebensbedingungen sich nur solche Organismen aufhalten und vermehren, denen zuckerhaltige Flüssigkeiten besonders zusagen, und die zudem gegen Säuren wenig empfindlich sind. Wir wir gesehen haben, trifft dies auch zu. Von den ermittelten Keimarten herrschten die Hefearten,

denen eine solche Zusammensetzung des Nährmediums ausserordentlich gut behagt, sowohl in bezug auf Häufigkeit des Vorkommens bei den untersuchten Proben, wie auch im prozentualen Verhältnis zu den übrigen Keimklassen vor. Neben den Hefearten waren als häufige Bewohner der Limonaden Schimmelpilze zu treffen, die bekanntlich ihre Vorliebe für zucker- und säurehaltige Substrate mit den Hefepilzen teilen. Sehr ungünstig sind dagegen die Verhältnisse für die Bakterien. Im allgemeinen verlangen diese Organismen einen nicht so einfach zusammengesetzten Nährboden und zudem sind sie vielfach ausserordentlich empfindlich gegen Säurewirkung. Sie fanden sich denn auch meistens nur in sehr kleinen Zahlen vor.

Welche Bedeutung ist nun dem Vorkommen der ermittelten Keimarten in Limonaden beizumessen? Bevor auf die Einzelheiten dieser Frage eingetreten wird, sei daran erinnert, dass die Organismen der Limonaden, insofern sie nicht in ihren Dauerformen (Sporen) sich darin aufhalten, als Schmarotzer zu betrachten sind, die von dem Substrate leben, ohne dessen Eigenschaften je in günstigem Sinne zu beeinflussen. Schon aus diesem Grunde sollte bei der Limonadebereitung darauf Bedacht genommen werden, möglichst keimarme Produkte herzustellen.

Verfolgt man weiter die Rolle, welche die in den Limonaden ermittelten Keimarten unter Umständen spielen können, so wird die Notwendigkeit der soeben gemachten Forderung noch verstärkt. Unter den Hefearten finden sich, soweit bisher bekannt geworden ist, keine Vertreter, die für den Menschen mit Sicherheit krankheitsverursachende Eigenschaften besitzen. Dagegen sind sie imstande, wie aus verschiedenen meiner Untersuchungen hervorging, eine Qualitätsverschlechterung der Limonaden herbeizuführen. Infolge ihrer öfters ausserordentlich starken Vermehrung treten sie so zahlreich auf, dass sie schon von blossem Auge als Flöckchen sichtbar sind, wodurch der Inhalt unappetitlich erscheint. Die Vermehrung der Hefen kann aber zuweilen noch weiter gehen, so dass schliesslich die Flüssigkeit ausgesprochen trübe wird. Analog wie bei den Bieren ist daher auch bei den Limonaden von Hefetrübungen zu sprechen. Mit dem Auftreten von sehr grossen Hefemengen machte sich bei einigen von diesen Fabrikaten noch ein weiterer Fehler geltend, indem, wie bei den Proben Nr. 11, 12, 13, 14, 30 und 37 zu konstatieren war, auch der Geschmack als fade sich erwies. Eine nähere Untersuchung derjenigen Hefearten, die die erwähnten Limonadefehler bedingten, wurde vorläufig¹⁾ nicht ausgeführt. Dagegen war nach dem mikroskopischen Aussehen und dem kulturellen Verhalten auf Gelatinenährboden zu schliessen, dass es sich bei Flockenbildungen und Trübungen sehr wahrscheinlich um Torulaarten, eventuell Saccharomyceten, handeln dürfte, während die Veränderungen des Ge-

¹⁾ Ich gedenke diese Untersuchungen noch zu erweitern und möchte zu diesem Zwecke namentlich die Herren Kantonschemiker, die sich mit fehlerhaften Limonaden beschäftigen, bitten, mir entsprechendes Material gefl. zu übermitteln.

schmackes durch Mycodermaarten, die als kräftige Säurezehrer bekannt sind¹⁾, zu erfolgen scheinen. Die säurezehrende Wirkung der Mycodermaarten kann neben den angeführten noch eine weitere ungünstige Beeinflussung der Limonaden zur Folge haben. Durch die starke Abnahme des Säuregehaltes wird der Boden geeigneter gemacht für Bakterienwachstum. Bakterienarten, die vielleicht unter normalen Verhältnissen nach einiger Zeit zugrunde gegangen wären, können sich nun unter den durch die Mycodermaarten veränderten Lebensbedingungen entwickeln.

Eine wesentlich geringere Bedeutung als Limonadeschädlinge dürfte der 2. in diesem Substrate ebenfalls häufig vertretenen Organismenklasse, den Schimmelpilzen, zugemessen werden. Einmal waren sie nie so zahlreich nachweisbar wie die Hefepilze, sodann nahmen sie gewöhnlich, was für unsere Frage von besonderer Wichtigkeit ist, bei längerer Lagerung ab. Sie scheinen daher in den Limonaden keine günstigen Lebensbedingungen zur Entwicklung zu finden. Da es ferner niemals gelang, auf Schimmelpilze zurückzuführende wahrnehmbare Veränderungen in diesen Fabrikaten nachzuweisen, so darf wohl angenommen werden, dass sie in latentem Zustande (Sporen) darin sich aufzuhalten und somit für die Qualität ohne Einfluss sind. Von den Schimmelpilzen sind nun verschiedene Arten bekannt, die für den Menschen pathogene Eigenschaften besitzen. Auch unter den in den Limonaden ermittelten Arten war eine von diesen nachweisbar und zwar *Aspergillus niger*. Da diese pathogenen Formen der Schimmelpilze aber nur in schon zerstörte Gewebe unter aëroben Verhältnissen einzudringen vermögen, also zuerst die Voraussetzung zutreffen muss, dass ihnen Gelegenheit zur Mycelbildung geboten wird, was im Verdauungstractus ausgeschlossen erscheint, so dürfte dem Vorkommen selbst pathogener Schimmelpilze in den Limonaden keine grosse Wichtigkeit beizumessen sein. Von besonderer Bedeutung ist dagegen das Auftreten von Schimmelpilzen in Limonaden von einem andern Gesichtspunkte aus. In der freien Natur finden sie sich auf organischen Materialien, wie Früchten, Milch, allen möglichen Hausabfällen, Fäkalien etc. vor, dagegen fehlen sie gewöhnlich in gutem Leitungswasser. Auch die Limonaden bieten ihnen, wie wir gesehen haben, keine günstigen Lebensbedingungen. Wenn die Schimmelpilze nun gleichwohl in grösserer Anzahl in dem Getränk nachweisbar sind, so ist ohne Zweifel der Schluss berechtigt, dass sie auf organischen Substanzen hineingelangten und dass somit diese Limonaden Verunreinigungen enthalten müssen.

Die 3. in den Limonaden ermittelte Klasse von Organismen, die Bakterien, hatten sich in der Grosszahl der untersuchten Proben auf den gebotenen Nährmedien äusserst spärlich eingefunden. Zuweilen wurden darunter verkümmerte Elemente angetroffen, die als Involutionsformen anzusehen waren und die bei der Weiterzüchtung gewöhnlich eingingen. Bei

¹⁾ *J. Thöni*. Bakteriologische Studien über Labmägen und Lab. Landwirtschaftl. Jahrbuch der Schweiz 1906, pag. 181.

verschiedenen Versuchen über die Frage des Verhaltens der Organismen bei der Lagerung der Limonaden konnte ferner gezeigt werden, dass die Bakterien in den älteren Proben nicht mehr so zahlreich waren wie in den jüngeren. Die erwähnten Momente sprechen alle sehr dafür, dass die Limonade für das Bakterienwachstum ein sehr ungeeignetes Nährsubstrat darstellt, das durch die einseitige Zusammensetzung als Nährboden, namentlich auch infolge seines hohen Säuregehaltes, für sehr viele Bakterienarten, wozu besonders zahlreiche pathogene Formen gehören, wie z. B. die Erreger der Cholera, der epidemischen Dysenterie u. s. w. direkt abtötend wirken muss. Unter diesen Umständen ist es auch begreiflich, dass schädigende Einflüsse für die Qualität dieses Getränkes, von Bakterien bedingt, nicht beobachtet wurden. Auffallend ist nun, dass bei einigen wenigen Limonaden (Nr. 3, 35 und 37) sehr hohe Bakterienmengen nachweisbar waren, und dass es ferner, wie bei der Versuchsserie mit Limonadeproben aus Fabrik D (Tabelle XV und XVI) und bei Probe Nr. 28 zu entnehmen ist, auch Fälle geben kann, wo eine ausserordentlich starke Bakterienvermehrung in den Limonaden stattfindet. Da die genannten Limonadeproben makroskopisch nichts Fehlerhaftes aufwiesen und auch bei der Vornahme der Aussaaten deutliches Schäumen zeigten, sich demnach genau verhielten wie in jeder Beziehung normale Limonaden, so gibt es nur zwei Möglichkeiten, die dieses Verhalten erklären dürfen. Einmal wäre es denkbar, dass Bakterienarten vorkommen, die ähnlich wie die Hefen auf diesem Substrat sich entwickeln können, oder, und dies scheint mir hier zutreffender, die fraglichen Limonadeproben enthielten Verunreinigungen, die zwar das Aussehen nicht veränderten, für die Bakterien jedoch eine Verbesserung des Nährbodens bedeuteten, die es ihnen ermöglichte, sich so stark zu vermehren. Für die Richtigkeit dieser Ansicht spricht auch das Verhalten der Organismen in den Limonadeproben aus Fabrik D. Die hierin konstatierte intensive Bakterienzunahme war zurückzuführen auf eine Fluoreszensart. Der gleiche Spaltpilz fand sich auch in Proben anderer Herkunft, ohne dabei je so zahlreich aufzutreten wie in dem erwähnten Beispiele. Schon geringe Beimengungen namentlich N-haltiger Körper in die Limonaden dürften für verschiedene Bakterienarten, die gegen Säurewirkung wenig empfindlich sind, genügen, ihnen das Vorkommen möglich zu machen. Eine das Wachstum der Bakterien in den Limonaden ferner fördernde Tätigkeit können, wie ich früher schon bemerkte, auch gewisse Hefearten (*Mycoderma*) bewirken, indem sie den Säuregehalt herabsetzen und vielleicht in Form absterbender Zellen die Nährstoffverhältnisse verbessern. Treffen nun verschiedene dieser Momente (Vorkommen säurezehrender *Mycoderma*-arten und Verunreinigungen) zu, so bieten ohne Zweifel die Limonaden recht günstige Lebensbedingungen auch für gewisse Bakterienarten.

Die aus den Limonaden isolierten Spaltpilze gehören sehr verschiedenen Arten an. Neben beinahe ausschliesslich harmlosen Saprophyten, wie Vertreter der Fluoreszenten, der Milchsäurebakterien, der Heu- und Kar-

toffelbazillen, verschiedener Coccenarten etc., waren nur in 3 Proben wenige Keime von *Bacterium coli*, das in gewissen Abarten für den Menschen nicht unschädlich ist, nachweisbar. Gestützt auf die obigen Ausführungen darf aber dem Auftreten von Bakterien in Limonaden nur dann Wichtigkeit beigemessen werden, wenn es sich um grössere Mengen *lebenskräftiger* Organismen handelt. Solche Fabrikate, die zahlreiche Mikroorganismen beherbergen, lassen stets die Vermutung zu, dass sie Verunreinigungen organischer Natur enthalten.

Zusammenfassend muss demnach die eingangs gestellte Frage, welche Bedeutung dem Vorkommen der in den Limonaden ermittelten Keimarten beizumessen sei, lauten :

1. *Die Organismen der Limonaden sind als harmlose Saprophyten zu betrachten, die für den Konsumenten in hygienischer Beziehung im allgemeinen bedeutungslos sind, dagegen unter Umständen die Güte des Produktes in verschiedenen Graden beeinflussen.*
2. *In normalen Limonaden sind es unter den Keimarten einzige die Hefen, die hinreichende Entwicklungsbedingungen finden, während die Schimmelpilze gezwungen sind, ein latentes Leben zu führen und die Bakterien sehr wahrscheinlich nur in fehlerhaften Produkten sich vermehren können.*
3. *Verschiedene Vertreter der Hefearten sind imstande, das Aussehen und den Geschmack dieses Getränkes nachteilig zu verändern.*
4. *Grössere Keimzahlen (mehrere 100 Keime pro cm³) für Schimmelpilze und Bakterien lassen auf Verunreinigungen schliessen; dabei besteht die Möglichkeit, dass unter den Bakterienarten sich solche vorfinden, die für den Menschen gefährlich sein können.*

Diese Ausführungen zeigen mit aller Deutlichkeit, dass es von grossem Interesse ist, dass bei der Fabrikation erstrebt wird, ein möglichst keimfreies Getränk zu bereiten. Aus den Untersuchungen über die Herkunft der Organismen in Limonaden (Kapitel B) wissen wir, dass als Infektionsquellen in Betracht fallen :

1. das Wasser und
2. die Aufnahmegefässe für die fertigen Limonaden (Flaschen).

Aus dem Auftreten von Hefe- und Schimmelpilzen, die meist schon in grosser Anzahl in den frisch hergestellten Getränken nachweisbar waren, muss in Anbetracht des Umstandes, dass die erwähnten Keimarten äusserst selten in normalem Trinkwasser zu treffen sind, geschlossen werden, dass namentlich Punkt 2 eine grosse Wichtigkeit als Herd für die Infektion der Limonaden mit Organismen beizulegen ist. Wenn damit auch angedeutet wird, dass das Wasser meistens für den Keimreichtum der Limonaden weniger in Betracht fällt, so darf seine Bedeutung doch nicht ganz ausser Acht gelassen werden.

Nach der Vorschrift des schweiz. Lebensmittelbuches soll das zur Herstellung von kohlensauren Getränken zu verwendende Wasser entweder des-

tilliert sein oder den Anforderungen an Trinkwasser entsprechen. Da nun aber nicht jedes Wasser, das als einwandfreies Trinkwasser gelten kann, auch stets keimarm ist, so wäre zu wünschen, dass, wo dies nicht der Fall ist, das Wasser zur Limonadebereitung durch Bakterienfilter keimfrei gemacht würde.

Zweifellos von grösster Wichtigkeit für den Keimgehalt von Limonaden sind nun diejenigen Organismen, die sich in den Aufnahmegeräßen aufhalten und auf diesem Wege in dieses Fabrikat gelangen. Je nachdem die Reinigung dieser Gefäße eine sorgfältigere oder weniger sorgfältige ist, werden sich kleinere oder grössere Mengen von Keimen darin aufhalten und vermehren. Eine ungenügende Reinigung hat aber nicht nur zur Folge, dass der Anfangskeimgehalt der Limonaden ein hoher ist, sondern sie ist es auch, die je nach der Menge und der Art der zurückbleibenden Schmutzpartikelchen den Keimgehalt in hohem Grade auch später beeinflusst. Neben der peinlichen Sorgfalt der Reinigung der Gefäße wäre noch ein weiterer Punkt ins Auge zu fassen. Bei der Verarbeitung kohlensäurehaltiger Flüssigkeiten ist es unvermeidlich, namentlich beim Einfüllen in die Flaschen, dass nicht Tropfen überall hin verspritzt werden. Diese Stellen bilden, da in derartigen Lokalen stets auch genügende Feuchtigkeit vorhanden ist, Brutstätten für sehr verschiedene Organismen. Je nach dem Grade der Möglichkeit einer wirksamen Reinigung der Räumlichkeiten werden sich die Keime zahlreicher oder weniger zahlreich einfinden und auf diese Weise eine grössere oder geringere Infektionsgefahr bei der Limonadebereitung bilden.

Aus den bisherigen Ausführungen geht hervor, dass wir in der biologischen Untersuchung ein Mittel besitzen, das geeignet ist, wertvolle Dienste bei der Beurteilung von Limonaden zu leisten. Um nochmals in Kürze die wichtigen dabei in Betracht zu ziehenden Punkte zusammenzufassen, sei erwähnt, dass in *normalen* Limonaden nur die Hefen zusagende Entwicklungsbedingungen finden. Sind diese schon in frisch bereiteten Fabrikaten in grösseren Mengen, z. B. mehrere Tausend Keime pro cm^3 , nachweisbar, so ist daraus zu schliessen, dass bei der Herstellung die notwendige Reinlichkeit fehlte. In älteren Limonadeproben ist das Auftreten grösserer Hefekeimzahlen, insofern sie nicht Flockenbildung oder Trübungen bewirken, belanglos. Die Schimmelpilze scheinen in den Limonaden nur ein latentes Leben zu führen. Treten sie daher sehr zahlreich darin auf, so muss ein derartiges Verhalten auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Aehnliches gilt auch für die Bakterien. Sie nehmen gewöhnlich bei der Lagerung ab. Finden sich nun zahlreiche lebenskräftige (mehrere Hundert Keime pro cm^3) Spaltpilze in diesen Getränken vor und sind darunter mehrere Arten vertreten, so darf mit grosser Sicherheit auf unerwünschte Beimengungen organischer Natur in den Limonaden geschlossen werden. Auf Grund des Auftretens dieser oder jener Bakterienart sind wir zuweilen in der Lage, über die Art der vorliegenden Verunreinigungen Anhaltspunkte zu erhalten. Denn ähnlich wie die höheren Organismen durch

Bau und Lebensweise vielfach auf bestimmte Standorte beschränkt sind, so sind oft in noch ausgesprochenerer Weise die Mikroorganismen abhängig von den chemischen und physikalischen Verhältnissen ihres Mediums. So deutet das öftere Vorkommen von Vertretern der Milchsäurebakterien, die in gutem Trinkwasser nicht vorzukommen pflegen, in Limonaden darauf hin, dass die betreffenden Flaschen mit Milch oder Hausabfällen in Berührung gekommen waren und nicht sorgfältig genug gereinigt wurden. Das Auftreten von Heu- und Kartoffelbazillen lässt auf pflanzliche und erdige Beimengungen schliessen, während die Colibakterien als Fäkalorganismen angesehen werden. Die Gruppe der Fluoreszenten und auch viele Kokkenarten finden sich nun auch sehr oft in einwandfreiem Trinkwasser. Ihrem Auftreten, wie auch dem der übrigen Bakterienarten, darf daher erst Aufmerksamkeit geschenkt werden, wenn sie zahlreich vorhanden sind. Genaue Angaben darüber, was unter zahlreich oder weniger zahlreich verstanden wird, können vorläufig nicht gemacht werden, weil hiefür die vorliegenden Untersuchungen eine zu wenig umfangreiche Basis liefern.

Kleine Mitteilungen.

Ueber den Keimgehalt einer Probe von fehlerhaftem künstlichem Mineralwasser.

Von Dr. J. THÖNI.

(Mitteilung aus dem Laboratorium des schweiz. Gesundheitsamtes.
Vorstand: Prof. Dr. Schaffer.)

Durch die Freundlichkeit von Herrn Dr. *H. Rufi*, Kantonschemiker in Bern, wurde uns eine Flasche künstliches Mineralwasser, das vom Lebensmittelinspektor beanstandet worden war, für eine bakteriologische Untersuchung überlassen.

Das Ergebnis dieser Untersuchung dürfte allgemein von Interesse sein, umso mehr da es zeigt, wie wichtig es unter Umständen sein kann, bei chemisch wenig veränderten Nahrungs- und Genussmitteln doch eine weitere biologische Untersuchung folgen zu lassen.

Die fragliche Probe Mineralwasser war klar und farblos. Beim Schütteln des Flascheninhaltes konnten jedoch kleinere und grössere braune Flöckchen beobachtet werden. Nach dem Oeffnen der Flasche war ein ausgesprochen muffiger Geruch, der sich jedoch ziemlich rasch verflüchtigte, bemerkbar. Sofort nach dem Oeffnen in den Flaschenhals gehaltenes Bleipapier wurde nach einiger Zeit schwärzlich gefärbt.

Um festzustellen, was für Organismen dieser Flascheninhalt beherberge, wurden damit Aussaaten gemacht mit $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{10}$, $\frac{1}{100}$ und $\frac{1}{1000} \text{ cm}^3$ in Nähr-